

# INFLUÊNCIA DA ALTA INGESTÃO DE MATÉRIA SECA NA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM VACAS MISTIÇAS

MICHELE RICIERI BASTOS,<sup>1</sup> ALEXANDRE FLORIANI RAMOS,<sup>2</sup> KATLEN DRIESSEN,<sup>2</sup> ALINE CARVALHO MARTINS,<sup>1</sup> RODOLFO RUMPF<sup>2</sup> E ROBERTO SARTORI<sup>3</sup>

1. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia,, Veterinária, FMVZ, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Botucatu, SP, Brasil, CEP 18618-000

2. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CEP 70770-900, Brasília, DF, Brasil

3. Departamento de Zootecnia, ESALQ, Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brasil, CEP 13418-900. E-mail: sartori@esalq.usp.br

## RESUMO

Objetivou-se avaliar o efeito da alta ingestão de matéria seca (AIMS) sobre a resposta superovulatória de vacas mestiças Nelore x Simental. Quatorze vacas não lactantes, com escore de condição corporal (ECC) igual a 4,0 (escala de 1 a 5), foram divididas aleatoriamente em dois grupos (Manutenção=M ou alta ingestão de matéria seca=AIMS). De sete dias antes do início da superovulação (SOV) até o final das aplicações de FSH, as vacas do grupo AIMS receberam dieta com 180% da manutenção. O grupo M recebeu dieta de manutenção. Sete dias após a IA, os embriões foram colhidos e avaliados. Quarenta dias após, inverteram-se os

tratamentos e realizou-se uma nova SOV. Para comparação entre os grupos, utilizou-se o teste t pareado. Os resultados estão apresentados em média  $\pm$  erro-padrão. O número de folículos recrutados detectados por ultrassonografia (19,6 $\pm$ 1,8 e 16,4 $\pm$ 2,0) e ovulados (15,0 $\pm$ 1,6 e 13,0 $\pm$ 1,6) não diferiu entre os grupos M e AIMS, respectivamente (P>0,10). Entretanto, os números de estruturas totais (14,1 $\pm$ 2,3 e 9,5 $\pm$ 1,5) e embriões viáveis (10,1 $\pm$ 2,1 e 6,7 $\pm$ 1,5) colhidos foram maiores no grupo M (P<0,05). Conclui-se que, nas condições deste estudo, AIMS previamente à SOV pode comprometer a produção embrionária em vacas de elevado ECC.

PALAVRAS-CHAVES: Bovinos, embrião, nutrição, superovulação.

## ABSTRACT

### INFLUENCE OF HIGH DRY MATTER INTAKE ON THE SUPEROVULATORY RESPONSE OF CROSSBRED COWS

This study investigated the effect of high dry matter intake (Flushing) on the superovulatory response of crossbred Nelore x Simmental cows. Fourteen non-lactating cows, with a mean body condition score (BCS) of 4.0 (scale from 1 to 5) were randomly assigned into two groups (Maintenance=M or Flushing=F). Seven days prior to onset of superovulation (SOV) until the last day of treatment with FSH, group F cows were fed a diet to achieve 180% of maintenance. Group M cows were fed a maintenance diet. Seven days after AI, embryos were collected and evaluated. Forty days later, the treatment groups were inverted and another

SOV was realized. Variables were compared by paired t test and data are presented as mean  $\pm$  SEM. The number of recruited (19.6 $\pm$ 1.8 and 16.4 $\pm$ 2.0) and ovulated (15.0 $\pm$ 1.6 and 13.0 $\pm$ 1.6) follicles detected by ultrasonography did not differ between the M and F groups, respectively (P>0.10). However, the total number of embryos/ova (14.1 $\pm$ 2.3 and 9.5 $\pm$ 1.5) and the number of viable embryos (10.1 $\pm$ 2.1 and 6.7 $\pm$ 1.5) recovered were greater in group M (P<0.05). Under the conditions of this study, we conclude that nutritional flushing previously to SOV may compromise embryo production in cows with high BCS.

KEY WORDS: Bovine, embryo, nutrition, superovulation.

