

Influência de Ingredientes da Dieta e Protocolos de Sincronização Sobre a Qualidade e Desenvolvimento Embrionário

José Eduardo P. Santos
Veterinary Medicine Teaching and Research Center,
School of Veterinary Medicine, UC - Davis,
18830 Road 112, Tulare, CA - 93274

INTRODUÇÃO

Após a inseminação artificial (IA), são duas as causas de falha na prenhez de bovinos, a não fertilização do ovócito ou a falta de sobrevivência a termo de um ovócito fertilizado. Estudos na década de 70 indicaram que a taxa de fertilização em bovinos é relativamente alta, ao redor de 95% (Ayalon, 1978), o que sugeria que o maior fator a contribuir com a infertilidade de bovinos em programas de IA é a mortalidade embrionária e fetal (Zavy, 1994). No entanto, em estudos mais recentes com vacas de leite secas e em lactação foi observado que as taxas de fertilização são variáveis e influenciadas por vários fatores, dentre eles o estresse calórico, dieta, programa de inseminação e momento da IA. De fato, a taxa de fertilização média de uma série de experimentos em vacas de leite não superovuladas se mostrou mais baixa que inicialmente esperada, ao redor de 78,1% (Santos et al., 2004).

Além da fertilização, a qualidade do embrião também é fator fundamental para o sucesso do programa reprodutivo de um rebanho. Em vacas de leite em lactação, a qualidade embrionária é inferior que a de vacas secas ou novilhas (Sartori et al., 2002). É possível que parte da redução na qualidade embrionária esteja relacionada a fatores endócrinos e metabólicos que afetem a qualidade do ovócito em desenvolvimento, resultando assim em um embrião de menor viabilidade. Na maioria dos casos, apenas 58% das vacas inseminadas apresentam um embrião viável no dia 5 a 7 após a IA (Santos et al., 2004). Melhoras na taxa de fertilização, mas principalmente na qualidade embrionária devem refletir em melhora nas taxas de concepção e sobrevivência embrioinária em vacas de leite.

FERTILIZAÇÃO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA EM VACAS EM LACTAÇÃO

Há uma distinção marcante entre a qualidade embrionária de vacas em lactação e de vacas não lactantes ou novilhas em crescimento. Em dois experimentos, Sartori et al. (2002) avaliou a taxa de fertilização e qualidade embrionária em vacas de leite em lactação comparadas com vacas seca ou novilhas em crescimento. Quando submetidas a estresse calórico, a taxa de fertilização foi reduzida em vacas de leite em lactação comparadas com novilhas em crescimento (Tabela 1). Da mesma forma, a qualidade dos embriões foi muito inferior para as vacas em lactação que as novilhas em crescimento.

Tabela 1. Taxa de fertilização e qualidade embrionária em vacas em lactação e novilhas em crescimento durante o verão (Sartori et al., 2002).

Item	Animal		P <
	Novilhas	Vacas	
Taxa de recuperação, %	39,5	30,9	NS
Taxa de fertilização, %	100	55,3	0,05
Qualidade embrionária (1 = excelente; 5 = degenerado)	2,2	3,8	0,05
Número de blastômeros/embrião	36,8	19,3	0,05
Embriões de excelente e boa qualidade, %	71,9	33,3	0,05
Número de espermatozóides acessórios/embrião	22,4	37,3	0,05

Da mesma forma, quando a qualidade embrionária foi avaliada em vacas lactantes ou secas, as vacas em lactação tiveram menor qualidade embrionária e menor proporção dos embriões classificados como de excelente ou boa qualidade.

Tabela 2. Taxa de fertilização e qualidade embrionária em vacas em lactação e secas quando não expostas ao estresse calórico (Sartori et al., 2002).

Item	Vaca		P <
	Secas	Lactação	
Taxa de recuperação, %	55,9	60,3	NS
Taxa de fertilização, %	89,5	87,8	NS
Qualidade embrionária (1 = excelente; 5 = degenerado)	2,2	3,1	0,06
Número de blastômeros/embrião	30,6	27,2	NS
Embriões de excelente e boa qualidade, %	82,3	52,8	0,05
Número de espermatozóides acessórios/embrião	36,5	42,0	NS

Efeito De Ingredientes Da Dieta Sobre A Taxa De Fertilização E Qualidade Embrionária Em Vacas Não Superovuladas

A literatura abrangendo os efeitos da nutrição sobre a qualidade de ovócitos é bastante escassa e poucos estudos reportaram efeitos detalhados de fatores nutricionais nas características de ovócitos. McEvoy et al (1995) observou que a restrição alimentar aumentou a quantidade de ovócitos coletados de ovelhas considerados viáveis. Em bovinos, a restrição alimentar prévia ao abate dos animais e coleta dos ovários aumentou o desenvolvimento *in vitro* de ovócitos colhidos de folículos pequenos (McEvoy et al., 1997).

Estudos conduzidos na Irlanda com novilhas observaram que o fornecimento de dietas com alta energia à vontade reduziu a qualidade e o desenvolvimento *in vitro* de ovócitos (Nolan et al., 1998a; Nolan et al., 1998b; Yaakub et al., 1999). Nolan et al. (1998a) forneceram uma dieta considerada de baixo valor nutricional (1 kg/d de concentrado e 3 kg/d de feno) ou uma dieta considerada de alto valor nutricional (7 kg/d de concentrado e feno à vontade). Ovócitos foram coletados via transvaginal por aspiração durante várias semanas. Foi observado que o fornecimento da dieta de alto valor nutricional aumentou o número de folículos aspirados por coleta, mas reduziu as porcentagens de ovócitos apresentando divisão (estágio de 2 células) e de blastocistos obtidos pelo cultivo de ovócitos (Tabela 5).

