

BRAITNER MATIAS PEREIRA

**SUPLEMENTAÇÃO ENERGÉTICA, VITAMÍNICA
E MINERAL (CANTER OF[®]) EM DOADORAS DE
EMBRIÕES BOVINOS**

Alfenas-MG

2008

BRAITNER MATIAS PEREIRA

**SUPLEMENTAÇÃO ENERGÉTICA, VITAMÍNICA
E MINERAL (CANTER OF[®]) EM DOADORAS DE
EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade José do Rosário Vellano, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes

Alfenas-MG

2008

Pereira, Braitner Matias
Suplementação energética, vitamínica e mineral
(Canter OF®) em doadoras de embriões bovinos. Braitner
Matias Pereira. -- Alfenas: Unifenas, 2008. 54p.

Orientador: Prof. Dr. Carlos A. de C. Fernandes
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) –
Universidade José do Rosário Velano.

1. bovino, nutrição e transferência de embrião.
CDU: 636.2 (043)

Aos meus avós José Rufino Pereira e Maria Terezinha Pereira (*in memoriam*) e aos meus pais José Matias-Pereira e Valdelice de Almeida Pereira, pelos estímulos e apoio nunca negado.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes.

Que me acolheu como orientando, pela sua experiência científica e pelos seus ensinamentos inigualáveis; bem como à Profa. Dr. Marilu Martins Gioso, co-orientadora, pela ajuda no desenvolvimento desta pesquisa, em especial nas análises dos seus resultados.

Aos meus professores do mestrado, principalmente ao Professor Paulo Roberto Corrêa Landgraf, aos colegas de turma do mestrado e aos graduandos: Felipe Assis, Leonardo Nassar e Carlos Eduardo Colorado, pela ajuda e estímulo que sempre me deram nas horas mais difíceis.

Aos meus pais, Jose Matias-Pereira e Valdelice de Almeida Pereira, responsáveis pela minha formação pessoal e profissional. A dedicação e o apoio, com muito amor e carinho, particularmente nos momentos mais difíceis, foram fundamentais para que eu pudesse buscar e alcançar os meus objetivos como pessoa e profissional.

À Larissa Paiva do Nascimento, minha namorada, pela ajuda e compreensão, ao longo da nossa caminhada juntos.

À Biotran e seus funcionários, que me ajudaram na realização do experimento e no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao senhor João Contti, proprietário da Fazenda Bela Vista, que cedeu os animais para o experimento.

À FAPEMIG e à Ouro Fino, pelo patrocínio, que tornou possível a realização deste trabalho.

Às instituições e pessoas que, de forma direta ou indireta, colaboraram para a realização desta pesquisa.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	08
2	OBJETIVO	12
3	REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1	Desenvolvimento folicular e superovulação em bovinos	13
3.2	Componentes do produto Canter OF®	16
3.2.1	Vitamina A	16
3.2.2	Betacaroteno	18
3.2.3	Carnitina	18
3.2.4	Selênio	19
3.2.5	Cobre	22
3.2.6	Vitamina E	23
3.2.7	Quelatos	24
3.2.8	Cromo	26
3.3	Superovulação	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1	Local	34
4.2	Doadoras	34
4.3	Programa existente, avaliação dos dados históricos: como estratificados	35
4.4	Avaliações Ultra-sonográficas	35
4.5	Esquema de superovulação, coleta dos embriões e avaliação dos mesmos	36
4.6	Rastreamento e manipulação dos embriões	38
4.7	Receptoras, transferência dos embriões e diagnóstico de gestação	41
4.8	Análises estatísticas	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Resultados relacionados à superovulação	43
5.2	Número e taxa de gestação	44
5.3	Doadoras com histórico de baixa produção embrionária	46
5.4	Doadoras com histórico de boa produção embrionária	46
6	CONCLUSÕES	49
7	REFERÊNCIAS	50
8	ANEXO	58
8.1	Características do Produto Canter OF®	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição dos parâmetros utilizados para classificação do estágio de desenvolvimento de embriões bovinos -----	39
Tabela 2- Descrição dos parâmetros utilizados para classificação dos Embriões bovinos quanto à qualidade (constituição morfológica) -----	40
Tabela 3- Escore de classificação e qualidade embrionária -----	41
Tabela 4,5- Resultados de superovulação e produção embrionaria em animais tratados e não tratados com Canter OF -----	44
Tabela 6,7- Resultados pareados de superovulação de todos os animais tratados e não tratados com Canter OF -----	44
Tabela 8,9- Resultados pareados de superovulação e produção embrionária de todos os animais com histórico de baixa resposta superovulatória -----	46
Tabela 10,11 - Resultados pareados de superovulação e produção embrionária de todos os animais com histórico de boa resposta superovulatória-----	46

RESUMO

Pereira, Braitner Matias. **Suplementação energética, vitamínica e mineral Canter OF® em doadoras de embriões bovinos**. Orientador: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes. Alfenas: Unifenas, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal).

O que se espera do tratamento superovulatório de uma fêmea bovina utilizada como doadora em programas de transferência de embriões (TE) é que esta produza estruturas em quantidade e qualidade. A nutrição e reprodução são dois aspectos que possuem estreitas interrelações, em qualquer sistema de produção. O Canter OF® é um suplemento nutricional com vitaminas, minerais e aminoácidos, cujos constituintes poderiam melhorar os resultados de fêmeas bovinas submetidas à superovulação. O objetivo deste trabalho foi verificar os efeitos da administração do *Canter OF®* sobre a resposta superovulatória e a produção embrionária de doadoras zebuínas submetidas aos programas de TE. Foram realizados 42 protocolos de superovulação, em 21 fêmeas bovinas doadoras da raça Guzerá, com peso corporal superior a 350 Kg, idade entre 20 e 60 meses e que estavam ciclando em intervalos regulares (21 ± 3 dias). Os animais foram manejados em regime de semiconfinamento e receberam a mesma alimentação durante todo o período experimental, composta de volumoso e suplementação mineral *ad libitum*, visando manutenção do escore de condição corporal entre 3 e 4 (escala de 1 a 5). Todos os animais utilizados passaram pelo menos uma vez pelo grupo tratado (*Canter OF®*) e pelo grupo controle num esquema de delineamento "Cross-over". O produto foi administrado diariamente (20 ml) a cada animal, de forma individual por 30 dias antes da colheita dos embriões. Foram avaliadas as seguintes variáveis: influência dos tratamentos sobre a resposta ovariana ao protocolo superovulatório (número e diâmetro médio dos folículos no dia da inseminação), número de corpos lúteos presentes no dia da colheita de embriões, taxa de recuperação embrionária, total de estruturas produzidas, número de embriões viáveis ou degenerados e oócitos não fecundados e a taxa de gestação das receptoras. Os resultados mostraram que, quando são analisados todos os animais utilizados não se observaram diferenças ($P > 0,05$) entre o total de corpos lúteos ($10,20 \pm 2,04$ e $9,79 \pm 1,73$), total de embriões ($7,64 \pm 2,06$ e $6,64 \pm 1,71$) e embriões viáveis ($4,64 \pm 1,24$ e $4,68 \pm 1,03$) entre o grupo Controle e o Tratado com *Canter OF®*, respectivamente. Quando se avaliaram apenas as vacas com pequena resposta superovulatória e produção embrionária ruim, os resultados do tratamento com *Canter OF®* são diferentes. Para estes animais, algumas das variáveis estudadas foram superiores no grupo tratado com *Canter OF®*. Neste grupo, o tratamento com *Canter OF®* aumentou a resposta superovulatória, o total de embriões por coleta e o número de embriões viáveis ($P < 0,05$). E os animais com histórico de resposta superovulatória boa não apresentaram nenhuma alteração estatisticamente significativa. Conclui-se que o produto, no protocolo utilizado foi eficiente em estimular maior número de ovulações, e produção de embriões, somente em doadoras com produção embrionária baixa.

Palavras chaves: Bovino, Nutrição e Transferência de embrião.

ABSTRACT

Pereira, Braitner Matias. **Energetic, vitamin and mineral supplementation, (Canter OF™ in bovine embryo donors.** Adviser: Carlos Antônio de Carvalho Fernandes. Alfenas, Unifenas, 2007. Dissertation (Master's degree in Animal Science).

A female bovine used as a donor in embryo transfer programs (ET) should produce structures with quality and quantity. The improvement of the efficiency of livestock production is a complex biological system involving interactions of hormonal, genetic, metabolic and nutritional factors. Nutrition and reproduction are closely linked in any production system. Canter OF™ is a nutritional supplement with vitamins, minerals and amino acids, which could improve the performance of female cattle in superovulation programs. The purpose of this paper was to verify the effects of the of Canter OF™ administration on the superovulatory response and embryo production in (ET) zebu cows. Forty-two superovulation protocols were carried out with , on 21 Guzará breed female bovine donors, aged 20-60 months, weighing more than 350 kg, and having normal estrous cycles (21 ± 3 days). The animals were kept in semiconfinement and received the same diet during the trial period, consisting of grass and mineral supplementation *ad libitum* to maintain the body condition score of between 3 and 4 (scale of 1 to 5). All animals passed through both the group (Canter OF™) and the control group at least once, in "Cross-over" design. The product was administered daily (20 ml) to each donor individually during the trial period. The following variables: influence of the treatments on the ovarian response to the superovulatory protocol (number and average diameter of follicles on insemination day); number of corpora lutea present on flushing day; embryo recovery rate; total embryos; number of and degenerate embryos and nonfertilized eggs, and recipient gestation rate. The results showed that no difference ($P > 0.05$) was found between the number of corpora lutea (10.20 ± 2.04 and 9.79 ± 1.73 to a), total embryos (7.64 ± 2.06 to 6.64 ± 1.71) and viable embryos (4.64 ± 1.24 and 4.68 ± 1.03 to a) and between the control group and the Canter OF™ group, respectively. When evaluation concerned only the cows with low superovulatory response and poor embryo production, the results with Canter OF™ treatment were different. In this group, Canter OF™ treatments were different. In this group, Canter OF™ treatment increased the superovulatory response, the number of embryos per flushing, and the number of viable embryos ($P < 0.05$). In the animals with a history of good superovulatory response no statistically significant alteration was found. In conclusion, the product used in the present protocol was effective to increase the superovulatory response and embryo production only in a donor with a low embryo production.

Keywords: Bovine; Nutrition; Embryo Transfer.

1 INTRODUÇÃO

Nutrição e reprodução são dois aspectos que possuem estreitos laços, em qualquer sistema de produção animal. A nutrição é responsável pela expressão e funcionamento de rotas metabólicas que permitirão ao animal expressar todo seu potencial produtivo e/ou reprodutivo (LOCK & GARNSWORTHY, 2002). Estas rotas metabólicas relacionadas à reprodução são complexas, e em várias situações não têm o mecanismo totalmente elucidado. Independente da via metabólica envolvida, a regulação que a nutrição exerce sobre a reprodução de machos e fêmeas ocorre, principalmente, por efeitos no cérebro, mais especificamente no hipotálamo, onde será alterada a secreção de GnRH.

O principal mecanismo de controle da reprodução de fêmeas bovinas pela nutrição ocorre pela alteração na secreção de GnRH (SCHILLO, 1992). Vários são os metabolitos circulantes indicados como responsáveis por estimular a liberação de GnRH, porém as substâncias oxidáveis, como glicose, ácidos graxos não esterificados e alguns aminoácidos, parecem ser os principais agentes que ativam as rotas neuroendócrinas responsáveis pelo controle da reprodução em bovinos. Atualmente ainda se sabe muito pouco sobre como o animal informa ao sistema nervoso central sobre o status nutricional e de como esta informação é traduzida em um sinal neuroendócrino.

Os efeitos da nutrição sobre a reprodução podem ocorrer por diferentes vias:

1- Ação direta nas gônadas – os nutrientes absorvidos são destinados para as células germinativas e para células endócrinas. O requerimento absoluto destas células não é grande, tanto para proteína quanto para energia.

2 –Efeitos no hipotálamo e hipófise – o efeito no eixo hipotálamo–hipófise pode ocorrer pela alteração na secreção de GnRH do hipotálamo ou na sensibilidade da hipófise a este hormônio. Vários metabolitos nutricionais e hormônios do metabolismo podem afetar a reprodução por agirem nestes locais.

3 – Metabolismo de hormônios esteróides. O metabolismo dos hormônios esteróides é feito principalmente no fígado por uma série de enzimas, sob controle

de um fator hipofisário. Hoje já se sabe que este fator é o hormônio do crescimento (MODE *et al.*, 1983). Como a secreção da somatotrofina é altamente afetada pela nutrição, o metabolismo dos esteróides gonadais é também influenciado. Neste caso a atividade biológica dos esteróides estaria alterada. Principalmente o efeito da retro-alimentação no hipotálamo, com conseqüente mudança na secreção de gonadotrofinas e atividade ovariana.

4 – *Clearance* hormonal - Em condições de restrição alimentar o fluxo sanguíneo para o fígado fica reduzido. Como este órgão é o principal local de metabolismo de hormônios, principalmente os esteróides, esta rota metabólica fica comprometida, com possível alteração na ação destes hormônios.

5 – hormônios do metabolismo - O status nutricional do animal pode afetar o padrão de secreção e atividade dos hormônios que regulam o metabolismo. Hormônios como insulina, somatotrofina e vários fatores de crescimento (IGFs, NGF, TGF etc.) têm sua atividade alterada pelo padrão nutricional. Como estas substâncias afetam o desenvolvimento folicular (KRUMMEN *et al.*, 1993) e outros processos reprodutivos, trata-se de um outro mecanismo de interação entre nutrição e reprodução.

