

**LUCIANA DA SILVA LEAL**

**AVALIAÇÕES OVARIANAS, NÍVEIS HORMONAIS E  
ASPECTOS QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS DA  
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS**

**BOTUCATU – SÃO PAULO**

**2004**

**LUCIANA DA SILVA LEAL**

**AVALIAÇÕES OVARIANAS, NÍVEIS HORMONAIS E  
ASPECTOS QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS DA  
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do Título de Mestre em Medicina Veterinária.

**Área de Concentração:**

Reprodução Animal

**Departamento:**

Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

**Orientadora:**

Profa. Dra. Eunice Oba

**BOTUCATU – SÃO PAULO**

**2004**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO  
DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Leal, Luciana da Silva.

Avaliações ovarianas, níveis hormonais e aspectos quantitativos e qualitativos da transferência de embriões em bovinos / Luciana da Silva Leal. – 2004.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2004.

Orientador: Eunice Oba

Assunto CAPES: 50504002

1. Bovino - Embrião

CDD 636.20898

Palavras-chave: Corpo lúteo; Doadoras; Dosagem hormonal; Receptoras; Transferência de embriões

***“ Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive. ”***

**Ricardo Reis**

## DEDICATÓRIA

A DEUS, por minha vida, minha família, minha profissão e por estar sempre olhando por mim.

Aos meus amados pais Fernando e Maria de Lourdes, pelo incentivo, educação, por dedicarem suas vidas a nós e pelo amor incondicional.

Às minhas queridas irmãs Fernanda e Débora, pela união nos momentos difíceis, alegrias e pela linda família que formamos.

Às minhas avós Josefina e Ermelinda (*in memorian*) e aos meus avôs Albertino e Manuel (*in memorian*), por toda a luta, carinho e exemplos de vida.

## AGRADECIMENTOS

À querida Profa. Dra. Eunice Oba, pela oportunidade, orientação, paciência, confiança e incentivo.

Ao Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, pelo auxílio fundamental na execução deste trabalho, dedicação, disponibilidade e conhecimentos transmitidos.

Aos queridos mestres do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária Cezinande de Meira, Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga, Marco Antonio Alvarenga, Maria Denise Lopes, Sony Dimas Bicudo e, em especial, ao Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa, pela participação na minha formação profissional, generosidade e dedicação.

Ao meu anjo da guarda Prof. Dr. Nereu Carlos Prestes, pelo convívio diário, apoio incondicional, amizade e carinho dedicados a mim.

Ao amigo Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira, pelo apoio, incentivo e por sempre acreditar em mim.

À Profa. Dra. Lídia Raquel de Carvalho, do Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, pela realização das análises estatísticas dos resultados.

Ao Prof. Dr. Alcides Amorim Ramos e a colega de pós-graduação Marilu M. Gioso, pelo auxílio no entendimento das análises estatísticas.

Aos pós-graduandos Adriano, André, Bel, Bió, Bigu, Camila, Carla, Cláudia, Dorça, Elen, Fabiana, Henrique, Jussara, Karina, Lindsay, Luciana Batalha, Luciana Takada, Márcio, Marlúcia, Milena, Viviane e Zé, pelo alegre convívio e, em especial a Cely, pelo companheirismo e amizade.

OS

Aos colegas residentes Letícia, Felipe e Karen, pelo excelente ano de trabalho e amizade.

À turma XXXIII, em especial a Marcella, Tatiana, Fernanda, Márcia, Clayton e Luís César pela amizade verdadeira e eterna.

Ao grande amigo Ian Martin, pela presença constante, ajuda sempre que necessária, conversas longas, conselhos, paciência e amizade verdadeira.

Ao amigo Ocilon Gomes de Sá Filho, pela colaboração na execução do experimento.

À amiga Fabíola C. A. de Carvalho, pela generosidade, conselhos e colaboração na realização desta Dissertação.

À amiga Christianne Silva Barreto, pelo apoio, correções, ajuda fundamental para o término desta Dissertação e grande generosidade.

À colega pós-graduanda Maria Inês Lenz Souza, pelo auxílio nas dosagens hormonais.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária Cristina, D. Cida, Edílson, Fátima, Márcio, Marquinho, Miguel, Tico e Walter, pelo excelente convívio e ajuda prestada sempre que preciso.

Às funcionárias da seção de pós-graduação Denise e Maria, pela simpatia e paciência.

À todos os funcionários da limpeza, trato, lavanderia, canil, administração, arquivo e manutenção, pela contribuição no bom funcionamento do Hospital Veterinário.

Aos funcionários das fazendas onde foram realizadas as colheitas e inovulações dos embriões, pelo auxílio na realização deste trabalho.

OS

À bibliotecária Selma Maria de Jesus, pela elaboração da ficha catalográfica.

Aos amigos Cely, Ian e Letícia e a Profa. Dra. Fernanda pela colaboração na elaboração do resumo em inglês.

Ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, pelos momentos felizes que me proporcionou.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida e oportunidade para a realização do curso de pós-graduação.

À todas as pessoas que de alguma maneira sempre me apoiaram. Muito obrigada a todos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
<b>2. 1. Doadoras.....</b>	<b>18</b>
<b>2. 1. 1. Ondas foliculares.....</b>	<b>18</b>
<b>2. 1. 2. Resposta ao tratamento de estimulação ovariana.....</b>	<b>19</b>
<b>2. 1. 3. Produção de embriões.....</b>	<b>20</b>
<b>2. 1. 4. Estágio de desenvolvimento embrionário.....</b>	<b>21</b>
<b>2. 1. 5. Progesterona.....</b>	<b>22</b>
<b>2. 1. 6. Estradiol.....</b>	<b>23</b>
<b>2. 2. Receptoras.....</b>	<b>24</b>
<b>2. 2. 1. Corpo lúteo (CL) e progesterona (P<sub>4</sub>).....</b>	<b>24</b>
<b>2. 2. 2. Efeito do estágio de desenvolvimento e grau de qualidade dos embriões inovulados sobre a prenhez.....</b>	<b>26</b>
<b>2. 2. 3. Assincronia entre receptoras e doadoras.....</b>	<b>27</b>
<b>2. 2. 4. Estradiol.....</b>	<b>28</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3. 1. Animais.....</b>	<b>29</b>
<b>3. 1. 1. Doadoras.....</b>	<b>29</b>
<b>3. 1. 2. Receptoras.....</b>	<b>29</b>
<b>3. 2. Seleção das doadoras.....</b>	<b>29</b>
<b>3. 3. Seleção das receptoras.....</b>	<b>30</b>
<b>3. 4. Estimulação ovariana e indução do cio.....</b>	<b>31</b>
<b>3. 5. Detecção do cio nas doadoras e receptoras e inseminação artificial das doadoras.....</b>	<b>32</b>

○

<b>3. 6. Colheita e classificação dos embriões.....</b>	<b>32</b>
<b>3. 7. Inovulação das receptoras e diagnóstico de gestação.....</b>	<b>36</b>
<b>3. 8. Avaliações ultra-sonográficas.....</b>	<b>37</b>
<b>3. 9. Colheita de sangue.....</b>	<b>37</b>
<b>3. 10. Dosagens hormonais.....</b>	<b>37</b>
<b>3. 11. Análise estatística.....</b>	<b>38</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>4. 1. Doadoras.....</b>	<b>39</b>
<b>4. 1. 1. Avaliação da resposta ovariana.....</b>	<b>39</b>
<b>4. 1. 2. Produção de embriões.....</b>	<b>45</b>
<b>4. 1. 3. Estágio de desenvolvimento e qualidade dos embriões recuperados.....</b>	<b>49</b>
<b>4. 1. 4. Progesterona.....</b>	<b>50</b>
<b>4. 1. 5. Estradiol.....</b>	<b>52</b>
<b>4. 2. Receptoras.....</b>	<b>53</b>
<b>4. 2. 1. Caracterização do corpo lúteo e produção de progesterona.....</b>	<b>54</b>
<b>4. 2. 2. Presença do folículo dominante e produção de 17<math>\beta</math> estradiol.....</b>	<b>65</b>
<b>4. 2. 3. Contratilidade uterina no momento da inovulação.....</b>	<b>67</b>
<b>4. 2. 4. Assincronia entre receptora e doadora.....</b>	<b>68</b>
<b>4. 2. 5. Estágio de desenvolvimento dos embriões inovulados.....</b>	<b>69</b>
<b>4. 2. 6. Qualidade dos embriões inovulados.....</b>	<b>69</b>
<b>5. CONCLUSÕES.....</b>	<b>72</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Atividades sanitárias realizadas nos animais e os meses do ano.....	30
<b>Tabela 2</b> - Esquema do tratamento de estimulação ovariana aplicado aos animais de acordo com o dia do ciclo estral, perfazendo um total de 160 (negrito) e 200 NIH-FSH-P1.....	32
<b>Tabela 3</b> - Descrição dos parâmetros utilizados para a classificação do estágio de desenvolvimento dos embriões bovinos.....	34
<b>Tabela 4</b> - Descrição dos parâmetros utilizados para a classificação dos embriões bovinos quanto à qualidade (constituição morfológica).....	35
<b>Tabela 5</b> - Escore de classificação e qualidade embrionária.....	36
<b>Tabela 6</b> - Média e desvio padrão de CL nos ovários direito e esquerdo e do número total de CL à palpação retal em novilhas e vacas (categoria).....	39
<b>Tabela 7</b> - Média e desvio padrão de CL nos ovários direito e esquerdo e do número total de CL à ultra-sonografia em novilhas e vacas (categoria).....	40
<b>Tabela 8</b> - Matriz de correlações de Pearson referentes às variáveis analisadas (CLODPR, CLODUS, CLOEPR, CLOEUS, CLTOTPR, CLTOTUS) nas doadoras no dia da colheita dos embriões.....	41
<b>Tabela 9</b> - Matriz de correlações de Pearson referentes às variáveis analisadas (CLTOTPR, CLTOTUS, ESTRECUP, EMBVIAV, EMBTRANS) nas doadoras no dia da colheita dos embriões.....	48
<b>Tabela 10</b> - Matriz de correlações de Pearson referentes aos estágios de desenvolvimento (mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido) e graus de qualidade dos embriões (1- excelente, 2- bom e 3- regular) recuperados das doadoras no dia da colheita dos embriões.....	50

## Tabelas

- Tabela 11-** Diâmetros dos CL à ultra-sonografia (mm) segundo o tamanho dos CL à palpação retal. 56
- Tabela 12-** Distribuição da freqüência das novilhas receptoras (n= 50) segundo o diâmetro do CL (mm) ao ultra-som e prenhez. 57
- Tabela 13-** Distribuição da freqüência das novilhas receptoras (n= 26) segundo o diâmetro da cavidade cística (mm) e prenhez. 58
- Tabela 14-** Distribuição da freqüência das novilhas receptoras (n= 50) segundo o volume do corpo lúteo (cm<sup>3</sup>) e prenhez. 59
- Tabela 15-** Distribuição da freqüência das novilhas receptoras (n= 26) segundo o volume da cavidade cística (cm<sup>3</sup>) e prenhez. 60
- Tabela 16-** Distribuição da freqüência das novilhas receptoras (n= 50) segundo o volume da massa luteal (cm<sup>3</sup>) e prenhez. 61
- Tabela 17-** Medianas e primeiro e terceiro quartis para o volume da massa luteal e tamanhos do CL à palpação retal. 61
- Tabela 18-** Matriz de correlações de Pearson referentes às variáveis diâmetro do CL (DIAM CL), volume do corpo lúteo (VOL CL), diâmetro da cavidade cística (DIAM CC), volume da cavidade cística (DIAM CC) e volume da massa luteal (VOL ML), obtidas pelo exame ultra-sonográfico realizado nas receptoras no dia da inovulação dos embriões. 62
- Tabela 19-** Distribuição da freqüência das novilhas receptoras (n= 53) segundo a concentração plasmática de progesterona (ng/mL) e prenhez. 63
- Tabela 20-** Matriz de correlações de Pearson referentes às variáveis concentração plasmática de progesterona (CONC P<sub>4</sub>), concentração plasmática de estradiol (CONC E<sub>2</sub>), diâmetro do CL (DIAM CL), volume do CL (VOL CL), diâmetro da

## Tabelas

cavidade cística (DIAM CC), volume da cavidade cística (VOL CC) e volume da massa luteal (VOL ML) nas receptoras no dia da inovulação dos embriões. 64

**Tabela 21-** Distribuição de freqüência das novilhas receptoras (n = 57) segundo o volume da massa luteal (cm<sup>3</sup>) e concentração plasmática de progesterona (ng/mL) 65

**Tabela 22-** Distribuição de freqüência das novilhas receptoras (n= 53) segundo a concentração plasmática de estradiol (pg/mL) e prenhez. 66

**Tabela 23-** Matriz de correlações de Pearson referentes às variáveis concentração plasmática de estradiol (CONC E<sub>2</sub>), concentração plasmática de progesterona (CONC P<sub>4</sub>), diâmetro do CL (DIAM CL), volume do CL (VOL CL), diâmetro da cavidade cística (DIAM CC), volume da cavidade cística (VOL CC) e volume da massa luteal (VOL ML) nas receptoras, no dia da inovulação dos embriões. 67

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1-** Diagrama de dispersão referente as variáveis corpos lúteos no ovário direito à palpação retal (CLODPR) e corpos lúteos no ovário direito à ultra-sonografia (CLODUS). 42
- Figura 2-** Diagrama de dispersão referente as variáveis corpos lúteos no ovário esquerdo à palpação retal (CLOEPR) e corpos lúteos no ovário esquerdo à ultra-sonografia (CLOEUS). 42
- Figura 3-** Diagrama de dispersão referente as variáveis número total de corpos lúteos à palpação retal (CLTOTPR) e número total de corpos lúteos à ultra-sonografia (CLTOTUS). 43
- Figura 4-** Imagens ultra-sonográficas de doadoras superovuladas. Corpo lúteo não cavitário (a), corpo lúteo com cavidade (b) e folículo (c). 44
- Figura 5-** Imagens ultra-sonográficas de corpos lúteos das receptoras. Corpo lúteo cavitário (a) e sem cavidade (b). 55
- Figura 6-** Embriões classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária como mórula de grau 2 (1, 3 e 12), mórula de grau 3 (4, 6, 9, 10 e 11), blastocisto inicial de grau 2 (7) e embrião degenerado (2, 5 e 8) 71
- Figura 7-** Embriões classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária como blastocisto de grau 1 (1), blastocisto inicial de grau 2 (2) e mórula de grau 3 (3). 71

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CLODPR - corpos lúteos no ovário direito à palpação retal  
CLODUS - corpos lúteos no ovário direito à ultra-sonografia  
CLOEPR - corpos lúteos no ovário esquerdo à palpação retal  
CLOEUS - corpos lúteos no ovário esquerdo à ultra-sonografia  
CLTOT – corpos lúteos totais  
CLTOTPR - número total de corpos lúteos à palpação retal  
CLTOTUS - número total de corpos lúteos à ultra-sonografia  
CONC E<sub>2</sub> - concentração plasmática de estradiol  
CONC P<sub>4</sub> – concentração plasmática de progesterona  
17β E<sub>2</sub> – 17 beta estradiol  
DIAM CC – diâmetro da cavidade cística  
DIAM CL – diâmetro do corpo lúteo  
E<sub>2</sub> - estradiol  
eCG - gonadotrofina coriônica eqüina  
EMBVIAB – embriões viáveis  
EMBTRANS – embriões transferidos  
ESTRECUP – estruturas recuperadas  
FSH – hormônio folículo estimulante  
FSH-p - hormônio folículo estimulante de origem suína  
hMG - gonadotrofina humana da menopausa  
IFN τ – interferon tau  
IGF-I - fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I  
°C – graus centígrados  
LH – hormônio luteinizante  
P<sub>4</sub> - progesterona  
PGF<sub>2</sub>α - prostaglandina F 2 alfa  
PR – palpação retal  
VOL CC – volume da cavidade cística  
VOL CL – volume do corpo lúteo  
VOL ML – volume da massa luteal  
US – ultra-som

## 1. INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira passa por um processo de transformação, no qual procura-se maximizar a produtividade, utilizando tecnologias que permitam lucro na produção. Com o propósito de se aproveitar melhor a capacidade reprodutiva de animais geneticamente superiores e conhecendo-se mais a fisiologia ovariana, foram desenvolvidos protocolos hormonais que possibilitaram a ovulação múltipla seguida da transferência de embriões.

O desenvolvimento dessas biotecnologias possibilitou o aumento dos índices reprodutivos em fêmeas bovinas, maior intensidade de seleção, diminuição do intervalo entre gerações, maior disponibilidade de animais para reposição (PENNA, 1993) e, além disso, também permitiu que uma fêmea de elevado padrão zootécnico fosse utilizada de uma forma mais racional, fornecendo um grande número de descendentes, num curto espaço de tempo (FERNANDES, 1994). No entanto, apresentam custo elevado e variação nos resultados, devido aos fatores que influenciam a resposta ovulatória de doadoras, que afetam a fertilização e a viabilidade embrionária e aqueles relacionados ao programa e ao manejo animal (ARMSTRONG, 1993).

A alta variabilidade de resposta à superestimulação ovariana pode ser decorrente do dia do início do tratamento hormonal, atividade biológica e dose da gonadotrofina utilizada, fatores individuais, idade e raça da doadora (REICHENBACH et al., 2001; PEIXOTO et al., 2002).

As causas da taxa de concepção baixa são inerentes ao embrião, à receptora, ao ambiente e ao método de inovulação (SREENAN & DISKIN, 1987).

Com relação ao programa de transferência de embrião e ao manejo animal, a seleção de doadoras e receptoras, alimentação dos animais, qualidade do sêmen, habilidade dos técnicos, controle do estro, manejo geral da propriedade e estacionalidade climática podem interferir nos resultados finais de prenhez (MORAES, 1990; ARMSTRONG, 1993).

Sabe-se da importância das biotecnologias de ovulação múltipla, transferência de embrião e técnicas afins (fertilização e maturação *in vitro*, produção de clones e animais transgênicos) para a exploração mais efetiva de fêmeas geneticamente

---

ão

superiores e a influência dos hormônios sobre a regulação do ciclo estral, no processo de implantação embrionário e na manutenção da gestação.