## INTRODUÇÃO

Um dos maiores entraves dos programas comerciais de transferência de embriões (TE) é a grande variação individual ao tratamento superestimulatório (MAPLETOFT et al., 2002; NOGUEIRA et al., 2002; BARROS & NOGUEIRA, 2004), observada tanto em vacas e novilhas *Bos indicus* (BARUSELLI et al., 2003) quanto em *Bos taurus* (SARTORI et al., 2003, 2004). A variabilidade na resposta ovariana está relacionada aos diferentes protocolos de superovulação (SOV), mas também ao estado nutricional do animal (YAAKUB et al., 1999). Em geral, fêmeas de elevado mérito genético, que são utilizadas como doadoras de embriões, não estão sob um manejo nutricional adequado, o que pode comprometer os resultados de TE.

Além das alterações nutricionais, o escore de condição corporal (ECC) e o nível energético da dieta também estão entre os fatores que mais afetam o desempenho reprodutivo da fêmea bovina (WEBB et al., 2004). Estes podem influenciar, de forma sinérgica ou antagônica, diversos fatores que regulam o desenvolvimento folicular ovariano e a esteroidogênese, refletindo quali e quantitativamente na produção de embriões (RHODES et al., 1995; ADAMIAK et al., 2005).

Dessa forma, pode-se afirmar que a resposta superovulatória pode ser influenciada por fatores intrínsecos (relacionados ao animal) e extrínsecos (ambiente), dentre eles a nutrição (WEBB et al., 2004). Trabalhos que foram desenvolvidos com o objetivo de aumentar o número de folículos recrutados mostraram que a população folicular presente na fase de recrutamento é pré-requisito para melhorar a resposta aos protocolos de SOV e, conseqüentemente, melhorar a eficiência reprodutiva dos animais domésticos (FORTUNE, 2003). Até o presente momento, o *flushing* nutricional (curto período de superalimentação) (GUTIERREZ et al., 1997; ARMSTRONG et al., 2001; GONG et al., 2002) e o uso do rbST (somatotropina bovina recombinante) (GONG et al., 1991; BURATINI et al., 2000) mostraram ser os principais fatores capazes de influenciar positivamente o número de folículos recrutados e/ou a resposta aos protocolos de SOV.

Embora o aumento da ingestão energética possa alterar o perfil dos hormônios metabólicos, principalmente IGF-I e insulina, e afetar o desenvolvimento folicular (ARMSTRONG et al., 2001), o período mínimo necessário para que este aporte energético tenha efeito sobre o número de folículos recrutados ainda precisa ser determinado.

Objetivou-se com este trabalho avaliar a influência da alta ingestão de matéria seca (AIMS) sete dias antes do início e durante a superestimulação ovariana com FSH, sobre a resposta superestimulatória, superovulatória e produção embrionária, em vacas mestiças F1 Nelore x Simental.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas quatorze vacas não lactantes, mestiças F1 Nelore x Simental, com idade entre cinco e seis anos, peso médio de 500,0 kg e ECC 4,0 (escala de 1 a 5; HOUGHTON et al., 1990), que passaram por exame ginecológico antes do início do experimento e encontravam-se sem alterações reprodutivas detectáveis.

As vacas foram divididas aleatoriamente em dois grupos experimentais (Manutenção e AIMS) e mantidas em sistema de pastejo com *Brachiaria decumbens*, mineralização adequada e água à vontade, em um delineamento experimental *cross-over*.

Três semanas antes do início da SOV, as vacas passaram a receber uma dieta de adaptação a fim de se evitar complicações ruminais durante o experimento, devido ao maior aporte nutricional. Durante essa adaptação, os animais permaneceram em um piquete com pouca oferta de gramíneas e com suplementação à base de silagem de milho e fonte proteica à base de NNP, em níveis próximos aos de manutenção. Sete dias antes do início da SOV as vacas foram transferidas para piquetes sem gramíneas e passaram a ser alimentadas exclusivamente com dieta balanceada, sal mineral e água à vontade. A dieta do grupo Manutenção foi ajustada para 100% das necessidades diárias de manutenção, totalizando uma ingestão de 2,03% do peso vivo (PV) por dia. O grupo AIMS recebeu uma dieta ajustada para 180% em relação

à manutenção (ingestão total de 3,65% do PV/dia). O encerramento da AIMS coincidiu com a última aplicação de FSH, totalizando onze dias de duração. Para que houvesse pouca competição pela dieta fornecida, e para assegurar um consumo alimentar relativamente uniforme entre as vacas, respeitou-se uma medida mínima de comprimento de cocho de 70 cm por animal.