O que se espera como bom desempenho de uma fêmea bovina utilizada como doadora de embriões em um programa de TE é que esta produza estruturas em quantidade e de qualidade (viáveis). Existem várias descrições na literatura de interações entre nutrição e produção embrionária, e os aspectos fisiológicos e/ou endocrinológicos envolvidos nesta inter-relação (BÓ *et al.*, 2006a, 2006b).

Vale ressaltar que a eficiência em produção de embriões não está associada apenas a variáveis que atuam próximas ao processo de superovulação até a colheita dos embriões. Os efeitos da nutrição nestes mecanismos vão além, influenciando o desenvolvimento folicular, qualidade do oócito, taxa de ovulação, desenvolvimento do embrião.

Nos últimos anos, a pecuária de corte brasileira apresentou notável crescimento. A situação atual da pecuária de corte no Brasil coloca o País em destaque neste setor no contexto mundial. Além de possuir o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, o país alcançou recentemente a posição de maior exportador mundial de carne. Uma análise mais ampla dos mercados - interno e

externo - parece apontar em situações opostas, numa primeira impressão. De um lado temos uma demanda crescente do mercado externo. Constatase que o chamado “boi verde” brasileiro está atraindo cada vez mais consumidores nos diferentes locais do mundo. Porém, internamente um contexto indesejável pressiona a pecuária de corte em sentido contrário. Com valorização e aumento da demanda de propriedades para a produção de grãos e biocombustíveis é crescente e inevitável a perda de áreas originalmente de pastagens para a agricultura. Estima-se que nos próximos 5 anos, mais de 15 milhões de hectares de pastagens se tornarão áreas de cultivo de soja, milho, algodão, cana-de-açúcar e outros. Em resumo, o Brasil terá que produzir mais carne numa área menor. Estas forças, aparentemente opostas, apontam para uma mesma direção: aumento de produtividade. O melhoramento genético é uma das ferramentas que podem auxiliar nesta melhoria de produtividade.

O melhoramento genético dos rebanhos é condição primordial para produção de carne em quantidade e principalmente em qualidade. As tecnologias associadas à reprodução apresentam grande impacto nos sistemas de criação, no ganho genético e também na disseminação de genes de animais considerados superiores (VAN ARENDONK & BIJMA, 2003).

A seleção genética em bovinos proporcionou animais com alta produção de leite e carne. No entanto, em condições naturais, os animais conseguem produzir, no máximo, uma cria por ano. A multiplicação mais efetiva de animais geneticamente superiores implica a necessidade da utilização de biotécnicas como ferramentas para aumentar a produção de descendentes. Assim, quanto maior o número de embriões viáveis produzidos, maior será o número de crias geradas por ano. Juntamente com a superovulação, vários fatores contribuem para influenciar as variáveis produção e qualidade de embriões. Entre esses fatores destacam-se os nutricionais, que produzem efeitos significativos na superovulação (YAAKUB *et al.*, 1999).

O desenvolvimento de tecnologias que visam aumentar a oferta de animais de genética de qualidade diferenciada pode, sem dúvida, contribuir no sentido de melhorar as características dos produtos de pecuária de corte e simultaneamente permitir a um número maior de criadores o acesso a reprodutores que possam realmente atuar como melhoradores dos plantéis.

As descobertas ocorridas em relação aos aspectos da fisiologia da reprodução em bovinos aumentaram as expectativas e possibilidades sobre a capacidade de contribuição das fêmeas no melhoramento genético da espécie. Com estes conhecimentos, novas biotecnologias tiveram sua utilização viabilizada na prática, tanto econômica quando na forma de aplicação (FORTUNE *et al.*, 1991; GINTHER *et al.*, 1997). A transferência de embriões (T.E.) é uma destas tecnologias. Esta técnica desenvolve-se rapidamente na pecuária bovina brasileira. Segundo a IETS (*International Embryo Transfer Society-2004*), o Brasil ocupa o segundo lugar na aplicação desta tecnologia. Com ela, o melhoramento genético pode ser efetuado com mais rapidez e eficiência, mesmo em pequenas populações de animais, com a disseminação do material genético de uma fêmea zootecnicamente superior (PEREIRA, 2007).

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram verificar os efeitos do tratamento com Canter OF[®] sobre o desempenho de doadoras de raças zebuínas em programas de transferência de embriões, avaliando os aspectos abaixo relacionados:

- Número de ovulações induzidas.
- Produção embrionária total.
- Taxa de recuperação embrionária.
- Embriões viáveis ou degenerados e oócitos não fecundados.
- Taxa de gestações das receptoras.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Desenvolvimento folicular e superovulação em bovinos

Em face da grande variação na oferta de alimentos nos diferentes períodos do ano, as espécies primitivas desenvolveram mecanismos de adaptação às condições de escassez de alimentos. Dentre estes, são observadas principalmente três estratégias, relacionadas à interação entre reprodução e nutrição, que neste período funcionaram como critérios de adaptação e seleção natural: a presença de reservas corporais de proteína, glicogênio e gordura; meios de prever quando a dieta será suficiente para gestação e/ou lactação; e alteração de eventos reprodutivos em função de aspectos nutricionais (KING *et al.*, 1993). Algumas espécies conservaram estes mecanismos ou parte deles até hoje, porém a domesticação eliminou total ou parcialmente estas estratégias em várias outras espécies. A seleção genética para produção intensiva, sem dúvida, fez diminuir ou mesmo desaparecer as características de adaptação, ou de tolerância às condições de menor disponibilidade de alimentos. Nestes animais, a restrição alimentar sempre será mais negativa à reprodução.

A grande variação dos resultados da superovulação é o principal fator limitante à contribuição que a técnica de transferência de embriões (TE) pode fornecer ao melhoramento genético. Conforme sustentou Fernandes (2000), passados quase cinco décadas do nascimento do primeiro bovino oriundo da técnica de TE, poucas mudanças significativas ocorreram nos protocolos de superovulação. A grande variação na resposta aos tratamentos hoje praticados causa sérios transtornos, ao técnico e ao proprietário, devido à impossibilidade de se prever seguramente os resultados. É um consenso a necessidade de estudos visando a possibilidade de controle de algumas variáveis, e a busca de outras ainda desconhecidas, para que o processo de superovulação possa ser uma etapa mais previsível dentro do contexto da TE. Conhecimentos sobre o mecanismo do recrutamento, desenvolvimento, seleção e dominância dos folículos, parecem ser um ponto-chave para explicar algumas das variações nos resultados da indução de ovulações múltiplas em bovinos.

O balanço energético positivo é importante para maximizar os resultados da superovulação (NOTTLE *et al.*, 1988; KING *et al.*, 1993; GUTIERREZ *et al.*, 1997), porém não se deve permitir um aumento demasiado nos escores da condição corporal (ECC), pois os animais nestas condições são mais suscetíveis ao calor e a problemas como cistos ovarianos e outros distúrbios. O estudo com vacas zebuínas desenvolvido por Siddiqui *et al.* (2002) mostraram que animais com escore de condição corporal (ECC) muito elevado (4,0 a 4,5 numa escala de 1 a 5), produziram menos embriões que outros, da mesma raça, sob as mesmas condições ambientais, que apresentavam ECC regular ou bom (2,5 a 3,5).

Os efeitos dos macro e microminerais sobre os resultados de superovulação em bovinos não são consenso na literatura. Existem trabalhos que apresentaram resultados benéficos na suplementação de algum elemento, o que não é confirmado por outros autores. De fato, não é fácil, ou às vezes possível, comparar resultados de trabalhos realizados em condições diferentes, onde variam desde a categoria animal, raça, condições ambientais, de solo e a dieta fornecida. (PEREIRA *et al.*, 2007).

O processo ovulatório é o principal mecanismo influenciado pela nutrição. Nas espécies domésticas que possuem várias ovulações por ciclo, o número destas pode variar de acordo com a condição nutricional. Este conhecimento é antigo e utilizado como ferramenta de manejo denominado “FLUSHING” em suínos e ovinos. O efeito do aporte de energia sobre a taxa de ovulação é muito rápido. A influência ocorre à partir de 4 a 6 dias após a mudança de aporte nutricional (OLDHAM & LINDSAY, 1984; STEWART & OLDHAM, 1986).

Não existe um consenso sobre o fator nutricional responsável por regular a taxa de ovulação. A proteína é o principal componente da dieta que influencia a taxa de ovulação. Porém, em ruminantes, deve-se creditar este efeito somente à fração protéica que escapa à fermentação rumenal. Segundo Driancourt (2001), não a proteína, mas os carboidratos, especificamente a taxa circulante de glicose, é o fator nutricional regulador da taxa de ovulação. Esta afirmação se baseia em trabalhos realizados com infusão pós-ruminal de glicose, que afeta a taxa de ovulação. Uma terceira corrente cita interação entre energia e proteína no controle da taxa de ovulação. King *et al.* (1993) relatam que o nível glicêmico capaz de afetar a taxa de ovulação é dependente da proteína dietética, ou seja, da concentração de

aminoácidos circulantes. Embora o efeito da nutrição sobre o desenvolvimento folicular seja mais perceptível nas fases finais, provavelmente esse efeito ocorre em todos os estágios anteriores (NOTTLE, SEAMARK & SETCHELL, 1988). O efeito sobre a taxa de ovulação ocorre por alteração na atresia folicular. O efeito do “flushing”, segundo vários autores, se dá principalmente por uma redução na atresia, nos estágios finais de desenvolvimento folicular. Como os efeitos podem ser observados em poucos dias, é provável que a principal influência dos fatores nutricionais sobre a taxa de ovulação ocorra mesmo nas fases finais (NOTTLE, SEAMARK & SETCHELL, 1988).

A ação dos fatores nutricionais sobre a ovulação ocorre de duas formas. Em condições nutricionais ideais, o folículo é mais sensível e permanece mais tempo no estágio de dependência de gonadotrofinas. Além disto, os níveis circulantes de FSH seriam maiores. Os folículos são mais sensíveis a alterações nutricionais nos períodos de rápido desenvolvimento. Neste período eles são dependentes de FSH e LH e, na falta destes hormônios, entram rapidamente em atresia. Na vaca, os efeitos da nutrição sobre o desenvolvimento folicular ocorrem principalmente por alteração nos níveis circulantes de gonadotrofinas, que exercem um papel central no desenvolvimento folicular e ovulação (NOTTLE, SEAMARK & SETCHELL, 1988).

A influência dos níveis nutricionais de energia e proteína sobre os níveis circulantes de gonadotrofinas nas fêmeas bovinas foi descrito há vários anos (GOMBE & HANSEL, 1973), porém os resultados da literatura ainda são conflitantes. Não é possível comparar resultados de trabalhos ou condições distintas, que utilizaram diferentes metodologias de coleta, estocagem e forma de mensuração das gonadotrofinas.

Os efeitos do aporte nutricional sobre a população folicular em novilhas de corte foram estudados por Gutierrez *et al.* (1997). Os resultados demonstraram que o grupo mais bem-alimentado apresentou uma maior população folicular. Este efeito, porém ocorreu apenas nos folículos de pequeno diâmetro (<4mm), e não nos de diâmetro médio (4–8mm) ou grande (>8mm). Nos animais com melhor balanço energético, a população aumentou 37% em relação ao grupo que apenas manteve o peso. Esta diferença foi observada apenas nos três primeiros dias do ciclo. Segundo Viana (1996) e Fernandes (2000), ocorre variação na população folicular durante o ciclo estral, em decorrência da relação de dominância folicular. O melhor momento

para avaliação da população folicular é quando a dominância ainda não está estabelecida. Os resultados de Gutierrez *et al.* (1997) e Gong; Bramley & Wilmut (1993) mostraram que as variações nutricionais podem alterar o recrutamento folicular, mas não afetam a seleção e dominância, em bovinos. Segundo estes autores esta resposta pode ser observada á partir de 5–8 dias da mudança na alimentação.

Fernandes (2000) relatou que um dos fatores de sucesso da superovulação consiste em iniciar o tratamento com gonadotrofinas quando existir uma boa população de folículos sensíveis, o que é possível conseguir com alteração nos padrões nutricionais, alguns dias antes do inicio do tratamento. O maior número de folículos por onda observado em animais com nutrição adequada, em relação a outros com restrição alimentar, se deve, segundo Wiltbank (2001), a um maior fluxo sangüíneo no fígado e aumento de substâncias como a insulina, IGF1 e GH. Porém a alteração nestes metabólitos não é indicada como responsável pelo maior recrutamento folicular em outros trabalhos, como citado por Gutierrez *et al.* (1997).

A existência de uma maior sensibilidade dos folículos ao FSH - ou seja, uma menor necessidade de FSH para dar suporte ao desenvolvimento dos folículos na fase da dependência de gonadotrofinas em animais com boas condições nutricionais -, pode ser um mecanismo a ser utilizado no manejo de doadoras durante o processo superovulatório. Animais que possuem as demandas nutricionais atendidas, respondem de forma mais satisfatória a estímulos exógenos para desenvolvimento folicular (DOWNING & SCARAMUZZI, 1991).

A nutrição durante o período em que emergem do ovário os folículos primordiais – quando realizada aproximadamente seis meses antes da sua ovulação em ovelhas e três a quatro meses em vacas - pode influenciar a taxa de ovulação e a qualidade dos oócitos. Em vacas de alta produção leiteira e balanço energético negativos, reduz-se a insulina e IGF-1, levando ao atraso no estro, baixa qualidade dos oocitos e deficiência na funcionalidade do corpo lúteo (ROBINSON *et al.*, 2005).

Componentes do produto Canter OF[®]

Vitamina A

É conhecida a relação entre a vitamina A e problemas reprodutivos. Essa

relação foi descoberta em estudos envolvendo animais de laboratório, especialmente ratos, e os resultados foram muitas vezes extrapolados para os tratamentos de bovinos (CORBETT, 1990).