Os objetivos do presente trabalho foram analisar a resposta ovariana à estimulação hormonal e produção de embriões das doadoras; avaliar o corpo lúteo e o tônus uterino das receptoras; estudar o grau de assincronia entre receptoras e doadoras e determinar a concentração plasmática de progesterona e estradiol nas doadoras e receptoras, no dia da transferência de embriões. Com vista a estas considerações, o presente trabalho teve como finalidade contribuir para um melhor entendimento, aperfeiçoamento e expansão desta técnica para a obtenção de melhores resultados.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2. 1. Doadoras**

#### **2. 1. 1. Ondas foliculares**

Nos bovinos cada ciclo estral apresenta duas ou três ondas de crescimento folicular (SAVIO et al., 1988; SIROIS & FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989) e, eventualmente, uma ou quatro (SIROIS & FORTUNE, 1988; RHODES et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 1997). Uma nova onda folicular ocorre, aproximadamente, a cada dez dias (seis a quinze dias de variação) e precedendo o início de cada onda, existe um aumento da secreção de FSH (hormônio folículo estimulante) (ADAMS et al., 1992a; ADAMS et al., 1992b; HAMILTON et al., 1992; SUNDERLAND et al., 1994; GONG et al., 1995; GINTHER et al., 1996).

Dos folículos que iniciam a emergência da onda, um deles é selecionado tornando-se dominante e continua crescendo, enquanto os outros regredem e tornam-se atrésicos (REICHENBACH et al., 2001). Um dos mecanismos essenciais para o desvio (início da maior diferença nas taxas de crescimento entre os dois maiores folículos da onda) é a diminuição da concentração plasmática de FSH (GINTHER et al., 1999). A capacidade do folículo dominante em continuar crescendo após o declínio da concentração de FSH pode ser decorrente do aumento da biodisponibilidade do IGF-I (fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I) no folículo, da expressão de RNA mensageiro do receptor de LH (hormônio luteinizante) e da expressão de receptores de LH nas células da granulosa, que conferem maior responsividade ao LH em relação aos folículos menores (CROWE, 1999).

O tratamento superovulatório suprime a deficiência de FSH, neutralizando os efeitos da dominância folicular, impedindo a divergência e permitindo o desenvolvimento simultâneo de vários folículos (REICHENBACH et al., 2001).

## **2. 1. 2. Resposta ao tratamento de estimulação ovariana**

Os protocolos hormonais utilizados para provocar a superovulação nas vacas doadoras apresentam respostas extremamente variáveis (DONALDSON, 1984), impossibilitando a previsão do número de embriões que serão recuperados (SILVA, 2002). Os fatores responsáveis pela variabilidade dos resultados são de origem múltipla e ainda pouco compreendidos (ALVAREZ, 1994; KAFI & MC GOWAN, 1997). Mas é sabido que, tipo e dose da gonadotrofina utilizada; dia do início do tratamento hormonal; raça, idade, condição corporal, sanidade; superovulações consecutivas; estação do ano; manejo geral da propriedade e fatores individuais determinam o sucesso ou não de um programa comercial de transferência de embriões (MORAES, 1990; SILVA, 2002).

Entre as principais gonadotrofinas utilizadas destacam-se a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) administrada isoladamente (BOLAND et al., 1978) ou associada ao soro anti-eCG (DIELEMAN et al., 1993; SILVA et al., 2002), a gonadotrofina humana da menopausa (hMG) (ALVAREZ et al., 1987) e o hormônio folículo estimulante (FSH) proveniente do extrato de hipófises de suínos, eqüinos e ovinos (DONALDSON, 1989) ou, mais recentemente, o FSH recombinante bovino (MARTINS Jr. et al., 1998). Porém, o FSH-p (hormônio folículo estimulante de origem suína) e o eCG são os hormônios mais utilizados (MORAES, 1990; SILVA et al., 2002). O eCG tem sido associado com um número elevado de folículos anovulatórios devido à sua meia-vida longa no sangue. O uso do soro anti-eCG diminui a incidência destes folículos, porém não ocorre um aumento correspondente no número de embriões transferíveis. Já o FSH com sua meia-vida curta resulta em taxa de ovulação equivalente, mas o total de embriões viáveis é maior (BOLAND et al., 1991).

Moraes (1990) trabalhando com 217 doadoras *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* encontrou médias de 8,25 e 9,37 corpos lúteos (CL) por colheita, quando utilizou eCG e FSH-p respectivamente. Estes resultados não acusaram diferença significativa entre os tratamentos efetuados, embora tenha sido observada uma tendência favorável ao FSH-p. Este mesmo autor verificou a influência do tipo racial sobre os valores médios de CL palpados que foram de 8,62 e 10,38 para vacas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* respectivamente.

Em se tratando de raças zebuínas, mais especificamente da raça Brahman Massey & Oden (1984) obtiveram média de 9,30 CL em vacas superovuladas com FSH. Já Dhanani et al. (1991) alcançaram resultado superior (10,60 CL por animal) em 97 doadoras da mesma raça, superovuladas com este hormônio. Gradela et al. (1996) detectaram média de 13,08 CL em 13 vacas Nelore tratadas com uma dose total de 22 mg de Folltropin-V<sup>®1</sup>.

Com relação às raças taurinas, o resultado obtido por Massey & Oden (1984) foi de 8,40 CL por colheita, valor este considerado alto. Bényei & Barros (2000) quando avaliaram o desempenho de vacas Holandesas importadas submetidas à estimulação ovariana com duas gonadotrofinas (FSH e eCG), nos dois primeiros anos de adaptação, conseguiram 3,30 e 8,20 número de CL para estimulação por FSH e 4,20 e 9,60 para o eCG.

### **2. 1. 3. Produção de embriões**

Ao analisar o tipo racial sobre a produção de embriões, Donaldson (1984) encontrou valores médios de 11,10 estruturas recuperadas e 5,30 embriões transferíveis para *Bos taurus taurus* de corte, enquanto que as doadoras do tipo *Bos taurus indicus* apresentaram, em média, 9,20 estruturas e 3,40 embriões transferíveis; ambas submetidas a tratamentos estimulantes com FSH-p. Seguindo a mesma linha de pesquisa, Moraes (1990) obteve números de estruturas colhidas e embriões viáveis por animal de 8,43 e 3,08 para vacas taurinas e 5,72 e 2,42 para vacas indianas. No entanto Gradela et al. (1996) e Silva et al. (2003) mostraram resultados superiores quando observaram a resposta ovariana de vacas Nelore tratadas com FSH. Os primeiros autores recuperaram, em média, 10,28 embriões por fêmea, dos quais 5,23 foram classificados como viáveis e, os últimos autores colheram, em média 11,50 embriões por fêmea, sendo 5,30 embriões transferíveis. Fonseca et al. (2001) descreveram em vacas zebuínas doadoras de embriões uma média geral de 5,20 estruturas viáveis ao utilizar o protocolo de 350 UI de FSH, administrado em 8 doses decrescentes, a cada 12 horas, a partir do décimo dia do ciclo estral.

---

<sup>1</sup> Folltropin-V<sup>®</sup> - Vetrepharm Inc. - Canadá

---

**Literatura**

Segundo Demczuk et al. (1998) a raça Simental apresentou um ótimo desempenho nas biotécnicas de ovulação múltipla e transferência de embriões. A média de embriões recolhidos no experimento realizado por estes pesquisadores mostrou-se satisfatória (9,80). Na mesma raça Jacomini & Diniz (2000) também registraram resultados bons, com médias de estruturas recuperadas, viáveis e degeneradas ou não fecundadas de 11,85; 6,68 e 5,17 respectivamente.

Bényei & Barros (2000) relataram números de embriões viáveis de 1,90 e 2,30; 5,50 e 4,00 para protocolos com FSH e eCG respectivamente, no primeiro e segundo ano após adaptação climática de vacas Holandesas importadas. Já para estruturas não fertilizadas e degeneradas, os valores foram de 0,90 e 1,00 para FSH e 1,50 e 3,40 para eCG. Segundo estes autores, as taxas obtidas durante o período de adaptação foram em decorrência das temperaturas elevadas, não caracterização das estações do ano e à continuidade das horas claras. No entanto quando Silva et al. (2002) compararam a resposta superovulatória de novilhas e vacas leiteiras Holandesas tratadas com as mesmas gonadotrofinas, obtiveram resultados superiores de estruturas colhidas, fertilizadas e viáveis, sendo de 7,90; 6,00 e 5,20 para vacas; 9,90; 7,60 e 6,40 para novilhas; 8,50; 6,30 e 5,20 para animais tratados com eCG associado ao soro anti-eCG e 9,50; 7,40 e 6,50 para animais tratados com FSH. Estes autores concluíram que as novilhas responderam melhor do que as vacas e que a utilização do FSH apresentou maior eficácia. Em estudo realizado por Negrão et al. (2003) com vacas leiteiras não lactantes, submetidas a uma dieta de manutenção e à administração de FSH, o número de embriões viáveis por doadora foi de apenas 3,56.

#### **2. 1. 4. Estágio de desenvolvimento embrionário**

De 1495 embriões viáveis de vacas taurinas avaliados por Callensen et al. (1995), 84,50% estavam em estágios iniciais de desenvolvimento (5,80% mórulas, 56,10% mórulas compactas e 22,60% blastocistos iniciais) e 15,50% em estágios mais avançados (10,30% blastocistos e 5,20% blastocistos expandidos). Fonseca et al. (2001) recuperaram em animais de raças zebuínas 3,70% mórulas, 16,30% blastocistos iniciais, 37,00% blastocistos, 42,20% blastocistos expandidos e 0,70% blastocistos eclodidos. Segundo estes autores, a incidência elevada de estágios

---

Literatura

avançados de desenvolvimento embrionário, no sétimo dia após o estro em zebuínos, pode estar relacionada à ovulação. Em experimento realizado por Randel (1984) fêmeas zebuínas apresentaram concentração de LH mais baixa durante o pico pré-ovulatório e o intervalo entre o início do estro e o pico pré-ovulatório de LH foi de apenas  $0,40 \pm 3,40$  horas em novilhas Brahman, enquanto que para novilhas Brahman x Hereford e Hereford foram, respectivamente, de  $6,80 \pm 2,10$  e  $5,30 \pm 1,30$  horas. Mizuta (2003) também obteve este intervalo, em média, maior para vacas Angus (8,00 horas) e Nelore x Angus (8,00 horas) do que para vacas Nelore (2,00 horas). Trabalhos com fêmeas européias encontraram valores de  $4,57 \pm 0,48$  horas (Dieleman et al., 1986) e entre 4,00 e 8,00 horas (Kaneko et al., 1991). Ovulações precoces podem resultar em fertilizações também mais precoces, permitindo aos embriões zebuínos mais tempo para o desenvolvimento e possibilitando-lhes atingirem estágios de desenvolvimento mais avançados no dia da colheita (Fonseca et al., 2001).

### **2. 1. 5. Progesterona**

A progesterona ( $P_4$ ) secretada pelas células luteínicas, placenta e glândula adrenal, apresenta como função básica preparar o endométrio para a implantação e manutenção da prenhez pelo aumento da secreção e inibição da motilidade miometrial (HAFEZ, 2000).

Trabalhos com as concentrações plasmáticas de  $P_4$  e estradiol ( $E_2$ ) em vários dias do ciclo estral têm ajudado a estimar quais fêmeas irão responder ao tratamento de estimulação ovariana e os índices de embriões recuperados e viáveis (DHANANI et al., 1991; GRADELA et al., 1996; SILVA et al., 2002). Diversos estudos foram realizados com o intuito de avaliar os fatores endócrinos que afetam a produção e a viabilidade embrionária. Entre eles, o experimento realizado por Gradela et al. (1996), no qual concluíram que a concentração plasmática  $P_4$  e  $E_2$  antes, durante e após a hiperestimulação do ovário parece afetar a resposta deste órgão e os números de embriões recolhidos e viáveis. Entretanto estas dosagens foram mais importantes no dia do estro induzido, quando esses hormônios ( $P_4$  e  $E_2$ ) foram correlacionados à qualidade dos embriões recuperados. Dhanani et al. (1991) mostraram que o conhecimento da concentração de  $P_4$  no primeiro dia da

---

Literatura

administração do FSH (dia 10) em fêmeas indianas poderia prever quais animais responderiam ou não ao tratamento hormonal. Nesta pesquisa, foram utilizados 97 animais da raça Brahman, sendo que 65 (67,00%) superovularam e 32 (33,00%) não responderam à administração da gonadotrofina. As taxas médias de  $P_4$  diferiram entre estes animais no primeiro e terceiro dia do tratamento superovulatório, no terceiro dia após o estro e no dia da colheita dos embriões. E nestes mesmos dias, os valores de  $P_4$  foram correlacionados significativamente ( $p < 0,05$ ) com o total de embriões recuperados e transferíveis. Silva et al. (2002) também obtiveram concentração de  $P_4$  menor em doadoras taurinas não responsivas, nos dias cinco e sete após o estro subsequente a superovulação. A  $P_4$  plasmática apresentou correlação positiva com os índices de estruturas recuperadas, fertilizadas e viáveis.

Santiago et al. (2000) comparando as concentrações plasmáticas de  $P_4$  no dia da colheita dos embriões, frente à utilização de 250 ou 500 UI de FSH em 17 novilhas Nelore, verificaram que a taxa deste esteróide está diretamente relacionada ao número de CL formados e inversamente correlacionada à dose de FSH.

Negrão et al. (2003) observaram taxa de  $P_4$  maior no dia da recuperação dos embriões do que durante o tratamento hormonal para induzir ovulações múltiplas.

### **2. 1. 6. Estradiol**

O  $E_2$  é o estrógeno biologicamente ativo produzido pelo ovário. De todos os esteróides, os estrógenos apresentam a mais ampla extensão de funções fisiológicas; este hormônio é necessário para as manifestações comportamentais do estro, contudo, em algumas espécies, pequena quantidade de  $P_4$  proveniente do corpo lúteo lizado é necessária para causar tais manifestações. Outras ações em relação à reprodução incluem o desenvolvimento físico das características sexuais secundárias femininas, crescimento do ducto e desenvolvimento da glândula mamária, controle da liberação de hormônios hipofisários e potencialização dos efeitos da ocitocina e prostaglandina  $F2\alpha$  ( $PGF2\alpha$ ) na contração uterina (HAFEZ, 2000).

A concentração de  $E_2$  durante o estro é geralmente superior nos animais superovulados e existe uma correlação positiva entre a taxa de  $E_2$  no dia do estro subsequente ao tratamento hormonal de estimulação ovariana e os números de

## Literatura

ovulações (GREVE et al., 1995; FERNANDES, 2000) e embriões viáveis (GRADELA et al., 1996). Gradela et al. (1996) agruparam animais de acordo com a concentração plasmática de  $P_4$  nos dias 13 e 14 do ciclo estral, ou seja, 24 e 48 horas após a aplicação de  $PGF2\alpha$ , sendo que no grupo I, a taxa de  $P_4$  plasmática foi menor ou igual a 1,00 ng/mL e no grupo II, maior que 1,00 ng/mL. No grupo I a concentração plasmática de  $E_2$  não diferiu entre os dias analisados (10; 11; 13; 14 e 21) sendo que a média foi de 7,03 pg/mL. Já no grupo II o  $E_2$  aumentou após a primeira aplicação de FSH (dia 10 –  $11,34 \pm 1,22$  pg/mL) alcançando a concentração máxima no dia 14 ( $37,45 \pm 3,50$  pg/mL). Estes autores observaram uma correlação positiva entre embriões viáveis e níveis de  $E_2$  no dia 14 no grupo I e nos dias 13 e 14 no grupo II.

## **2. 2. Receptoras**

### **2. 2. 1. Corpo lúteo (CL) e progesterona ( $P_4$ )**

Segundo Fields & Fields (1996) o CL é formado a partir da hiperplasia e diferenciação das células da granulosa e da teca do folículo ovulatório. É uma estrutura primariamente reconhecida pela habilidade em sintetizar e secretar  $P_4$ , hormônio que está intimamente relacionado com a manutenção de um ambiente adequado ao desenvolvimento embrionário e manutenção do próprio CL durante o período da ovulação à implantação, quando ocorre o reconhecimento materno da gestação (FIELDS & FIELDS, 1996). Existem evidências de que o CL de *Bos taurus indicus* produz menos  $P_4$  do que o de fêmeas *Bos taurus taurus* (RANDEL, 1989). Segundo Segerson et al. (1984) fêmeas zebuínas apresentaram CL menor com menos conteúdo de  $P_4$  por grama de tecido luteal. Neste aspecto, estudos reportaram que a detecção do CL por palpação retal é mais difícil em zebuínos do que em taurinos (PLASSE et al., 1968; VALE FILHO et al., 1986).

A caracterização do CL fornece informações importantes sobre o estado reprodutivo da fêmea bovina e possibilita a adequação de procedimentos de manipulação ou sincronização do ciclo estral (VIANA et al., 1999). A seleção das receptoras no dia da transferência de embriões geralmente é realizada levando-se em consideração o tamanho do CL à palpação retal. Este método apesar da

---

## Literatura

praticidade e facilidade de execução, apresenta limitação na avaliação devido à sua baixa sensibilidade e especificidade (SPRECHER et al., 1989). O trabalho realizado por Vianna (1996) mostrou que a escolha das receptoras pela projeção do CL não é adequada. Um CL com projeção pequena pode apresentar uma porção grande embebida no estroma ovariano, enquanto que um CL com projeção maior pode apresentar massa luteal total pequena. Assim a projeção nem sempre está relacionada ao tamanho do CL. Um método mais eficiente de estimar a massa luteal total por palpação retal, é pelo aumento de volume que o CL proporciona ao ovário no qual está presente (FERNANDES & VELÁSQUEZ, 1997). Segundo Nickel et al. (1973) os ovários da espécie bovina são relativamente simétricos, ou seja, possuem o mesmo volume.

A ultra-sonografia é uma técnica que permite a completa visualização do tecido luteal, possibilitando maior precisão na identificação e na mensuração do CL. (PIERSON & GINTHER, 1987; RIBADU et al., 1994). Nesta avaliação a imagem do CL é uniforme, circunscrita e menos ecogênica que o estroma ovariano (VIANA et al., 1999).

Durante o ciclo estral, os níveis de  $P_4$  refletem o crescimento, a manutenção e a regressão luteal (SPANNO & SILVA, 1992) e sua avaliação permite a associação das características morfológicas do CL ao ultra-som com o seu estado funcional. A concentração de  $P_4$  circulante depende diretamente de sua produção, da liberação pelo tecido luteal e da taxa de *clearance* (VIANA et al., 1999). Fatores como o fluxo sanguíneo, presença de agentes luteotróficos ou luteolíticos e a disponibilidade de precursores para a sua biossíntese pelas células luteais interferem na produção deste hormônio (WILTBANK, 1994). Estes interagem determinando um padrão de secreção circadiana para os esteróides ovarianos (SPANNO & SILVA, 1992).