Após esse período, as vacas do grupo AIMS retornaram à dieta de manutenção até o momento da colheita dos embriões e, após as colheitas,

todas as vacas retornaram ao sistema de pastejo em *Brachiaria decumbens*, com suplementação mineral adequada e água à vontade. Quarenta dias após, foi realizada uma outra repetição do experimento, e os tratamentos foram invertidos, ou seja, o grupo Manutenção passou a ser o grupo AIMS e vice-versa.

A composição centesimal e as percentagens de matéria seca (MS), nutrientes digestíveis totais (NDT) e proteína bruta (PB) da dieta oferecida estão ilustradas na Tabela 1.

**TABELA 1.** Composição centesimal, percentagens de matéria seca (MS), nutrientes digestíveis totais (NDT), e proteína bruta (PB) da dieta experimental<sup>1</sup>

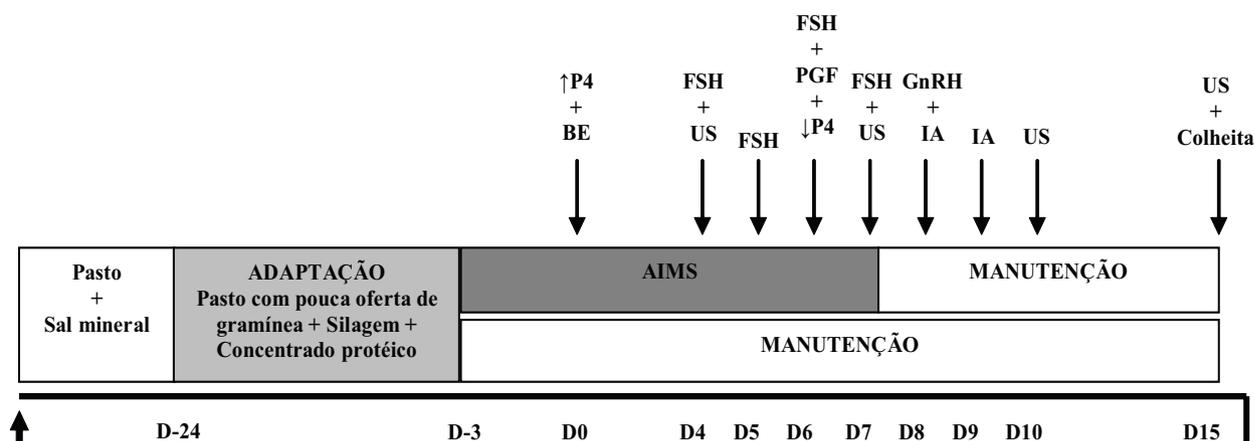
Componentes	% na dieta	% de MS	% de NDT	% de PB
Feno de <i>coast-cross</i>	36,7	85,0	50,0	10,0
Silagem de milho	18,0	25,0	62,8	7,5
Milho moído	24,4	90,0	80,0	9,0
Farelo de trigo	12,4	90,0	70,0	14,0
Concentrado*	8,5	90,0	65,0	22,0
Dieta total	-	76,5	63,4	10,8

1. Valores calculados por tabela. \*Quantidades por quilo do produto (Boião PPU, Integral Nutrição Animal, Goiânia, GO): antioxidante (320,0 mg), cálcio (39,4 g), cobalto (32,0 mg), cobre (240,0 mg), enxofre (14,4 g), ferro (320,0 mg), flúor (máx) (542,0 mg), fósforo (32,8 g), iodo (48,0 mg), magnésio (99,6g), manganês (160,0 mg), nitrogênio não proteico (80,87 g), NNP equiv. proteína (máx) (50,50 %), palatabilizante (200 g), proteína bruta mínima (52,6 %), selênio (4,8 mg), sódio (118,8 g), solub.do fósforo (P) em ácido cítrico a 2% (mín) (90,0%), vitamina A (4000,0 UI/kg), vitamina E (40,0 UI/kg), zinco (960,0 mg), relação cálcio: fósforo (mín) (1,2:1).

