

# SUPEROVULAÇÃO E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM VACAS *Bos taurus* (CARACU) E *Bos indicus* (NELORE) ADAPTADAS AO AMBIENTE TROPICAL<sup>1</sup>

RAFAEL HERRERA ALVAREZ<sup>2</sup>, ANTÔNIO CAMPANHA MARTINEZ<sup>3</sup>, RITA MARIA LADEIRA PIRES<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 21/06/10. Aceito para publicação em 18/03/11.

<sup>2</sup>Polo Regional de Desenvolvimento Tecnológico dos Agronegócios do Centro Sul (PRDTA - Centro Sul), Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo (SAA), CEP 13400-970, Piracicaba, SP, Brasil. E-mail: [herrera@apta.sp.gov.br](mailto:herrera@apta.sp.gov.br)

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina Veterinária, UEM, Campus de Umuarama, PR, Brasil.

<sup>4</sup>Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Genética e Reprodução Animal (CPDGRA), Instituto de Zootecnia (IZ), APTA, SAA, Rua Heitor Penteado 56, Centro, CEP 13460-000, Nova Odessa, SP, Brasil.

**RESUMO:** O objetivo do presente estudo foi comparar a resposta ovariana e produção de embriões de vacas *Bos t. indicus* e *Bos t. taurus*, adaptadas às condições ambientais do estado de São Paulo, Brasil, submetidas ao tratamento de superovulação. Noventa vacas das raças Caracu (*Bos taurus*, n=40) e Nelore (*Bos indicus*, n=50) recém desmamadas de suas crias, foram tratadas com um dispositivo vaginal contendo 1,38 g de progesterona (CIDR-B<sup>®</sup>, Pfizer, Brasil) e injeção, IM, de 2,5 mg de benzoato de estradiol (Estrogin<sup>®</sup>, Farmavet, Brasil). No quarto dia, iniciou-se o tratamento de superovulação utilizando 400 UI de pFSH (Pluset<sup>®</sup>, Calier, Espanha) IM em doses decrescentes (75-75; 75-50; 50-25; 25-25 IU) com intervalos de 12 horas. No sétimo dia foi retirado o CIDR-B e aplicados, IM, 150 mcg de cloprostenol (Veteglan<sup>®</sup>, Calier, Espanha). As vacas foram inseminadas duas vezes, 48 e 62 horas após o cloprostenol e a coleta não cirúrgica de embriões foi realizada sete dias após a primeira inseminação. As diferenças no número de corpos lúteos (CL), total de estruturas (ovócitos/embriões) e de embriões transferíveis foram analisadas pelo teste t de Student. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) no número de CL, total de estruturas e de embriões transferíveis das vacas Caracu ( $11,4 \pm 3,3$ ;  $8,6 \pm 2,6$  e  $6,0 \pm 2,4$ ) e Nelore ( $12,0 \pm 4,1$ ;  $9,0 \pm 4,3$  e  $5,1 \pm 2,9$ ), respectivamente. Esses resultados são indicativos que vacas Nelore e Caracu manejadas e superovuladas em ambiente tropical apresentam resposta ovariana e produção de embriões semelhante.

Palavras-chave: caracu, raças bovinas adaptadas, superovulação, transferência de embriões.