O estabelecimento da prenhez em vacas receptoras de embrião é um evento multifatorial que envolve a interação de variáveis hormonais, bioquímicas e fisiológicas (FARIN et al., 2001). A perda da prenhez é maior durante o período embrionário (da concepção até o final da organogênese, entre os dias 1 e 42) do que durante os períodos fetal (da completa diferenciação dos órgãos ao parto, entre os dias 42 e 280) e neonatal (do parto ao 28º dia de vida extra-uterina) (HUBBERT, 1974).

É no período embrionário que ocorre a liberação de *interferon-tau* (IFN- $\tau$ ) e o reconhecimento materno da gestação (ROBERTS et al., 1999). O IFN- $\tau$  é um complexo de glicoproteínas secretado em grande quantidade pelo concepto entre os dias 17 e 22 da gestação. Este complexo age de maneira antiluteolítica, inibindo ou alterando o padrão de secreção endometrial de PGF2 $\alpha$ ; além disso, possui atividades antiviral e antiproliferativa que auxiliam na manutenção da prenhez (KERBLER et al., 1997). Neste experimento, Kerbler et al. (1997) encontraram uma correlação positiva entre a concentração de P<sub>4</sub> e síntese de IFN- $\tau$  pelo concepto, sugerindo que o aumento das concentrações de P<sub>4</sub> na vaca é benéfico ao desenvolvimento embrionário.

### **2. 2. 2. Efeito do estágio de desenvolvimento e grau de qualidade dos embriões inovulados sobre a prenhez**

Estudos demonstraram que não houve diferença na taxa de prenhez entre os estágios de desenvolvimento embrionário (SHEA, 1981; LINDNER & WRIGHT, 1983; TAKEDA et al., 1986; MORAES, 1990; HASLER, 2001; SPELL et al., 2001), entretanto outros autores (WRIGHT, 1981; NIEMANN et al. 1982; LOONEY et al., 1984; DONALDSON, 1985; WRIGHT, 1985; KIM, 1987; MC EVOY & SREENAN, 1990) verificaram que a inovulação de blastocistos resultaram em índices de prenhez maiores do que as mórulas. Porém para Berlin et al. (1983) a maior porcentagem de gestação foi obtida com a inovulação de mórulas. Takeda e colaboradores (1986) conseguiram taxas médias de prenhez para a transferência de mórulas, blastocistos iniciais e blastocistos de graus 1 e 2, de 67,00; 67,50 e 73,00% respectivamente. Para Moraes (1990) as taxas de prenhez quando se inovulou estruturas de diferentes padrões foram de 13,74% (mórulas), 10,00% (blastocistos iniciais), 15,43% (blastocistos) e 5,22% (blastocistos em expansão). Hasler (2001) descreveu resultados bem melhores de prenhez (66,90; 70,30; 70,90; 71,40 e 56,00% para mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido). Spell et al. (2001) obtiveram índices de gestação para mórula inicial, mórula compacta, blastocisto inicial e blastocisto de 50,00; 73,40; 73,10 e 63,20%, respectivamente.

---

## Literatura

As porcentagens de prenhez após a transferência de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* ou *in vitro* são influenciadas pela qualidade embrionária (FARIN et al., 1999). Thibier & Nibart (1992) e Janowitz (1995) destacaram a grande importância desta característica para a obtenção de bons resultados.

A avaliação morfológica da qualidade embrionária é subjetiva e influenciada pelo avaliador e pelas normas dos laboratórios. De acordo com a classificação de qualidade embrionária é esperado encontrar uma diferença significativa na taxa de sobrevivência entre as estruturas de graus extremos; entretanto, entre cada grau isto não é sempre evidente (SREENAN & DISKIN, 1987). Mapletoft (1985) obteve os melhores resultados transferindo embriões excelentes ou bons no estágio de mórula tardia a blastocistos. Fernandes (1995) relatou taxas de gestação semelhantes para embriões classificados como excelentes e bons (54,90 e 52,90%) e inferiores para regulares e ruins (28,50% e 0). No entanto, no estudo realizado por Farin et al. (1999) a inovulação de embriões grau 1 (excelente) resultou em número maior de receptoras gestantes do que para graus 2 e 3 (bom e regular). Em experimento realizado por Hasler (2001), o grau do embrião foi um fator significativo para o estabelecimento da prenhez. Os índices de gestação obtidos com a inovulação de embriões frescos de graus 1; 2 e 3 foram de 73,20; 68,30 e 56,30% respectivamente.

A inovulação de embriões de qualidade inferior pode acarretar uma alta taxa retorno ao estro e uma maior incidência de morte embrionária tardia (FERNANDES, 1995). Para Solano et al. (2003) as vacas que receberam embriões de baixa qualidade apresentaram índice mais elevado de retorno ao estro (74,10%) do que aquelas que receberam embriões excelentes (60,70%) e bons (60,80%).

### **2. 2. 3. Assincronia entre receptoras e doadoras**

Para que a transferência de embriões tenha sucesso é necessária a sincronização entre o estágio de desenvolvimento do embrião e o trato reprodutivo da fêmea. É sabido que a taxa de prenhez diminui com o grau de assincronia, mas segundo Seidel (1980) existe uma tolerância de 1,5 dias. Para Coelho (1986) as taxas de prenhez de acordo com o grau de assincronia das receptoras em relação às doadoras em dias, foram de -2 (25,30%), -1 (55,50%), 0 (63,80%), +1 (63,00%) e

## Literatura

+2 (22,40%), confirmando a afirmação feita por Hafez (2000) de que o tempo de assincronia não deve ultrapassar 24 horas, pois os melhores resultados ocorrem no período máximo de 12 horas. Hasler (2001) registrou que a assincronia do estro entre +24 e -24 horas não afetou os índices de prenhez para embriões frescos e criopreservados.

Spell et al. (2001) observaram melhores taxas de gestação quando as doadoras estavam no estro 12 a 24 horas antes do que as receptoras e piores, quando as doadoras apresentavam sinais de estro 12 horas após as receptoras; porém sem diferença estatística. Segundo Reichenbach et al. (2001) para a inovulação de embriões de qualidade boa (classes 1 ou 2) à fresco ou criopreservados, recomenda-se o uso de receptoras que tenham mostrado sinais de estro no mesmo período das doadoras.

#### **2. 2. 4. Estradiol**

A concentração de  $E_2$  durante a sincronização do estro foi negativamente correlacionada ( $r = -0,39$ ) com as taxas de prenhez após a inseminação artificial (WEHRMAN et al., 1993). Vacas mais velhas (com mais de 12 anos) apresentaram concentrações circulantes de  $17\beta E_2$ , durante a fase folicular, maior do que vacas novas (WINDER et al., 1981; BRYNER et al., 1990). A concentração de  $E_2$  elevada nesta fase do ciclo estral foi associada a valores baixos de fertilização e implantação; e incidência maior de anormalidades embrionárias (BRYNER et al., 1990; BRUEL et al., 1993). Elevações prolongadas nas concentrações de  $E_2$  durante o ciclo estral anterior podem alterar a função uterina do ciclo subsequente e conseqüentemente um ambiente intrauterino inadequado ou adverso pode aumentar as perdas embrionárias e diminuir as taxas de prenhez. A interação entre concentração baixa de  $P_4$  e alta de  $E_2$ , durante a regulação da maturação oocitária e preparação do oviduto e/ou do útero para a manutenção do embrião pode influenciar negativamente as taxas de prenhez. No entanto, Wehrman et al. (1997) não observaram os efeitos descritos por Bryner et al. (1990) e Bruel et al. (1993).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3. 1. Animais**

##### **3. 1. 1. Doadoras**

Foram utilizadas 19 novilhas e 36 vacas doadoras das raças Limousin (12), Red Angus (16) e Simental (27), com idade entre 16 e 40 meses, pertencentes a Casa Branca Agropastoril - Fazenda Água Limpa e a Fazenda Santa Rosa, localizadas no município de Fama e Elói Mendes respectivamente, região sul do Estado de Minas Gerais, com clima mesotérmico de classificação Cw, segundo Köppen. Os animais foram mantidos em regime de semiconfinamento, com dieta composta de silagem de milho e ração comercial, visando um balanço energético positivo segundo o NRC (Nutrient Requirement Council – 1998) para manutenção de um escore corporal de três a quatro, numa escala de um a cinco. A alimentação foi fornecida em cochos individuais, duas vezes ao dia, e entre os horários de arraçoamento e à noite, os animais permaneceram em piquetes de capim *Brachiaria brizantha* com suplementação mineral e água *ad libitum*.

##### **3. 1. 2. Receptoras**

Foram utilizadas 60 novilhas receptoras, mestiças, com peso acima de 300 kg, escore corporal acima de três, pertencentes às mesmas propriedades e mantidas em piquetes de capim *Brachiaria decumbens* com suplementação mineral e água *ad libitum*.

#### **3. 2. Seleção das doadoras**

Realizou-se exame ginecológico completo nas doadoras que apresentaram dois ciclos estrais fisiológicos e regulares, utilizando-se vaginoscopia, palpação retal e ultra-sonografia, com o objetivo de detectar alguma anormalidade no aparelho reprodutivo. Procurou-se utilizar animais com características genéticas e zootécnicas

## Métodos

superiores, escore corporal entre três ou quatro e livres de qualquer condição de desconforto tais como: estresse térmico, nutrição inadequada, mudança de ambiente, doenças de casco e úbere, doenças infecto-contagiosas e outras.

### 3. 3. Seleção das receptoras

As receptoras adquiridas pelas fazendas foram submetidas a quarentena, avaliação clínica geral, exames para a detecção de brucelose e tuberculose, administração de vermífugos e ectoparasiticidas, exame ginecológico completo (vaginoscopia e palpação retal) para verificar a saúde genital e a fase do ciclo estral. Além disso, procurou-se selecionar receptoras de porte compatível com a raça do embrião a ser inovulado e capazes de produzir leite suficiente para amamentar e permitir que a cria se desenvolvesse normalmente.

**Tabela 1-** Atividades sanitárias realizadas nos animais e os meses do ano.

Atividade sanitária	Animais	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Febre Aftosa (V)	Todos					X						X	
Leptospirose (V)	Todos	X						X			X		
IBR e BVD (V)	Todos							X					
Carbúnculo-Botulismo (V)	Prenhes *	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Pasteurelose (V)	Prenhes *	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Salmonelose (V)	Prenhes *	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Vermifugação	Prenhes *	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Raiva (V)	Todos						X						
Exame de Tuberculose	Todos							X					
Exame de Brucelose	Todos							X					

(V) Vacina comercial

\* Procedimento realizado 45 a 60 dias antes da data estimada do parto

O calendário de atividades sanitárias e profiláticas adotado pelo médico veterinário Dr. Carlos Antônio de Carvalho Fernandes nas propriedades utilizadas no experimento foi adequado a região onde as propriedades estão localizadas (tabela 1).

### **3. 4. Estimulação ovariana e indução do cio**

Para o tratamento superovulatório das doadoras utilizou-se o FSH de origem suína (Folltropin-V<sup>®</sup>), produto comercial altamente purificado contendo baixos níveis de LH. Cada doadora recebeu oito doses decrescentes do hormônio, a cada 12 horas, perfazendo um total de 160 ou 200 NIH-FSH-P1 (unidade padrão de potência biológica do FSH) diluídos em 16,00 ou 20,00 mL de solução salina, a partir do 9º ou 10º dia do ciclo, considerando-se um estro normal ou induzido como dia 0 (cio base-que precede o tratamento hormonal).

As aplicações de FSH foram realizadas por via intramuscular, com agulha 25 x 8 mm, para evitar-se perda do medicamento por refluxo. A luteólise foi induzida com duas aplicações de 0,53 mg de cloprostenol sódico (Ciosin<sup>®2</sup>) por via intramuscular, 96 e 108 horas após o início da administração de FSH. Nas receptoras o estro foi induzido mediante uma aplicação desta droga, nas mesmas dose e via, 24 horas antes.

---

<sup>2</sup> Ciosin<sup>®</sup> - Coopers Brasil S. A., Brasil

**Tabela 2-** Esquema do tratamento de estimulação ovariana aplicado aos animais de acordo com o dia do ciclo estral, perfazendo um total de 160 (negrito) e 200 NIH-FSH-P1.

Dia do ciclo estral	Manhã		Produto (mL)		Tarde		Produto (mL)	
	(NIH-FSH-P1)				(NIH-FSH-P1)			
9	<b>35</b>	40	<b>3,50</b>	4,00	<b>35</b>	40	<b>3,50</b>	4,00
10	<b>25</b>	30	<b>2,50</b>	3,00	<b>25</b>	30	<b>2,50</b>	3,00
11	<b>15</b>	20	<b>1,50</b>	2,00	<b>15</b>	20	<b>1,50</b>	2,00
12	<b>5<sup>a</sup></b>	10 <sup>a</sup>	<b>0,50</b>	1,00	<b>5<sup>a</sup></b>	10 <sup>a</sup>	<b>0,50</b>	1,00
Total	<b>80</b>	100	<b>8,00</b>	10,00	<b>80</b>	100	<b>8,00</b>	10,00

Fonte: Fernandes (2000)

a- administração de 0,53 mg de cloprostenol sódico

### **3. 5. Detecção do cio nas doadoras e receptoras e inseminação artificial das doadoras**

Após a aplicação do luteolítico, as doadoras foram mantidas em piquetes na presença de rufiões mestiços zebuínos, com mais de dois anos de idade (1:40). A técnica cirúrgica utilizada foi a aderência do “S peniano”. A observação visual do estro foi realizada por um funcionário treinado, três vezes ao dia, por um período não inferior a 20 minutos. O reflexo de imobilidade foi o sinal considerado para a determinação do estro. Inquietação, monta nas outras vacas, edema e descarga de muco pela vulva foram considerados sinais secundários. Os animais em estro foram inseminados duas vezes, 12 e 24 horas após o início das manifestações. Para as receptoras, foi adotado o mesmo critério de observação do estro, sendo anotados o dia e a hora em que este foi detectado.

### **3. 6. Colheita e classificação dos embriões**

Os embriões foram colhidos pelo método não cirúrgico, sete dias após o início do estro, conforme descrito em experimento realizado por Fernandes (1994). Após os procedimentos normais de contenção em tronco e limpeza manual do reto,

---

Métodos

avaliou-se a resposta ovariana à superestimulação pela contagem do número de CL por palpação retal e ultra-sonografia.

Realizou-se a anti-sepsia local e aplicação de 6,00 a 8,00 mL de lidocaína a 2%<sup>3</sup> no espaço entre a 1ª e 2ª vértebra coccígea, a fim de se conseguir uma anestesia peridural baixa.

Os cornos uterinos foram lavados individualmente, no mínimo seis vezes, com cerca de 800 mL de *Phosphate Buffer Saline*<sup>4</sup>. Terminada a colheita, o filtro foi levado ao laboratório e seu conteúdo transportado para uma placa de petri de 15,00 cm de diâmetro e com fundo quadriculado. As estruturas presentes na placa foram rastreadas com o auxílio de um microscópio estereoscópico<sup>5</sup>, num aumento de 15x e após a identificação foram transportadas para outra placa contendo solução de manipulação<sup>6</sup> onde foram classificadas, num aumento de 80x, quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade, segundo Lindner & Wright (1983).

Após a colheita dos embriões, as doadoras receberam 0,53 mg de cloprostenol sódico, visando a regressão mais rápida dos CL e o retorno à atividade ovariana normal.

---

<sup>3</sup> Anestésico Lidovet® – União Química, Brasil

<sup>4</sup> DPBS® - Nutricell, Brasil

<sup>5</sup> Carton SCZ - T4™ – Carton, Japão

<sup>6</sup> TQC – Holding – AB Technology

**Tabela 3-** Descrição dos parâmetros utilizados para a classificação do estágio de desenvolvimento dos embriões bovinos.

Classificação	Idade (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 60 x.
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, 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.

Fonte: Fernandes (2000)

**Tabela 4-** Descrição dos parâmetros utilizados para a classificação dos embriões bovinos quanto à qualidade (constituição morfológica).

Característica	Avaliação
Formato	O embrião deve ter 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 celular.
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.

Fonte: Fernandes (2000)

**Tabela 5-** Escore de classificação e qualidade embrionária.

Classificação/Qualidade	Avaliação
1 / Excelente	Praticamente nenhuma alteração morfológica. Zona pelúcida intacta e esférica, massa celular homogênea com células de tamanho uniforme, nenhum ou poucos fragmentos celulares no espaço perivitelino.
2 / Bom	Pequenas alterações morfológicas. Alterações mínimas na forma e coloração, alguns fragmentos ou debris celulares no espaço perivitelino e/ou pequenas formações vesiculares nos blastômeros.
3 / Regular	Alterações morfológicas significativas, embora com a maior parte da massa celular intacta.
4 / Ruim	Muitos fragmentos ou debris celulares no espaço perivitelino, vesículas maiores e em maior número e claras mudanças degenerativas nos blastômeros, com menos da metade da massa celular intacta.
5 / Degenerado	Comprometimento morfológico total.

Fonte: Fernandes (2000) modificado

### **3. 7. Inovulação das receptoras e diagnóstico de gestação**

No dia da inovulação dos embriões, os ovários das receptoras foram avaliados por palpação retal para identificar e localizar o CL e classificá-lo quanto ao tamanho em pequeno, médio e grande; levando-se em consideração a projeção e a assimetria ovariana. Para o CL ser considerado pequeno a assimetria entre os ovários tinha que ser de 10,00 a 30,00%, médio 40,00 a 70,00% e grande > 80,00%.

O tônus uterino foi avaliado quanto à contratilidade no dia da inovulação do embrião, sendo classificado em grau 1 (flácido), grau 2 (estágio intermediário entre flácido e contraído) e grau 3 (contraído).

Os embriões foram transferidos a fresco pelo método não cirúrgico, utilizando-se um inovulador apropriado. No momento deste procedimento foi realizada anestesia epidural baixa, aplicando-se 6,00 mL de lidocaína a 2% sem vaso constritor. Nas receptoras que não foi possível identificar qual ovário possuía o CL, não foi realizada a inovulação. O diagnóstico de gestação foi determinado por palpação retal 45 dias após a transferência dos embriões.