Dados preliminares de Lozano et al. (2000) demonstraram que quando vacas de leite receberam diferentes quantidades de concentrado (3,5 kg/d vs 6,5 kg/d) o número de ovócitos coletados via aspiração transvaginal e a porcentagem de ovócitos que progrediram para o estágio de duas células não foi diferente. No entanto, quando esses ovócitos foram fertilizados *in vitro*, a porcentagem que progrediu para o estágio de duas células foi maior para o grupo alimentado com quantidade reduzida de concentrados. Um dos problemas com os dados obtidos pelo grupo de pesquisadores da Irlanda é a falta de uma descrição mais detalhada do consumo total de nutrientes pelos animais experimentais. Todos esses experimentos não oferecem valores de consumo total de energia metabolizável e de proteína. Além disso, as alterações feitas nas dietas não só alteraram o consumo total de matéria seca, mas também alterou a composição nutricional da ração fornecida, o que dificulta a interpretação dos dados. Vale também salientar que, na maioria dos estudos, o animal utilizado foi novilha ou ovelha e não vaca em lactação. Vacas em lactação submetidas à restrição alimentar sofreriam de balanço negativo de nutrientes, o que é sabido afetar o seu desempenho reprodutivo.

Kendrick et al. (1999) observaram que o balanço de energia líquida no início da lactação pode afetar a qualidade de ovócitos coletados por aspiração transvaginal. Vacas em lactação recebendo uma dieta com menor concentração energética e em maior balanço negativo de energia produziram menos ovócitos considerados de boa qualidade. Apesar desses dados não esclarecerem completamente como a nutrição afeta os ovócitos, está claro que o consumo de energia pode influenciar a qualidade dos ovócitos em novilhas em crescimento e em vacas lactantes.

Tabela 3. Efeito do tipo de dieta sobre o número de folículos e a taxa de formação de blastocistos *in vitro*.

Item	Dieta		P <
	Baixa	Alta	
Novilhas, n	16	16	
Número de coletas	72	72	
Número de folículos aspirados por coleta	6,4	7,5	0,05
Número de ovócitos recuperados por coleta	2,2	2,3	NS
% ovócitos apresentando divisão	73,0	61,8	0,05
% blastocistos obtidos por ovócito cultivado	24,1	12,7	0,01

Adaptado de Nolan et al. (1998a)

ÁCIDOS GRAXOS

A adição de gordura a dieta de vacas em lactação tem, geralmente, efeito positivo sobre o desempenho reprodutivo. Parte desse efeito pode ser atribuída a um aumento na densidade energética da dieta, mas mesmo quando o consumo de energia não é alterado, alterações metabólicas e endócrinas são observadas, o que sugere que os ácidos graxos possam também ser os mediadores desse benefício. De fato, um dos achados mais consistentes com a suplementação com gordura é o aumento nas concentrações sanguíneas de progesterona, independente do consumo de energia.

Devido aos efeitos distintos de fontes de ácidos graxos no metabolismo uterino e taxa de concepção de vacas em lactação, nós avaliamos o efeito da fonte de ácido graxo na forma de sabão de Ca na taxa de fertilização e qualidade embrionária de vacas de leite em início de lactação (Cerri et al., 2004). Vacas holandesas ($n = 154$) foram alocadas em uma das duas dietas que diferiam apenas na fonte de ácidos graxos: uma rica em ácidos graxos saturados e monossaturados proveniente de óleo de palma (OP) e a outra rica em ácido linolêico e uma mescla de ácidos graxos monoinsaturados com 18 C na configuração trans (ALT). As dietas foram fornecidas dos 25 dias antes do parto aos primeiros 70 dias de lactação. Após a sincronização da ovulação com o programa Ovsynch, as vacas foram inseminadas e os úteros lavados 5 dias após a IA. Um total de 161 ovulações foram observadas, sendo que 14 (18,7%) das vacas no grupo OP e 12 (15,2%) no grupo ALT, tiveram dupla ovulação na IA. O número de estruturas coletadas foi de 45 e 41 para o OP e ALT, respectivamente, e a taxa de recuperação (número de estruturas/número de corpos lúteos) foi similar para ambos os tratamentos (53,4%). O número de espermatozoides acessórios na zona pelúcida foi superior ($P < 0.001$) para o grupo ALT que OP (34.3 vs 21.5), o que pode explicar a maior ($P = 0.10$) taxa de fertilização para as vacas que receberam ALT (87,2 %) que para as vacas que receberam OP (73,3%). As vacas que receberam ALT também tiveram embriões de melhor qualidade já que uma maior proporção ($P = 0.06$) deles foi classificada com excelente ou boa (73.5% para ALT vs 51.5% para OP). Além disso, o número total de blastômeros/embrião foi superior ($P = 0.13$) para as vacas na dieta suplementada com ALT que OP (19.4 vs 14.0) e a proporção de blastômeros vivos também foi maior para ALT que OP (94.2 vs 85.3%; $P = 0.09$). Estes resultados indicam que a manipulação na fonte suplementar de gordura oferecida para as vacas no final da gestação e início de lactação influencia a taxa de fertilização e qualidade embrionária. É provável que esses efeitos positivos tenham sido mediados por uma melhora na qualidade dos ovócitos dessas vacas.

NUTRIÇÃO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA EM VACAS SUPEROVULADAS

Alguns pesquisadores têm sugerido que reduções drásticas no consumo de alimento por período limitado de tempo podem melhorar a qualidade embrionária, apesar de poder reduzir a resposta superovulatória. Mantovani et al. (1993) observou que o consumo à vontade de concentrados reduziu significativamente a produção de embriões considerados transferíveis após tratamento superovulatório em novilhas. Yaakub et al. (1999b) alocou 76 novilhas em quatro tratamentos utilizando um delineamento fatorial de 2x2. Os tratamentos consistiram de dois concentrados (um à base de cevada e outro à base de polpa cítrica e de beterraba) com consumo restrito ou à vontade. As novilhas alimentadas com concentrado restrito (3 kg/d) receberam silagem de gramínea à vontade. Já as novilhas recebendo concentrado à vontade, receberam apenas 1 kg (matéria seca) da mesma silagem de gramínea. As novilhas foram superovuladas com tratamentos com FSH e os embriões coletados após o abate das novilhas entre os dias 6 e 8 após a inseminação. As novilhas recebendo quantidade restrita de concentrado produziram mais embriões e estes eram de melhor qualidade (Tabela 6).

Tabela 4. Efeito da quantidade de concentrado consumido sobre a resposta superovulatória e a qualidade embrionária em novilhas de corte.