Três dias após o início do fornecimento das dietas experimentais (Manutenção ou AIMS), todas as vacas foram sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona (P4; DIB, Sintex S.A., Argentina) e 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE; Ric-BE, Syntex S.A., Argentina) e foram superovuladas com FSH seguindo o protocolo de TE em tempo fixo descrito na Figura 1. Cada vaca recebeu oito injeções im de FSH a cada doze horas, em doses decrescentes, utilizando-se uma dose total de 250 UI de FSH (Pluset, Calier, S.A., Barcelona, Espanha) e 0,150 mg de prostaglandina F2 $\alpha$  (PG F2 $\alpha$ ; D-Cloprostenol; Prolise; ARSA S. R. L., Buenos Aires, Argentina) simultânea à sexta e sétima aplicação de FSH. A retirada do dispositivo intravaginal de progesterona foi simultânea à sexta aplicação do FSH. Doze horas após a última

aplicação de FSH, induziu-se a ovulação com 0,05 mg de GnRH (acetato de gonadorelina; Gestran Plus; ARSA S. R. L., Buenos Aires, Argentina). Doze e 24 horas após a aplicação do indutor da ovulação, as vacas foram inseminadas artificialmente com sêmen congelado de uma mesma partida de um mesmo touro, e os embriões foram colhidos sete dias após a injeção para indução da ovulação. Após a colheita, as vacas receberam 0,150 mg de PGF2 $\alpha$  (D-Cloprostenol; Prolise) e retornaram ao pasto.

Os exames ultrassonográficos foram realizados por um único operador, mediante um aparelho de ultrassom em tempo real (Aloka SSD-500 V; Corometrics Medical Systems Inc., Wallingford, CT, USA) com transdutor linear transretal de 7,5 MHz.



**FIGURA 1.** Esquema representativo do delineamento experimental, mostrando o período das dietas experimentais, o protocolo de superestimulação ovariana e os exames ultrassonográficos. Legenda: D-24 a D15 = dias em relação ao início do protocolo de superestimulação (D0); P4 = implante de progesterona, BE = benzoato de estradiol, FSH = hormônio foliculo estimulante; PGF = prostaglandina F2 $\alpha$ , GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina; IA = inseminação artificial; US = exame ultrassonográfico. AIMS = alta ingestão de matéria seca (180% em relação à dieta de manutenção).

Exames ultrassonográficos ovarianos foram realizados no ato da primeira e da última aplicação de FSH, e dois e sete dias após a indução da ovulação (Figura 1). Na avaliação realizada no dia da primeira aplicação de FSH, contaram-se apenas folículos pequenos (3,0 a 5,0 mm de diâmetro), e na avaliação do dia da última aplicação de FSH e dois dias após a indução da ovulação, contaram-se apenas os folículos com diâmetro  $\geq$  6,0 mm.

Para realização das colheitas dos embriões, as vacas foram contidas em tronco individual e procedeu-se à anestesia peridural com 4,0 mL de lidocaína 2,0%. Aplicou-se a técnica de colheita dupla, relatada por CASTRO NETO et al. (2005), em que se posicionou o balão do catéter de Foley no corpo uterino justaposto ao óstio cranial da cérvix, empregando-se, em média, 1.000 mL de Dulbecco Phosphate Buffered Saline (DPBS) por animal. Após a lavagem uterina, o útero foi preenchido com DPBS e o catéter mantido no local com sua abertura lacrada com uma presilha de filtro de coleta. Em seguida, as vacas foram soltas e retornaram ao tronco vinte minutos depois, para a remoção do DPBS que estava no útero e para a realização de um segundo lavado com um volume extra de 500 mL de DPBS. O lavado uterino foi colhido em filtro de 75  $\mu$ m, com devida identificação para cada animal e transportado para o

laboratório, onde os embriões foram rastreados e avaliados em estereomicroscópio (Zeiss – Stemi SV6, Holanda). Classificaram-se os embriões segundo o grau de desenvolvimento e qualidade, de acordo com o manual da International Embryo Transfer Society – IETS (STRINGFELLOW & SIEDEL, 1999). Embriões de graus 1 a 3 foram considerados viáveis.