### **3. 8. Avaliações ultra-sonográficas**

As avaliações ultra-sonográficas (modelo Scanner 100 LC Pie Medical<sup>7</sup>) dos ovários das doadoras e receptoras foram realizadas no dia da transferência de embriões. Nas doadoras, determinou-se o número de CL de cada ovário e nas receptoras, as imagens do ovário que continha o CL foram gravadas em disquete para mensurações posteriores, utilizando-se o recurso do próprio aparelho.

### **3. 9. Colheita de sangue**

As amostras de sangue foram colhidas pela punção da artéria ou veia coccígea, com auxílio de agulha 21G1 e depositadas em tubos de colheita de sangue<sup>8</sup> a vácuo heparinizados, no dia da colheita e inovulação dos embriões nas doadoras e receptoras respectivamente.

O volume obtido foi centrifugado a 2500 x g por 10 minutos para a obtenção do plasma que foi acondicionado em tubos plásticos previamente identificados, os quais foram armazenados em freezer a -20 °C.

### **3. 10. Dosagens hormonais**

As amostras foram quantificadas em suas concentrações plasmáticas de P<sub>4</sub> e E<sub>2</sub>, através de procedimento de radioimunoensaio, utilizando-se kits comerciais para P<sub>4</sub> fase sólida (Coat A- Count Diagnostics Products Corporation)<sup>9</sup> e para E<sub>2</sub> (3<sup>a</sup>

---

<sup>7</sup> Pie Medical<sup>TM</sup> – Holanda

<sup>8</sup> Vacutainer<sup>®</sup> BD, EUA

<sup>9</sup> Coat A - Count Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, EUA

geração DSL- Gênese)<sup>10</sup>, no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ - UNESP - Campus de Botucatu.

Todas as amostras foram processadas em um único ensaio (estradiol e progesterona). Para o estradiol, o coeficiente de variação foi 10,47% e a concentração mínima detectável de 0,0025 pg/mL. Para a progesterona, o coeficiente de variação foi de 4,25% e a concentração mínima detectável de 0,08 ng/mL.

### **3. 11. Análise estatística**

Os dados foram analisados utilizando o sistema SAS versão 6.12 (1996). Os resultados foram submetidos aos tratamentos estatísticos da média, desvio padrão e porcentagem. O Teste T –pareado foi utilizado para analisar CL de novilhas e vacas à palpação retal (PR) e ao ultra-som (US). Foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson para as variáveis: CL nos ovários direito e esquerdo à PR; CL nos ovários direito e esquerdo ao US; número total de CL à PR e ao US; estruturas recuperadas (ESTRECUP), embriões viáveis (EMBVIIV), embriões transferidos (EMBTRANS); estágios de desenvolvimento e qualidade embrionária; diâmetros (DIAM) e volumes (VOL) do CL e cavidade cística (CC) nas receptoras e concentração de P<sub>4</sub> e 17β E<sub>2</sub> nas doadoras e receptoras. O Teste T para amostras independentes foi utilizado para avaliar ESTRECUP, EMBVIIV, EMBTRANS, estruturas não fecundadas e degeneradas e concentrações de P<sub>4</sub> e 17β E<sub>2</sub> nas novilhas e vacas doadoras. O Teste do Qui-quadrado foi aplicado para as comparações que implicaram proporções (tamanho do CL à PR, CL cavitário ou não, contratilidade uterina, assincronia, estágio de desenvolvimento e qualidade dos embriões versus taxas de prenhez). Para avaliar o DIAM CL e o VOL da massa luteal (ML) foram utilizados a análise de variância seguida pelo Teste T e Teste de Kruskal-Wallis. O Teste Exato de Fisher avaliou DIAM CL, VOL CL, DIAM CC, VOL CC e VOL ML versus taxas de prenhez. Em todas as análises realizadas foram consideradas diferenças significativas quando p<0,05. As correlações foram consideradas quando r ≥0,60.

---

<sup>10</sup> DSL- Gênese, São Paulo, Brasil

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4. 1. Doadoras

#### 4. 1. 1. Avaliação da resposta ovariana

Existem vários métodos para se avaliar a resposta ovariana aos hormônios empregados para a superovulação em bovinos, uma delas é a determinação do número de ovulações ocorridas. No presente trabalho, os números médios de CL palpados nos ovários direito e esquerdo e a média do número total de CL à palpação retal em novilhas e vacas estão representados na tabela 6. Os valores encontrados foram superiores aos obtidos por Chupin et al. (1984), Massey & Oden (1984), Kim et al. (1985), Coelho et al. (1987), Moraes (1990), Dhanani et al. (1991), Alvarez (1995), Gradela et al. (1996) e Bényei & Barros (2000) e inferiores aos relatados por Lubbadah (1980) e Goto et al. (1987). A resposta ovariana à estimulação hormonal é bastante diversificada, tornando difícil a comparação de dados uma vez que dentro da mesma raça, existe o efeito do hormônio, da partida da droga administrada, do manejo adotado pela propriedade, do clima da região onde é realizado o experimento e também da resposta individual do animal.

**Tabela 6-** Média e desvio padrão de CL nos ovários direito e esquerdo e do número total de CL à palpação retal em novilhas e vacas (categoria).

CL/ categoria	Novilhas	Vacas	Totais
CLODPR	7,35 ± 3,26 (n= 26)	7,10 ± 3,63 (n= 52)	7,18 ± 3,49 (n= 78)
CLOEPR	7,19 ± 3,30 (n= 26)	6,72 ± 3,40 (n=51)	6,88 ± 3,35 (n=77)
CLTOT	14,54 ± 5,96 (n=26)	13,86 ± 6,80 (n=51)	14,09 ± 6,50 (n=77)

p> 0,05

CLODPR corpo lúteo no ovário direito à palpação retal

CLOEPR corpo lúteo no ovário esquerdo à palpação retal

CLTOT corpos lúteos totais

**Tabela 7-** Média e desvio padrão de CL nos ovários direito e esquerdo e do número total de CL à ultra-sonografia em novilhas e vacas (categoria).

CL/ categoria	Novilhas	Vacas	Totais
CLODUS	8,17 ± 4,21 (n= 24)	8,24 ± 4,15 (n= 45) <sup>a</sup>	8,22 ± 4,14 (n= 69)
CLOEUS	7,74 ± 3,60 (n = 23)	7,43 ± 3,71 (n= 44) <sup>b</sup>	7,54 ± 3,65 (n= 67)
CLTOT	16,22 ± 4,86 (n = 23)	15,75 ± 7,40 (n= 44)	15,91 ± 7,16 (n= 67)

a, b indicam diferença estatística (p= 0, 04)

CLODUS corpo lúteo no ovário direito à ultra-sonografia

CLOEUS corpo lúteo no ovário esquerdo à ultra-sonografia

CLTOT corpos lúteos totais

A média e desvio padrão dos CL totais detectados através do ultra-som foi de  $15,91 \pm 7,16$  (n= 67) e à palpação retal foi de  $14,09 \pm 6,50$  (n= 77) independente da categoria animal. Embora estes dados não indiquem diferença estatística colaboram com a teoria de Alvarez (1995) de que a ultra-sonografia é cerca de 10,00% mais precisa do que a palpação retal.

Não foram encontradas diferenças significativas (Teste T-pareado) entre os valores de CL para novilhas e vacas à palpação retal e ao ultra-som ( $p > 0,05$ ), demonstrando que neste experimento a resposta ovariana à administração de gonadotrofinas foi similar para estes grupos de animais. Hasler et al. (1983) pesquisaram a resposta superovulatória em novilhas e vacas (n= 1000), não encontrando diferença nos resultados obtidos de fêmeas até os 10 anos de idade. Apesar de Angel e colaboradores (1984) terem detectado número de ovulações maior em novilhas, a qualidade dos embriões recuperados foi melhor nas vacas.

A literatura compara com mais freqüência as taxas de ovulação entre fêmeas de idades diferentes. Grupos de pesquisadores como Katska & Smorag (1984), Kim et al. (1985), Bryner et al. (1987) e Moraes (1990) identificaram redução no número de CL em vacas mais velhas. Os dados apresentados nas tabelas 6 e 7 não confirmaram esta observação, talvez este fato se deva à idade dos animais utilizados (16 - 40 meses).

Quando avaliado o número de CL entre os ovários na mesma categoria animal, o grupo das vacas apresentou diferença estatística entre o CLODUS e o CLOEUS. A diferença estatística encontrada ( $p = 0,04$ ) no grupo mencionado pode

## Discussão

estar relacionada ao número de vacas utilizado no experimento ter sido superior ao número de novilhas. Entretanto os resultados do estudo de Alvarez (1995) evidenciaram que a superovulação elimina a diferença no número de ovulações entre os ovários esquerdo e direito em vacas.

**Tabela 8-** Matriz de correlações de Pearson referentes às variáveis analisadas (CLODPR, CLODUS, CLOEPR, CLOEUS, CLTOTPR, CLTOTUS) nas doadoras no dia da colheita dos embriões.

Variáveis	CLODPR	CLODUS	CLOEPR	CLOEUS	CLTOTPR	CLTOTUS
CLODPR	1,00	0,93*	0,80*	0,70*	0,95*	0,89*
CLODUS		1,00	0,77*	0,71*	0,91*	0,93*
CLOEPR			1,00	0,93*	0,94*	0,91*
CLOEUS				1,00	0,87*	0,92*
CLTOTPR					1,00	0,96*
CLTOTUS						1,00

\* significativo ( $p= 0,0001$ )

CLODPR corpo lúteo no ovário direito à palpação retal

CLOEPR corpo lúteo no ovário esquerdo à palpação retal

CLODUS corpo lúteo no ovário direito à ultra-sonografia

CLOEUS corpo lúteo no ovário esquerdo à ultra-sonografia

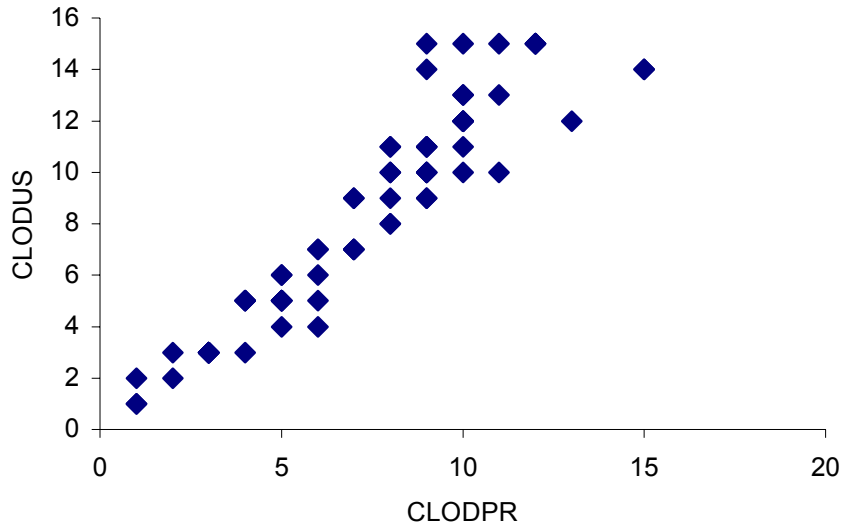
CLTOTPR número total de corpos lúteos à palpação retal

CLTOTUS número total de corpos lúteos à ultra-sonografia

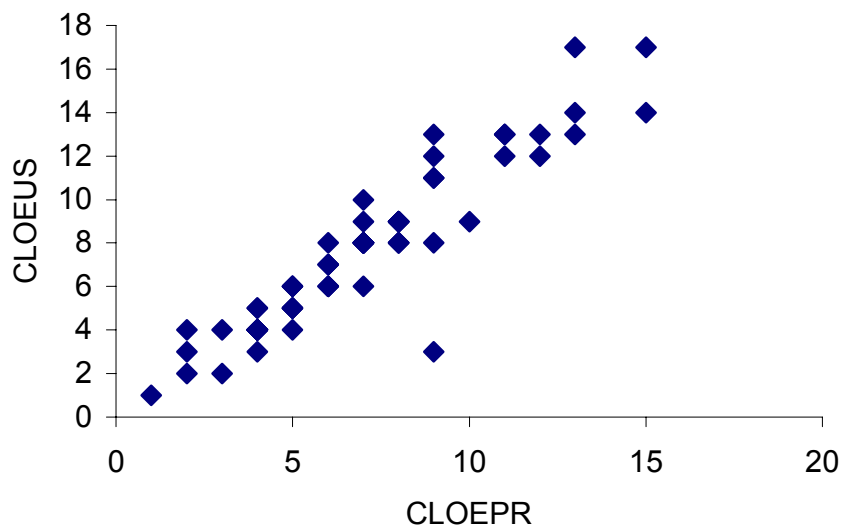
Foram observadas correlações positivas entre número de CL à palpação retal e à ultra-sonografia no ovário direito ( $r= 0,93$ ,  $p= 0,0001$ ); número de CL à palpação retal e à ultra-sonografia no ovário esquerdo ( $r= 0,93$ ,  $p= 0,0001$ ) e número total de

## Discussão

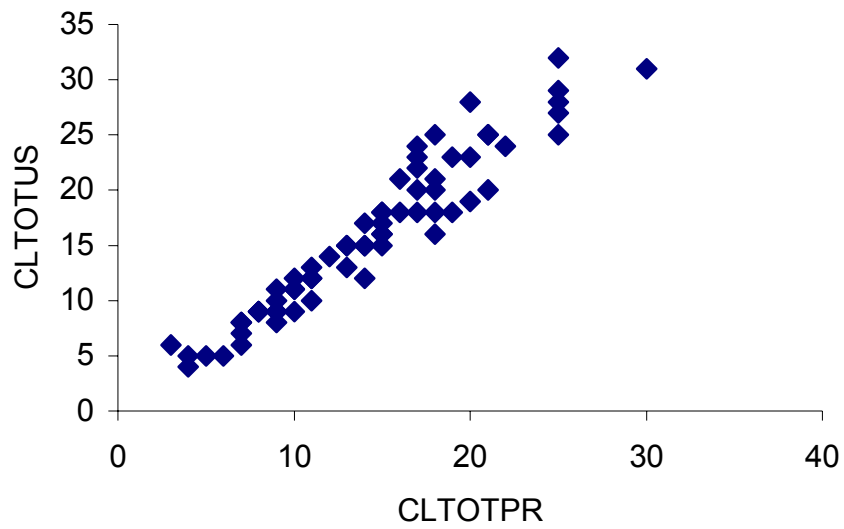
CL à palpação retal e à ultra-sonografia ( $r= 0,96$ ,  $p= 0,0001$ ), conforme a tabela 8 e representados nas figuras 1; 2 e 3.



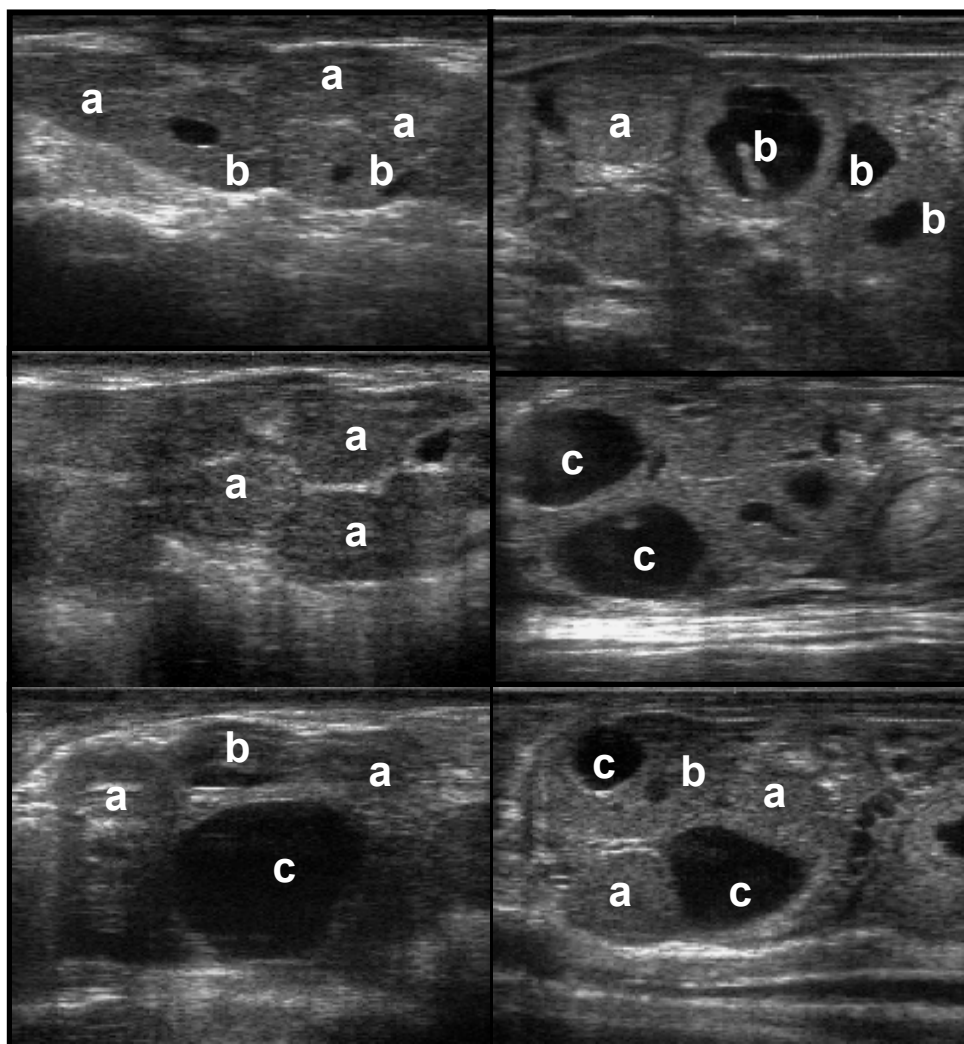
**Figura 1-** Diagrama de dispersão referente as variáveis corpos lúteos no ovário direito à palpação retal (CLODPR) e corpos lúteos no ovário direito à ultra-sonografia (CLODUS).



**Figura 2-** Diagrama de dispersão referente as variáveis corpos lúteos no ovário esquerdo à palpação retal (CLOEPR) e corpos lúteos no ovário esquerdo à ultra-sonografia (CLOEUS).



**Figura 3-** Diagrama de dispersão referente as variáveis número total de corpos lúteos à palpação retal (CLTOTPR) e número total de corpos lúteos à ultrasonografia (CLTOTUS).