Os herbívoros normalmente não ingerem Vitamina A, porque os vegetais não a contêm, mas sim uma pró-vitamina denominada Betacaroteno. Este, no organismo, se transforma em vitamina A. Portanto, no bovino, se existir deficiência de vitamina A, existe antes uma deficiência de Betacaroteno (FUCK *et al.*, 2000).

Entre os fatores nutricionais, a vitamina A destaca-se, e sua importância na reprodução animal é bem conhecida (McDOWELL, 1989). A suplementação de vitamina A, injetável por via intramuscular na dosagem de 1.000.000 UI de palmitato de retinol, melhora a qualidade de embriões bovinos (SHAW *et al.*, 1995).

Estudos recentes demonstraram que as suplementações com vitamina A e Betacaroteno no período entre ovulação e formação do blastocisto influenciaram o desenvolvimento do embrião. No entanto, as consequências, no longo prazo, no desenvolvimento destas mudanças são desconhecidas e ambas as áreas merecem uma investigação mais detalhada (KAKAR *et al.*, 2005). A bibliografia, em geral, não diferencia o efeito da vitamina A e do Betacaroteno. Assim que foi sintetizada industrialmente, a vitamina A foi aplicada exclusivamente para prevenir e tratar os transtornos de fertilidade desta origem. Na vaca leiteira, a deficiência de vitamina A ou de seu precursor natural pode ocasionar redução nas taxas de concepção, mortes embrionárias, aborto, retenção de placenta e nascimento de bezerros mortos, fracos ou cegos (HURLEY & DOANE, 1989).

Além disso, devido à sua função sobre a mucosa, a carência de vitamina A promove uma menor secreção de muco (mucopolissacarídeos) que, por sua vez, ocasiona lesões inflamatórias e degenerativas nas mucosas genitais. Não existe um efeito direto da vitamina A sobre a função ovariana, já que o corpo lúteo do bovino não contém vitamina A e sim Betacaroteno (FUCK *et al.*, 2000).

Trabalhos relacionados com a vitamina A em gado leiteiro têm sugerido um papel específico do Betacaroteno na função reprodutiva, independente de ser precursor da vitamina A (CHEW *et al.*, 1989). Isso se deve à observação de que os níveis de Beta caroteno no fluido folicular e no corpo lúteo são elevados, enquanto os níveis hepáticos de Betacaroteno são pequenos (GAWIENOWSKI *et al.*, 1984).

Betacaroteno

O Betacaroteno é integrante da membrana microssomal do corpo lúteo bovino, onde pode exercer função na integridade da mesma. Em períodos em que o suprimento de vitamina A ao corpo lúteo não é suficiente para seu funcionamento, o Betacaroteno pode ser metabolizado e suprir suas funções devido ao fato de atuar como uma forma local de armazenamento de retinol (HURLEY & DOANE, 1989).

O alto teor de Betacaroteno no corpo lúteo pode afetar a produção de esteróides ovarianos. Essas diferenças ocorreram em vacas suplementadas com Beta caroteno que obtiveram uma maior resposta da produção de progesterona pós injeção de HCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) (BINDAS *et al.*, 1986). Porém, as suplementações de Betacaroteno em vacas deficientes elevaram o teor do mesmo no corpo lúteo, mas não pareceu alterar o conteúdo de vitamina A ou o peso, estrutura e a função do corpo lúteo (PARMER *et al.*, 1986).

Estudos "*in vitro*" de células luteais sugeriram que relações entre retinol, ácido retinóico e Betacaroteno provocam diferentes efeitos na secreção de progesterona das células luteais quando comparadas às suas concentrações absolutas (GAWIENOWSKI *et al.*, 1984). Adicionalmente, Talavera & Chew (1987) mostraram que o ácido retinóico e o Beta caroteno podem estimular a utilização de lipoproteína de baixa densidade pelas células luteínicas para síntese de progesterona.

Arechiga *et al.* (1998) avaliaram o efeito da inseminação em tempo fixo associada à suplementação por Betacaroteno sobre o desempenho reprodutivo e rendimento de leite em vacas leiteiras sob estresse térmico e observaram efeitos benéficos.

Carnitina

A carnitina (3-hidroxi-4-N-trimetilamino-butilato) é sintetizada no organismo a partir de dois aminoácidos essenciais, lisina e metionina, exigindo para sua síntese a presença de ferro, ácido ascórbico, niacina e vitamina B₆. Ela é uma amina quaternária com função fundamental na geração de energia pela célula, pois age

nas reações transferidoras de ácidos graxos livres de cadeia longa do citosol para mitocôndrias, facilitando sua oxidação e geração de adenosina trifosfato (ATP). O aumento do fluxo de substratos através do Ciclo de Krebs poderia resultar em produção e utilização mais efetivas do oxigênio, além da melhora na capacidade de realizar tarefas físicas. A carnitina também tem sido freqüentemente utilizada como coadjuvante no tratamento de dislipidemias, uma vez que atua como um importante co-fator na oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, aumentando a utilização de triglicerídeos para o fornecimento de energia (CERRETELLI & MARCONI, 1990; EVANS & FORNASI, 2003).

A concentração orgânica de carnitina - aproximadamente 20g ou 120mmol - é resultante de vários processos metabólicos, tais como ingestão, biossíntese, transporte dentro e fora dos tecidos e excreção (MITCHEL, 1978; CERRETELLI & MARCONI, 1990; EVANS & FORNASI, 2003). Doenças que comprometem algum desses processos, e que têm como características o aumento do metabolismo e estado nutricional debilitado, geram um estado carencial de carnitina. As conseqüências são relacionadas principalmente ao metabolismo de lipídeos.

Além disso, por ser uma substância produzida no organismo em condições normais e com boa tolerabilidade, a suplementação de L-carnitina tem sido estudada em função de possíveis efeitos antioxidantes, tanto em indivíduos saudáveis quanto naqueles com necessidades especiais, como portadores de doenças isquêmicas e neuropatia diabética (COTTER *et al.*, 1995 e BRASS, 1998).

Selênio

Existem, até o presente momento, poucos trabalhos sobre a ocorrência de deficiência de selênio nas pastagens do Brasil, mas há indicações de que este possa ser um problema importante para bovinos sob pastejo em regiões de solos mais pobres. Porém, a deficiência de selênio na dieta de bovinos pode ser corrigida de diferentes modos: através do uso de sais de selênio (selenito, selenato) no sal mineral, dosagem oral periódica com os mesmos produtos, injeções periódicas de selênio (quase sempre associadas à vitamina E), péletes (*pellets*) densos para serem engolidos pelos animais, contendo 95% de ferro e 5% de selênio (EMBRAPA,

2008).

[Lucci et al. \(1984b\)](#) realizaram um levantamento dos níveis de selênio em pastagens e alimentos concentrados de várias regiões do Estado de São Paulo em dois períodos: seca e chuva. Na maioria das amostras de pasto analisadas, o selênio apresentou-se em concentrações baixas ou muito baixas, sendo os valores consistentemente mais elevados no período das chuvas. [Lucci et al. \(1984a\)](#) dosaram também os níveis plasmáticos de selênio em 1.973 vacas criadas nas mesmas regiões onde foi feito o levantamento de selênio nos alimentos. Os resultados mostraram níveis reduzidos de selênio em 78% das vacas amostradas, com elevada correlação entre o baixo nível de selênio no sangue dos animais e na pastagem. Estes autores relataram, ainda, históricos de retenção de placenta nos rebanhos com evidências de deficiência de selênio. Lucci et al. ([1985](#), [1987](#), 1993a, 1993b) estudaram ainda o efeito da suplementação de selênio sobre a retenção de placenta em vacas e relataram significativa redução na incidência do problema.

[Zanetti, Lucci & Meirelles \(1985\)](#) e Santiago ([1986a](#); [1986b](#)) reportaram efeitos positivos da administração de selênio, associado ou não à vitamina E, na redução de placentas retidas e outras características ligadas à fertilidade dos rebanhos.

O elemento é necessário para o crescimento e fertilidade dos animais e para a prevenção de várias condições mórbidas características, algumas das quais respondem também, em certa medida, à terapia com a vitamina E, quais sejam: necrose hepática dos ratos e suínos, diátese exsudativa e fibrose pancreática das aves, hepatose dietética e microangiopatia dos suínos, e distrofia muscular (doença do músculo branco) em cordeiros, bezerros, potros e outras espécies animais. Todos estes distúrbios patológicos são acompanhados de alterações bioquímicas no sangue e tecidos, particularmente níveis subnormais de selênio e glutathione-peroxidase, a enzima de cuja molécula, o selênio, é parte integrante. Esta enzima catalisa a reação de redução de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio) e dos hidroperóxidos formados a partir dos ácidos graxos e outros compostos, exercendo desta forma um importante papel na proteção dos tecidos contra os danos oxidativos. A relação desta função com a da vitamina E, que também age como um antioxidante, é apenas parcialmente conhecida (EMBRAPA, 2008).

A hipótese mais aceita é a de [Noguchi et al. \(1973\)](#), que sugerem que a vitamina E atua como um antioxidante lipossolúvel na membrana celular, e que o selênio age como componente da enzima glutathiona-peroxidase, que atua reduzindo os peróxidos formados. Neste sentido a enzima é de importância primária, destruindo os peróxidos antes que eles ataquem a membrana celular, enquanto a vitamina E atua dentro da própria célula, prevenindo a reação em cadeia de auto-oxidação dos lipídios da membrana celular.

Em vacas, a deficiência de selênio tem sido associada à retenção de placenta e ao nascimento de prematuros fracos ou mortos. O selênio sozinho foi menos efetivo do que quando combinado com a vitamina E. Evidências adicionais de que a retenção de placenta é uma expressão da deficiência dietética de selênio foram apresentadas por Julien *et al.* ([1976a](#) e [1976b](#)): a incidência de placenta retida foi reduzida de 51,2%, em vacas não tratadas, para 8,8% em vacas sob condições similares, tratadas com uma única injeção de 50 mg de selenito de sódio + 680 UI de vitamina E no pré-parto. Até o presente, não existe uma explicação satisfatória para o modo de ação do selênio e da vitamina E neste e em outros aspectos do ciclo reprodutivo das fêmeas.

De modo geral, o requerimento de selênio para ruminantes está em torno de 0,1 ppm na matéria seca da dieta, mas esta exigência mínima pode variar de acordo com diversos fatores, dos quais o mais importante é o teor de vitamina E, uma vez que, como foi visto, selênio e vitamina E podem, até certo ponto, substituir um ao outro na dieta.

O selênio exerce ainda outras funções no organismo, não relacionadas com a enzima glutathiona-peroxidase; devido a sua forte tendência a formar complexos com metais pesados, o mineral desempenha função protetora nas intoxicações por cádmio e mercúrio. Dentre as alterações produzidas pela deficiência dietética de selênio, incluem-se aquelas que afetam a esfera reprodutiva. Em todas as espécies animais, a deficiência do elemento ocasiona algum tipo de desordem reprodutiva em machos ou fêmeas.

O selênio está envolvido em dezenas de reações orgânicas e dentre estas se destacam o funcionamento da glutathiona-peroxidase, responsável direto pela destruição de hidroperóxidos antes que haja agressão à integridade das membranas (ROWNTREE; HILL & HAWEINS, 2004). Portanto, o selênio atua sobre a integridade

das membranas e proteção contra degeneração oxidativa dos tecidos.

O selênio também participa da atividade dos hormônios da tireóide, potencialização da resposta imunológica, locomoção do espermatozóide, metabolismo de ácidos graxos, síntese de DNA e RNA (SANTOS & AMSTALDEN, 1998; UNDERWOOD & SUTTLE, 1999).

Cobre

O cobre é um nutriente envolvido em dezenas de reações e funções no organismo, destacando-se: a respiração celular, formação óssea, formação e manutenção da integridade das hemácias, manutenção da elastina aórtica e mielina, queratinização e pigmentação dos tecidos, integridade do sistema nervoso central, sistema imunológico, metabolismo de lipídeos e participação ativa na reprodução e crescimento (GOONERATNE; BUCKLEY & CRHISTENSEN, 1989; McDOWELL, 1992; UNDERWOOD & SUTTLE, 1999).

A enzima citocromo oxidase, catalisadora da reação do oxigênio da água, essencial para o processo de respiração celular, é constituída, dentre outros elementos, pelo cobre. Também, a síntese de hemoglobina é dependente conjuntamente do cobre e ferro. O elemento cobre também faz parte do colágeno e elastina, responsável pela integridade de vasos e artérias. O cobre também atua na conversão de tirosina em melanina, sendo em parte responsável pela pigmentação do pelo e lã. Ainda dentro das interações antagônicas, zinco e ferro em altos níveis são capazes de alterar a disponibilidade de cobre (PULLS, 1984).

O cobre é um componente essencial de enzimas, como a ceruloplasmina, tirosinase, lisil-oxidase, citocromo-oxidase e superóxido-dismutase (SOD). O cobre é necessário para a respiração celular, formação óssea, função cardíaca normal, desenvolvimento do tecido conjuntivo, mielinização da medula espinhal, queratinização e pigmentação dos tecidos. Relativamente ao sistema imune, a deficiência de cobre afeta as células T e B, os neutrófilos e macrófagos, resultando em um decréscimo das células produtoras de anticorpos (McDOWELL, 1977). Vários estudos citados por Harmon (1998) relataram a importância do cobre para o sistema imune, onde dietas com níveis baixos de cobre diminuem a quantidade de

granulócitos, leucócitos, neutrófilos, a atividade da superóxido-dismutase, reduzindo a capacidade do organismo bovino em combater as infecções. Este mesmo autor trabalhando com novilhas Holandesas 84 dias pré-parto e 105 dias pós-parto, relatou que o grupo suplementado com cobre (+20 ppm além da dieta basal com 6-7 ppm de Cu), em relação ao grupo controle, sem adição de cobre, tiveram menor número de quarto mamário infectado .