Item	Concentrado		P <
	3,0 kg/d	À vontade	
Novilhas, n	38	38	
Corpos lúteos	15,5	12,3	0,06
Estruturas recuperados	9,5	6,5	0,05
Embriões grau 1 e 2	2,7	1,0	0,001
Embriões grau 3	2,1	1,8	NS
Embriões transferíveis	4,8	2,8	0,001
Ovócitos não fertilizados	1,2	0,9	NS

Adaptado de Yaakub et al. (1999b)

Nesse mesmo experimento (Yaakub et al., 1999b), o tipo de concentrado também afetou a qualidade embrionária (Tabela 7). Esses dados demonstram que a quantidade e fonte de carboidratos na dieta de novilhas doadoras de embriões afetam a resposta superovulatória e qualidade embrionária. É possível que o efeito deletério do alto consumo de concentrado na produção embrionária esteja relacionada à alterações nos perfis de progesterona. No entanto, nenhuma explicação plausível foi atribuída ao decréscimo na qualidade embrionária em novilhas recebendo concentrado com cevada comparada com aquelas recebendo concentrado à base de polpa cítrica e de beterraba. Uma diferença marcante entre essas duas fontes de carboidratos é que a cevada é rica em amido e as polpas de citrus e de beterraba contém alta pectina e mais alta fibra em detergente neutro. Essas diferentes fontes de carboidratos apresentam diferentes padrões de fermentação ruminal, sendo que a fermentação do amido resulta em altas concentrações de propionato e a fermentação de pectina e fibra em detergente neutro resulta em altas concentrações de acetato no líquido ruminal. Esses ácidos graxos voláteis proporcionam diferentes efeitos sobre o metabolismo energético animal e sobre a secreção de insulina. No entanto, é também possível que a dieta com cevada tenha causado problemas ruminais já que parte desses animais receberam esse concentrado à vontade e com apenas 1 kg de feno de gramínea. Dietas como essas podem resultar em acidose ruminal, a qual poderia afetar a qualidade embrionária.

Tabela 5. Efeito do tipo de concentrado consumido sobre a resposta superovulatória e a qualidade embrionária em novilhas de corte.

Item	Concentrado		P <
	Cevada	Polpa cítrica e de beterraba	
Novilhas, n	39	37	
Corpos lúteos	13,4	14,4	NS
Estruturas recuperados	7,9	8,1	NS
Embriões grau 1 e 2	1,3	2,40	0,05
Embriões grau 3	1,5	2,3	NS
Embriões transferíveis	2,9	4,8	0,05
Ovócitos não fertilizados	1,4	0,7	NS

Adaptado de Yaakub et al. (1999b)

Além de fontes de carboidratos e da disponibilidade de alimento, estudos têm sido conduzidos para avaliar o efeito da adição de gordura, de fontes de gordura, e de diferentes fontes protéicas na dieta sobre a resposta superovulatória e a qualidade embrionária.

Foi observado que vacas consumindo dietas suplementadas com gordura possuem um maior número de folículos de tamanho médio (3 a 10 mm). Portanto, seria esperado que o fornecimento de gordura à dieta de novilhas submetidas à superovulação beneficiaria a resposta superovulatória já que um maior número de folículos seria recrutado. Em estudo conduzido por Ryan et al. (1992) a suplementação da dieta de vacas de corte com gordura polinsaturada não afetou a taxa de fertilização e a recuperação embrionária após o tratamento superovulatório. Thomas e Williams (1996) observaram que o fornecimento de dietas isocalóricas, mas com diferentes fontes de energia (controle sem gordura, gordura animal e óleo de soja) tiveram apenas um pequeno efeito sobre o número de folículos de tamanho médio, mas não afetaram o número de corpos lúteos ou a concentração de progesterona sérica. Em ovinos, a adição de 3 ou 6% de óleo de peixe à dieta de ovelhas submetidas a superovulação resultou num aumento na concentração plasmática de estradiol no momento da inseminação, a qual foi associada com um aumento no número de folículos com mais de 8 mm, mas retardou o desenvolvimento embrionário mensurado através da contagem de células (núcleos) nos blastocistos coletados. Não se sabe o porquê da redução no desenvolvimento embrionário quando óleo de peixe foi adicionado à dieta, mas é possível que os ácidos graxos polinsaturados presentes nesse tipo de fonte de gordura inibam a proliferação celular, afetando a transcrição genética e a síntese protéica. Esses dados demonstram que o fornecimento de gordura na dieta de animais doadores de embriões parece não afetar a resposta superovulatória ou a qualidade embrionária.

Muito tem se discutido sobre os efeitos da quantidade e tipo de proteínas oferecidas nas dietas de vacas de leite sobre a taxa de concepção e a viabilidade embrionária. Vários estudos mencionados por Butler (1998) estabeleceram uma relação entre a concentração plasmática de nitrogênio uréico e taxas de concepção em vacas de leite de alta produção. De acordo com esses dados, vacas com nitrogênio uréico acima de 19 mg/dl apresentam taxas de concepção mais baixas do que aquelas com mais baixo nitrogênio uréico sanguíneo. Foi sugerido que o efeito negativo do excesso de proteína bruta ou de proteína degradável no rúmen na dieta poderia afetar a reprodução de fêmeas bovinas através de um aumento nas concentrações sanguíneas de nitrogênio uréico. Novilhas alimentadas com dietas com excesso de proteína degradável no rúmen apresentaram níveis mais altos de nitrogênio uréico

plasmático e uma redução na taxa de concepção. O decréscimo na taxa de concepção foi atribuído às alterações endometriais, já que o pH uterino foi reduzido no dia 7 após a inseminação.

Blanchard et al. (1990) estudaram os efeitos da degradabilidade da proteína na dieta de vacas de leite sobre a resposta superovulatória e qualidade embrionária. Eles observaram que aumentando a quantidade de proteína degradável no rúmen de 64 para 73% da proteína bruta da dieta (PB = 16%), reduziu a porcentagem de ovócitos fertilizados e a porcentagem de embriões transferíveis. Outro estudo similar, mas utilizando vacas não lactantes e com quantidade extremas de proteína bruta e degradável no rúmen (Garcia-Bojalil et al., 1994) não observou efeitos deletérios da proteína sobre a viabilidade embrionária (Tabela 8)

Tabela 6. Efeito da proteína bruta (PB) e degradável no rúmen (PDR) sobre a qualidade embrionária em vacas superovuladas.