**Figura 4-** Imagens ultra-sonográficas de doadoras superovuladas. Corpo lúteo não cavitário (a), corpo lúteo com cavidade (b) e folículo (c).

Em trabalho realizado por Monniaux et al. (1983) dos métodos utilizados para determinar a taxa de ovulação, a palpação retal foi o menos acurado, pois sua precisão diminuiu à medida que os números de ovulações aumentaram, sendo totalmente impreciso quando o ovário apresentava mais de 10 CL. Para Becker & Pinheiro (1986) isto ocorreu porque muitas estruturas não exibiram proeminência na superfície externa dos ovários e, algumas vezes, até simulavam uma sobreposição.

Alvarez (1995) demonstrou que a palpação retal e a ultra-sonografia subestimaram o número de estruturas luteínicas, conforme foi verificado na inspeção direta dos ovários, após o abate dos animais. Com base nas análises de correlações (tabela 8) verificou-se que a contagem do número CL à palpação retal, apesar de ter sido inferior quando comparada ao exame ultra-sonográfico, pode ser utilizada para determinar a resposta ovariana ao tratamento superovulatório ( $r = 0,96$ ,  $p = 0,0001$ ), porém ressalta-se a importância da experiência do examinador.

#### **4. 1. 2. Produção de embriões**

De um total de 78 colheitas foram recuperadas 626 estruturas, sendo que 336 (53,67%) foram classificadas como viáveis, 200 (31,95%) não fertilizadas e 90 (14,38%) degeneradas; do total de viáveis, 285 (84,82%) foram transferidas.

O número médio por colheita de estruturas recuperadas foi  $8,02 \pm 5,92$  ( $n = 78$ ), embriões viáveis  $4,31 \pm 4,54$  ( $n = 78$ ), embriões transferidos  $3,65 \pm 3,73$  ( $n = 78$ ), estruturas não fecundadas  $2,60 \pm 3,92$  ( $n = 77$ ) e embriões degenerados  $1,17 \pm 2,27$  ( $n = 77$ ). Considerando-se as variáveis (estruturas colhidas e viáveis), os resultados do presente estudo foram inferiores aos relatados por Donaldson (1984), Demczuk et al. (1998), Jacomini & Diniz (2000) e Silva et al. (2002) trabalhando com vacas taurinas, e Donaldson (1984), Gradela et al. (1996) e Silva et al. (2003) quando utilizaram vacas zebuínas e, superiores aos descritos por Moraes (1990) em vacas zebuínas e Bényei & Barros (2000) e Negrão (2003) em vacas taurinas.

No entanto Donaldson (1984) e Moraes (1990) apesar de terem recuperado mais estruturas por animal (9,20 e 8,43), verificaram número de embriões viáveis menor (3,40 e 3,08). Já Silva et al. (2002) recuperaram menos estruturas (7,90), porém o total de embriões viáveis foi de 5,20 por vaca.

## Discussão

Com relação aos resultados obtidos para estruturas não fertilizadas e degeneradas estes foram inferiores aos relatados por Bényei & Barros (2000) quando utilizaram o Folltropin-V<sup>®</sup> ( $4,8 \pm 4,9$ ) e Jacomini & Diniz (2000) ( $5,17$ ).

De acordo com o Teste T para amostras independentes, não foram verificadas diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) para estruturas recuperadas, viáveis, transferidas, não fecundadas e degeneradas de novilhas e vacas. Em média, as novilhas apresentaram número maior de estruturas recuperadas ( $8,62 \pm 5,86$ ,  $n = 26$ ) do que as vacas ( $7,73 \pm 5,99$ ,  $n = 52$ ). No entanto, os valores de embriões viáveis ( $4,15 \pm 4,34$ ,  $n = 26$ ) e transferidos ( $3,62 \pm 3,73$ ,  $n = 26$ ) das novilhas foram inferiores aos obtidos das vacas ( $4,35 \pm 4,67$ ,  $n = 52$ ) e ( $3,67 \pm 3,77$ ,  $n = 52$ ) respectivamente. Estes dados diferiram dos encontrados no trabalho de Silva et al. (2002) em que a taxa de embriões viáveis foi maior para novilhas ( $6,40$ ) do que para vacas ( $5,20$ ). Segundo estes autores a menor resposta superovulatória, taxa de fertilização e número de embriões viáveis em vacas em relação às novilhas foram associados a uma concentração de  $P_4$  significativamente menor durante o diestro, antes e após o tratamento superovulatório. A diferença na concentração plasmática de  $P_4$  no diestro foi atribuída a diferenças na competência do CL (ciclos não estimulado e superestimulado) e taxa de ovulação (ciclo superestimulado). Ressalta-se que no presente experimento as vacas apresentaram maior taxa de recuperação de embriões viáveis mesmo apresentando menor concentração de  $P_4$  no dia da colheita dos embriões.

Com relação às estruturas não fertilizadas e degeneradas as vacas também obtiveram índices melhores ( $2,49 \pm 4,02$  e  $0,92 \pm 2,06$ ,  $n = 51$ ) do que as novilhas ( $2,81 \pm 3,78$  e  $1,65 \pm 2,61$ ,  $n = 26$ ), apesar de não ter sido observada diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Estes dados contradizem as explicações de Goto et al. (1988) e Herrler et al. (1990) que destacaram a elevação da concentração de  $E_2$  de acordo com o aumento da resposta das doadoras, tornando frágil a membrana pelúcida, levando às degenerações e dificultando a fecundação. Porém no presente experimento as novilhas apresentaram menor concentração de  $E_2$  mesmo com maior taxa de ovulação. Moraes (1990) sugeriu que o maior número de estruturas não fertilizadas seria conseqüente da maior quantidade de estruturas colhidas em animais que apresentaram taxa de ovulação mais elevada. No presente

## Discussão

experimento, estas observações foram confirmadas com a obtenção de número de estruturas não fertilizadas superior nas novilhas.

Observaram-se correlações positivas entre o número médio de estruturas recuperadas por colheita e os valores de CL palpados no ovário direito ( $r= 0,65$ ,  $p= 0,0001$ ), CL ao ultra-som no ovário direito ( $r= 0,60$ ,  $p= 0,0001$ ), CL palpados no ovário esquerdo ( $r= 0,60$ ,  $p= 0,0001$ ), CL ao ultra-som no ovário esquerdo ( $r= 0,56$ ,  $p= 0,0001$ ), total de CL palpados ( $r= 0,66$ ,  $p= 0,0001$ ) e total de CL identificados ao ultra-som ( $r= 0,61$ ,  $p= 0,0001$ ) (tabela 9).

Com relação aos embriões viáveis, as correlações foram significativas ( $r \geq 0,60$ ,  $p < 0,05$ ) para estruturas recuperadas ( $r= 0,69$ ) e transferidas ( $r= 0,91$ ). Quando se correlacionou embriões viáveis com número total de CL à palpação retal ( $r= 0,50$ ) e à ultra-sonografia ( $r= 0,42$ ) as correlações apresentaram-se baixas ( $r < 0,60$ ), apesar de serem significativas ( $p > 0,05$ ) (tabela 9).

Para o número médio de estruturas transferidas por colheita as correlações encontradas para estruturas recuperadas ( $r= 0,66$ ), embriões viáveis ( $r=0,91$ ), número total de CL à palpação retal ( $r= 0,43$ ) e número total de CL à ultra-sonografia ( $r= 0,38$ ) estão apresentados na tabela 9.

**Tabela 9-** Matriz de correlações de Pearson referentes às variáveis analisadas (CLTOTPR, CLTOTUS, ESTRECUP, EMBVIAV, EMBTRANS) nas doadoras no dia da colheita dos embriões.

Variáveis	CLTOTPR	CLTOTUS	ESTRECUP	EMBVIAV	EMBTRANS
CLTOTPR	1,00	0,96*	0,66*	0,50*	0,43*
CLTOTUS		1,00	0,61*	0,42*	0,38*
ESTRECUP			1,00	0,69*	0,66*
EMBVIAV				1,00	0,91*
EMBTRANS					1,00

\* significativo ( $p < 0,05$ )

CLTOTPR número total de corpos lúteos à palpação retal

CLTOTUS número total de corpos lúteos à ultra-sonografia

ESTRECUP estruturas recuperadas

EMBVIAV embriões viáveis

EMBTRANS embriões transferidos

A determinação do número de corpos lúteos por palpação retal e exame ultra-sonográfico no dia da colheita dos embriões pôde ser utilizada como parâmetro de estimativa do número de estruturas recuperadas, pois as correlações entre estas variáveis foram significativas ( $r = 0,66$  e  $r = 0,61$ , respectivamente). Saumande & Batra (1985), Saumande et al. (1985), Gradela et al. (1996) e Peixoto et al. (2002) também verificaram correlação positiva entre os valores de CL palpados e embriões recuperados.

Sabendo-se que a ultra-sonografia é um método de alta precisão, esperava-se que a correlação entre o número médio de estruturas recuperadas por colheita fosse mais significativa quando comparada ao número de CL identificados ao ultra-som; porém foi observada correlação maior com o número de CL à palpação retal.

---

Discussão

Isto ocorreu porque o número de embriões recuperados foi mais próximo dos valores obtidos para CL à palpação retal, além da possível identificação de folículos luteinizados, chamados por Monniaux et al. (1983) de pseudo-CL. Estas estruturas não seriam distinguíveis de um CL verdadeiro à palpação retal e ao ultra-som; observação confirmada por Alvarez (1995). A taxa de recuperação de estruturas foi de 57,51 e 50,09% considerando-se o número total de CL à palpação retal e à ultrasonografia respectivamente. Para Gradela et al. (1996) a taxa de recuperação dos embriões foi de 78,00%.

No presente trabalho a correlação entre estruturas recuperadas e viáveis (0,69) foi menor do que a descrita por Peixoto et al. (2002) (0,72). A correlação entre embriões viáveis e estruturas transferidas foi alta ( $r= 0,91$ ), pois todos os embriões transferidos eram viáveis, porém esta correlação só não foi maior porque nem todos os embriões viáveis foram transferidos, alguns deles foram congelados, devido à ausência de receptora compatível no dia da colheita.

#### **4. 1. 3. Estágio de desenvolvimento e qualidade dos embriões recuperados**

Das 626 estruturas recuperadas em 78 colheitas obteve-se as classificações quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária de 621 estruturas ( $n= 77$  colheitas). Destas 331 (53,30%) foram consideradas viáveis; 200 (32,21%) não fecundadas e 90 (14,49%) degeneradas.

Das 331 estruturas viáveis, 153 (46,22%) foram identificadas como mórula compacta, 84 (25,38%) blastocisto inicial, 74 (22,36%) blastocisto e 20 (6,04%) blastocisto expandido. Observou-se uma predominância de estágios iniciais de desenvolvimento embrionário (mórula compacta e blastocisto inicial), como era esperado encontrar para vacas de raças taurinas, confirmando dados de Callensen et al. (1995) e descrições de Reichenbach et al. (2001).

Com relação à qualidade embrionária verificou-se uma maior recuperação de embriões excelentes e bons. Do total de 331 embriões, 183 (55,29%), 106 (32,02%) e 42 (12,69%) foram classificados como graus 1 (excelente), 2 (bom) e 3 (regular), respectivamente. Demczuck et al. (1998) encontraram índices semelhantes, que

## Discussão

foram de graus 1-ótimo (55,40%), 2-bom (34,30%), 3-sofrível (9,90%) e 4-ruim (0,30%); embora a classificação utilizada tenha sido diferente.

Quando correlacionados os estágios e graus de qualidade embrionários, os resultados obtidos para blastocisto inicial e graus 1 foram  $r = 0,64$ ; para a mesma estrutura com grau 2 ( $r = 0,65$ ) e blastocisto correlacionado com grau 1 ( $r = 0,67$ ), conforme demonstrado na tabela 10.

**Tabela 10-** Matriz de correlações de Pearson referentes aos estágios de desenvolvimento (mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido) e graus de qualidade dos embriões (1- excelente, 2- bom e 3- regular) recuperados das doadoras no dia da colheita dos embriões.

Grau/Variáveis	Mórula Compacta	Blastocisto Inicial	Blastocisto	Blastocisto Expandido
Grau 1	0,46*	0,64*	0,67*	1,00
Grau 2	0,54*	0,65*	0,43*	0
Grau 3	0,52*	0,11	0,081	0

\* significativo ( $p = 0,0001$ )

Estes resultados indicaram que houve predominância de blastocisto inicial de grau 1 e 2, blastocisto de grau 1 e que todos os blastocistos expandidos foram considerados de grau 1. Para mórula a incidência foi semelhante para as três classificações de qualidade embrionária.

#### 4. 1. 4. Progesterona

A concentração plasmática de  $P_4$  apresentou valores mínimos de 0,08 e máximos de 36,74 ng/mL, sendo em média de  $7,23 \pm 10,54$  ng/mL ( $n = 77$ ) no dia da colheita dos embriões. Alvarez (1995) descreveu concentração plasmática de  $P_4$  de  $6,50 \pm 1,17$  ng/mL, no dia da colheita dos embriões, para doadoras tratadas com FSH e, Gradela et al. (1996) de  $10,36 \pm 2,05$  ng/mL para o grupo I (concentração de

## Discussão

$P_4 \leq 1,00$  ng/mL, nos dias 13 e 14 do ciclo estral) e  $29,90 \pm 3,67$  ng/mL para o grupo II (concentração de  $P_4 > 1,00$  ng/mL, nos dias 13 e 14 do ciclo estral).

Nas novilhas a taxa de  $P_4$  foi em média  $9,01 \pm 11,24$  ng/mL (n= 26) e nas vacas  $6,32 \pm 10,16$  ng/mL (n= 51). Não se observou diferença estatística entre estes valores (p= 0,29) segundo o Teste T para amostras independentes. Para Silva et al. (2002) a concentração de  $P_4$  das novilhas ( $22,30 \pm 1,50$  ng/mL, n= 70) foi diferente estatisticamente (p= 0,001) do que das vacas ( $11,30 \pm 1,40$  ng/mL, n= 40) sete dias após o estro subsequente à superovulação. Estes pesquisadores sugeriram que após a estimulação de gonadotrofinas, os CL das novilhas seriam mais competentes que nas vacas, porém sem justificativa técnica. Acreditamos que os valores encontrados (novilhas/  $9,01 \pm 11,24$  ng/mL) e (vacas/  $6,32 \pm 10,16$  ng/mL) não apresentaram diferença e foram inferiores aos apresentados por Silva et al (2002), por estarem influenciados pelo número de animais, 26 e 51 (novilhas e vacas) respectivamente, e que a concentração de  $P_4$  foi superior nas novilhas porque estas apresentaram maior número de CL no dia da colheita dos embriões.

As correlações entre a concentração plasmática de  $P_4$  e o número total de CL palpados (r= 0,38), número total de CL ao ultra-som (r= 0,42), estruturas recuperadas (r= 0,24) e embriões viáveis (r= 0,16) foram baixas mostrando que, neste experimento, a concentração plasmática deste hormônio no dia da colheita dos embriões não interferiu na recuperação de estruturas e viabilidade embrionária e não foi influenciada pelo número de CL.

Para Dhanani et al. (1991) as taxas médias de  $P_4$  no primeiro e terceiro dia do tratamento superovulatório, no terceiro dia após o estro e no dia da colheita dos embriões foram correlacionadas significativamente com o total de embriões recuperados e transferíveis. Alvarez (1995) descreveu que níveis de  $P_4$  no dia da colheita de embriões foram altamente correlacionados (r= 0,88, p< 0,01) com o número de CL, mas não com o número de embriões recuperados. Gradela et al. (1996) concluíram que elevados níveis de  $P_4$  nos dias 13 e 14 do ciclo indicaram um maior número de estruturas recuperadas e, até três dias após o estro, interferiram com a viabilidade embrionária. Santiago et al. (2000) demonstraram que a  $P_4$  estava diretamente relacionada ao número de CL formados. Para Silva et al. (2002) a  $P_4$  plasmática apresentou correlação positiva com os índices de estruturas recuperadas, fertilizadas e viáveis, nos dias cinco e sete após o estro subsequente a

superovulação. Para uma avaliação mais completa da influência da concentração plasmática de  $P_4$  na taxas de recuperação e viabilidade embrionárias seria necessário ter colhido sangue durante o tratamento superovulatório, nos dias do estro e da colheita dos embriões.

#### **4. 1. 5. Estradiol**

A concentração plasmática de  $17\beta E_2$  variou de 0,0025 a 46,3954 pg/mL, sendo em média de  $4,36 \pm 6,11$  pg/mL ( $n= 77$ ), no dia da colheita dos embriões. Gradela et al. (1996) verificaram taxas de  $E_2$ , no dia da colheita dos embriões, de  $4,16 \pm 0,19$  para o grupo I e  $9,66 \pm 1,71$  para o grupo II. No presente experimento foi encontrada uma média de  $3,09 \pm 2,28$  pg/mL ( $n= 26$ ) para as novilhas e  $5,01 \pm 7,27$  pg/mL ( $n= 51$ ) para as vacas. Não foi observada diferença significativa entre estas concentrações ( $p= 0,08$ ) segundo o Teste T para amostras independentes.

Para Alvarez (1995) as concentrações plasmáticas médias de  $17\beta E_2$  antes do início dos tratamentos superovulatórios foram de 5,20 pg/mL, apresentando uma queda drástica no período final da administração do FSH até atingirem níveis basais pré-ovulatórios e se manterem desta forma até o dia da colheita dos embriões.

Gradela et al. (1996) relataram correlação positiva entre a concentração de  $17\beta E_2$  no dia do estro subsequente a estimulação ovariana e o número de embriões viáveis ( $r= 0,85$ ,  $p= 0,0657$ ). Estes autores sugeriram que ovócitos que apresentam fertilização bem sucedida resultando em prenhez são aqueles oriundos de folículos ricos em  $E_2$ . Porém o presente trabalho não apresentou correlação entre embriões viáveis e concentração plasmática de  $17\beta E_2$  no dia da colheita dos embriões ( $r= -0,04$ ,  $p> 0,05$ ).

As correlações entre a concentração plasmática de  $17\beta E_2$  e o número total de CL palpados ( $r= 0,02$ ), número total de CL ao ultra-som ( $r= 0,13$ ), estruturas recuperadas ( $r= -0,01$ ) e embriões viáveis ( $r= 0,04$ ) foram baixas mostrando que, neste experimento, a concentração plasmática de  $17\beta E_2$  no dia da colheita dos embriões não interferiu na recuperação de estruturas e viabilidade embrionária e não foi influenciada pelo número de ovulações.