## SUPEROVULATION AND EMBRYO PRODUCTION IN TROPICAL-ADAPTED *Bos taurus* (CARACU) AND *Bos indicus* (NELORE) COWS

**ABSTRACT:** The aim of this study was to compare ovarian response and embryo production of superovulated *Bos indicus* and *Bos taurus* cows adapted to the environmental conditions from São Paulo State, Brazil. Ninety non-lactating cows from Caracu (*Bos taurus*, n=40) and Nelore (*Bos indicus*, n=50) were treated with an intravaginal device containing progesterone (1.38 mg; CIDR-B<sup>®</sup>, Pfizer Animal Health, Montreal, Québec, Canada) and 2.5 mg, intramuscularly (IM), of estradiol benzoate (Estrogin<sup>®</sup>, Farmavet, São Paulo, Brazil). Four days later, all animals were treated with multiple IM injections of 400 IU of FSH (Pluset<sup>®</sup>, Calier, Spain) in decreasing doses (75-75; 75-50; 50-25, and 25-25 IU) at 12-h intervals over 4 days. On the seventh day, CIDR-B device was removed and cows received, IM, 150 µg of cloprostenol (Veteglan<sup>®</sup>, Calier, Spain). Cows were then inseminated 48 and 62 h after cloprostenol treatment and embryos were recovered non-surgically seven days after first insemination. Differences in the number of corpora lutea (CL) number, total number of structures (ova/embryos), and number of transferable embryos were analyzed by Student t test. There was no difference ( $P > 0.05$ ) in the average number of CL, total ova/embryos and transferable embryos of Caracu ( $11.4 \pm 3.3$ ;  $8.6 \pm 2.6$  e  $6.0 \pm 2.4$ ) and Nelore ( $12.0 \pm 4.1$ ;  $9.0 \pm 4.3$  e  $5.1 \pm 2.9$ ) cows, respectively. These results suggest that Caracu and Nelore cows superovulated in tropical climate had similar ovarian responses and embryo production.

Key words: caracu, bovine adapted breeds, superovulation, embryo transfer.

## INTRODUÇÃO

Existe evidência que o processo adaptativo ao clima tropical de certas raças taurinas resulta em alterações na expressão de genes relacionados com a reprodução (HANSEN *et al.*, 2004). Isso explicaria o fato que a sobrevivência de embriões de raças taurinas e zebuínas adaptadas ao clima tropical seja superior à de raças taurinas não adaptadas quando submetidos a temperaturas elevadas (ROCHA *et al.*, 1998; PAULA-LOPES *et al.*, 2003; HERNÁNDEZ-CÉRON *et al.*, 2004). No Brasil, MONTEIRO *et al.* (2007) e EBRHARDT *et al.* (2009) obtiveram diferenças significativas na capacidade de desenvolvimento de embriões oriundos das raças Nelore e Holandesa, submetidos a estresse calórico e posterior cultivo *in vitro*.

Outra consequência do processo adaptativo estaria associado a alterações na fisiologia reprodutiva e dinâmica ovariana das raças bovinas autóctones. Com efeito, SEGERSON *et al.* (1984) observaram uma maior população folicular, particularmente de folículos < 5 mm de diâmetro, nos ovários de vacas Brahman em comparação com vacas Angus. Isso explica, em parte, a maior produção de embriões das raças adaptadas ao clima tropical, conforme evidenciou estudo recente com vacas Nelore e Angus submetidas ao processo de superovulação e coleta de embriões (AGUIAR, 2008).

Dentre as raças crioulas *Bos t. taurus* adaptadas ao ambiente tropical do Brasil, destaca-se a Caracu, a qual possui o conceito de ser uma raça tolerante ao calor, resistente a doenças e de boa fertilidade (LIMA *et al.*, 1992). É provável que a seleção natural da raça Caracu tenha resultado em alterações fisiológicas e metabólicas que a tornam próxima da fisiologia reprodutiva das raças zebuínas. Conseqüentemente, considerando que a população folicular da raça Caracu é semelhante à da raça Nelore (*Bos t. indicus*) (ALVAREZ, *et al.*, 2006), pode-se especular que a resposta ovariana ao tratamento de superovulação seja também semelhante entre essas duas raças.

Portanto, o presente estudo objetivou comparar a resposta ovariana e a produção de embriões de vacas Caracu e Nelore submetidas ao processo de superovulação e coleta de embriões.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Local

O experimento foi desenvolvido na área de campo

da Unidade de Reprodução Animal (ULRBPA/CPDGRA) do Instituto de Zootecnia, em Nova Odessa, SP Brasil (latitude 22°46'S; longitude 47°17'W) nos meses de novembro a fevereiro (temperatura média máxima = 30,0 ± 0,8 °C e precipitação média absoluta = 153,1 ± 78,8 mm<sup>3</sup>).