O requerimento de cobre na dieta varia de 4 a 12mg/kg MS de acordo com a concentração de molibdênio e enxofre na dieta. A recomendação é de 10mg/kg de MS de cobre para bovinos de corte, se a dieta não exceder 0,25% de S e 2mg/kg de Mo. O enxofre age com o molibdênio no rúmen, formando tiomolibidatos que por sua vez reagem com o cobre formando compostos insolúveis pobremente absorvidos para bovinos pastejando forragens contendo 20mg de Mo/kg. Altas concentrações de ferro e zinco também reduzem o estado de cobre e podem aumentar a necessidade de cobre (NRC, 1996). O NRC (2001) assume uma variação de 12 a 15,7mg/kg de MS de cobre/dia para gado leiteiro, respectivamente, para novilhas e vacas em lactação.

Para Underwood (1981) existiam uma ampla variedade de alterações em ruminantes associadas com a deficiência de Cu simples ou induzidas (alto Mo e S), tais como: anemia, diarréia grave, redução do crescimento, mudança de cor dos pêlos, ataxia neonatal, infertilidade temporária, falência cardíaca e fragilidade dos ossos longos que se quebram com facilidade.

Vitamina E

A vitamina E - descoberta por Evans, Matill e Sure (2003) em 1930 - se apresenta como um fator necessário para a reprodução. Ela existe na forma de a, b e principalmente g tocoferol, todos contendo um anel aromático substituído e uma cadeia hidrocarbônica lateral. A vitamina E reduz as exigências de oxigênio dos músculos e órgãos; atua como anticoagulante; é vasodilatadora de capilares, fortalece as paredes dos capilares; auxilia na regeneração da pele, no processo de coagulação normal do sangue; melhora a ação da insulina na diabete; age como diurético; aumenta o poder e atividade dos músculos; age como antipolvente;

protege os ácidos graxos poliinsaturados (encontrados para o gato, no atum), protege os aminoácidos sulfurados; protege a vitamina A; previne a trombose, arteriosclerose e tromboflebite; aumenta a proporção de HDL-colesterol; protege e é protegida pela vitamina C; aumenta a capacidade dos leucócitos de resistir às infecções; é essencial à reprodução (para cães, suínos, galos, coelhos e peixes) e age como antioxidante, no rompimento da cadeia, neutralizando assim os radicais livres e evitando a peroxidação de lipídios, no interior das membranas. A peroxidação dos lipídios poderá destruir a integridade estrutural das células e ocasionar transtornos metabólicos e por isto causa tantos sintomas diferentes para cada espécie. É importante ressaltar que estas funções estão ligadas à presença e a ação do selênio.

A absorção da vitamina E necessita da presença de micelas mistas de ácido biliar. As doses pequenas são mais absorvidas que as grandes. Na célula epitelial intestinal, a vitamina E entra nos quilomícrons e deixa o intestino pela linfa. Vai ser acumulada em vários órgãos e tecidos e principalmente no fígado. Esta reserva pode ser transferida para as crias e é suficiente até a primeira prenhez, pois os tocoferóis podem ser transmitidos pela placenta e pelas glândulas mamárias.

Selênio e vitamina E apresentam forte relação de sinergismo, diminuindo as exigências de vitamina E na membrana celular e aumentando sua retenção no plasma sanguíneo. Por sua vez, a vitamina E mantém o Se corporal na forma ativa, diminuindo sua perda e prevenindo a oxidação de fosfolipídios da membrana (McDOWELL, 1992; GALYEAN *et al.*, 1999). O selênio também exerce ação antagônica ao enxofre (HENRY & MILES, 2000), podendo substituí-lo em aminoácidos sulfurados e, então, ser incorporado a esqueletos protéicos (produção de selênio-aminoácidos, substituição do grupo sulfidril em sistemas enzimáticos e produção de substâncias tóxicas).

Quelatos

As substâncias capazes de exercer ação quelante são numerosas, sendo representadas, entre outras, por ácidos inorgânicos bifásicos, ácidos orgânicos dicarboxílicos, diaminas, aminoácidos e peptídeos (MALETTTO, 1984). Do ponto de

vista nutricional, apenas quelatos formados com aminoácidos ou dipeptídeos são interessantes.

A estabilidade dos quelatos é dependente do número de átomos que compõem o anel, sendo mais estável com dois ou três átomos, pois resultam em quatro ou seis ligações que formam ângulos tetraédricos do anel heterocíclico que impedem competições com moléculas eletrofílicas e átomos que possam destruir a ligação do quelato. Além disto, depende do número de anéis fechados, onde, quanto maior este número mais estável será o quelato.

Quanto mais básico for o ligante maior será sua capacidade de doar elétrons e mais estável. São mais estáveis quando os ligantes possuem pequeno raio atômico, maior eletronegatividade e devem possuir no mínimo dois átomos doadores de elétrons, como por exemplo, os átomos da coluna V e VI da tabela periódica (LANGWINSKI & PATINO, 2002; ASHMEAD, 1993; GRADDON, 1968 citado por HYNES & KELLY, 1995).

Como se pode observar a seguir, segundo o tipo de ligação que apresentam, os minerais orgânicos ou complexados podem ser classificados como (AFFCO, 1999):

1• Quelato metal-aminoácido: resultado da reação de um sal metálico solúvel com aminoácidos, em proporção molar 1:1, 1:2 (preferencialmente) ou 1:3, a fim de se criarem ligações covalentes. O peso molecular aproximado dos aminoácidos hidrolisados deve ser de 150 Da, visto que o peso molecular total não deve ultrapassar 800 Da;

2• Complexo metal-aminoácido: obtido da complexação de um sal metálico solúvel e um ou mais aminoácidos;

3• Complexo metal-aminoácido específico: semelhante ao anterior, mas resultado da ligação com um aminoácido específico;

4• Metal proteinado: resultado da quelação de um sal metálico solúvel com uma proteína parcialmente hidrolisada;

5• Complexo metal-polissacarídeo: obtido através da complexação de um sal metálico solúvel e uma solução de polissacarídeos.

Cromo

O papel do cromo na nutrição em bovinos demonstrou a importância do elemento em situação de estresse emocional, físico e metabólico, resultante da intensificação da produção, a qual propiciaria maior susceptibilidade a doenças e alterações metabólicas (OLIVEIRA & SOARES FILHO, 2005).

A ação do cromo é basicamente de potencializador da insulina, e sua ausência provoca alterações nos metabolismos dos carboidratos, aminoácidos e lipídeos em ação semelhante ao diabetes, e ainda um efeito supressor no sistema imunológico (BURTON, 1995). Em termos práticos, o cromo desempenharia ação positiva em situações de estresse, tais como, marchas, longas jornadas, desmame, castração, entre outros.

O cromo (Cr) é um dos mais importantes dos novos elementos minerais para bovinos. Na década de 1990, foi reconhecido o potencial do Cr na nutrição de bovinos e suínos ([CHANG & MOWAT, 1992](#)). Nos últimos dez anos, trabalhos científicos têm mostrado a importância do Cr para bovinos, em especial, quando há estresse emocional, físico e metabólico resultante da intensificação das práticas produtivas que propiciam uma maior susceptibilidade às doenças e alterações metabólicas ([BURTON, 1995](#); [MOWAT, 1997](#)).

O Cr funciona como componente integral e biologicamente ativo do fator de tolerância à glicose (GTF), que potencializa a ação da insulina na célula. O átomo de Cr, do GTF, facilita a interação entre a insulina e os receptores dos tecidos musculares e gordurosos ([MERTZ, 1987](#)).

Assim, o GTF com o Cr⁺³ é um mensageiro químico que se liga aos receptores na superfície das células dos tecidos, estimulando sua capacidade de usar a glicose como combustível metabólico, ou armazená-la sob a forma de glicogênio ([ANDERSON, 2001](#)). O GTF é importante não só para o metabolismo dos carboidratos, como também para os de proteínas e lipídeos, e os hormônios do crescimento ([BURTON, 1995](#)).

Ele é requerido para o funcionamento normal das células α , secretoras de

insulina no pâncreas, prevenindo uma super-resposta da secreção de insulina mediante ao estímulo da glicose ([STRIFFLER, 1995](#)). A insulina é um hormônio que promove o processo anabólico e inibe o catabólico nos músculos, fígado e tecido adiposo; para tal, é dependente do GTF.

Em condições de estresse (período pré e pós-parto, no transporte, em alta lotação e variação extrema de temperatura, há aumento dos níveis sanguíneos de glicose e, simultaneamente, do hormônio cortisol, provocando mobilização das reservas de Cr nos tecidos.

O cortisol é antagônico à insulina e, nessa situação, o Cr mobilizado, para ação da insulina, é eliminado pela urina ([MERTZ, 1992](#)). O cortisol tem também efeito imunossupressor do sistema imunológico (resposta imune humoral, células imunemediadoras).

Quando o Cr é insuficiente, a ação da insulina é prejudicada, e há alteração nos metabolismos dos carboidratos, aminoácidos e lipídeos ([BURTON, 1995](#); [MOWAT, 1997](#)), que se soma ao efeito supressor do sistema imunológico (resposta imuno-humoral, células imunemediadoras) mediado pelo cortisol ([MERTZ, 1992](#)).

Nas plantas, o cromo encontra-se, naturalmente, na forma orgânica, em concentração aproximada de 30 a 50 ppb (10⁻⁹). Ele pode, também, estar presente, como contaminante, nas forragens, rações e suplementos minerais ([YANG *et al.*, 1996](#)).

A análise de cromo na dieta é limitada e exige equipamento com alta especificação. [Mowat \(1997\)](#) relatou que altos níveis de ferro (Fe) e zinco (Zn), na dieta interferiram na biodisponibilidade do Cr para bovinos.

As exigências de Cr não são conhecidas. No entanto, a suplementação de Cr é recomendada em situação de alta produção e para animais sob estresse: dieta com baixo teor de proteína, alto fornecimento de silagem; dietas com teores baixos em fibras (0,5 mg/kg da fonte orgânica de Cr); antes do confinamento e três semanas antes do abate (0,2 a 0,3 mg/kg da fonte orgânica); na desmama precoce; no pré e pós-parto.

Recomenda-se uma concentração de 4 a 5 mg/cab./dia da fonte orgânica de Cr, durante as três últimas semanas do pré-parto, e 5 a 6 mg/cab/ dia, durante as três semanas do pós-parto ([CHANG & MOWAT, 1992](#)). As fontes de Cr

recomendadas para suplementação são as leveduras, o picolinato de cromo ou nicotinato de cromo ([MOWAT, 1994, 1996](#)).

Superovulação

Denomina-se superovulação ao aumento do número fisiológico de ovulações próprias da espécie, provocada mediante a administração de gonadotrofinas. No bovino, se considera que houve resposta ao tratamento quando se produzem mais de duas ovulações. A superovulação deve complementar-se com um regime ótimo de inseminação artificial, utilizando sêmen de muito boa qualidade (CABODEVILA & TORQUATI, 2001).

Os principais tipos de hormônios esteróides envolvidos nos processos reprodutivos da fêmea são os progestágenos e estrógenos. O progestágeno mais importante é a progesterona, a qual é produzida pelo corpo lúteo (CL), a placenta e córtex adrenal. A síntese de progesterona pelo CL é controlada pelo hormônio luteinizante (LH) no animal não gestante; a prolactina (PRL) também mantém o CL (efeito luteotrópico) em algumas espécies, particularmente em ratas, camundongas e ovelhas. Os locais de produção de estrogênio são: ovários (células da granulosa dos folículos ovarianos), a unidade fetoplacentária e o córtex adrenal. A síntese ovariana de estrogênio é controlada pelo hormônio folículo estimulante (FSH), que atua nas células da granulosa. O LH também desempenha um papel vital na síntese do estrogênio, na qual controla a produção da molécula precursora essencial (testosterona) pelas células da teca interna (STANBENFELDT & EDQVIST, 1996).

O hormônio folículoestimulante (FSH) tem função essencial no desenvolvimento dos folículos. O uso de FSH exógeno para induzir a superovulação é baseado nessa função fisiológica. Folículos em vários estágios de desenvolvimento estão normalmente presentes nos ovários, em qualquer tempo. Grupos consecutivos de folículos menores crescem, maturam e degeneram ou ovulam. O FSH estimula o crescimento dos folículos menores. FSH exógeno reverte a atresia de folículos acima de 1,7mm. O hormônio luteinizante (LH) estimula a produção de andrógenos na teca interna. Andrógenos tecais são usados como precursores para a produção de estrógenos pelas células granulosas que foram estimuladas pelo FSH (BÉNYEI & BARROS, 2000).

Os animais das raças zebuínas são mais sensíveis aos medicamentos para indução de desenvolvimento folicular em comparação com os das raças européias. Animais da raça Nelore possuem ovários, folículos e corpos lúteos menores, o que pode estar relacionado à exigência de menor quantidade de FSH para a indução da superovulação (VISINTIN *et al.*, 1999).

O controle farmacológico do ciclo estral e da ovulação de vacas zebuínas (*Bos taurus indicus*) depende primeiramente do entendimento do comportamento fisiológico reprodutivo da vaca, o qual está ligado diretamente ao seu estado nutricional e condição, parida ou solteira (MOREIRA, 2002).

A alta variabilidade de respostas aos tratamentos superovulatórios têm motivado a realização de estudos com a finalidade de formular protocolos com capacidade de estabilizar e racionalizar os programas de superovulação (ANDRADE *et al.*, 1999).