## **4. 2. Receptoras**

### **4. 2. 1. Caracterização do corpo lúteo e produção de progesterona**

Das 60 fêmeas estudadas a localização do CL ocorreu mais no ovário direito (n= 38; 63,33%) do que no ovário esquerdo (n= 22; 36,67%). Estes dados estão de acordo com as descrições de Jainudeen & Hafez (1995) de que a ovulação em vacas ocorre mais freqüentemente no ovário direito (60,00%) que no ovário esquerdo (40,00%). A diferença entre o número de CL entre os ovários está descrita em ampla literatura. Relatos de Hasler et al. (1987) indicaram diferença de 57,00% para o ovário direito e 43,00% para o esquerdo; Demczuk et al. (1998), Viana et al. (1999) e Spell et al. (2001) observaram 64,00%; 57,14% e 60,00% para o lado direito e 36,00%; 42,86% e 40,00% para o lado esquerdo respectivamente.

Com relação ao tamanho do CL à palpação retal, 18,33% (11/60) foram considerados pequenos, 33,33% (20/60) médios e 48,33% (29/60) grandes. Neste aspecto, observou-se que houve uma predominância de estruturas grandes, contrariando os achados de Demczuk et al. (1998) que observaram incidência maior de estruturas médias. Estes autores registraram 19,20% (n= 144) para CL1 (“menor CL”), 51,60% (n= 387) CL2 (“tamanho médio”) e 29,10% (n= 218) CL3 (“maior CL”). Spell et al. (2001) classificaram os CL como: “excelentes ou bons” (66,00%) (diâmetro palpável >10,00 mm ou consistência moderadamente firme); e “ruins” (33,00%) (diâmetro palpável <10,00 mm ou textura macia). Valores divergentes foram registrados por Silva et al. (2003) que classificaram os CL como “evidentes” (35,30%) e “pouco evidentes” (64,70%). Confrontando a classificação e os resultados destes dois últimos estudos com o presente experimento verificou-se que a proporção de CL pequenos encontrados foi menor, embora a classificação tenha sido diferente (“ruins” e “pouco evidentes”).

Das receptoras utilizadas (n= 60) apenas 53 (83,33%) receberam embrião e, destas, 29 (54,72%) tornaram-se prenhes, sendo que 15 (51,72%) mostraram CL grande, 7 (24,14%) médio e 7 (24,14%) pequeno. Com relação à taxa de prenhez segundo o tamanho do CL à palpação retal encontrou-se 70,00% (7/10), 38,89% (7/18) e 60,00% (15/25) para pequeno, médio e grande respectivamente. Não foi

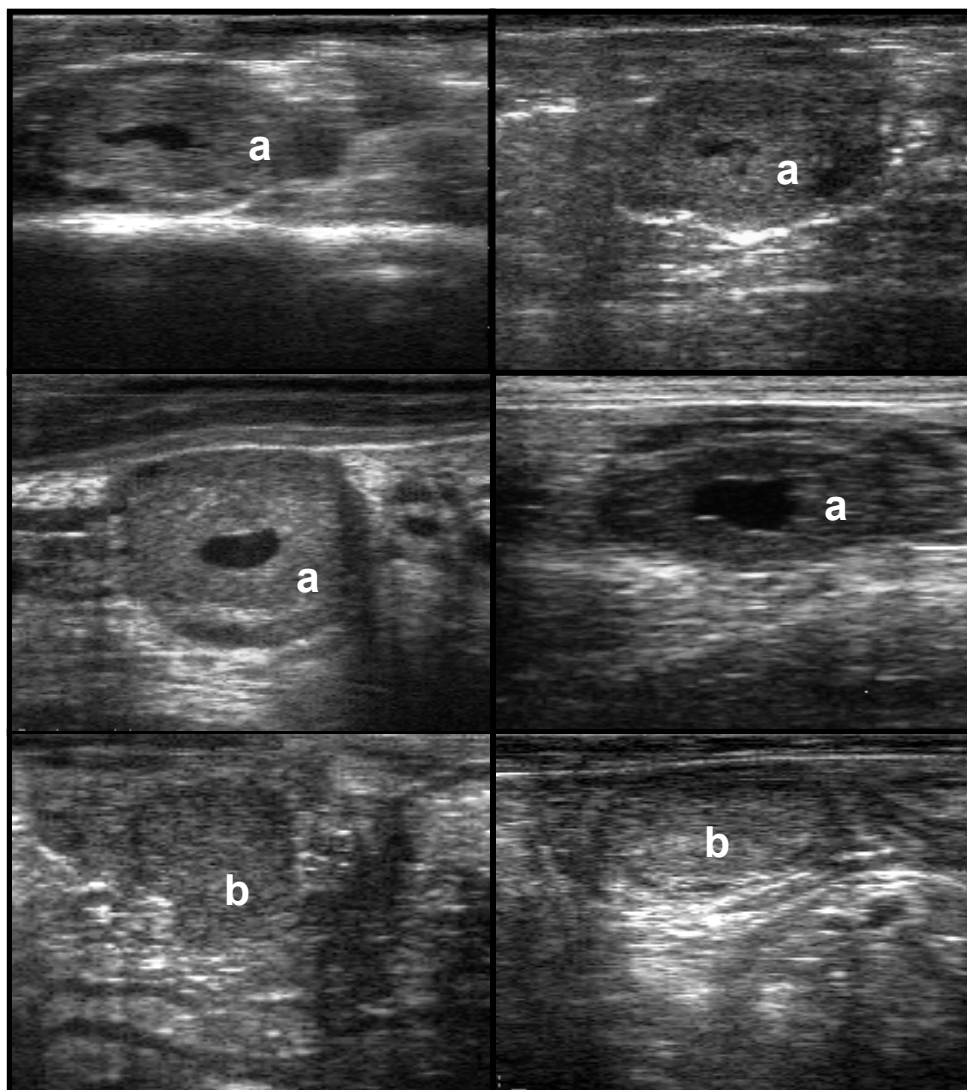
---

*Discussão*

observada diferença estatística entre as taxas de prenhez de acordo com o tamanho do CL à palpação retal, segundo o Teste do Qui-quadrado ( $p > 0,05$ ). Com isto foi possível verificar que a seleção das receptoras pela projeção do CL não foi efetiva em estimar a taxa de gestação nos diferentes grupos.

Fernandes & Velásquez (1997) observaram uma maior taxa de gestação naquelas receptoras em que a assimetria ovariana foi média ou grande, embora sem diferença estatística. Demczuk et al. (1998) observaram índices de prenhez de 36,00% (n= 52); 48,80% (n= 189) e 51,20% (n= 112) para CL1, CL2 e CL3, respectivamente. Spell et al. (2001) comparando as porcentagens de prenhez com as duas classificações de CL (“excelentes ou bons” e “ruins”) encontraram valores elevados 70,00% e 80,00% respectivamente. Silva et al. (2003) não encontraram diferenças significativas entre os valores de prenhez para “ausência de CL à palpação retal”, sendo a presença do CL confirmada pela ultra-sonografia (50,00%), CL “pouco evidente” (51,50%) e CL “evidente” (52,70%).

Ao exame ultra-sonográfico constatou-se que 50,88% (29/57) dos CL detectados continham cavidade cística, porém este achado quando comparado as porcentagens de prenhez não apresentou diferença estatística ( $p > 0,05$ ; Teste do Qui-quadrado). Tom et al. (1998), Viana et al. (1999) e Spell et al. (2001) visualizaram cavidades luteais em 40,00; 37,14 e 79,00% dos CL, entre os dias 7 e 16 do ciclo estral respectivamente. A figura 5 ilustra CL com e sem cavidade cística.



**Figura 5-** Imagens ultra-sonográficas de corpos lúteos das receptoras. Corpo lúteo cavitário (a) e sem cavidade (b).

## Discussão

Para a determinação dos diâmetros do CL e da cavidade cística à ultra-sonografia foi calculada a média dos valores encontrados para os dois maiores eixos (longitudinal e transversal). Com base nesta metodologia os valores averiguados foram de  $17,82 \pm 6,26$  mm (n= 57) para o diâmetro do CL e para cavidade cística  $6,76 \pm 4,19$  mm (n= 29). Os diâmetros médios dos CL quanto ao tamanho à palpação retal foram  $16,35 \pm 5,40$  mm (pequeno),  $15,12 \pm 2,94$  mm (médio) e  $20,17 \pm 7,37$  mm (grande). Spell et al (2001) encontraram diâmetro médio do CL de  $23,60 \pm 0,32$  e  $25,00 \pm 0,46$  mm para “excelentes ou bons” e “ruins” respectivamente, ambos por palpação retal.

Apesar dos índices de prenhez terem sido semelhantes entre os três grupos de tamanho do CL à palpação retal, notou-se que as estruturas consideradas grandes realmente apresentaram os maiores diâmetros ao exame ultra-sonográfico, enquanto que os diâmetros dos CL pequenos e médios foram próximos. Ao se utilizar a análise de variância seguida pelo Teste T, observou-se diferença significativa ( $p = 0,015$ ) entre a média do diâmetro dos CL (tabela 11).

**Tabela 11-** Diâmetros dos CL à ultra-sonografia (mm) segundo o tamanho dos CL à palpação retal.

Classificação do CL à palpação retal	Diâmetro do CL ao exame ultra-sonográfico (mm)
Pequeno	$16,35 \pm 5,40$ <sup>ab</sup>
Médio	$15,12 \pm 2,94$ <sup>b</sup>
Grande	$20,17 \pm 7,37$ <sup>a</sup>

a,b indica diferença estatística ( $p = 0,015$ )

Com base nestes resultados averiguou-se que a palpação retal foi satisfatória para distinguir CL médios de grandes; porém perdeu a sensibilidade ao avaliar CL pequenos.

Das novilhas inovuladas (n= 53), em 50 os CL foram mensurados ao exame ultra-sonográfico. Para avaliar a frequência das receptoras que se tornaram ou não gestantes de acordo com os diâmetros dos CL, estes foram agrupados em três categorias de medidas  $<15,00$ ;  $\geq 15,00$  a  $<25,00$  e  $\geq 25,00$  mm.

## Discussão

Com base nos achados do diâmetro do CL à ultra-sonografia, não houve diferença na taxa de prenhez entre os três intervalos de diâmetro ( $p= 1,00$ ) conforme apresentado na tabela 12.

**Tabela 12-** Distribuição da freqüência das novilhas receptoras ( $n= 50$ ) segundo o diâmetro do CL (mm) ao ultra-som e prenhez.

Diâmetro do CL (mm)	Taxa de Prenhez					
	Prenhe		Não prenhe		Total	
	nº	%	nº	%	nº	%
< 15,00	7	58,33	5	41,67	12	24,00
≥ 15,00 a < 25,00	18	52,94	16	47,06	34	68,00
≥ 25,00	2	50,00	2	50,00	4	8,00
Total	27	54,00	23	46,00	50	100,00

$p= 1,00$  segundo o Teste Exato de Fisher

Para avaliar a freqüência das receptoras prenhes ou não segundo os diâmetros das cavidades císticas, estes foram divididos em quatro grupos de medidas <5,00; ≥5,00 a <10,00, ≥10,00 a <15,00 e ≥15,00 mm. A distribuição da freqüência das novilhas receptoras prenhes ( $n= 13$ ) e não prenhes ( $n= 13$ ) segundo o diâmetro da cavidade cística (mm) está representada na tabela 13. Os dados demonstraram que não houve diferença nos índices de gestação entre cada intervalo de diâmetro ( $p= 0,37$ ) segundo o Teste Exato de Fisher.

## Discussão

**Tabela 13-** Distribuição da freqüência das novilhas receptoras (n= 26) segundo o diâmetro da cavidade cística (mm) e prenhez.

Diâmetro da cavidade cística (mm)	Taxa de Prenhez					
	Prenhe		Não prenhe		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<5,00	2	25,00	6	75,00	8	30,77
≥5,00 a <10,00	8	57,14	6	42,86	14	53,85
≥10,00 a <15,00	2	66,67	1	33,33	3	11,54
≥15,00	1	100,00	0	0	1	3,85
Total	13	50,00	13	50,00	26	100,00

p = 0,37

Os volumes do CL e da cavidade cística foram calculados usando a fórmula para volume de uma esfera ( $V= 4/3\pi \times (D/2)^3$ ), onde D é o diâmetro médio do CL. Quando o CL avaliado era uma estrutura homogênea, considerou-se o volume do mesmo equivalente ao volume da massa luteal. Se o CL apresentava um centro anecóico, o volume da massa luteal foi calculado subtraindo-se o volume deste centro do volume total do CL. O valor médio para volumes do CL foi  $4,36 \pm 9,09$  (n= 57), da cavidade cística  $0,40 \pm 0,97$  (n= 29) e da massa luteal  $4,16 \pm 8,42 \text{ cm}^3$  (n= 57). Grygar et al. (1997) e Spell et al. (2001) registraram medidas superiores; os diâmetro e volume médios dos CL estudados por Grygar et al. (1997) foram de 24,39 mm e  $6,91 \text{ cm}^3$ . Já os valores do diâmetro e volume da cavidade cística e volume do tecido luteal foram de 9,35 mm, 0,55 e  $6,66 \text{ cm}^3$ , respectivamente, e os verificados por Spell et al. (2001) para o diâmetro médio do CL e volume da massa luteal foram de 24,00 mm e  $7,00 \text{ cm}^3$ , respectivamente.

Para a análise da incidência de novilhas gestantes ou não de acordo com os volumes dos CL, estes foram agrupados em quatro classes de medidas <2,00; ≥2,00 a <4,00; ≥4,00 a <6,00 e ≥6,00  $\text{cm}^3$ . Os dados das fêmeas gestantes (n= 27; 54,00%) e não gestantes (n= 23; 46,00%) correlacionados com estas medidas estão representados na tabela 14. Observou-se que não houve influência do volume do CL nas taxas de prenhez (p= 0,49) segundo o Teste Exato de Fisher.

## Discussão

**Tabela 14-** Distribuição da freqüência das novilhas receptoras (n= 50) segundo o volume do corpo lúteo (cm<sup>3</sup>) e prenhez.

Volume do CL (cm <sup>3</sup> )	Taxa de Prenhez					
	Prenhe		Não prenhe		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<2,00	10	58,82	7	41,18	17	34,00
≥2,00 a <4,00	10	50,00	10	50,00	20	40,00
≥4,00 a <6,00	4	80,00	1	20,00	5	10,00
≥6,00	3	37,50	5	62,50	8	16,00
Total	27	54,00	23	46,00	50	100,00

p= 0,49

Já para os volumes das cavidades císticas, as mensurações foram divididas em três grupos <1,00; ≥1,00 a <2,00 e ≥2,00 cm<sup>3</sup>. No total de 13/26 receptoras prenhes, em onze (42,31%), uma (3,85%) e uma (3,85%) os volumes das cavidades císticas foram <1,00, ≥1,00 a <2,00 e ≥2,00 cm<sup>3</sup> respectivamente.

Das 13 receptoras não prenhes, todas apresentaram volumes das cavidades císticas <1,00 cm<sup>3</sup>. Na tabela 15 está demonstrado que apesar da freqüência de receptoras com volume da cavidade cística maior que 1,00 cm<sup>3</sup> ter sido muito baixa (n= 2), não foi verificada diferença estatística nos índices de gestação entre os três intervalos de volume (p= 0,48) no Teste Exato de Fisher.

## Discussão

**Tabela 15-** Distribuição da freqüência das novilhas receptoras (n= 26) segundo o volume da cavidade cística (cm<sup>3</sup>) e prenhez.

Volume da cavidade cística (cm <sup>3</sup> )	Taxa de Prenhez					
	Prenhe		Não prenhe		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<1,00	11	45,83	13	54,17	24	92,31
≥1,00 a <2,00	1	100,00	0	0	1	3,85
≥2,00	1	100,00	0	0	1	3,85
Total	13	50,00	13	50,00	26	100,00

p= 0,48

Para avaliar a freqüência das receptoras de acordo com os volumes das massas luteais, estes foram agrupados em quatro categorias de medidas <2,00; ≥2,00 a <4,00, ≥4,00 a <6,00 e ≥6,00 cm<sup>3</sup>. No total de 27 animais gestantes (54,00%), em 13 (26,00%), sete (14,00%), cinco (10,00%) e duas (4,00%) os volumes das massas luteais foram <2,00, ≥2,00 a <4,00, ≥4,00 a <6,00 e ≥6,00 cm<sup>3</sup>. Dos 23 animais não gestantes, sete (14,00%), dez (20,00%), um (2,00%) e cinco (10,00%) apresentaram volumes similares aos descritos para as fêmeas prenhes, respectivamente. Não houve diferença na taxa de prenhez entre os quatro intervalos de volumes das massas luteais (p= 0,12), segundo o Teste exato de Fisher (tabela 16).

## Discussão

**Tabela 16-** Distribuição da frequência das novilhas receptoras (n= 50) segundo o volume da massa luteal (cm<sup>3</sup>) e prenhez.

Volume da massa luteal (cm <sup>3</sup> )	Taxa de Prenhez					
	Prenhe		Não prenhe		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<2,00	13	65,00	7	35,00	20	40,00
≥2,00 a <4,00	7	41,18	10	58,82	17	34,00
≥4,00 a <6,00	5	83,33	1	16,67	6	12,00
≥6,00	2	28,57	5	71,43	7	14,00
Total	27	54,00	23	46,00	50	100,00

p= 0,12

Os volumes médios da massa luteal foram para CL considerado pequeno à palpação retal ( $2,92 \pm 2,75$ ; n= 10), médio ( $1,98 \pm 1,03$ ; n= 19) e grande ( $6,07 \pm 11,67$ ; n= 28). Segundo o Teste de Kruskal-Wallis houve diferença (p= 0,001) nos volumes da massa luteal para médio e grande (tabela 17).

Para Spell et al. (2001) os valores encontrados para volume luteal foram  $6,8 \pm 0,27$  cm<sup>3</sup> de CL “excelentes ou bons” e  $7,4 \pm 0,39$  cm<sup>3</sup> de CL “ruins” à palpação retal.