### Animais e manejo

Foram utilizadas vacas das raças Caracu (*Bos t. taurus*, n=40) e Nelore (*Bos t. indicus*, n=50) com idade média (± dp) de 7,2 ± 2,3 anos e condição corporal (média ± dp) de 3,22 ± 0,40, em uma escala de 1 a 5 (HAMILTON, 2006). Os animais foram deixados propositalmente vazios durante o período de aleitamento das crias (aproximadamente seis a sete meses) para atender as necessidades de outro experimento. Dessa forma, a superovulação foi iniciada, em média (± dp), 7,3 ± 0,9 meses após o parto, no período de 15 a 45 dias após a desmama dos bezerros. Todos os animais foram mantidos em pastagens de *Panicum maximum* cv. Tanzânia, sendo que no período da seca (abril a setembro) recebiam suplementação de silagem de milho. Sal mineral e água ficaram disponíveis *ad libitum*.

### Delineamento experimental

Em um momento inespecífico do ciclo estral, os animais foram tratados com um dispositivo intra-vaginal contendo 1,38 g de progesterona (CIDR-B®, Pfizer, Brasil) e injeção intramuscular (IM) de 2,5 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Farmavet, Brasil). No quarto dia, iniciou-se o tratamento de superovulação utilizando 400 UI de pFSH (Pluset®, Calier, Espanha) aplicadas IM, em sub-doses decrescentes (75-75; 75-50; 50-25; 25-25 IU) com intervalos de 12 horas. No sétimo dia foi retirado o CIDR e aplicados, IM, 150 mcg de cloprostenol (Veteglan®, Calier, Espanha). As vacas foram observadas duas vezes ao dia para detectar sinais do estro e inseminadas, sistematicamente, 48 e 62 horas, após o tratamento de cloprostenol. A inseminação foi realizada utilizando o sêmen de dois touros (um para cada raça), cuja fertilidade foi previamente testada em um experimento anterior. Sete dias após a primeira inseminação o número de corpos lúteos (CL) nos ovários foi estimado por ultrassonografia (Ultrassom Pie Medical, com probe de 7.5 MHz) e, em seguida, realizou-se a coleta de embriões (lavagem separada dos cornos uterinos) conforme técnica cervical descrita por ALVAREZ *et al.*, (1994). A avaliação morfológica da qualidade dos embriões foi realizada por somente um técnico, utilizando um microscópio ótico (aumento de 60x) consi-

derando os critérios definidos pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (ROBERTSON; NELSON, 1998). Para fins do presente estudo, os embriões grau 1, 2 e 3 foram considerados transferíveis, enquanto que os embriões grau 4 (degenerados) e os ovócitos não fecundados foram considerados não transferíveis. Todas as variáveis foram analisadas de acordo com a raça, Caracu ou Nelore.

### Análise dos dados

Os dados foram analisados utilizando o software Statistica ((StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). O teste de Chi-quadrado, com a correção de continuidade, foi utilizado para estabelecer diferenças na porcentagem de animais com boa resposta ao tratamento de superovulação (ovários com três ou mais CL), enquanto que as diferenças no número de CL, total de estruturas (ovócitos e embriões) e embriões transferíveis foram analisadas por meio do teste t de Student, considerando os dados como amostras independentes. Os dados originais foram previamente submetidos ao Teste de White e transformados em  $\sqrt{n+0.5}$  para eliminar a heteroscedasticidade dos mesmos. O nível de  $P < 0,05$  foi considerado como significativo.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado dos exames ultrassonográficos dos ovários, no dia da coleta de embriões, evidenciou três