Todas as variáveis apresentaram homoscedasticidade pelo teste de Cochran e distribuição normal pelo teste de Lilliefors, exceto o número de corpos lúteos, que sofreu transformação logarítmica, passando a ter distribuição normal. Para comparar as variáveis entre os grupos, utilizou-se o teste t pareado. Os resultados estão apresentados sob a forma de média  $\pm$  erro-padrão da média.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, utilizando sete dias de fornecimento da AIMS antes do início da SOV, não foi observada diferença entre os tratamentos Manutenção e AIMS ( $P > 0,10$ ) quanto ao número de folículos recrutados na onda folicular sincronizada, quanto à resposta superestimulatória (número de folículos no final do tratamento com FSH) e resposta superovulatória (número de corpos lúteos). No entanto, o número de estruturas totais e o

número de embriões viáveis mostraram-se maiores ( $P \leq 0,05$ ) no grupo Manutenção, comparado ao grupo AIMS (Tabela 2).

**TABELA 2.** Resultados (média  $\pm$  EPM) da população folicular, corpos lúteos e embriões colhidos em vacas recebendo dieta de Manutenção ou com alta ingestão de matéria seca (AIMS)

	Manutenção (n = 14)	AIMS (n = 14)
Folículos de 3 a 5 mm (início do FSH); n	19,5 $\pm$ 1,8	16,4 $\pm$ 2,0
Folículos $\geq$ 6 mm (final do FSH); n	17,6 $\pm$ 1,8	18,9 $\pm$ 2,6
Corpos lúteos; n	15,0 $\pm$ 1,6	13,0 $\pm$ 1,6
Estruturas totais; n	14,1 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	9,5 $\pm$ 1,8 <sup>b</sup>
Embriões viáveis; n	10,7 $\pm$ 2,1 <sup>a</sup>	6,7 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup>Diferença entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

Trabalhos desenvolvidos com novilhas cruzadas (Hereford x Holandês) demonstraram que o fornecimento de AIMS (200%) por um curto período de tempo (duas ou três semanas) foi capaz de aumentar o número de folículos recrutados (GUTIERREZ et al., 1997; GONG et al., 2002) e, conseqüentemente, melhorou a resposta aos protocolos de superovulação à base de FSH (GONG et al., 2002). No entanto, alguns trabalhos observaram efeito nulo (FRERET et al., 2006) ou negativo (NOLAN et al., 1998; YAAKUB et al., 1999; WRENZYCKI et al., 2000; SIDDIQUI et al., 2002; LOZANO et al., 2003; ADAMIAC et al., 2005; MOLLO et al., 2007) da alta ingestão alimentar sobre o número de folículos recrutados e sobre a produção de ovócitos e de embriões.

O efeito positivo da alta ingestão sobre a população folicular normalmente é atribuído ao aumento das concentrações circulantes de IGF-I e, principalmente, insulina. Ambos atuam como potentes estimuladores da proliferação de células da granulosa e da esteroideogênese em bovinos, além de aumentar a resposta ovariana às gonadotrofinas (WEBB et al., 2004). No entanto, a insu-