**Tabela 17-** Medianas e primeiro e terceiro quartis para o volume da massa luteal e tamanhos do CL à palpação retal.

Tamanho do CL à palpação retal	Medianas (1º; 3º quartis)
Pequeno	2,31 (1,57; 2,84) <sup>ab</sup>
Médio	1,81 (1,14; 2,95) <sup>b</sup>
Grande	3,56 (1,94; 5,82) <sup>a</sup>

a,b indica diferença estatística (p= 0,001)

Considerando-se que o volume médio da massa luteal está relacionado ao diâmetro do CL ( $V= 4/3\pi \times (D/2)^3$ ) era esperado encontrar diferença significativa entre os dados analisados (CL médio e grande).

Foram encontradas correlações positivas significativas entre o diâmetro e o volume do CL (r= 0,87, p= 0,0001), diâmetro e volume da cavidade cística (r= 0,87,

## Discussão

p= 0,0001), diâmetro do CL e volume da massa luteal (r= 0,87, p= 0,0001) e os volumes do CL e da massa luteal (r= 0,99, p= 0,0001). Estes resultados são esperados uma vez que estas medidas são interdependentes (tabela 18).

**Tabela 18-** Matriz de correlações de Pearson referentes às variáveis diâmetro do CL (DIAM CL), volume do corpo lúteo (VOL CL), diâmetro da cavidade cística (DIAM CC), volume da cavidade cística (DIAM CC) e volume da massa luteal (VOL ML), obtidas pelo exame ultra-sonográfico realizado nas receptoras no dia da inovulação dos embriões.

Variáveis	DIAM CL	VOL CL	DIAM CC	VOL CC	VOL ML
DIAM CL	1,00	0,87*	0,78*	0,87*	0,87*
VOL CL		1,00	0,74*	0,94*	0,99*
DIAM CC			1,00	0,87*	0,73*
VOL CC				1,00	0,93*
VOL ML					1,00

\* significativo (p= 0,0001)

DIAM CL diâmetro do CL

VOL CL volume do corpo lúteo

DIAM CC diâmetro da cavidade cística

DIAM CC volume da cavidade cística

VOL ML volume da massa luteal

A concentração plasmática de P<sub>4</sub> no dia da inovulação dos embriões variou de 0,43 a 39,91 ng/mL, sendo que a média foi de 4,91 ± 2,97 ng/mL (n= 60). A média aproximou-se da dosagem realizada por Viana et al. (1997), quando estudaram o desenvolvimento, a função e a regressão luteal em vacas da raça Gir (4,61 ± 0,17

## Discussão

ng/mL). Para Battochio et al. (1999), a taxa de P<sub>4</sub> sete dias após o estro foi de 4,00 ng/mL e para Solano et al. (2003) esta variou de 0,35 a 4,44 ng/mL.

Os níveis plasmáticos médios de P<sub>4</sub> para as receptoras gestantes e não gestantes foram de  $4,79 \pm 2,98$  (29/53) e  $5,82 \pm 2,94$  ng/mL (24/53) respectivamente. Estes dados foram superiores aos dosados por Galimberti et al. (2001) que obtiveram taxas médias deste hormônio de  $3,42 \pm 1,12$  e  $2,75 \pm 1,26$  ng/mL e por Silva et al. (2002) que descreveram médias de  $2,92 \pm 0,08$  e  $2,88 \pm 0,08$  ng/mL para as fêmeas gestantes e não gestantes respectivamente. Apesar de não ter sido observada diferença estatística ( $p= 0,39$ ) entre as taxas de prenhez segundo a concentração plasmática de P<sub>4</sub>, conforme o Teste Exato de Fisher, notou-se que esta foi maior nas novilhas que não estavam prenhes 45 dias após a inovulação, quando foi realizado o diagnóstico de gestação por palpação retal. Os resultados indicaram que a taxa de P<sub>4</sub> no dia da inovulação dos embriões, não influenciou os índices de prenhez obtidos conforme apresenta a tabela 19. Galimberti et al. (2001) e Silva et al. (2002) observaram o mesmo.

**Tabela 19-** Distribuição da freqüência das novilhas receptoras (n= 53) segundo a concentração plasmática de progesterona (ng/mL) e prenhez.

Concentração de progesterona (ng/mL)	Taxa de Prenhez					
	Prenhe		Não prenhe		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<5,00	18	62,07	11	37,93	29	54,72
≥5,00 a <10,00	8	42,11	11	57,89	19	35,85
≥10,00	3	60,00	2	40,00	5	9,43
Total	29	54,72	24	45,28	53	100,00

$p= 0,39$

As taxas médias de P<sub>4</sub> para os CL considerados pequenos, médios e grandes à palpação retal foram de  $4,20 \pm 2,66$ ;  $4,40 \pm 3,10$  e  $5,54 \pm 2,97$  ng/mL, respectivamente. Os CL considerados grandes à palpação retal produziram maior quantidade de P<sub>4</sub> do que os CL pequenos e médios, porém isto não afetou as porcentagens de prenhez.

## Discussão

Conforme demonstrado na tabela 20 foram observadas diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) entre a concentração plasmática de  $P_4$  e o diâmetro do CL, o volume do CL e o volume da massa luteal, porém as correlações ficaram abaixo de  $r = 0,60$ . Para os diâmetro e volume da cavidade cística e o  $E_2$  as correlações ficaram abaixo de  $r = 0,60$ , sem diferença estatística ( $p > 0,05$ ) (tabela 20).

Spell et al. (2001) não observaram diferenças significativas entre o diâmetro do CL, volume luteal ou concentração plasmática de  $P_4$  entre receptoras que tornaram-se ou não prenhes após a transferência de embrião. Ainda segundo estes autores houve uma correlação simples positiva e significativa entre diâmetro do corpo lúteo ou volume do tecido luteal e concentração plasmática de  $P_4$  ( $r = 0,15$ ,  $p < 0,01$  e  $r = 0,18$ ,  $p < 0,01$ , respectivamente). A concentração de  $P_4$  plasmática no momento da transferência de embriões também não influenciou as taxas de prenhez.

**Tabela 20-** Matriz de correlações de Pearson referentes às variáveis concentração plasmática de progesterona (CONC  $P_4$ ), concentração plasmática de estradiol (CONC  $E_2$ ), diâmetro do CL (DIAM CL), volume do CL (VOL CL), diâmetro da cavidade cística (DIAM CC), volume da cavidade cística (VOL CC) e volume da massa luteal (VOL ML) nas receptoras no dia da inovulação dos embriões.

Variáveis	CONC $P_4$	CONC $E_2$	DIAM CL	VOL CL	DIAM CC	VOL CC	VOL ML
CONC $P_4$	1,00	0,19	0,46*	0,36*	0,13	0,29	0,37*

\*  $p < 0,05$

CONC  $P_4$  concentração plasmática de progesterona

CONC  $E_2$  concentração plasmática de estradiol

DIAM CL diâmetro do CL

VOL CL volume do CL

DIAM CC diâmetro da cavidade cística

VOL CC volume da cavidade cística

VOL ML volume da massa luteal

A tabela 21 apresenta a frequência das novilhas receptoras ( $n = 57$ ) segundo o volume da massa luteal ( $\text{cm}^3$ ) ao exame ultra-sonográfico e a concentração plasmática de  $P_4$  ( $\text{ng/mL}$ ). Entre os animais com volume da massa luteal  $< 2,00 \text{ cm}^3$

## Discussão

foi constatada diferença significativa entre a porcentagem de animais que apresentaram concentração plasmática de  $P_4 < 5,00$  e aqueles que apresentaram  $\geq 5,00$  a  $< 10,00$  e  $\geq 10,00$  ng/mL ( $p = 0,025$ ) conforme o Teste Exato de Fisher.

**Tabela 21-** Distribuição da frequência das novilhas receptoras ( $n = 57$ ) segundo o volume da massa luteal ( $\text{cm}^3$ ) e concentração plasmática de progesterona (ng/mL).

Volume da massa luteal ( $\text{cm}^3$ )	Concentração plasmática de progesterona (ng/mL)							
	<5,00		$\geq 5,00$ a <10,00		$\geq 10,00$		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<2,00	20	83,33 <sup>a</sup>	4	16,67 <sup>b</sup>	0	0 <sup>b</sup>	24	100,00
$\geq 2,00$ a <4,00	9	47,37 <sup>a</sup>	8	42,11 <sup>a</sup>	2	10,53 <sup>a</sup>	19	100,00
$\geq 4,00$ a <6,00	4	57,14 <sup>a</sup>	2	28,57 <sup>a</sup>	1	14,29 <sup>a</sup>	7	100,00
$\geq 6,00$	2	28,57 <sup>a</sup>	3	42,86 <sup>a</sup>	2	28,57 <sup>a</sup>	7	100,00

Letras a e b nas linhas diferem estatisticamente ( $p = 0,025$ )

#### **4. 2. 2. Presença do folículo dominante e produção de $17\beta$ estradiol**

Das 60 receptoras de embriões, 55 (91,67%) apresentaram um folículo dominante, 3 (5,00%) dois folículos e em 2 (3,33%) foram identificados vários folículos pequenos (diâmetros  $\cong 5,00$  mm) ao exame ultra-sonográfico realizado no dia da inovulação. O diâmetro médio dos folículos foi de  $11,41 \pm 2,16$  mm. Em 37/55 animais, o folículo dominante localizou-se no ovário direito (63,79%) e nos 21/55 no ovário esquerdo (36,21%). Em 41 receptoras (70,69%), o folículo foi visualizado no mesmo ovário que continha o CL e em 17 (29,31%) no ovário contralateral. Spell et al. (2001) também verificaram predominância do folículo dominante no ovário direito (59,00%), porém, a presença deste e do CL em ovários opostos foi maior (56,00%).

A concentração plasmática de  $17\beta E_2$  no dia da inovulação dos embriões, apresentou valores mínimos de 0,43 pg/mL e máximos de 39,91 pg/mL, com média de  $4,45 \pm 6,03$  pg/mL ( $n = 60$ ). Para as receptoras nas quais foi confirmada a

## Discussão

preñez, a taxa média deste hormônio foi de  $5,28 \pm 7,43$  pg/mL e para aquelas que apresentaram diagnóstico negativo foi de  $3,90 \pm 4,85$  pg/mL.

Para analisar a frequência das receptoras prenhes ou não segundo a concentração plasmática de  $17\beta$  E<sub>2</sub> (pg/mL), estas foram divididas em quatro categorias (tabela 23). Das 29 receptoras prenhes (54,72%), 21 (39,62%) apresentaram concentração plasmática de  $17\beta$  E<sub>2</sub> dentro dos intervalos <5,00, 5 (9,43%) no intervalo de  $\geq 5,00$  a <10,00; 1 (1,89%) intervalo de  $\geq 10,00$  a <15,00 e 2 (3,77%)  $\geq 15,00$  pg/mL.

No grupo de receptoras não prenhes (n= 24; 45,28%), a incidência foi de 18 (33,96%), 4 (7,55%), 0 e 2 (3,77%) fêmeas para os mesmos intervalos respectivamente. Não houve influência da concentração plasmática de  $17\beta$  E<sub>2</sub> nas porcentagens de prenhez ( $p= 1,00$ ) segundo o Teste Exato de Fisher (tabela 22).

**Tabela 22-** Distribuição da frequência das novilhas receptoras (n= 53) segundo a concentração plasmática de estradiol (pg/mL) e prenhez.

Concentração de estradiol (pg/mL)	Taxa de Prenhez					
	Prenhe		Não prenhe		Total	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%
<5,00	21	53,85	18	46,15	39	73,58
$\geq 5,00$ a <10,00	5	55,56	4	44,44	9	16,98
$\geq 10,00$ a <15,00	1	100,00	0	0	1	1,89
$\geq 15,00$	2	50,00	2	50,00	4	7,55
Total	29	54,72	24	45,28	53	100,00

$p= 1,00$

Relatos na literatura sobre a concentração plasmática de E<sub>2</sub> em vacas receptoras de embrião no dia da inovulação são pouco descritos. Mann et al. (1995) obtiveram nível plasmático de E<sub>2</sub> no oitavo dia do ciclo de 1,10 e 1,30 pg/mL para as fêmeas com diagnóstico de gestação positivo e negativo respectivamente. Valor semelhante foi descrito por Wehrman et al. (1997) em estudo com vacas receptoras de embrião no sexto dia do ciclo ( $1,80 \pm 0,20$  pg/mL). Hirako et al. (2002) acompanharam o perfil hormonal dos estrógenos durante a gestação de vacas

## Discussão

Holandesas que receberam um ou dois blastocistos produzidos *in vitro* e constataram que em média as concentrações de todos os estrógenos situaram-se entre 1,00 e 6,00 pg/mL até o dia 50 da gestação. Contudo a estrona e o  $17\beta$  E<sub>2</sub> permaneceram em níveis basais até o dia 80 da gestação.

Foram constatadas correlações negativas entre a concentração plasmática de E<sub>2</sub> e o diâmetro e o volume do CL, o diâmetro e volume da cavidade cística e o volume da massa luteal, porém os dados não foram estatisticamente significativos ( $p > 0,05$ ); indicando que a concentração plasmática de E<sub>2</sub> não foi influenciada por estas variáveis. Para a P<sub>4</sub> a correlação foi positiva e não significativa ( $r = 0,19$ ,  $p = 0,13$ ) (tabela 23).

**Tabela 23-** Matriz de correlações de Pearson referentes às variáveis concentração plasmática de estradiol (CONC E<sub>2</sub>), concentração plasmática de progesterona (CONC P<sub>4</sub>), diâmetro do CL (DIAM CL), volume do CL (VOL CL), diâmetro da cavidade cística (DIAM CC), volume da cavidade cística (VOL CC) e volume da massa luteal (VOL ML) nas receptoras, no dia da inovulação dos embriões.

Variáveis	CONC E <sub>2</sub>	CONC P <sub>4</sub>	DIAM CL	VOL CL	DIAM CC	VOL CC	VOL ML
CONC E <sub>2</sub>	1,00	0,19	- 0,04	- 0,05	- 0,15	- 0,12	- 0,05

$p > 0,05$

CONC E<sub>2</sub> concentração plasmática de estradiol

CONC P<sub>4</sub> concentração plasmática de progesterona

DIAM CL diâmetro do corpo lúteo

VOL CL volume do corpo lúteo

DIAM CC diâmetro da cavidade cística

VOL CC volume da cavidade cística

VOL ML volume da massa luteal

#### 4. 2. 3. Contratilidade uterina no momento da inovulação

Das fêmeas avaliadas quanto à contratilidade do útero no momento da inovulação, 49/60 (81,67%) apresentaram útero flácido (grau 1), 11/60 (18,33%) útero em um estágio intermediário entre flácido e contraído (grau 2) e 0/60 útero contraído (grau 3). Com relação a prenhez segundo os graus 1 e 2 os índices foram

## Discussão

de 47,62% (20/42) e 81,82% (9/11) respectivamente. Estes índices foram estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) segundo o Teste do Qui-quadrado, indicando que receptoras cujos úteros foram classificados como grau 2 (intermediário) apresentaram os melhores resultados de gestação.

Segundo Fernandes (1999) em inovulações não cirúrgicas, variáveis como tempo necessário para transpor a cérvix, possibilidade de inoculação de microorganismos no lúmen uterino, local de deposição do embrião e grau de lesão interna do útero afetam a taxa de gestação. Além da experiência do operador, estas variáveis podem ser influenciadas pela contenção das receptoras no momento da inovulação, cuidados com higiene, características morfológicas da cérvix e manipulação uterina durante o processo. Nos animais que apresentaram útero de difícil manipulação (maior tônus muscular) os resultados de gestação foram inferiores (31,03%), podendo ter ocorrido lesão no endométrio pelo aplicador e maior dificuldade de deposição do embrião no local adequado. Nas inovulações cuja manipulação uterina foi fácil ou regular, as porcentagens de prenhez foram de 58,76 e 45,56% respectivamente.

#### **4. 2. 4. Assincronia entre receptora e doadora**

Utilizou-se apenas receptoras cujos estros foram detectados um dia antes (-1 d), no mesmo dia (0 d) e 1 dia após (+1 d) o estro das doadoras. Das 53 fêmeas inovuladas, 11 (20,75%), 23 (43,40%) e 19 (35,85%) apresentaram como assincronia -1 d; 0 d e +1 d respectivamente. As porcentagens de gestação segundo a assincronia do estro foram de 54,55% (-1 d); 56,52% (0 d) e 52,63% (+1 d). Para -1 d o índice de gestação foi semelhante ao de Coelho (1986). Entretanto houve discrepância entre os valores obtidos no presente estudo para os de Demczuk et al. (1998) quando comparados os dias -1 d e 0 d, sendo respectivamente 38,30 e 44,30%. Spell et al. (2001) encontraram índices de 81,50 e 70,20% para estas mesmas variáveis. Os resultados obtidos para o +1 d foram semelhantes aos de Demczuk et al. (1998) (51,20%); Spell et al. (2001) (50,00%); e os de Janowitz (1995) (49,50%).

Neste estudo, um período de assincronia de 24 horas não representou diferença estatística nas taxas de gestação ( $p > 0,05$ ) segundo o Teste do Qui-

quadrado. Confirmando os dados de Hasler (2001) que inovulou embriões frescos e criopreservados. Estes resultados nas taxas de gestação ( $p > 0,05$ ) reforçaram a observação feita por Hafez (2000) de que o período de assincronia não deve ultrapassar 24 horas.

#### **4. 2. 5. Estágio de desenvolvimento dos embriões inovulados**

Cinqüenta e cinco embriões foram transferidos em 53 receptoras, pois duas novilhas receberam dois embriões cada. Com relação ao estágio de desenvolvimento foram inovuladas 28 mórulas compactas (50,91%), 7 blastocistos iniciais (12,73%), 13 blastocistos (23,64%) e 7 blastocistos expandidos (12,73%). As taxas de prenhez foram para mórula compacta 46,43% (13/28), blastocisto inicial 71,43% (5/7), blastocisto 61,54% (8/13) e blastocisto expandido 42,86% (3/7).

Os índices de prenhez foram similares ( $p > 0,05$ ) para fêmeas que receberam embriões nos estágios de mórula compacta e blastocisto (inicial, blastocisto e expandido) segundo o Teste do Qui-quadrado. Embora os melhores resultados tenham sido alcançados com a transferência de blastocistos iniciais e blastocistos, seria necessário um número maior de inovulações com estes estágios embrionários para esta tendência ser confirmada pela análise estatística.