PB (PDR), %	Vacas	Embriões transf.	Embriões não transf.	Estruturas não fertilizadas	Embriões transf. %	DAPI ¹ negativo %	Referência
12,3 (59,7)	22	4,0	1,6	1,8	49,7	53,1 ^b	Garcia-Bojalil et al., 1994
27,4 (70,7)	22	4,9	2,0	1,8	54,0	66,7 ^a	
16,0 (73,0)	19	4,5	4,0	3,1	44,2 ^b	ND ²	Blanchard et al., 1990
16,1 (64,0)	19	5,5	3,3	2,3	66,9 ^a	ND	

a, b Médias são diferentes (P < 0,10)

¹ Coloração vital de 4,6-diamidino-2-fenilindole; ² Não disponível

Como o excesso de proteína na dieta de ruminantes também pode ser interpretado como uma falta de energia fermentescível no rúmen, talvez mais importante que a concentração de proteína bruta ou proteína degradável no rúmen na dieta é a relação entre as quantidades de proteína e energia consumidas pelo animal.

GOSSIPOL

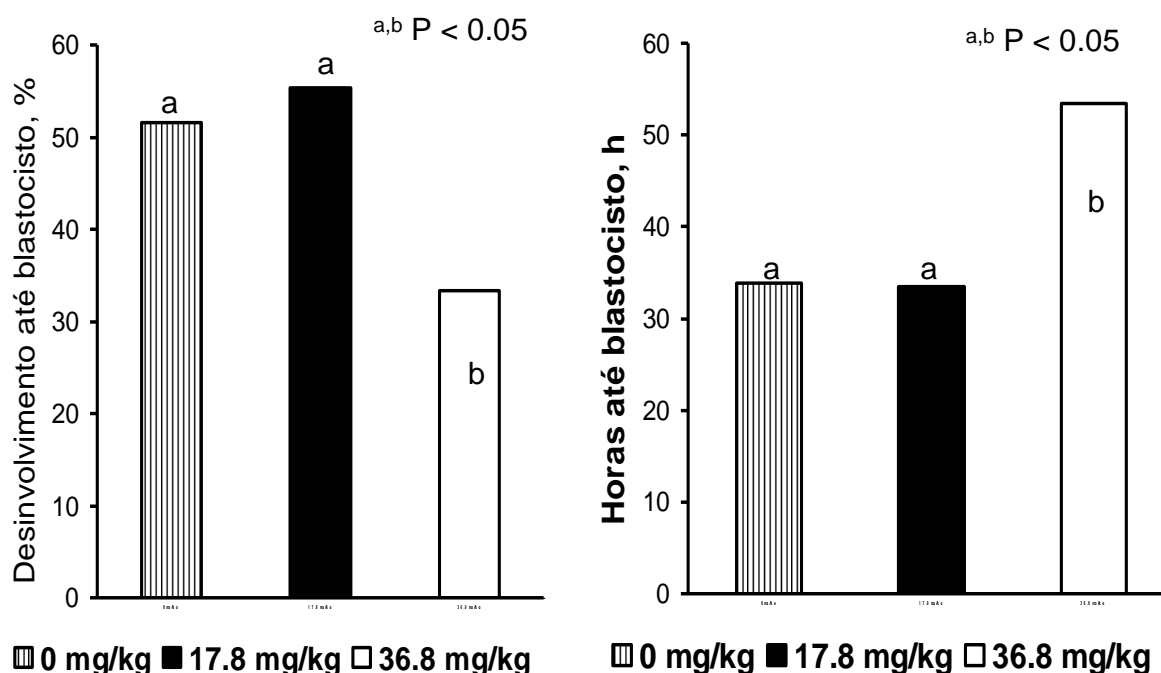
Dois experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito da ingestão de gossipol e da concentração plasmática de gossipol sobre a qualidade embrionária (Coscioni et al., 2003b, Villaseñor et al., 2003). Em ambos os experimentos, novilhas foram alimentadas com dietas sem gossipol, com um nível intermediário de gossipol e um nível alto de gossipol livre na dieta. A adição de gossipol a dieta aumentou a concentração de gossipol plasmático nas novilhas em ambos experimentos.

No primeiro estudo (Coscioni et al., 2003b), 75 novilhas foram alimentadas com 0, 20 ou 40 mg de gossipol livre/kg de peso vivo (controle, médio e alto gossipol, respectivamente) por 60 dias antes da superovulação e coleta de embrião. O número de estruturas coletadas foi similar para os três grupos e foram, respectivamente, 9,4, 8,4 e 8,8 ($P=0.88$). O número de estruturas consideradas excelentes e boas foi similar para os três tratamentos ($P = 0,87$) e foram 3,5, 3,6 e 3,3 para o controle, médio e alto gossipol, respectivamente. No entanto, novilhas recebendo a dieta com alto gossipol tiveram um maior número (5,8) de embriões de grau 3 e degenerados ($P < 0,01$) que as novilhas nos grupos controle (3,6) e médio (3,2). O alto consumo de gossipol retardou o desenvolvimento embriônico no dia 7 e mais embriões foram classificados como mórulas no grupo alto que no controle e médio ($P < 0,02$).

Quando embriões foram coletados no dia 5 após a IA (Villasenor et al., 2003), o número de células para o controle, médio e alto diferiu (22,1, 24,2 e 17,0) e foi menor para o grupo recebendo a alta concentração de gossipol na dieta ($P < 0,01$). Quando embriões foram cultivados *in vitro*, o desenvolvimento foi retardado quando provenientes de novilhas que receberam a alta concentração de gossipol na dieta (Figura 1).

Portanto, o consumo de mais de 36,0 mg de gossipol livre/kg de peso vivo resulta em redução na qualidade e desenvolvimento embrionário *in vivo* e *in vitro*.

Figura 1. Desenvolvimento in vitro de embriões coletados no dia 5 após a IA de novilhas alimentadas com vários níveis de gossipol



EFEITOS DA SOMATOTROFINA BOVINA (bST) SOBRE A RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E A DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Quando o uso do bST para vacas em lactação foi aprovado nos EUA, uma das principais preocupações foi o seu impacto sobre a eficiência reprodutiva nesses animais. Com o aumento na produção de leite proporcionado pelo uso desse hormônio de 4 a 5 kg de leite/d, foi inúmeras vezes sugerido que o desempenho reprodutivo desses animais seria comprometido devido ao aumento nas demandas energéticas.