Dois fatores muito importantes agem na variação da resposta ovariana: tratamento com gonadotrofinas por protocolo e condição ovariana e o tempo de tratamento com gonadotrofinas (ALVAREZ *et al.*, 1998).

O crescimento folicular pode ser sincronizado com diferentes drogas tais como progesterona, estradiol, uma combinação de progesterona e estradiol, GnRH. O emprego de progesterona ou progestágenos em doses elevadas pode suprimir o suporte de LH para o folículo dominante, induzindo assim atresia do folículo (THATCHER *et al.*, 2001).

O LH excessivo durante o tratamento de superovulação causa a ativação prematura dos oocistos. Em vacas superovuladas com FSH, a alta contaminação de LH resultou em baixa fecundação (BÉNYEI & BARROS, 2000).

O crescimento dos folículos ovarianos em bovinos ocorre em um padrão denominado ondas de crescimento folicular, onde em um ciclo há normalmente a emergência de duas ou três ondas de crescimento folicular. Durante o ciclo estral uma onda de folículos emerge entre os dias 1 e 3 após o estro. São geralmente, em torno de 10 a 50 folículos neste grupo com o tamanho de 2 a 3mm cada. Nos dias subseqüentes, parte desses folículos crescem para 4 a 6mm, sendo que 2 a 5 folículos maiores do grupo continuarão a crescer enquanto que os outros regridem. Neste grupo de folículos, pelo menos um continua a crescer e torna-se dominante,

momento denominado divergência. Após esse momento, a maioria dos folículos inicia sua atresia (MOREIRA, 2002).

O tratamento superovulatório deve ser realizado no começo de uma onda folicular, antes da seleção do folículo dominante, para obter-se a melhor resposta possível (BÓ, 2002).

O número de ondas por ciclo parece estar associado com a duração do ciclo estral e com a duração da fase luteínica. Isto pode ser demonstrado pelo surgimento de novas ondas de crescimento folicular quando se prolonga a fase luteínica pela administração de progesterona exógena. O folículo dominante presente na fase em que ocorre a luteólise torna-se ovulatório (BORGES *et al.*, 2001) Injeções de FSH exógeno (eCG ou FSH) são amplamente utilizadas em programas de ovulação múltipla/transfência de embriões para aumentar a produção de embriões de animais de qualidade genética. Aplicações subcutâneas ou intramusculares de eCG ou FSH estimulam o crescimento de folículos adicionais, os quais ovulam espontaneamente sem a necessidade de LH ou hCG exógeno em vacas, búfalas, ovelhas e cabras (JAINUDEEN *et al.*, 2004).

O tratamento superovulatório não promove o desenvolvimento folicular e sim, fornece aqueles folículos que normalmente se tornariam atrésicos, um meio hormonal adequado para que continuem seus processos de maturação, culminando com a ovulação (DINIZ *et al.*, 1999).

Em bovinos, o cortisol endógeno liberado pelo estresse pode suprimir o pico de LH e ovulação ou diminuir a resposta superovulatória, que poderia confundir a sensibilidade para gonadotrofinas exógenas (COSTA *et al.*, 2001).

Existem diversos protocolos de superovulação, utilizando o cio natural ou em qualquer fase do ciclo estral. No cio natural inicia-se o tratamento superovulatório entre 8 e 12 dias após a manifestação do estro, coincidindo com o início da segunda onda folicular. Realizam-se 8 aplicações de FSH com intervalos de 12 horas, para aumentar o recrutamento dos folículos. No terceiro dia da superovulação, realizam-se 2 aplicações de prostaglandina com o intuito da luteólise do corpo lúteo, para que haja redução da progesterona e conseqüente pico de LH, ocorrendo assim a ovulação (BÓ, 2002).

O benzoato de estradiol é utilizado em protocolos de superovulação com a função de suprimir o desenvolvimento folicular e sua resposta em tratamentos superovulatórios, sendo mais eficaz quando combinado com aplicação intramuscular de progesterona (P4), na introdução de implante vaginal, CIDR®, ou auricular, CRESTAR®, Norgestomet.

A TE é uma biotécnica que permite recolher embriões de uma fêmea doadora e transferi-los para fêmeas receptoras com a finalidade de complementarem o período de gestação (REICHENBACH *et al.*, 2002). A principal meta do programa de transferência de embriões é a superovulação, obtendo-se o número alto e satisfatório de embriões viáveis por doadora, através do aumento do número de oocistos liberados após administração de hormônios exógenos, e posterior transferência dos embriões obtidos para o trato reprodutivo de receptoras para completarem a gestação (RUMPF *et al.*, 2000).

A TE consiste na estimulação hormonal do aparelho reprodutivo de uma fêmea, dita doadora para conduzir o desenvolvimento e a maturação de vários folículos ovarianos simultaneamente. Entre os dias 6 e 8 após a inseminação artificial (IA), os embriões são coletados através de uma lavagem uterina e transferidos para vacas, ditas receptoras, que levarão a gestação a termo. A importância básica da TE para a produção animal está na possibilidade de uma fêmea produzir um número de descendentes muito superiores ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva (REICHENBACH *et al.*, 2002).

Para a produção animal, os aspectos mais importantes da TE são os seguintes:

- Expansão genética em núcleos de vacas pré-selecionadas;
- Aumento da intensidade de seleção nas fêmeas;
- Comércio de embriões;
- Criopreservação de raças em perigo de extinção.

Diversos fatores podem influenciar os resultados no momento da TE. Para doadoras, os fatores do meio são os mais importantes, e dentre estes, os aspectos nutricionais apresentam grande relevância (FERNANDES *et al.*, 2006).

Segundo Alberto (2001), a seleção e manejo das doadoras são um dos

pontos críticos da TE, haja vista a necessidade de utilizar animais sem distúrbios reprodutivos com ciclo estral regular e em adequado estado nutricional.

O objetivo do tratamento superovulatório em bovinos é o de obter o número máximo de embriões fertilizados e transferidos com alta probabilidade de ocorrência de prenhes (MAPLETOFT *et al.*, 2002).

A fonte mais provável de variabilidade das respostas ovarianas à estimulação exógena por gonadotrofinas poderia ser a fase do ciclo estral em que a fêmea se encontra no início do tratamento (DINIZ *et al.*, 1999).

A variação individual e o tipo de hormônio são fatores importantes que interferem na resposta superovulatória. O estado ovariano no momento do tratamento parece ser fator determinante na resposta superovulatória, sendo uma característica constantemente pesquisada para elevar o índice de recuperação de embriões viáveis. Existem outros componentes da dinâmica folicular, como o tamanho, a distribuição e as condições dos folículos antrais que podem afetar a resposta ovulatória frente ao tratamento hormonal (VISINTIN *et al.*, 1999).

Donaldson (1983, 1984) demonstrou que apesar de que se cumprirem todos os requisitos, a resposta superovulatória resulta em muita variação. Em um estudo que envolveu 1263 doadoras, somente 68% das fêmeas induzidas a superovulação produziram embriões transferíveis.

Segundo Cabodevila & Torquati (2001), os efeitos negativos de altas doses de gonadotrofinas se relacionam com os fenômenos de superestimulação ovárica. Dos animais superestimulados, geralmente se obtêm também uma menor taxa de coleta (ovócitos e embriões em função dos corpos lúteos palpados ou observados). Têm-se atribuído a ela as seguintes razões: retenção de oócitos nos folículos luteinizados e nos corpos lúteos; retenção de oócitos e/ou embriões nos ovidutos; níveis muito altos de estrógenos produzidos pelos grandes folículos não ovulados que bloqueariam a capacidade de captação das fímbrias com a conseguinte caída de ovócitos na cavidade abdominal.

Nem sempre a ovulação está sincronizada nos tratamentos superovulatórios e, portanto, existem dificuldades no acerto das inseminações realizadas, levando à recuperação de inúmeras estruturas não fecundadas. A má observação do estro e a experiência do técnico também podem levar a este resultado. O GnRH e o LH tem

vido muito utilizados para o controle da ovulação. A aplicação de um ou outro hormônio sincroniza a ovulação, permitindo a inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

4 MATERIAL E MÉTODOS

Local

O trabalho foi realizado de abril a novembro de 2006. Foram feitas 42 colheitas de embriões, numa propriedade rural, localizada no município de São João Batista do Glória – Minas Gerais, que possui um programa comercial de transferência de embriões.

Doadoras

Foram utilizadas como doadoras de embrião 21 vacas e novilhas, da raça Guzerá, com peso corporal acima de 350 Kg, idade variando entre 20 e 60 meses. Estes animais estavam ciclando em intervalos regulares (21 ± 3 dias). Inicialmente, passaram por exame ginecológico de palpação retal, ultra-sonografia e vaginoscopia, visando detectar-se alguma anormalidade que pudesse desclassificá-los da condição de doadora, como cérvix extremamente tortuosa, aplasias e aderências. Tais animais receberam a mesma alimentação durante todo o período experimental, visando um balanço energético positivo segundo o NRC (Nutrient Requirement Council, 1988) e manutenção de um escore corporal de 3 a 4 (numa escala de 1 a 5 – segundo FERREIRA, 1990).

Os animais foram mantidos em piquetes, na presença de um rufião, na proporção de 1 rufião para 21 fêmeas, para o auxílio na detecção de estro, o qual foi observado visualmente, 3 vezes ao dia, em intervalos de 8 horas. A condição a ser adotada para se considerar o animal em estro foi o reflexo de imobilidade.

Programa existente, avaliação dos dados históricos: como estratificados

Todos os animais foram utilizados pelo menos uma vez no grupo tratado e no grupo controle. Este esquema de delineamento em “cross-over” permite que os animais figurem nos grupos controle e tratado. Para a variável produção de embriões, este delineamento é o mais apropriado, visto o grande coeficiente de variação.

No grupo tratado, os animais receberam 20ml diariamente, de forma individual, via oral, do produto Canter OF[®], iniciando-se o tratamento 30 dias antes da colheita dos embriões.

Estes animais foram diariamente para uma cocheira individual para receber alimentação diária e administração do produto. Os animais do grupo controle, também foram levados diariamente para uma cocheira individual para receber alimentação diária, porém não receberam qualquer tratamento. Este procedimento visa submeter ambos os grupos ao mesmo estresse, e evitar que esta seja uma variável que possa influenciar de forma distinta os dois grupos.

Para as coletas de um mesmo animal, grupos tratado e controle, foram utilizados sêmen de um mesmo touro, de uma mesma partida, evitando diferenças decorrentes desta variável.

Avaliações Ultra-sonográficas

A avaliação ultra-sonográfica dos ovários foi feita no dia da colheita, mensurando o número de corpos lúteos, indicativos de ovulação, nos animais do grupo controle e tratado.

O exame ultra-sonográfico foi realizado com um aparelho portátil, marca Esaote, modelo Águila, que opera com um sistema de ultra-sonografia de varredura linear em tempo real, utilizando um transdutor para avaliação endo-retal de frequência de 6-8Mhz. As imagens geradas foram gravadas cartão de memória (recurso do aparelho) para posterior análise e comparação com outros exames. Em

cada exame foi mensurado o número de corpos lúteos, em ambos os ovários, conforme o esquema descrito por Viana (1996).

Esquema de superovulação, coleta dos embriões e avaliação dos mesmos

Para o tratamento superovulatório de um mesmo animal foi usado sempre o mesmo hormônio (Folltropin-V[®] Vethrepharm Inc), mesma partida em dosagens iguais. O sêmen utilizado foi avaliado anteriormente para evitarem-se alterações no número e qualidade dos embriões devido a estes fatores. Todos os animais foram superovulados e coletados pelo menos duas vezes. Os animais foram superovulados com intervalo mínimo de 50 dias.



Figura 1. Esquema de manipulação hormonal de doadoras e receptoras

Após a constatação de estarem ciclando regularmente, os animais receberam, em grupos de quatro (dois tratados e dois controle), num dia pré-estabelecido, um implante intra-vaginal de progesterona (CIDR[®] – Pfizer). No dia seguinte, visando a eliminação de um possível folículo dominante e o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular, foram aplicados 3 mg de Benzoato de Estradiol (Ric-Be[®] – Sintex). Após quatro dias da aplicação do análogo do estradiol, foi iniciada a superovulação.

O protocolo de superovulação adotado foi o de oito doses decrescentes, intervaladas de 12 horas, perfazendo um total de 130 mg (Folltropin - Vetrepharm) para cada estimulação. A luteólise foi induzida com 0,530 mg de Cloprostenol sódico (Sincrocio[®] – Ouro Fino – 50mg) no momento da sétima aplicação de FSH.

Juntamente com a oitava aplicação o implante de progesterona foi removido. Uma vez em estro, os animais foram inseminados por duas vezes: 12 e 24 horas após o início das manifestações.

Os embriões foram colhidos pelo método não cirúrgico, de 6,5 a 7,0 dias após as inseminações. Os procedimentos realizados seguem a técnica descrita por Fernandes (1994). Após a limpeza manual do reto ou após a colheita de embriões, procedeu-se à avaliação da resposta superovulatória pela contagem via retal do número de corpos lúteos e folículos de cada ovário, por palpação retal e também por ultra-sonografia, conforme descrito anteriormente. Após este procedimento de avaliação realizou-se assepsia local e aplicaram entre a primeira e a segunda vértebra coccígea, 6 a 8mL de xilocaína a 2% (Anestésico Pearson[®] - Laboratório Pearson - Brasil) objetivando uma anestesia peridural baixa.