(8,9%) vacas Caracu e cinco (10,0%) vacas Nelore com três ou menos CL ( $P=0,68$ ). Esses animais, bem como outros três (dois Caracu e um Nelore) que apresentaram problemas no retorno do líquido de lavagem uterina durante a coleta de embriões foram excluídos da análise de dados da produção de embriões. A taxa de resposta negativa ao tratamento de superovulação é semelhante à reportada previamente por SILVA *et al.* (2009) na raça Nelore e ALVAREZ *et al.* (2006) nas raças Nelore e Caracu. Esses resultados também confirmam a variabilidade da resposta em termos de produção de embriões, uma vez que aproximadamente 20% das doadoras submetidas ao processo de superovulação e coleta de embriões não produzem nenhum embrião (SILVA *et al.*, 2009; ALVAREZ *et al.*, 2006). A grande variabilidade da resposta ovariana aos tratamentos de superovulação tem sido estabelecida não somente nos bovinos, mas também em outras espécies, inclusive a humana (ALVAREZ, 1994). No presente estudo, a variabilidade da taxa de ovulação foi constatada pelo alto coeficiente de variação (CV) no número de CL presentes nos ovários no dia da coleta (CV=37,4% e 36,0%) nas vacas Caracu e Nelore, respectivamente.

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) no número de CL, total de estruturas (ovócitos e embriões) e de embriões transferíveis das vacas Caracu e Nelore (Tabela 1).

**Tabela 1. Resposta ovariana e produção de embriões (média  $\pm$  EPM) de vacas Nelore (*Bos indicus*) e Caracu (*Bos taurus*) superovuladas com 400 UI de pFSH<sup>1</sup>**

Parâmetro	Raça		
	Nelore	Caracu	P (Teste T)
Nº de animais	44	35	
Corpos lúteos <sup>2</sup>	12,0 $\pm$ 4,1	11,4 $\pm$ 3,3	0.771
Embriões recuperados	9,0 $\pm$ 4,3	8,6 $\pm$ 2,6	0.663
Embriões transferíveis	5,1 $\pm$ 2,9	6,0 $\pm$ 2,4	0.540

<sup>1</sup>Dados originais. Na análise estatística, esses valores foram transformados em  $\sqrt{n+0.5}$ .

<sup>2</sup>Avaliados por ultrassonografia no dia da coleta de embriões.  
EPM = erro padrão da média.

Esses resultados sugerem que a resposta superovulatória do gado Caracu é semelhante à do gado Nelore. Diversos estudos indicaram alterações metabólicas e funcionais decorrentes do processo evolutivo das raças taurinas crioulas, criadas em um ambiente tropical. Por exemplo, sabe-se que a seleção de certas raças taurinas tolerantes ao calor (Senepol, Romosinuano) apresentaram alterações na secreção

de hormônios gonadotróficos e esteróides (D'OoCHIO *et al.*, 1990; ALVAREZ *et al.*, 2000), no crescimento folicular e desenvolvimento luteínico (SEGERSON *et al.*, 1984; SIMPSON *et al.*, 1994), bem como na secreção específica de metabólitos e hormônios metabólicos (SIMPSON *et al.*, 1997; ALVAREZ *et al.*, 2000), que as aproximam da fisiologia reprodutiva e metabólica das raças zebuínas (Brahman).

O grau de resposta ovariana, em termos de produção e qualidade de embriões, sugere que as gonadotrofinas exógenas exercem um estímulo de intensidade semelhante nos ovários das duas raças estudadas. Ao nosso conhecimento, não existem estudos comparando a fisiologia reprodutiva de vacas Caracu com outras raças termo-tolerantes ou suscetíveis ao estresse térmico. Estudos de tolerância ao calor realizados com machos das raças Caracu, Nelore e Angus mostraram que durante o verão, a raça Caracu apresenta comportamento e hábitos de pastejo mais próximos da raça Nelore que da Angus (GLASER, 2008). Desta forma, é provável que a raça Caracu apresente, igualmente, certa similaridade fisiológica à encontrada em raças zebuínas e em outras raças taurinas tolerantes ao calor. Os resultados obtidos no presente experimento são indicativos que vacas Caracu superovuladas em clima tropical apresentam resposta ovariana e produção de embriões semelhante à obtida com vacas Nelore. No entanto, essas informações podem ser consideradas preliminares, sendo necessária a realização de análises mais detalhadas dos aspectos anatômicos (população folicular e dinâmica ovariana) e fisiológicos (sensibilidade ovariana a uma determinada dose de gonadotrofinas) de vacas Caracu frente a outras raças taurinas não adaptadas aos trópicos.