lina responde de forma mais aguda às alterações na dieta do que o IGF-I (WEBB et al., 2004). Até o presente momento, o período mínimo de AIMS em que se detectou diferença nas concentrações de insulina e de IGF-I foi de dez dias, mas não se sabe se esta diferença já estava presente antes, uma vez que não foram feitas dosagens prévias (ARMSTRONG et al., 2001). Com base nos resultados de ARMSTRONG et al. (2001), o presente estudo optou por aumentar a ingestão alimentar por apenas sete dias antes do início do protocolo de SOV, a fim de se verificar se esse período de AIMS seria suficiente para elevar o número de folículos recrutados e, conseqüentemente, a resposta superovulatória, de forma que também resultasse em menor ganho de peso dos animais durante o tratamento e menor custo. No entanto, sete dias de AIMS, antes do início da SOV, não foi suficiente para alterar a população de folículos recrutados no início de uma onda. O fato de não ter sido encontrada diferença no número de folículos recrutados na onda sincronizada, possivelmente, ocorreu pelo elevado ECC dos animais utilizados neste experimento. De fato, ADAMIAC et al. (2005) observaram que animais hiperinsulinêmicos (fêmeas com elevado ECC e submetidas à alta ingestão alimentar) apresentaram menor número de folículos totais no ovário e menor número de ovócitos maturados e blastocistos produzidos após cultivo *in vitro*. Provavelmente, neste estudo, a associação AIMS e elevado ECC dos animais impediu um possível efeito positivo sobre o número de folículos recrutados. Além disso, esse período de sete dias de AIMS antes da SOV talvez não tenha sido suficientemente longo para alterar o recrutamento folicular, como descrito por ADAMIAC et al. (2005).

Com relação à produção embrionária, o fornecimento de AIMS por sete dias antes e mais quatro dias durante a superestimulação ovariana reduziu o número de estruturas totais e embriões viáveis colhidos. Apesar de a insulina e o IGF-I não terem sido dosados neste trabalho, acredita-se que sete dias de AIMS tenham sido suficiente para alterar a concentração circulante desses hormônios, principalmente a de insulina, em virtude do efeito negativo sobre a produção embrionária,

observado neste trabalho. Dados publicados sugerem que a AIMS associada a um elevado ECC nos animais possa exercer um efeito deletério sobre a maturação ovocitária e produção de embriões, possivelmente pelo excesso de IGF-I (WEBB et al., 2004) e pela hiperinsulinemia (ADAMIAK et al., 2005), o que pode ter ocorrido neste experimento, por terem sido usados animais com ECC médio igual a 4,0. Além disso, deve-se considerar que a permanência da AIMS durante as aplicações de FSH também possa ter resultado num efeito deletério sobre os ovócitos.

Corroborando os resultados negativos observados sobre a produção e qualidade embrionária nos animais submetidos à AIMS, YAAKUB et al. (1999) e WRENZYCKI et al. (2000) mostraram que novilhas que receberam quantidade restrita de concentrado produziram maior número de embriões e de qualidade superior quando comparadas a novilhas que receberam dieta à vontade. Similarmente, trabalhos com novilhas da raça Nelore (MOLLO et al., 2007) observaram que o número de embriões colhidos foi superior no grupo de baixa ingestão alimentar.

Dessa forma, acredita-se que o efeito positivo da AIMS sobre a população folicular, a resposta superovulatória e a produção embrionária seja dependente do estado metabólico em que o animal se encontra no momento em que a dieta é fornecida. SIDDIQUI et al. (2002) sugeriram que um nível nutricional que limite o ECC em 2,5 a 3,0 (escala de 1 a 5), em vacas zebus antes de um tratamento de superovulação, seja melhor do que um alto nível nutricional. Em concordância, ADAMIAK et al. (2005), além de mostrarem efeito negativo da hiperinsulinemia na qualidade dos ovócitos, sugeriram que o efeito do nível nutricional sobre as qualidades ovocitária e embrionária é dependente do ECC inicial da fêmea bovina. Outra possibilidade a ser considerada é que esses animais estavam a pasto antes do experimento e, durante parte do experimento, ficaram totalmente confinados com dieta exclusivamente no cocho. Portanto, não se pode descartar a possibilidade de o confinamento desses animais, mesmo que apenas com dieta de manutenção, durante o período de adaptação experimental, ter resultado no efeito semelhante

ao esperado com a AIMS e, após o período de adaptação, quando passaram a receber a dieta de alta ingestão, este maior aporte energético tenha sido excessivo, comprometendo a produção embrionária desses animais.

## CONCLUSÕES

A alta ingestão de matéria seca, previamente à SOV, pode comprometer a produção embrionária em vacas de elevado ECC.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo auxílio financeiro, à FAPESP, pela concessão de bolsa, e à Integral Nutrição Animal, pelo fornecimento do concentrado.