Feita a análise e mensuração da resposta ovariana (por palpação transretal e ultra-sonografia) e a anestesia, toda a região perivulvar foi lavada com sabão neutro e posteriormente foi seca e desinfetada com álcool iodado. Introduziu-se na cérvix o cateter de colheita (cateter de Foley nº 16 ou 18 - AB Technology - EUA) com um mandril de aço inoxidável em seu interior, dirigindo-o sempre para o corno ipsilateral ao ovário que apresentasse melhor resposta à superovulação. Com a extremidade do cateter posicionado no terço médio do corno uterino, o balonete do mesmo foi inflado com certa quantidade do líquido de colheita, suficiente para este se fixar no local e evitar refluxo e perda de líquido durante a colheita. O mandril foi cuidadosamente retirado, segurando-se a porção do corno uterino imediatamente caudal ao balonete.

Para a lavagem uterina, o recipiente com o líquido de colheita (DPBS[®] – Nutricell – Brasil) foi posicionado cerca de 50cm acima do dorso da doadora, de forma que o líquido poderia fluir para o útero por gravidade. Utilizou-se como circuito de colheita um aparato composto de mangueiras de borracha siliconizadas com presilhas para interrupção de fluxo, acopladas. Uma extremidade do circuito foi conectada ao frasco contendo o líquido de colheita, a outra à extremidade do cateter e a terceira ao filtro destinado a receber as estruturas de origem uterina. Com o útero identificado por via retal, procedeu-se ao fluxo de líquido para o interior do mesmo. Uma vez repleto o corno uterino, a entrada de líquido foi interrompida e o corno uterino levemente massageado. Após a massagem, procurou-se segurar a

extremidade deste corno quando então se permitiu o esvaziamento do mesmo. Foram feitas de 5 a 6 lavagens em cada corno. Terminado o procedimento em um corno, o balonete foi desinflado e retirou-se o cateter. Fora do animal, o mandril de aço foi novamente acoplado ao cateter e este reintroduzido no animal, sendo agora dirigido para o outro corno uterino, onde se realizou o mesmo procedimento. Foram utilizados para as lavagens de ambos os cornos uterinos aproximadamente 800mL de DPBS.

O líquido recuperado das lavagens uterinas, executadas em circuito fechado, foi passado por um filtro apropriado (Coletor de embriões - Millipore[®]) com diâmetro dos poros de 80 micra (0,08mm), onde os embriões ficaram retidos. Tomou-se sempre o cuidado de manter uma certa quantidade de líquido de colheita dentro do filtro para evitar o ressecamento dos embriões.

Rasteamento e manipulação dos embriões

O conteúdo do filtro de colheita foi passado para uma placa de petri tamanho 100x20mm (Corning[™] - EUA), com fundo quadriculado. Utilizou-se um pequeno volume adicional de DPBS para lavar o filtro e evitar a permanência de algum embrião no mesmo. Após passagem do líquido do filtro de colheita para a placa esta foi deixada em repouso por um período de cinco minutos para a decantação dos embriões. Na placa de petri as estruturas presentes foram rasteadas e identificadas. Tal procedimento foi executado com o auxílio de um microscópio estereoscópico trinocular (Carton SCZ-T4[™] – Carton – Japão), num aumento de 20 vezes.

Uma vez identificada, cada estrutura foi transportada por meio de uma pipeta automática (0,01mL) acoplada a uma ponteira estéril, para uma outra placa menor, tamanho 35x10mm (Corning[™] - EUA), contendo meio de manipulação, (Meio TQC Holding – Brasil). Ambas as placas foram mantidas a temperatura ambiente durante a manipulação. A placa 100x20 foi rasteada pelo menos quatro vezes, e entre cada procedimento o conteúdo foi misturado no sentido de auxiliar a identificação de alguma estrutura, não observada nos rasteamentos anteriores. Os embriões foram classificados após o término do rasteamento, no mesmo equipamento.

Após o rasteamento e identificação das estruturas, estas foram classificadas, já na placa 35x10. Para classificação utilizou-se um aumento de 80x, analisando cada estrutura individualmente e movimentando a mesma no meio, para que se pudesse avaliar o embrião por diferentes ângulos. Foram feitas duas classificações, uma quanto ao estágio de desenvolvimento (tabela 1) e outra quanto à qualidade (constituição morfológica). A classificação quanto à qualidade seguiu os parâmetros expressos na tabela 2.

Tabela 1 - Descrição dos parâmetros utilizados para classificação do estágio de desenvolvimento de embriões bovinos.

Classificação	Idade em dias	Descrição
Mórula	5 a 5½	Os blastômeros formam uma massa celular que ocupa cerca de 70% do espaço perivitelínico. É possível individualizar cada blastômero num aumento superior a 60x.
Mórula compacta	6 a 6½	A massa celular sofre uma compactação e ocupa cerca de 60% do espaço perivitelínico. Não é possível individualizar os blastômeros
Blastocisto inicial	6½ a 7	Ocorre a formação da blastocele, que é uma cavidade preenchida por líquido no interior da massa celular que ocupa cerca de 80% do espaço perivitelínico
Blastocisto	7	Ocorre diferenciação entre as células do trofoblasto e botão embrionário. A blastocele aumenta de tamanho e o embrião ocupa quase todo o espaço perivitelínico
Blastocisto expandido	7 a 8	O diâmetro do embrião aumenta cerca de 50% e ocorre uma diminuição da espessura da zona pelúcida
Blastocisto eclodido	8 a 9	Ocorre a ruptura da zona pelúcida. Esta estrutura pode inclusive estar ausente.

A classificação quanto à qualidade foi feita simultaneamente à avaliação do estágio de desenvolvimento, considerando os aspectos morfológicos descritos na

Tabela 1. Esta classificação atribui a cada estrutura um valor de um a cinco, de acordo com a morfologia apresentada, considerando os parâmetros de avaliação morfológica. A relação entre a qualidade e o escore de classificação está descrito na Tabela 3.

Tabela 2- Descrição dos parâmetros utilizados para classificação dos embriões bovinos quanto à qualidade (constituição morfológica).

Característica	Avaliação
Formato	O embrião deve ter sempre o formato externo esférico, que é a forma normal da zona pelúcida. Quaisquer alterações neste formato, como depressões e saliências, indicam queda na viabilidade. Internamente a massa celular também deve possuir um formato próximo a uma esfera.
Simetria	A possibilidade hipotética de divisão do embrião em duas metades idênticas também é levada em consideração. A movimentação da estrutura deve fornecer um plano onde se pode dividir a mesma em duas partes iguais.
Coloração	Deve ser homogênea. Áreas de coloração irregular indicam células degeneradas (mortas) e formação de vesículas que reduzem a qualidade. A blastocele é sempre mais clara que a massa de células.
Extrusão celular	Diz respeito às células que se desprendem da massa principal, ficando na periferia da mesma. Quanto maior a quantidade destas células extrusadas, menor o número de células do embrião, e sua viabilidade.
Zona Pelúcida	Tem a função de proteger o embrião. Além de ser totalmente esférica, a zona pelúcida não deve ter áreas de lesão ou ruptura.

Tabela 3- Escore de classificação e qualidade embrionária.

Classificação	Qualidade	Avaliação
1	Excelente	Praticamente nenhuma alteração morfológica
2	Bom	Pequenas alterações morfológicas
3	Regular	Alterações morfológicas significativas
4	Degenerado	Comprometimento morfológico total

Receptoras, transferência dos embriões e diagnóstico de gestação

Os embriões encontrados na placa de Petri, avaliados morfológicamente e que foram classificados como viáveis, foram inovulados em receptoras. Para transferência a fresco, o embrião deve sofrer três banhos consecutivos com meio de manutenção (TQC Holding) para lavagem. Após os banhos, o embrião foi envasado em palhetas de 0,25 ml. A palheta é carregada em primeiro lugar com o meio de manutenção, deixa um espaço com ar e logo se carrega o embrião com meio de manutenção. Posteriormente, a segunda coluna de ar e a última, o embrião é carregado novamente com o meio de manutenção.

A palheta que contem o embrião foi colocada em uma bainha estéril e em seguida no inovulador. Para manter a bainha do inovulador livre de contaminações, foi usada a camisinha sanitária.

Foram utilizadas como receptoras novilhas e vacas mestiças, com peso corporal superior a 350 kg. Estes animais foram avaliados anteriormente, por palpação retal e vaginoscopia, visando-se a detecção de alguma anomalia que pudesse prejudicar a fertilidade.

Foram realizados dois diagnósticos de gestação. O primeiro entre 21 e 25 dias após a inovulação (28 a 32 dias de gestação) e o segundo entre 53 e 73 dias pós-inovulação (60 a 80 dias de gestação). O diagnóstico precoce, ou seja, com cerca de 30 dias de gestação teve como objetivo avaliar a viabilidade dos embriões em desenvolvimento. O acompanhamento da gestação foi realizado para monitoramento das perdas embrionárias.

Análises estatísticas

Para as variáveis foram calculadas medidas de tendência central (média e

mediana) e medidas de dispersão (desvio padrão e coeficiente de variação) para dados obtidos nos dois grupos, Tratado e Controle. Para a comparação das variáveis mensuradas entre os grupos, foi utilizado o teste de “t” para amostras pareadas. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, a comparação entre os dois grupos foi realizada o teste não paramétrico de Wilcoxon (ZAR, 1984).

Foram avaliadas e comparadas entre os tratamentos as seguintes variáveis:

- Estruturas ovarianas, corpos lúteos e folículos no dia da coleta;
- Taxa de recuperação embrionária média;
- Total de estruturas produzidas;
- Média de embriões viáveis ou degenerados e oócitos não fecundados.
- Taxa de gestação das receptoras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas durante todo o período experimental quaisquer reações indesejáveis que pudessem ser relacionadas à aplicação do produto. Os animais, após as primeiras administrações, passaram a procurar o produto, mostrando que o mesmo é palatável para bovinos.

Resultados relacionados à superovulação

Todos os dados expostos representam a média \pm erro padrão.

A Tabela 4 mostrou que quando se analisam todos os animais utilizados neste trabalho não se observam diferenças entre o número total de estruturas ovarianas entre o grupo Controle e o Tratado com Canter OF[®]. Foram observadas em média $10,74 \pm 1,76$ e $9,45 \pm 1,48$ ovulações em ambos os ovários para os dois grupos, respectivamente.

O total médio de estruturas (embriões totais) recuperadas também não foi estatisticamente diferente no Grupo tratado com Canter OF[®]. Isto provavelmente ocorreu devido ao elevado desvio padrão que esta variável apresenta (Fernandes, 2000).

As taxas de recuperação embrionárias médias, que são obtidas dividindo-se o total de estruturas recuperadas pelo total de corpos lúteos detectados nos ovários no dia da coleta, foram de $59,17 \pm 10,37\%$ e $51,91 \pm 9,51,2\%$, para os grupos controle e tratado com Canter OF[®]. Valores semelhantes aos citados por Fernandes (2000).

Não foram observados no dia da colheita dos embriões, diferenças relacionadas à população folicular dos animais nos dois grupos.

Nenhuma variável apresenta diferença estatística pelos testes não paramétricos (WILCOXON) ou análise de variância (ANOVA).

Tabela 4 - Resultados de superovulação e produção embrionária em animais tratados e não tratados com Canter OF.

Tratamentos	Animais	Ovulações	Estruturas totais	Taxa de Recuperação (%)
Controle	19	10,74±1,76	6,53±1,65	59,17±10,37
Canter OF	22	9,45±1,48	5,96±1,38	51,91±9,51
Total	41	10,05±1,13	6,22±1,05	55,27±6,94

Tabela 5 - Resultados de superovulação e produção embrionária em animais tratados e não tratados com Canter OF.

Tratamentos	Animais	Estruturas transferidas	Degenerados ou oócitos	Gestações	Taxa gestação(%)
Controle	19	3,95±0,97	1,89±0,70	1,95±0,66	32,10±7,51
Canter OF	22	4,45±1,01	1,05±0,29	2,14±0,49	35,35±6,35
Total	41	4,22±0,70	1,44±0,36	2,05±0,40	33,84±4,82

Tabela 6 - Resultados pareados de superovulação de todos os animais tratados e não tratados com Canter OF.

Tratamentos	Animais	Ovulações	Estruturas Totais	Taxa de Recuperação
Controle	14	10,20±2,04	7,64±2,06	71,67±11,51
Canter OF	14	9,79 ±1,73	6,64±1,71	62,57±10,07
Total	28	10,20±1,31	7,14±1,32	67,12±7,56

Tabela 7 - Resultados pareados de superovulação de todos animais tratados e não tratados com Canter OF.

Tratamentos	Animais	Estruturas transferidas	Degenerados ou oócitos	Gestações	Taxa de Gestação (%)
Controle	14	4,64±1,24	2,11±0,73	2,29±0,86	36,42 ± 8,78
Canter OF	14	4,68±1,03	1,21±0,41	2,29±0,54	48,32 ± 6,37
Total	28	4,66 ±0,79	1,66 ± 0,42	2,29 ±0,50	42,37± 5,44

A tabela 5 mostra o número médio de ovulações e a produção total de embriões nos animais, tratados ou não com Canter OF[®]. Nestes animais, nenhuma variável apresenta diferença estatística pelos testes não paramétricos (WILCOXON) ou TESTE T; todos os dados expostos representam a média ± erro padrão.

A média de embriões viáveis por colheita também não diferiu entre os grupos. Houve uma diferença numérica de quase um embrião viável a mais para o grupo tratado com CanterOF[®], o que representa cerca de 13% a mais de embriões viáveis. Mais uma vez, o elevado desvio padrão desta variável não permitiu que existisse diferença estatística entre os grupos.