Entretanto, mais recentemente, novas pesquisas têm demonstrado que o uso do bST pode, ao contrário do que se pensava, melhorar a eficiência reprodutiva de vacas em lactação e melhorar a resposta superovulatória de doadoras em programas de transferência de embriões.

Vários estudos têm demonstrado que os efeitos do bST sobre as funções reprodutivas não estão limitados ao *status* energético do animal. Hoje, é sabido que o bST e IGF-I atuam diretamente nos tecidos reprodutivos de bovinos (Lucy, 2000). Técnicas imuno-histoquímicas de tecidos reprodutivos têm demonstrado a presença de

receptores para bST e IGF-I no corpo lúteo e folículos do ovário bovino (Lucy, 2000). Portanto, é possível que os impactos do bST sobre a reprodução bovina seja mediado pelas alterações no balanço de energia, assim como pela atuação do próprio hormônio e do IGF-I nos tecidos reprodutivos.

A utilização de bST em vacas cuja ovulação foi sincronizada com o protocolo Ovsynch (d 0, GnRH; d 7, PGF_{2α}; d 9 GnRH) aumentou a taxa de concepção em dois estudos da Universidade da Flórida (Moreira et al., 2000a; Moreira et al., 2000b). Nesses estudos, foi demonstrado que o efeito do bST sobre a fertilidade provavelmente ocorre após a fertilização (Moreira et al., 2000b).

A resposta ovulatória durante o processo de superovulação com FSH é geralmente potencializada pelo uso de bST (Gong et al., 1996). Em três experimentos, Gong et al. (1996) observou que novilhas tratadas com bST apresentaram uma maior resposta superovulatória, um maior número de embriões, um maior de embriões transferíveis, e uma maior porcentagem de embriões transferíveis (Tabela 9)

Tabela 7. Efeito da somatotrofina bovina na resposta superovulatória em novilhas

Tratamento	Taxa de Ovulação	Nº de Embriões	Nº de Embriões Transferíveis	Embriões Transferíveis, %
Experimento I				
Controle	11.4 ^a	6.0 ^a	5.0 ^a	83.3
bST	18.9 ^b	11.8 ^b	10.8 ^b	91.5
Experimento II				
Controle	10.3 ^a	3.2 ^c	1.5 ^a	46.9 ^a
bST	18.4 ^b	5.8 ^d	5.7 ^b	98.3 ^b
Experimento III				
Controle	---	3.7 ^c	2.6 ^a	70.3 ^a
bST	---	7.2 ^d	6.3 ^b	87.5 ^b

Adaptado de Gong et al. (1996).

a vs b: $P < 0.05$; c vs d: $P < 0.10$.

Moreira et al. (2000c) estudaram os efeitos do bST sobre a resposta superovulatória e o desenvolvimento embrionário em vacas lactantes e secas

submetidas a várias superovulações. Tratamento com bST não aumentou o número de embriões recuperados, mas vacas secas produziram melhores respostas superovulatórias do que as lactantes. Entretanto, vacas tratadas com bST tiveram um menor número de estruturas não fertilizadas e uma maior taxa de embriões transferíveis. Além disso, vacas tratadas com bST produziram embriões com grau mais avançado de desenvolvimento (Tabela 10)

Tabela 8. Efeito da somatotrofina bovina na resposta superovulatória e no desenvolvimento embrionário em vacas secas e lactantes.

Item	Controle	bST	P <
Número de estruturas por coleta	9,4	9,3	NS
Ovócitos não fertilizados	3,7	1,0	0,04
Embriões transferíveis, %	56,4	77,2	0,01
Estágio de desenvolvimento			
Mórula	1,7	1,5	0,81
Blastocisto inicial	2,9	3,0	0,95
Blastocisto	0,4	2,4	0,04
Blastocisto expandido	0,4	0,5	0,88

Adaptado de Moreira et al. (2000c)

É provável que o aumento na resposta superovulatória observada por Gong et al. (1996) seja devido ao aumento na concentração de IGF-I causada pelo tratamento com bST. Esse fator de crescimento potencializa a ação das gonadotrofinas (Lucy, 2000), o que aumentaria o recrutamento folicular causado pelo tratamento com FSH. A melhora na qualidade e o avanço no desenvolvimento embrionário pode ter sido causado tanto pelo bST quanto pela IGF-I, através de ações diretas destes hormônios no embrião ou na secreção de progesterona pelo corpo lúteo.

PROGRAMAS DE SINCRONIZAÇÃO

O uso de programas de sincronização de cio e ovulação pode afetar a qualidade embrionária de acordo com o tipo de manipulação folicular e a qualidade do ovócito que é fecundado. Métodos de sincronização de cio e ovulação, assim como o momento da IA afetam a taxa de fertilização e a qualidade embrionária.

MOMENTO DA IA

O momento da IA em relação ao início do cio afeta a taxa de fertilização e a qualidade embrionária. A partir do início do cio, a taxa de fertilização aumentou conforme a IA foi atrasada para 24 após os primeiros sinais de cio (Figura 2; Sacke et al., 2000). Por outro lado, prolongando o intervalo entre o início do cio e a IA resultou em embriões de qualidade inferior.