## REFERÊNCIAS

- ADAMIAK, S. J.; MACKIE, K.; WATT, R. G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hiperinsulinemia in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 73, p. 918-926, 2005.
- ARMSTRONG, D. G.; MCEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J.; WEBB, R. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1624-1632, 2001.
- BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. SOV em zebuínos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina, 2004. p. 212-222. Disponível em: <<http://www.geraembryo.com.br/t.tecnicos/16%20Ciro%20Moraes%20Barros.pdf>>
- BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; NASSER, L. F. T.; SILVA, R. C. P.; MENEGATTI, J. A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I. C. C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (supl), p. 244-245, 2003.
- BURATINI JR, J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BO, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment

with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421-431, 2000.

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

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 135-163, 2003.

FRERET, S.; GRIMARD, B.; PONTER, A. A.; JOLY, C.; PONSART, C.; HUMBLLOT, P. Reduction of body-weight gain enhances *in vitro* embryo production in overfed superovulated dairy heifers. **Reproduction**, v. 131, p. 783-794, 2006.

GONG J. G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: Follicular populations and peripheral hormones. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 941-949, 1991.

GONG, J. G.; ARMSTONG, D. G.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; GARNSWORTHY, P. C.; WEBB, R. The effect of dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, v. 57, p. 1591-1602, 2002.

GUTIERREZ, C. G.; OLDHAM, J.; BRAMLEY, T. A.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 1876-1884, 1997.

HOUGHTON, P. L.; LEMENAGER, R. P.; HENDRIX, K. S.; MOSS, G. E.; STEWART, T. S. Effects of body composition, pre- and postpartum energy intake and stage of production on energy utilization by beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 1447-1456, 1990.

LOZANO, J. M.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P.; O'CALLAGHAN, D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. **Reproduction**, v. 125, p. 543-553, 2003.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 42, p. 601-611, 2002.

MOLLO, M. R.; RUMPF, R.; MARTINS, A. C.; CARRIJO, L. H. D.; SAUERESSIG, M. G.; SARTORI, R. Produção de embriões em novilhas nelore superovuladas submetidas

à baixa ou alta ingestão alimentar. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35 (supl.), p. 1241, Resumo, 2007.

NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, B. J. P.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A.; D'OCCHIO, M. J.; BARROS, C. M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology**, v. 57, p. 1625-1634, 2002.

NOLAN, R.; O'CALLAGHAN, D.; DUBY, R. T.; LONERGAN, P.; BOLAND, M. P. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. **Theriogenology**, v. 50, p. 1263-1274, 1998.

RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W.; DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrous. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 41-49, 1995.

SARTORI, R.; SUÁREZ-FERNÁNDEZ, C. A.; MONSON, R. L.; GUENTHER, J. N.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v. 60, p. 1319-1330, 2003.

SARTORI, R.; SOUZA, A. H.; GUENTHER, J. N.; CARAVIELLO, D. GEIGER, L. N.; SCHENK, J.; WILTBANK, M. C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v. 1, p. 86-90, 2004.

SIDDIQUI, M. A. R.; SHAMSUDDIN, M.; BHUIYAN, M. M. U.; AKBAR, M. A.; KAMARUDDIN, K. M. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 37-41, 2002.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. (Ed.). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3. ed. Brasília: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, Biblioteca do Congresso, 1999.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ASRMSTRONG, D. G. Control of follicular interactions and nutritional influences. **Journal of Animal Science**, v. 82 (Supl.), p. E63-E74, 2004.

WRENZYCKI, C.; DE SOUZA, P.; OVERSTROM, E. W.; DUBY, R. T.; HERRMANN, D.; WATSON, A. J.; NIEMANN, H.; O'CALLAGHAN, D.; BOLAND, M. P. Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered

embryos. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18, p. 69-78, 2000. and embryo yield in beef heifers. **Theriogenology**, v. 51, p. 1259-1266, 1999.

YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D. O.; BOLAND, M. P.  
Effect of type and quantity of concentrates on superovulation

---

Protocolado em: 7 maio 2008. Aceito em: 9 set. 2009.