Número e taxa de gestação

O número médio de gestações/colheita não foi superior no grupo tratado com Canter OF[®]. Neste grupo conseguiu-se, em média, apenas 0,2 gestações a mais que o grupo controle, ou seja, 24,58% a mais de prenhez por coleta. A taxa de gestação média das receptoras que foram inovuladas com embriões originados de doadoras tratadas com Canter OF[®] também não foi numericamente superior

Doadoras com histórico de baixa produção embrionária

Quando se estratificam as doadoras em animais de diferentes categorias, relacionadas à resposta à superovulação e produção embrionária os resultados do tratamento com Canter OF[®] são muito diferentes. Em vacas com boa resposta ovariana e produção embrionária satisfatória ou boa (>3 embriões viáveis/colheita) a administração do produto não se mostrou eficiente em nenhuma das variáveis avaliadas.

Tabela 8- Resultados pareados de superovulação e produção embrionária em de todos animais com histórico de baixa resposta superovulatória.

Tratamentos	Animais	Ovulações	Estruturas totais	Taxa de Recuperação. (%)
Controle	6	4,08±1,08	1,25±0,44	40,14±13,85
Canter OF	6	7,67 ±2,70	7,50±2,68	76,88±17,80
Total	12	5,87±1,49	4,38±1,60	58,51±12,10

Todos os dados expostos representam a média ± erro padrão (P<0,05).

Tabela 9- Resultados pareados de superovulação e produção embrionária em de todos animais com histórico de baixa resposta superovulatória.

Tratamentos	Animais	Estruturas Transferidas	Degenerados ou Oócitos	Gestações	Taxa Gestação (%)
Controle	6	1,08±0,49	0,33±0,21	0,42±0,20	27,78 ± 16,48
Canter OF	6	4,75±1,66	2,33±1,61	2,50±0,75	52,36 ± 13,70
Total	12	2,92 ±0,99	1,33 ± 0,83	1,46 ±0,49	40,07± 10,87

Todos os dados expostos representam a média ± erro padrão (P<0,05).

Tabela 10- Resultados pareados de superovulação e produção embrionária em de todos animais com histórico de boa resposta superovulatória.

Tratamentos	Animais	Ovulações	Estruturas totais	TX RECUPERAÇÃO (%)
Controle	9	12,44±1,52	7,67±1,66	65,20±13,39
Canter	9	14,67±2,24	9,00±2,90	59,57±16,13
Total	18	13,56±1,34	8,33±1,63	62,39±10,19

EXECUTADO TESTE T PARA TODAS AS VARIÁVEIS (P>0,05)

Todos os dados expostos representam a média ± erro padrão.

Tabela 11- Resultados pareados de superovulação e produção embrionária em de todos animais com histórico de boa resposta superovulatória.

Tratamentos	Animais	Estruturas transferidas	Degenerados ou oócitos	Gestações	Tx gestação (%)
Controle	9	5,22±0,91	2,22 ±0,76	2,06±1,38	40,95±9,84
Canter	9	5,44±1,90	1,83±0,71	3,11±1,38	38,05±10,05
Total	18	5,33±1,02	2,03±0,51	2,58±0,72	39,5±6,83

EXECUTADO TESTE T PARA TODAS AS VARIÁVEIS (P>0,05)

Todos os dados expostos representam a média ± erro padrão.

Quando se avaliam as vacas cujo histórico era de resposta superovulatória < 4 corpos lúteos/estimulação e produção embrionária < 3 embriões viáveis por coleta, os resultados do tratamento com Canter OF[®] são diferentes. Para estes animais, ao contrário do que ocorreu quando foram avaliadas todas as colheitas, todas as variáveis foram superiores no grupo tratado com Canter OF[®].

O tratamento com Canter OF[®] fez aumentar a resposta superovulatória. Houve um incremento médio de 73,3% no número de ovulações

Vários autores retrataram que o efeito do aporte de energia e outros componentes da dieta sobre a taxa de ovulação. A influência ocorre à partir de 4 - 6 dias após a mudança de aporte nutricional (OLDHAM & LINDSAY, 1984; STEWART & OLDHAM, 1986). O processo ovulatório é o principal mecanismo influenciado pelo ambiente nutricional. Nas espécies domésticas que possuem varias ovulações por ciclo, o número destas pode variar de acordo com o aspecto nutricional. A taxa de gestação média foi superior ($P < 0,05$) nos animais tratados com Canter OF[®]. Foram obtidos valores de $0,42 \pm 0,20$ e $2,5 \pm 0,75$ para os animais dos grupos Controle e Tratado.

O número médio de embriões viáveis, assim como o total médio de gestações foi superior quando as doadoras foram tratadas com Canter OF[®]. Estes resultados podem ter ocorrido pelo efeito do produto por estimular maior desenvolvimento folicular e produção embrionária, proporcionam que os oócitos produzidos por estes folículos que ovularam sejam de boa qualidade e possam ser fecundados. O número de gestações produzidas por coleta após o tratamento com Canter OF[®] neste grupo de doadoras está inclusive igual ao da média descrita na literatura, segundo a IETS (2004), que é de 2,5 gestações por coleta. Assim sendo, com a utilização do Canter OF[®], doadoras que não eram viáveis num processo comercial de produção de embriões, podem alcançar esta viabilidade.

6 CONCLUSÕES

O Produto, no protocolo utilizado não foi eficiente em alterar qualquer das variáveis analisadas neste trabalho;

Ao se analisarem apenas as doadoras com históricos de produção embrionária ruim, o protocolo foi capaz de melhorar, nos animais tratados, o número de ovulações induzidas, produção embrionária total e embriões viáveis.

7 REFERÊNCIAS

ALBERTO, R.H. Manejo de doadoras e receptoras In: PALMA, G.A. **Biotechnologia de la reproducción**. Buenos Aires: INTA, 2001, p.21-26.

ALVAREZ, R.H. et al. Endocrine profiles and ovulation rate of cows superovulated with FSH following passive immunization against steroid free-bovine follicular fluid. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.35, nº. 6, 1998. Disponível em:< <http://www.scielo.br/scielo.php>.> Acesso em 13 jan.2008.

ANDERSON, L.E. et al. Prostaglandin F_{2α} receptor in the Corpus Luteum: recent information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1041-1047, 2001.

ANDRADE, J.C.O. et al. Diferentes protocolos de superovulação em vacas Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n.3, p. 317-318, 1999.

ARECHIGA C.F. et al. Effects of timed insemination and supplemental beta-carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.390-402, 1998a.

ARECHIGA C.F. et al. Effect of injection of -carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. **Theriogenology**, v.50, p.65-76, 1998b.

ASHMEAD, H. D. Comparative intestinal absorption and subsequent metabolism of metal amino acid chelates and inorganic metals salts. In: **The roles of amino acid chelates in animal nutrition**. New Jersey : Noyes, 1993, p. 47-51.

ASSOCIATION OF AMERICAN FEED CONTROL OFFICIALS (AFFCO). **Official Publication**. Atlanta, 1999. 162p.

BENYEI, B.; BARROS, C.C.W. Effect of superovulation on performance of bovine embryo donors imported from temperate zone to tropical climate during the first two years of adaptation. **Arq. Bras. Med. Zootec.**, v. 52, n. 4, p. 366-371, ago. 2000.

BINDAS, E.M. et al. Reproductive performance of lactating Holstein cows fed supplemental B-carotene. **J. Dairy Sci.**,v. 69, 1986, p. 2173.

BÓ, G.A. Sincronización del desarrollo folicular y luteal in grupos de donantes y receptoras de embriones bovinos. In: II CURSO DE ABORDAGEM TEÓRICO-PRÁTICA DE NOVAS TÉCNICAS DE SINCRONIZAÇÃO SEM OBSERVAÇÃO DE CIO EM BOVINOS (IA e TE) 2002. Cornélio Procópio-PR: Outubro de 2002.

BÓ, Gabriel A. et al. Protocolos de transferência de embriões em tempo fixo para receptoras de embriões bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 17-23, 2006a.

BÓ, Gabriel A. et al. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, Estados Unidos, v. 65, p. 89-101, 2006b.

BORGES, A.M. et al. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. **Arq. Bras.Med.Vet. Zootec.**, v.53, n.5, p. 595-604, out. 2001.

BRASS E.P. Carnitine as ergogenic aid in health and disease. **J Am Coll Nutr.** v.17, n.3, p. 203-204, 1998.

BURTON, J. L. Supplemental chromium: its benefits to the bovine immune system. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 53, n. 3, p. 117-133, 1995.

CABODEVILA, J.; TORQUATI, S. Superovulación de hembras bovinas. In: PALMA, G.A. **Biología de la Reproducción**. Balcarce, Argentina: Ediciones, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria., 2001. Cap. VI. p.79-108.

CERRETELLI, P.; MARCONI, C. L-carnitine supplementation in humans. The effects on physical performance. **Int J Sports Med.**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 1990.

CHANG, X.; MOWAT, D.N. Supplemental chromium for stressed and growing feeder calves. **Journal Animal Science**, Urbana, v.70, n.3, p.559-565, 1992.

CHEW, A.B.P. et al. Vitamin A and B-carotene in bovine and porcine plasma, liver. **J. Dairy Sci.**, v.72, n. 3, p.785-813, 1989.

CORBETT, J.L. **Feeding standards for Australian Livestock. Ruminants**. East Melbourne: CSIRO, 1990. 266 p.

COSTA, L.L. et al. Superovulatory response embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. **Theriogenology** v. 56, n.1, p. 65-77, 2001.

COTTER, M.A. et al. Effects of acetyl- and propionyl-L-carnitine on peripheral nerve function and vascular supply in experimental diabetes. **Metabolism**, v. 44, n. 9, p. 1209-1214, 1995.

DINIZ, E.G. et al. Eficiência de dois diferentes produtos hormonais na superovulação de vacas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n.3, p. 319-320, 1999.

DONALDSON, L.E. The day of the estrous cycle that FSH is started and superovulation in cattle. **Theriogenology**, v.22, n.1, p.97-99, 1984.

DONALDSON, L.E. The effects of PGF_{2a} treatments in superovulated cattle on estrus response to embryo production. **Theriogenology**, n.20, p.279-285, 1983.

DOWNING, J.A. ; SCARAMUZZI, R.J. Nutrient effects on ovulation rate, ovarian function and the secretion of gonadotrophic and metabolic hormones in sheep **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 43, p. 209–227, 1991.

DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v.55, p.1211-1239, 2001.

EMBRAPA. Gado de Corte. **Deficiências de microelementos e reprodução**. Brasília: EMBRAPA/CNPGC. Disponível em: <<http://www.cnpqg.embrapa.br/publicacoes/ct/ct23/04deficienciasmicroelementos.html>> Acesso em 29 jan. 2008.

EVANS, A.G., FORMASI, G. Pharmacokinetics of L-Carnitine. **Clin Pharmacokinet.** ,v. 42, n. 11, p. 941-967, 2003.

FERNANDES C.A.C, et al. Efficiency of different pgf2a analogues in the postpartum period of dairy cows. *In: WORLD BUIATRICS CONGRESS*, 2006, Nice- France. **Anais ... Nice - France: WBC**, 2006. p.17.

FERNANDES, C.A.C. **Alterações na fisiologia reprodutiva e nos resultados de superovulação em vacas e novilhas pela imunização ativa com líquido folicular suíno**, 2000, 119f.. tese (Doutorado) – FMVL – Unesp, Botocatu, 2000.

FERNANDES, C.A.C. et al. Comparação entre doses e vias de aplicação de cloprostenol para sincronização de estro em bovinos. **Rev. Bras. de Reprod. Animal**, Belo Horizonte, v.18, n.34, p.105-109,1994.

FERREIRA S.A.; VANE, J.R. Prostaglandins: their disappearance from and release into the circulation. **Nature**, v.216, p.868-873, 1967.

FONSECA, J.F. et al. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 436-457, 2001.

FORTUNE, J.E. et al. 1991. Follicle selection in domestic ruminants. **J. Reprod. Fert.**, n.43, p.187-198, 1991.

FUCK, E.J. et al. Fatores nutricionais na reprodução das vacas leiteiras. I. Energia e proteína. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 24, n. 3, p. 147-161, 2000.

GALYEAN, M.L. et al. Interaction of cattle health/immunity and nutrition. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1120-1134, 1999.

GAWIENOWSKI, A.M. et al. Biosynthesis of retinal in bovine corpus luteum. **J.lipid. Res**, v. 67, p. 2978, 1984.

GINTHER, O.J. et al. Sampling follicular fluid without altering follicular status in cattle: oestradiol concentrations early in a follicular wave. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p.181-186, 1997.

GLOVER, D.V.; MERTZ, E.T. Corn. *In* R.A. OLSON; FREY, K.J. (ed.) Nutritional quality of cereal grains: genetic and agronomic improvement. Agronomy Monograph 28. **ASA Madison**, WI. p. 183-336, 1987.

GOMBE, S.; HANSEL, W. Plasma luteinizing hormone (LH) and progesterone levels in heifers on restricted energy intakes. **Journal of Animal Science**, v.37, n.3, p.728-733, 1973.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WILMUT, I. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. **Biol. Reprod.**, v.48, p.1141-1149, 1993.

GOONERATNE, S.R.; BUCKLEY, W.T.; CRHISTENSEN, D.A. A review of copper deficiency and metabolism in ruminants. **Canadian J. Animal Science**, v. 69, n. 4, p. 819-845, 1989.

GOTTSCHALL, C. Alimentação da vaca leiteira visando a máxima produção de leite e desempenho reprodutivo. **A Hora Veterinária**, v. 19, n.110, p. 66-70,1999.

GUTIERREZ, C.G. et al. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. **J. Anim. Sci.**, v.7, p.1876-1884, 1997.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6.ed. São Paulo: Manole, 2004. p.102-103- 649.