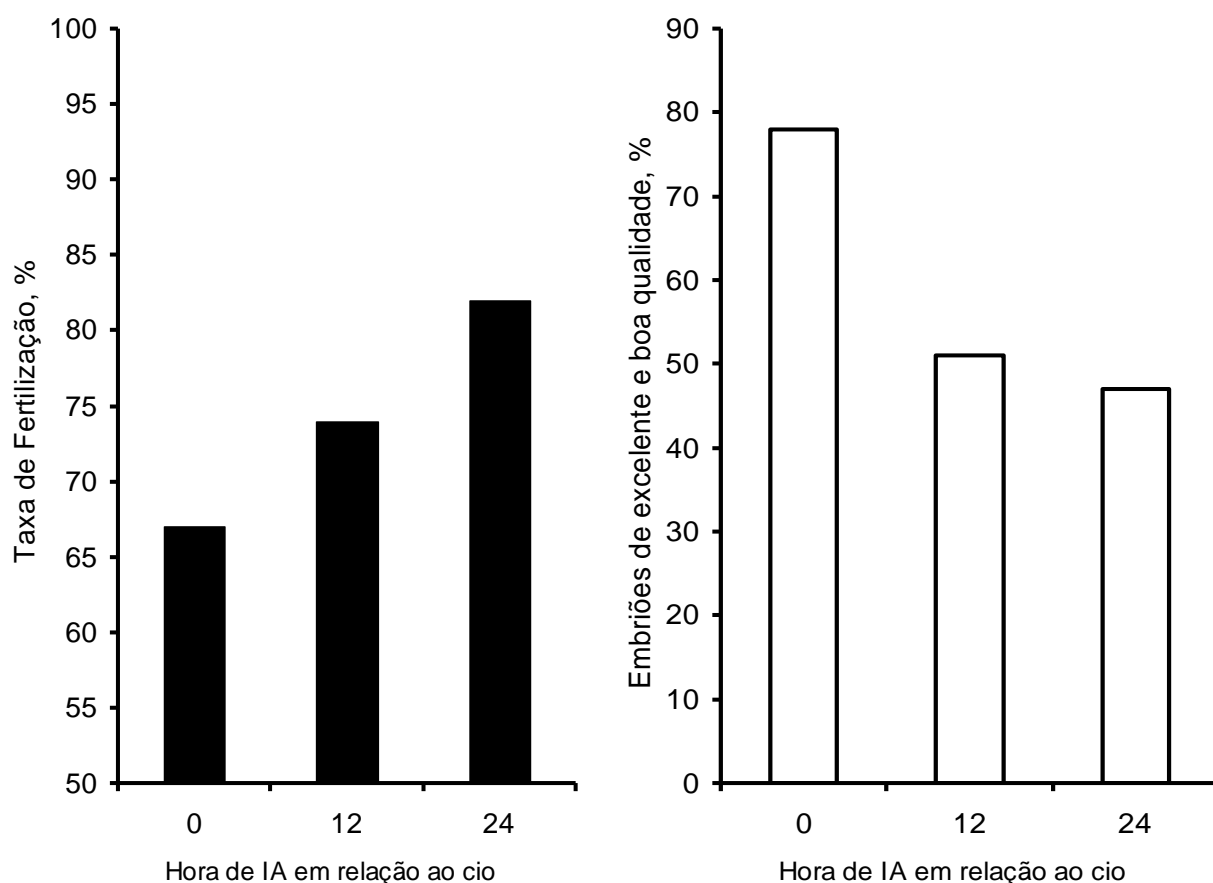


Figura 2. Efeito do momento da IA em relação ao início do cio sobre a taxa de fertilização e qualidade embrionária em vacas secas (Sacke et al., 2000)

Com base nesses dados, Sacke et al. (2000) propôs um modelo para explicar as alterações na taxa de concepção de bovinos de acordo com o momento da IA em relação ao início dos sinais de cio (Figura 3). De acordo com o modelo proposto, a

maior taxa de concepção deve ser esperada quando a vaca é inseminada entre 6 e 12 horas após o início do cio. O grande problema é determinar quando a vaca irá demonstrar seus primeiros sinais de cio sem um sistema constante de vigilância da atividade da vaca. Por isso, em rebanhos que observam cio e inseminam 2 vezes ao dia, a regra de inseminar vacas no período subsequente da observação (observada pela manhã e inseminada pela tarde) funciona relativamente bem. Por outro lado, em rebanhos que observam cio apenas uma única vez ao dia, a vaca deve ser inseminada assim que observada em cio.

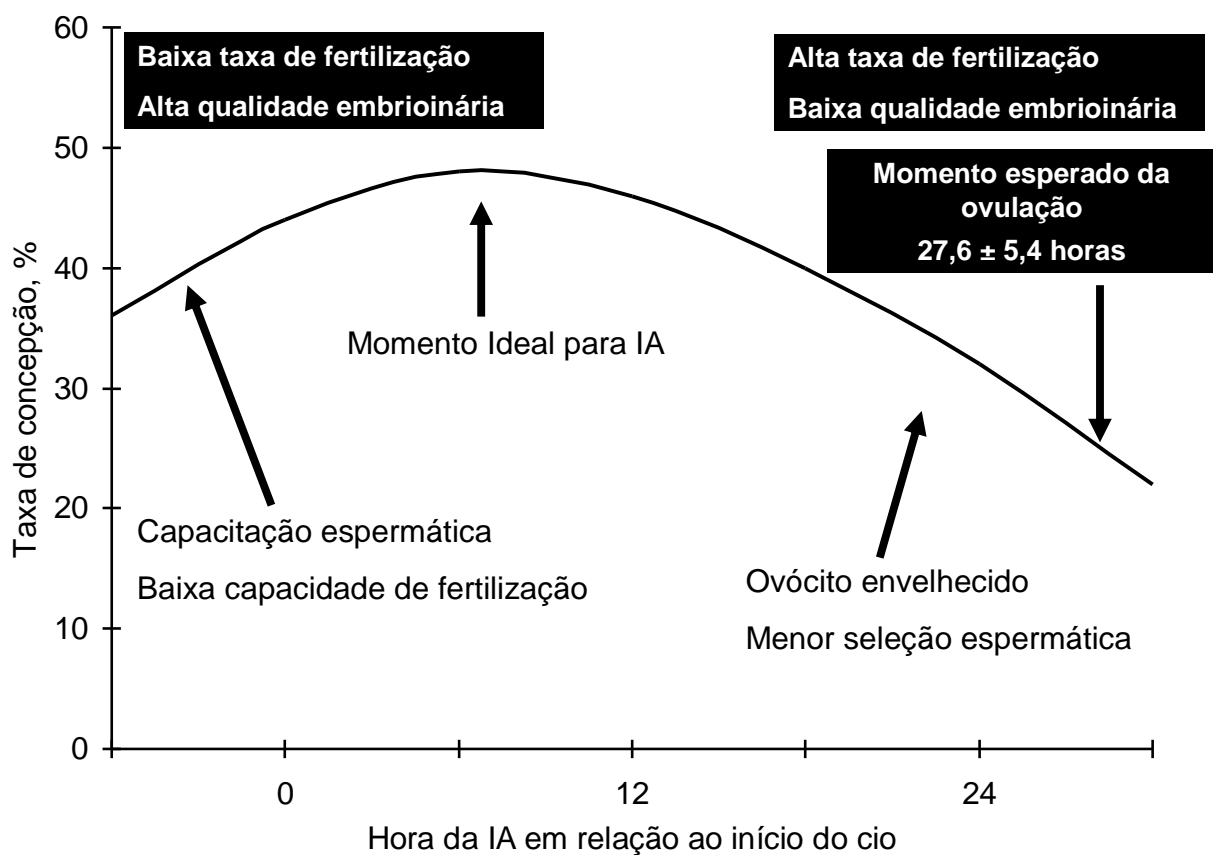


Figura 3. Modelo proposto por Sacke et al. (2000) para descrever o efeito do momento da IA em relação ao início do cio sobre a taxa de concepção em bovinos.