## CONCLUSÕES

A produção de embriões de vacas Caracu superovuladas em clima tropical não é diferente da obtida com vacas Nelore.

Sugere-se a continuidade desta linha de pesquisa, avaliando-se as características fisiológicas, anatômicas e comportamentais da raça Caracu frente a outras raças taurinas não adaptadas aos trópicos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, P.R.L. **Estudo de marcadores moleculares (microssatélites) em vacas doadoras de embriões com diferentes respostas superovulatórias.** 2008, 112f. Tese. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.
- ALVAREZ, P. *et al.* Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science** Champaign, v.78, p.1291–1302, 2000.
- ALVAREZ, R.H. Recentes progressos na superovulação dos bovinos. **Zootecnia**, Nova Odessa, v. 32, p. 3-10, 1994. (Supl.)
- ALVAREZ, R.H.; PIRES, R.M.L.; MARTINEZ, A.C. Resposta ovariana e produção de embriões de vacas superovuladas com pluset ou folltropin em dose única subcutânea. **Acta Scientiae Veterinarie**, Porto Alegre, v. 34, p.516, 2006. (Abstr.).
- D'OCCHIO, M.J.; NEISH, A.; BROADHURST, L. Differences in gonadotrophin secretion postpartum between Zebu and European breed cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 22, p.311–317, 1990.
- EBERHARDT, B.G. *et al.* Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.114, p.54–61, 2009.
- GLASER, D.G. **Aspectos comportamentais de bovinos das raças Angus, Caracu e Nelore a pasto frente à disponibilidade de recursos de sombra e água para imersão.** 2008, 117f. Tese. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.
- HAMILTON, J.G. **Condition scoring of beef cattle.** Agriculture notes. 2006. Disponível em: [http://www.dpi.vic.gov.au/dpi/nreninf.nsf/v/B97320A1EC64D46FCA25741D0003F80D/\\$file/Condition\\_Scoring\\_Beef\\_Cattle.pdf](http://www.dpi.vic.gov.au/dpi/nreninf.nsf/v/B97320A1EC64D46FCA25741D0003F80D/$file/Condition_Scoring_Beef_Cattle.pdf). Acesso em 17/06/2010.
- HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p.349–360, 2004.
- HERNANDEZ-CERON, J.; CHASE JR. C.C.; HANSEN, P.J. Differences in heat tolerance preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 87, p.53-58, 2004.
- LIMA, M.L.P. *et al.* O gado Caracu. **Zootecnia**. Nova Odessa, v. 30, p.1-12, 1992.
- MONTEIRO F.M. *et al.* Resistance of embryos from *Bos indicus* cattle during early stages of in vitro development to heat shock compared to embryos crossbred from crossbred cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.4, n.1-2, p.51-58, 2007.
- PAULA-LOPES, F.F. *et al.* Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract

tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, England, v.125, p.285-294, 2003.

ROBERTSON I.; NELSON R.E. Certification and identification of the embryo. In: Stringfellow DA, Seidel SM. (Ed.) **Manual of the International Embryo Transfer Society. IETS**, 3<sup>a</sup> ed, Savoy, D.A. Stringfellow & S.M. Seidel, 1998, 173p.

ROCHA, A. et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, Amsterdam, 49, 657-665, 1998.

SEGERSON, E. C. et al. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.59, p.1026-1046, 1984.

SILVA, J.C.C. et al. Factors affecting embryo production in superovulated Nelore cattle. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v.6, n.3, p.440-445, 2009.

SIMPSON, R. B. et al. Effect of exogenous estradiol on plasma concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein activity, and metabolites in ovariectomized Angus and Brahman cows. **Domestic Animal Endocrinology**, Amsterdam, v. 14, p.367-380, 1997.

SIMPSON, R. B. et al. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, England, v.102, p.483-492, 1994.