HARMON, R.J. Somatic cell counts: Myths vs reality. In: NATIONAL MASTITIS COUNCIL REGIONAL MEETING, 37, 1998, Bellevue. **Proceedings...** Madison: National Mastitis Council, 1998. p.40-50.

HENRY, P.R.; MILES, R.D. Interactions among the trace minerals. **Ciência Animal Brasileira**, v.1, n. 2, p. 95-106, 2000.

HURLEY, W.C.; DOANE, R.M. Recent developments in the roles of vitamins and minerals in reproduction. **J. Dairy Sci.** v. 72, p. 784 – 804, 1989.

IETS. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões**. Publicado em 2004. Disponível em: www.ufrgs.br/favet/revista/33-suple/ANAIS%20PTB%20-%20SBTE-2005%20%20Palestras%20e%20Resumos.pdf. Acesso em 11 jan. 2008.

JAINUDEEN, M.R. et al. Indução da Ovulação, Produção e Transferência de Embriões. In: HAFEZ, E.S.E; Hafez, B.. **Reprodução animal**, 7. ed. Barueri: Manole, 2004. p.413-419.

JULIEN, W.E. et al. Selenium and vitamin E and incidence of retained placenta in parturient dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 59, p. 1954-1959, 1976a.

JULIEN, W.E. et al. Selenium and vitamin E and incidence of retained placenta in parturient dairy cows. II. Prevention in commercial herds with prepartum treatment. **J. Dairy Sci.**, v. 59, p. 1960-1962, 1976b.

KAKAR, M.A. et al. The effect of peri-conception nutrition on embryo quality in the superovulated ewe **Theriogenology** , v. 64, p. 1090-1103, 2005.

KING, G.J. et al. Reproduction in domesticated animals. **World Animal Science**. University of Guelph. Elsevier Science Publishers, 1993. , p 459-491

KRUMMEN, L.A. et al. Identification and characterization of binding proteins for inhibin and activin in human serum and follicular fluid. **Endocrinology**, v.132, p.431-443, 1993.

LANGWINSKI, D., PATINO, H.O. **A Nutrição de ruminantes e os complexos orgânicos de minerais**. São Paulo: Tortuga, 2002. 52 p.

LAZZARINI NETO, S. Instalações e Benfeitorias. Vol. 4. Disponível em: www.agronomia.com.br/conteudo/artigos/artigos_deficiencias_minerais_3.htm. Acesso em 13 jan. 2008.

LOCK, A.L. ; GARNSWORTHY, P.C. Independent effects of dietary linoleic and linolenic fatty acids on the conjugated linoleic acid content of cows' milk. **Animal Science**, v. 74, n. 1, p. 163-176, 2002.

LUCCI, C.S. et al. Selênio em bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. I. Níveis de selênio em soros sanguíneos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, v.21, p.65-70, 1984a.

LUCCI, C.S. et al. Selênio em bovinos leiteiros do Estado de São Paulo. II. Níveis de selênio nas forragens e concentrados. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP**, v.21, p.71-76, 1984b.

LUCCI, C. S. et al. Suplementação de selênio para bovinos leiteiros. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNICA, 1985, Balneário de Camboriú. **Anais...** Balneário Camboriú: SBZ, 1985. p.134.

LUCCI, C.S. et al. Selênio em bovinos de leite em Itirapina, Estado de São Paulo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.22, p.653-656, 1987.

LUCY, C.M. et al. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. **Biol. Reprod.**, v. 48, p. 1219-1227, 1993.

LUCY, M.C. et al. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (Sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. **J. Dairy Sci.**, v. 76, n. 4, p. 1014-1027, 1993.

MALETTO, S. Absorção e interferência dos elementos minerais no organismo animal –micro elementos - Importância na sanidade. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO MINERAL, 1, 1984, São Paulo. **Anais...** São Paulo: SNIDA, 1984. p.9-18.

MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 42, p. 601-611, 2002.

MATIAS-PEREIRA, J. **Manual de Metodologia da Pesquisa Científica**. São Paulo: Altas, 2007.

McDOWELL, L.R. **Minerals in Animal and Human Nutrition**. New York : Academic Press, 1992. 524 p.

McDOWELL, L.R. **Nutrition of grazing ruminants in warm climates**. New York : Academic Press, 1985. 443p.

McDOWELL, L.R.; CONRAD, J.H. Trace mineral nutrition in Latin America. **World Animal Review**, v.24, p.24-33, 1977.

MERTZ, W. Chromium: history and nutritional importance. **Biological Trace Elements Research**, Totowa, v. 32, n. 2, p. 3-8, 1992. .

MITCHELL, M.E. Carnitine metabolism in humans subjects. II. Values of carnitine in biological fluids and tissues of "normal" subjects. **Am J Clin Nutr.**, v. 31, n. 3, p. 481-491, 1978.

MODE, A. et al. Purification of liver feminizing factor from rat pituitaries and demonstration of its identity with growth hormone. **Endocrinology**, v.113, p.1250-1259, 1983.

MOREIRA, R.J.C. **Uso do protocolo Crestar® em tratamentos utilizando Benzoato de Estradiol, PGF_{2α}, PMSG e GnRH para controle do ciclo estral e ovulação em vacas de corte**. 2002, 48f. Dissertação de (Mestrado). Escola Superior de agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

MOWAT, D. N. **Supplemental organic chromium for beef and dairy cattle. Proceeding in Ruminant Nutrition**. Ontario - Canada: University of Guelph, 1997. p. 1-21

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle. Minerals**, 7. rev. ed., Washington: National Academic Press, 1996. p. 54-69. Disponível em irc.nrc-cnrc.gc.ca/pubs/bsi/88_e.htm. Acesso em 03 jan. 2008.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of beef cattle**. 6. ed. Washington: National Academic Press, 1997a.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **The role of chromium in animal nutrition**. Washington: National Academic Press, 1997b.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement of dairy cattle**. 7. ed. Washington: National Academic Press, 2001.

NOGUCHI, T. et al. Biochemical and histological studies of the selenium-deficient pancreas in chicks. **J. Nutr.**, p. 103-444, 1973.

NOTTLE, M.B.; SEAMARK. R.F.; SETCHELL, B.P. Supplementation with lupin grain increases FSH in ovariectomised ewes. **J. Reprod. Fertil**, v.1, n. 51, p.31, 1988. Abstract Series.

OLDHAM, C.M.; LINDSAY, D.R. The minimum period of intake of lupin grain required by ewes to increase their ovulation rate when grazing dry summer pasture. In: LINDSAY D.R., PEARCE D.T.; **Reproduction in sheep**. Australian Academy of Science Australian Wool Corporation, 1984. p. 274-276.

OLIVEIRA, D. J. C; SOARES FILHO, C. V. S. Suplementação com cromo para ruminantes / Chromium Supplementation for Ruminants **Arq. ciênc. vet. zool.** UNIPAR; v. 8, n. 1, p. 71-77, jan.-jun. 2005.

OUROFINO. Medicamentos. Disponível em <http://www.ourofino.com> Acesso em 10 jan. 2008.

PARMER, T.G. et al. Effects of a low carotene status on corpora lutea function in the Holstein dairy cow. **J.Dairy Sci.**, v. 69, suppl. 1, p.240, 1986.

PEREIRA, B. M. et al. "Influência da Suplementação Energética e Mineral na Produção de Embriões em Vacas Superovuladas". **Acta Scientiae Veterinariae** v. 35, Supl. 3, p. 1216, 2007.

PULLS, R. **Mineral levels in animal health: Diagnostic data**. Canadá: British Columbia, 1984.

REICHENBACH, H.D. et al. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p.153-160.

ROBINSON, J.J. et al. Nutrition and fertility in ruminant livestock. **Animal Feed Science and Technology**, v. 126, n. 3-4, p. 259-276, 2005

ROWNTREE, J.E.; HILL G.M.; HAWEINS, D.R. Effect of Se on selenoprotein and thyroid hormone metabolism in beef and dairy cows and calves. **Journal Animal Science**, v. 82, p. 2995-3005, 2004.

RUMPF, R. e t al. **Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e eqüina**. Brasília: EMBRAPA – Recursos genéticos e biotecnologia, 2000. p.71-103.

SANTIAGO, C.M. Estudo da influência do uso de emulsão de selênio - torofenol nas vacas de corte em gestação no Rio Grande do Sul, Brasil. **A Hora Veterinária**, v.6, n.31, p.23-25, 1986a.

SANTIAGO, C.M. Estudo do efeito do uso da emulsão de selênio - torofenol na fecundidade de vacas de corte no Rio Grande do Sul, Brasil. **A Hora Veterinária**, v.6, n.32, p.13-15, 1986b.

SANTOS, J.E.P.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, v. 26, n. 1, p.19-89, 1998.

SBTE. Anais do XXI Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2007, Costa do Sauípe. Acta Scientiae Veterinariae. Porto Alegre : UFRGS, 2007, vol. 35. Disponível em www.ufrgs.br/favet/revista/35-suple-3/INICIAL_ANAIS_XXI_SBTE_2007.pdf. Acesso em 20 jan. 2008.

SCHILLO, K.K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v. 70, p. 1271-1282, 1992.

SHAW, D W. et al. Effect of retinol palmitate rate and embryo quality in superovulated cattle; **Theriogenology**, v. 44, p. 51-58, p.1995.

SIDDIQUI, M.A.R. et al. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. **Reprod. Domestic Animals**, v.37, n.1, p.37-41, 2002.

STABENFELDT, H.G.; EDQVIST, E.L. Processos reprodutivos na fêmea. In: SWENSON, j.m.; REECE, O.W. **Fisiologia dos animais domésticos**. 11. ed. Rio de Janeiro, 1996. p. 615-616.

STEWART. R. ; OLDHAM. C.M. Feeding lupins for 4 days during the luteal phase and increase ovulation rate. **Proceedings of the Aultralian Society of Animal Production**. v.16, p.367, 1986.

STRIFFLER, J. S. et al. Chromium improves insulin response to glucose in rats. **Metabolism, Clinical and Experimental**, Philadelphia, v. 44, n. 10, p. 1303-1307, 1995.

TALAVERA, F. ; CHEW, B.P. Retinol, retinoic acid and B carotene ratios on progesterone secretion by bovine luteal cells. **J.Dairy Sci.**, v. 70, suppl.1, p. 119, 1987.

THATCHER W.W. et al. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v.55, p.75-89, 2001.

UNDERWOOD, E.J.; SUTTLE, N.F. **The mineral nutrition of livestock**. New York: CABI Publishing, 1999. 614 p.

VALDIVIA, R. et al. Effect of dietary aluminium and phosphorus on performance, phosphorus utilization and tissue mineral composition in sheep. **Journal of Animal Science**, v.55, p.402-410, 1982.

VAN ARENDONK, J.A; BIJMA, P. Factors affecting commercial application of embryo technologies in dairy cattle in Europe - a modelling approach. **Theriogenology**, v.59, p.635-649, 2003.

VIANA, J.H.M. **Avaliação ultra-sonográfica de estruturas ovarianas em doadoras e receptoras de embrião**. 1996. 120f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1996.

VISINTIN, J.A. et al. Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelamento de embriões pelo método one-step com etilenoglicol. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v.36, n. 5, 1999. Disponível em <<http://www.scielo.br>> Acesso em 14 jan. 2008.

WILTBANK. M. Relação entre reprodução e nutrição em vacas de leite. In: **Curso Novos Enfoques na Reprodução de Bovinos**. Uberaba: Unesp, p. 15–26, 2001. Disponível em www.fca.unesp.br/conapecjr/index.php. Acesso em 22 jan. 2008.

YAAKUB, H. et al. Effect of type and quality of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers; **Theriogenology**, v. 51, p. 1259-1266, 1999.

YANG, W. Z. et al. Effects of chromium supplementation on early lactation performance of Holstein cows. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v. 76, p. 221, 1996.

ZANETTI, M.A.; LUCCI, C.S.; MEIRELLES, G.J.R. Suplementação de selênio para vacas em final de gestação. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 22., 1985, Balneário Camboriú. **Anais...** Balneário Camboriú: SBZ, 1985. p.135.

ZAR, J.H. **Biostatistical Analysis**. Englewood Cliffs: Prattice Hall, 1994. 718 p.

8 ANEXO

Características do Produto Canter OF[®]

O produto Canter OF é um suplemento com vitaminas, minerais e aminoácidos indispensáveis ao metabolismo celular, que agem sinergicamente na proteção dos tecidos corporais e das células reprodutivas, pois reduzem a formação de radicais livres.

Canter OF[®] é indicado para reprodução.

Composição básica do produto:

BETA CAROTENO, L-CARNITINA, L-LISINA, SELÊNIO (QUELATO), VITAMINA E, CROMO AMINOÁCIDO QUELATO, COBRE AMINOÁCIDO QUELATO, PALATABILIZANTE, SORBITOL, ÁLCOOL ETÍLICO, ADITIVO ANTIOXIDANTE (EDTA), PROPILGALATO, METILPARABENO (ANTIFÚNGICO), AGLUTINANTE (SUSPENDER), GLICERINA, ÁGUA.

Níveis de garantia por litro do produto

Betacaroteno.....	1.250 mg
Carnitina.....	167.000mg
Lisina.....	100.000mg
Selênio.(quelato).....	150 mg
Vitamina.E.....	20.000 mg
Cromo.(quelato).....	80 mg
Cobre.(quelato).....	2.000 mg
Aditivoantioxidante.(EDTA).....	500 mg
Aglutinante.(Suspende).....	25.000 mg
Propilgalato	500 mg
Metilparabeno.(antifúngico).....	2.100 mg
Sorbitol.....	332.420mg

Fonte: Ourofino (2008).