DURAÇÃO DO PERÍODO DE DOMINÂNCIA FOLICULAR

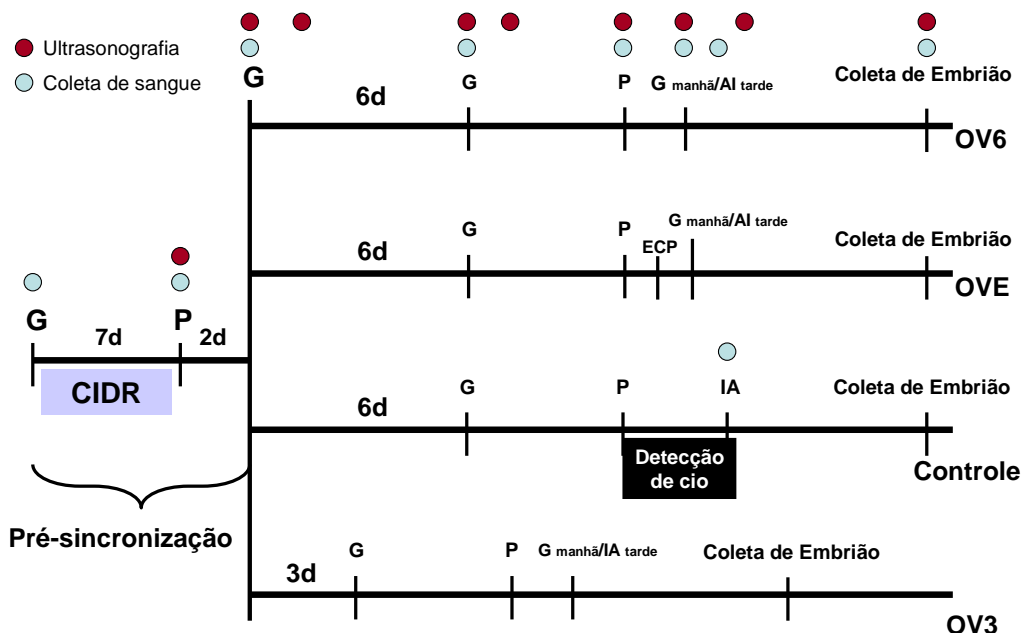
O aumento no período de dominância folicular resulta em redução na taxa de concepção em vacas de leite. Vacas com baixas concentrações de progesterona no sangue têm aumento no período de dominância folicular ocasionado pelo aumento na pulsatilidade de LH. Esse aumento no LH é capaz de ativar o ovócito e iniciar prematuramente o processo de meiose, sem conseguir causar ovulação (Revah and Butler, 1996; Mihm et al., 1999). Quando o ovócito é fertilizado, o embrião acaba não sobrevivendo e morre antes do estágio de 16 células (Ahmad et al., 1995). Em vacas de corte, folículos pré-ovulatórios grandes que se mantiveram dominantes por um período prolongado de tempo ante do pico de LH reduziram a taxa de concepção quando comparados com a ovulação de folículos menores com menor tempo de dominância (36 vs 91%; Breuel et al., 1993). Da mesma forma, vacas com 3 ondas de crescimento folicular, o que resulta em menor período de dominância folicular, tem melhor taxa de concepção que vacas com 2 ondas de crescimento folicular (Townson et al., 2002). Portanto, programas de manipulação hormonal para sincronização de cio e ovulação devem assegurar que o folículo tenha capacidade ovulatória e curto período de dominância.

PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DE CIO E OVULAÇÃO

Foi avaliado o efeito do protocolo de sincronização ou por indução de estro e IA após detecção de cio ou sincronização de ovulação e IA em tempo fixo (Figura 4; Cerri et al. 2005). Foi criado 4 tratamentos, três com IA em tempo fixo (OV3, OV6 e OVE) e um com IA após detecção de cio (Controle).

Figura 4. Diagrama do estudo (Cerri et al., 2005).

ECP = cipionato de estradiol; G = GnRH; P = prostaglandina



Após pré-sincronizar o ciclo estral, as vacas foram submetidas à sincronização de cio iniciando no dia 6 do ciclo estral com uma injeção de GnRH para ovular o folículo dominante e iniciar uma nova onda de crescimento folicular, seguida 7 dias mais tarde por uma de PGF_{2α} para regredir o corpo lúteo e induzir o cio. As vacas no grupo controle foram observadas por sinais de cio uma vez ao dia e inseminadas logo em seguida. Nos grupos de sincronização de ovulação, o protocolo Ovsynch foi utilizado iniciando no dia 3 do ciclo estral (OV3) ou no dia 6 (OV6 e OVE), mas o OVE também recebeu uma injeção de 0,5 mg de cipionato de estradiol para aumentar a concentração de estradiol no sangue das vacas. O mesmo inseminador inseminou todas as vacas com sêmen de um único touro e o útero das vacas foi lavado para a coleta de estruturas 6 dias após a IA.

A taxa de ovulação ao GnRH foi menor ($P < 0,001$) para vacas que o receberam no dia 3 (OV3 = 7,1%) que no dia 6 do ciclo estral (Controle = 79,2%, OV6 = 87,3%, e OVE = 85,2%) por causa de um folículo dominante de menor diâmetro (9,5 vs 14,2 vs 15,4 vs 15,0 mm; $P < 0,001$). Uma nova onda de crescimento folicular foi recrutada após a injeção de GnRH em 7,1% das vacas do OV3, o que foi muito inferior ($P < 0,001$) ao Controle (81,2%), OV6 (88,6%) e OVE (88,9%). Com isso, o diâmetro do folículo ovulatório diferiu ($P < 0,001$) entre os tratamentos e teve em média 20,7, 19,7, 18,1 e 19,7 mm para os grupos OV3, Controle, OV6 e OVE, respectivamente. A taxa de sincronização (luteólise e ovulação) na IA foi maior para as vacas observadas em cio no grupo Controle (96,9%) que nos grupos sujeitos a IA em tempo fixo (84,1%). A

fertilização foi similar entre os tratamentos e foi de 86,3%. No entanto, embriões do grupo OV3 foram de qualidade inferior e com menor número de blastômeros que os demais tratamentos. Os tratamentos OV3 e Controle também resultaram em menor proporção de blastômeros vivos que os tratamentos OV6 e OVE. Os dados deste experimento indicam claramente que a extensão do período de dominância folicular, quando não houve ovulação ao primeiro GnRH do protocolo Ovsynch (OV3), reduz a qualidade embrionária. Além disso, a taxa de fertilização ou qualidade embrionária não diferiu entre as vacas inseminadas em tempo fixo ou após serem detectadas em cio. Isto indica que quando programas de sincronização de ovulação são propriamente implementados a fertilização e qualidade embrionária são similares às aquelas observadas em vacas inseminadas após indução de cio.

Referências Bibliográficas

- Ahmad, N., Schrick, F.N., Butcher, R.L., Inskeep, E.K., 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52, 1129-1135.
- Ayalon, N., 1978. A review of embryonic mortality in cattle. *J. Reprod. Fertil.* 54, 483-493.
- Blanchard, T., J. Ferguson, L. Love, T. Takeda, B. Henderson, J. Hasler e W. Chalupa. 1990. Effect of dietary crude protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 51(6):905-908.
- Butler, W.R. 1998. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81:2533-2539.
- Cerri, R.L.A., H.M. Rutigliano, R.G.S. Bruno, R.C. Chebel, and J.E.P. Santos. 2005. Effect of artificial insemination (AI) protocol on fertilization and embryo quality in high-producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88(Suppl. 1): ? (Abstr.).
- Cerri, R.L.A., R.G.S. Bruno, R.C. Chebel, K.N. Galvão, H. Rutigliano, S.O. Juchem, W.W. Thatcher, D. Luchini, and J.E.P. Santos. 2004. Effect of fat sources differing in fatty acid profile on fertilization rate and embryo quality in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87(Suppl. 1): 297 (Abstr.).
- Coscioni, A.C., M. Villaseñor, K.N. Galvão, R. Chebel, J.E.P. Santos, J.H. Kirk, B. Puschner, and L.M.C. Pegoraro. 2003. Effect of gossypol intake on plasma and uterine gossypol concentrations and on embryo quality and development in superovulated Holstein dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 86(Suppl. 1):240 (Abstr.).
-

Garcia-Bojalil, C.M., C.R. Staples, W.W. Thatcher e M. Drost. 1994. Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:2537-2548.

Gong, J.G., I. Wilmut, T.A. Bramley, and R. Webb. 1996. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. *Theriogenology*. 45:611-622.

Kendrick, K.W., T.L. Bailey, A.S. Garst, A.W. Pryor, A. Ahmadzadeh, R.M. Akers, W.E. Eyestone, R.E. Pearson, and F.C. Gwazdauskas. 1999. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. *J. Dairy Sci.* 82: 1731-1740.

Lozano, J.M., D.P. Nation, F.A. Ward, e D. O'Calaghan. 2000. Effect of nutrition on oocyte developmental capacity in dairy cows. *Theriogenology* 53(1):284.(Abstr.)

McEvoy, T.G., J.J. Robinson, R.P. Aitken, P.A. Findlay, R.M. Palmer e I.S. Robertson. 1995. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in vitro development of ova. *Anim. Reprod. Sci.* 39: 89-107.

Moreira, F., L. Badinga, C. Burnley, and W.W. Thatcher. 2002. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology* 57: 1371-1387.

Nolan, R. P. Duffy, M. Wade, D. O'Callaghan e M.P. Boland. 1998a. Effect of quantity and type of diet and frequency of trans-vaginal ovum aspiration on in-vitro embryo development in heifers. *Theriogenology* 49:402(Abstr.).

Nolan, R. D. O'Callaghan, R.T. Duby, P. Lonergan e M.P. Boland. 1998b. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology* 50:1263-1274.

Revah, I. e W.R. Butler. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J. Reproduction and Fertility*. 106:39-47.

Ryan, D.P., R.A. Spoon e G.L. Williams. 1992. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. *J. Anim. Sci.* 70:3505-3513.

Saacke, R.G., J.C. Dalton, S. Nadir, R.L. Nebel, J.H. Bame. 2000. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 663-677.

Santos, J.E.P., W.W. Thatcher, R.C. Chebel, R.L.A. Cerri, and K.N. Galvão. 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrous synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83C: 513-535.

Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S.A., Guenther, J.N., Parrish, J.J., Wiltbank, M.C., 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.* 85, 2803-2812.

Thomas, M.G. e G.L. Williams. 1996. Metabolic hormone secretion and FSH-induced superovulatory responses of beef heifers fed dietary supplements containing predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. *Theriogenology* 45:451-458.

Villaseñor, M., A.C. Coscioni, K.N. Galvão, S.O. Juchem, J.E.P. Santos, and B. Puschner. 2003. Effect of gossypol intake on plasma and uterine gossypol concentrations and on embryo development and viability *in vivo* and *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 86(Suppl. 1):240 (Abstr.).

Yaakub, H., D.O'Callaghan e M.P. Boland. 1999a. Effect of roughage type and concentrate supplementation on follicle numbers and in vitro fertilisation and development of oocytes recovered from beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 55:1-12.

Yaakub, H., D.O'Callaghan e M.P. Boland. 1999b. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology* 51:1259-1266.

Zavy, M.T., 1994. Embryonic mortality in cattle. In: Zavy, M.T., Geisert, R.D. (Ed.), *Embryonic mortality in domestic species*, CRC Press, Boca Raton, pp. 99-140.