Takeda et al. (1986), Moraes (1990), Hasler (2001) e Spell et al. (2001) também não verificaram diferença estatística nos índices de gestação entre os estágios de desenvolvimento embrionário. Entretanto para Wright (1981), Niemann et al. (1982), Looney et al. (1984), Donaldson (1985), Wright (1985), Kim (1987) e Mc Evoy & Sreenan (1990) a transferência de blastocistos resultou em índice de prenhez maior do que quando se transferiu mórulas. No trabalho de Berlin et al. (1983) a maior porcentagem de gestação foi resultante da inovulação de mórulas.

#### **4. 2. 6. Qualidade dos embriões inovulados**

Os índices de prenhez de acordo com a qualidade dos embriões foram de 62,50% (20/32), 42,10% (8/19) e apenas 25,00% (1/4) para os graus 1 (excelente), 2 (bom) e 3 (regular). Apesar de não ter sido constatada diferença significativa no

---

Discussão

Teste do Qui-quadrado ( $p > 0,05$ ) para as taxas de prenhez resultantes da transferência de embriões de graus 1 e 2, observou-se uma tendência favorável para os embriões classificados como excelentes.

Fernandes (1995) relatou taxas de gestação similares para embriões excelentes (54,90%) e bons (52,90%), e Spell et al (2001) registraram 74,10% de prenhez para embriões grau 1 (excelente ou bom) e 71,80% para embriões grau 2 (regular). Entretanto Demczuck et al. (1998) e Hasler (2001) demonstraram resultados de prenhez significativamente diferentes entre os graus de classificação dos embriões. No experimento de Demczuck et al. (1998) os embriões avaliados como ótimos e bons (designados como G1 e G2) apresentaram porcentagens de prenhez maiores (51,20 e 40,10%, respectivamente), do que as obtidas com embriões classificados como sofríveis (G3 - 21,80%) e ruins (G4 - 0%). Para Hasler (2001) as taxas de prenhez foram de 73,20% (grau 1), 68,30% (grau 2) e 56,30% (grau 3).

As figuras 6 e 7 representam alguns embriões quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária.



**Figura 6-** Embriões classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária como mórula de grau 2 (1, 3 e 12), mórula de grau 3 (4, 6, 9, 10 e 11), blastocisto inicial de grau 2 (7) e embrião degenerado (2, 5 e 8).



**Figura 7-** Embriões classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária como blastocisto de grau 1 (1), blastocisto inicial de grau (2) e mórula de grau 3 (3).

## 5. CONCLUSÕES

- A determinação do número de corpos lúteos por palpação retal e exame ultrassonográfico, no dia da colheita dos embriões, pôde ser utilizada como parâmetro de estimativa do número de estruturas recuperadas;
- A concentração plasmática de  $P_4$ , no dia da colheita dos embriões, não interferiu na recuperação de estruturas e viabilidade embrionária e não foi influenciada pelo número de CL;
- A concentração plasmática de  $17\beta E_2$ , no dia da colheita dos embriões, não interferiu na recuperação de estruturas e viabilidade embrionária e não foi influenciada pelo número de ovulações;
- Os diâmetros e volumes do CL e da cavidade cística e o volume da massa luteal não interferiram nas taxas de prenhez;
- A palpação retal foi satisfatória para distinguir CL médios de grandes, porém perdeu a sensibilidade ao avaliar CL pequenos;
- Foram observadas correlações baixas ( $r < 0,60$ ) entre a concentração plasmática de  $P_4$  e  $17\beta E_2$  e o diâmetro do CL, volume do CL, diâmetro da cavidade cística, volume da cavidade cística e o volume da massa luteal;
- Não se observou diferença estatística entre as concentrações plasmáticas de  $P_4$  e  $17\beta E_2$ , no dia da ovulação dos embriões, para as receptoras que se tornaram ou não gestantes,
- As receptoras cujos úteros foram classificados como grau 2 (intermediário) apresentaram os melhores resultados de gestação;
- Um período de assincronia de 24 horas não representou diferença estatística nas taxas de gestação.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\***

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992a.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, n. 2, p. 627-640, 1992b.

ALVAREZ, H. R.; AGUIAR, A. F.; STRASSBURGER, J. Indução da superovulação com FSH-p ou hMG em gado Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 11, p. 187-191, 1987.

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

ALVAREZ, R. H. **Efeito da imunização passiva contra o líquido folicular bovino na taxa de ovulação e na produção de embriões de vacas superovuladas e não superovuladas**. 1995. 192 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ANGEL, M. O.; VOSS, H. J.; HOLTZ, W. Recovery rate and quality of embryos collected suckled cows and beef heifers after superovulation with PMSG. **Theriogenology**, v. 22, n. 5, p. 553-562, 1984.

ARMSTRONG, D. T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v. 93, p. 7-24, 1993.

BATTOCHIO, M.; GAVIA, G.; MOLLO, A.; VERONESI, M. C.; SOLDANO, F.; BONO, G.; CAIROLI, F. Agreement between ultrasonographic classification of the CL and plasma progesterone concentration in dairy cows. **Theriogenology**, v. 51, p. 1059-1069, 1999.

BECKER, W. A. P.; PINHEIRO, L. E. L. Ovarian response to superovulation in Nelore cows (*Bos taurus indicus*). **Theriogenology**, v. 25, n. 6, p. 785-793, 1986.

BÉNYEI, B.; BARROS, C. C. W. Efeito da superovulação sobre o desempenho de bovinos doadores de embrião importados de clima temperado para clima tropical nos dois primeiros anos de adaptação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 4, p. 366-371, 2000.

BERLIN, R.; ODILLE, B.; CARRETERO, A. P.; FIERRO, R. N. Evaluación y clasificación de embriones bovinos en la técnica de transplante de embriones. **Veterinaria**, v. 14, n. 3, p. 199-200, 1983.

\* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14724**: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2001.

## Bibliográficas

- BOLAND, M. P.; CROSBY, T. F.; GORDON, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. **Theriogenology**, v. 10, p. 175-180, 1978.
- BOLAND, M. P.; GOUDING, D.; ROCHE, J. F. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 34, n. 1, p. 5-17, 1991.
- BRUEL, K. F.; LEWIS, P. E.; SCHRICK, F. N.; LISHMAN, A. W.; INSKEEP, E. K.; BUTCHER, R. L. Factors affecting fertility in the postpartum cow: role of the oocyte and follicle in conception rate. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 655-661, 1993.
- BRYNER, R. W.; INSKEEP, E. K.; LEWIS, P. E.; BUTCHER, R. L. Hormonal profiles in young and old beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 65, p. 59-60, 1987.
- BRYNER, R. W.; WINDER, M. G.; LEWIS, P. E.; INSKEEP, E. K.; BUTCHER, R. L. Changes in hormonal profiles during the estrous cycle in old lactating beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 7, p. 181-190, 1990.
- CALLENSSEN, H.; LOVENDAHL, P.; BAK, A. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. **Journal Animal Science**, v. 73, p. 1539-1543, 1995.
- CHUPIN, D.; COMBARNOUS, Y.; PROCUREUR, R. Antagonistic effect of LH on FSH induced superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 21, p. 229, 1984.
- COELHO, E. N. **Alguns aspectos da transferência de embriões bovinos**. 1986. 83 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- COELHO, E. N.; CHOW, L. A.; AZEVEDO, N. A.; LARA, J. L. R. Superovulação e colheita de embriões em doadoras *Bos taurus* e *Bos indicus*. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1987, Belo Horizonte, p. 95.
- CROWE, M. A. Gonadotrophic control of terminal follicular growth in cattle. **Reproduction Domestic Animal**, v. 34, p. 157-166, 1999.
- DEMCZUK, E.; KOZICKI, L. E.; PONTELLI, E. S.; SALLES, J. O. Transferência de embrião em vacas da raça Simental na região noroeste do Paraná e Sul do Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 4, p. 174-177, 1998.
- DHANANI, J.; JILLELLA, D.; CHENOWETH, P. J. Prediction of response to superovulation treatment in *Bos indicus* cattle by plasma progesterone estimation. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 192, 1991.
- DIELEMAN, S. J.; BEVERS, M. M.; VAN TOL, H. T. M.; WILLEMSE, A. H. Peripheral plasma concentrations of oestradiol, progesterone, cortisol, LH and prolactin during the oestrus cycle in the cow, with emphasis on the peri-oestrus period. **Animal Reproduction Science**, v. 10, p. 275-292, 1986.

## Bibliográficas

DIELEMAN, S. J.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A. M.; DE LOSS, F. A. M. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. **Theriogenology**, v. 39, p. 25-41, 1993.

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

DONALDSON, L. E. LH and FSH profiles at superovulation and embryo production in the cow. **Theriogenology**, v. 23, n. 3, p. 441-447, 1985.

DONALDSON, L. E. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. **Theriogenology**, v. 31, n. 1, p. 183, 1989.

FARIN, P. W.; SLENNING, B. D.; BRITT, J. H. Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Theriogenology**, v. 52, p. 659-670, 1999.

FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 151-170, 2001.

FERNANDES, C. A. C. **Efeito do tratamento com hormônio foliculo estimulante (FSH) sobre a taxa de gestação de novilhas mestiças usadas como receptoras de embriões**. Viçosa, 1994. 63 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

FERNANDES, C. A. C. Avaliação da incidência e performance reprodutiva de vacas com retenção de placenta. In: XI CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1995. **Anais...** Minas Gerais: Belo Horizonte, 1995.

FERNANDES, C. A. C.; VELÁSQUEZ, L. F. U. Características do corpo lúteo e taxa de gestação de receptoras de embrião. **Archivos de Reproduction Animal**, v. 1, n. 2, p. 28-31, 1997.

FERNANDES, C. A. C. Inovações não cirúrgicas e taxa de gestação de receptoras de embrião. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, p. 263-266, 1999.

FERNANDES, C. A. C. **Imunização ativa contra líquido folicular suíno, alterações na fisiologia reprodutiva e resultados de superovulação em vacas e novilhas**. Botucatu, 2000. 105 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

FIELDS, M. J.; FIELDS, P. A. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. **Theriogenology**, v. 45, p. 1295-1325, 1996.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.

## Bibliográficas

FONSECA, J. F.; SILVA FILHO, J. M.; PINTO NETO, A.; PALHARES, M. S. Estádios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 671-676, 2001.

GALIMBERTI, A. M.; FONSECA, F. A.; ARAÚJO, M. C. C.; COSTA, E. P.; FREITAS, C.; GUIMARÃES, J. D.; FERREIRA, A. M. Taxa de gestação e níveis plasmáticos de progesterona, em receptoras de embrião bovino, tratadas com busarelina após a inovulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 353-359, 2001.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycle with two and three follicular waves. **Theriogenology**, v. 87, n. 1, p. 223-230, 1989.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRIKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of reproduction**, v. 55, p. 1987-1994, 1996.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULLICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, p. 1079-1093, 1999.

GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Effects of chronic treatment with a potent gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, p. 263-270, 1995.

GOTO, K.; NAKANISHI, Y.; OHKUTSU, S.; OGAWA, K.; TASAKI, M.; OHTA, M.; INOHAE, S.; TATEYAMA, S.; KAWABATA, T. Plasma progesterone profiles and embryo quality in superovulated Japanese black cattle. **Theriogenology**, v. 27, n. 5, p. 819-826, 1987.

GOTO, K.; OHKUTSU, S.; NAKANISHI, Y.; OGAWA, K.; TASAKI, M.; OHTA, H. et al. Endocrine profiles and embryo quality in superovulated Japanese Black Cattle. **Theriogenology**, v. 29, n. 3, p. 615-629, 1988.

GRADELA, A.; ESPER, C. R.; ROSA E SILVA, A. A. M. Plasma concentrations of progesterone, 17 $\beta$  estradiol and androstenedione and superovulatory response of nelore cows (*Bos indicus*) treated with FSH. **Theriogenology**, v. 45, p. 843-850, 1996.

GREVE, T.; CALLENSSEN, H.; HYTTEL, P.; ASSEY, R. The effects of exogenous gonadotropin on oocyte and embryo quality in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 41-50, 1995.

GRYGAR, I.; HUDLAC, E.; DOLEZEL, R.; NEDBALKOVA, J. Volume of luteal tissue and concentration of serum progesterone in cows bearing homogeneous corpus luteum with cavity. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p. 77-82, 1997.

## Bibliográficas

HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in Farm Animals**. 7 ed. Philadelphia: Lippicott Williams & Wilkins, p. 95-127, 2000.

HAMILTON, S. A.; XU, Z. Z.; KIEBO, R. Z.; YOUNGQUIST, R. S.; GARVERICH, H. A. Relationship between ovarian follicular dynamics and follicle-stimulating hormone levels during the bovine estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 261, 1992.

HASLER, J. F.; MCCAULEY, A. D.; SCHERMERHORN, E. C.; FOOTE, R. H. Superovulatory responses of Holstein cows. **Theriogenology**, v. 19, n. 1, p. 83-99, 1983.

HASLER, J. F.; MCCAULEY, A. D.; LATHROP, W. F.; FOOTE, R. H. Effect of donor-embryo-recipient interactions and pregnancy rate in a large-scale-bovine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 139-168, 1987.

HASLER, J. F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v. 58, p. 1401-1415, 2001.

HERRLER, A.; ELSAESSER, F.; NIEMANN, H. Rap milk progesterone assay as a tool for selection of potential donor cows prior to superovulation. **Theriogenology**, v. 33, n. 2, p. 415-422, 1990.

HIRAKO, M.; TAKAHASHI, T.; DOMEKI, I. Peripheral changes in estrone sulfate concentration during the first trimester of gestation in cattle: comparison with unconjugated estrogens and relationship to fetal number. **Theriogenology**, v. 57, p. 1939-1947, 2002.

HUBBERT, W. T. Factors affecting survival of the bovine fetus and neonate. **Theriogenology**, v. 1, p. 15-34, 1974.

JACOMINI, J. O.; DINIZ, E. G. Programação de doadoras de embriões bovinos utilizando implante subcutâneo de progesterona. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, n. 1, 2000.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Bovinos e Bubalinos. In: HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Manole, 1995. p. 319-334.

JANOWITZ, U. Untersuchungen zu Einflussfaktoren auf then Transfererfolg bei Empfängern im Rahmen des Embryotransfers beim Rind. **Animal Breeding Abstracts**, v. 63, n. 6, p. 402, 1995.

KAFI, M.; MC GOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 137-157, 1997.

## Bibliográficas

KANECO, H.; TERADA, T.; TAYA, K.; WATANABE, G.; SASAMOTO, S.; HASEGAWA, Y.; IGARASHI, M. Ovarian follicular dynamics and concentrations of oestradiol-17 $\beta$ , progesterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone during the periovulatory phase of the oestrus cycle in the cow. **Reproduction Fertility and Development**, v. 3, p. 529-535, 1991.

KATSKA, L.; SMORAG, Z. Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 7, n. 5, p. 451-460, 1984.

KERBLER, T. L.; BUHR, M. M.; JORDAN, L. T.; LESLIE, K. E.; WALTON, J. S. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon – tau synthesis by the conceptus in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 703-714, 1997.

KIM, S. K. The studies on the effects of embryo morphology on pregnancy rates in Holstein cows. **Korean Journal of Animal Science**, v. 28, n. 8, p. 521-526, 1984.

KIM, H. S.; KIM, Y. J.; LEE, J. M.; LEE, K. S.; CHUNG, K. S., Studies on the factors affecting superovulation induction in cattle. **Korean Journal of Animal Science**, v. 27, p. 201-205, 1985.

LINDNER, G. M.; WRIGHT Jr., R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, p. 407-416, 1983.

LOONEY, C. R.; ODEN, A. J.; MASSEY, J. M.; JOHNSON, C. A.; GODKE, R. A. Pregnancy rates following HCG administration at the time of transfer in embryo-recipient cattle. **Theriogenology**, v. 21, n. 1, p. 246, 1984.

LUBBADEH, W. F. Repeated superovulation with non-surgical recovery of embryos in dairy cows. **Dissertation Abstracts International**, v. 40, p. 3602, 1980.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 1-5, 1995.

MAPLETOFT, R. J. Embryo transfer in the cow: general procedures. **Revue Scientifique at Thechinique Office International des Epizzoties**, v. 4, n. 4, p. 843-858, 1985.

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

MC EVOY, T. G.; SREENAN, J. M. Effect of embryo quality and stage of development on the survival of zona pellucida-free cattle demi-embryos. **Theriogenology**, v. 33, n. 6, p. 1245-1252, 1990.

## Bibliográficas

- MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais dos estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*)**. 2003. 98 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- MONNIAUX, D; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v. 19, n. 1, p. 55-81, 1983.
- MORAES, G. V. **Avaliação quali-quantitativa da transferência de embriões em bovinos**. 1990. 170 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- NEGRÃO, S. L.; COELHO, L. A.; NEGRÃO, J. A.; LIMA, C. G. Efeito dos níveis de energia da dieta na taxa de recuperação de embriões e nas concentrações plasmáticas de progesterona, estradiol e glicose em vacas doadoras de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 31, p. 502, 2003.
- NICKEL, R.; SCHUMMER, A.; SEIFERLE, E.; SACK, W. O. The viscera of the domestic mammals. **Verlag Paul Parey**, p. 304-392, 1973.
- NIEMANN, H.; LAMPETER, W. W.; SACHER, B.; KRUFF, B. Comparison of survival rates of day 7 and day 8 bovine embryos after fast freezing and thawing. **Theriogenology**, v. 18, n. 4, p. 445-452, 1982.
- PEIXOTO, M. G. C. D.; FONSECA, C. G.; PENNA, V. M.; ALVIM, M. T. T. Análise multivariada de resultados da ovulação múltipla seguida de transferência de embriões de doadoras zebuínas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 5, p. 492-500, 2002.
- PENNA, V. M. Núcleos MOET em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 4, p. 82-104, 1993.
- PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v. 29, p. 21-37, 1987.
- PLASSE, D.; WARNICK, A. C.; KOGER, M. Reproductive behavior of *Bos indicus* females in subtropical environment. I. Pubert and ovulation frequency in Brahman and Brahman x British heifers. **Journal Animal Science**, v. 27, p. 94-100, 1968.
- RANDEL, R. D. Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). **Theriogenology**, v. 21, n. 1, p. 170-185, 1984.
- RANDEL, R. D. Endocrine aspects of zebu cows. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8., 1989, Belo Horizonte. **Anais...Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**, 1989. v. 2, p. 1-23.

## Bibliográficas

- REICHENBACH, H-D. et al. Transferência e Criopreservação de Embriões Bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Eds). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2001. p. 127-177.
- RHODES, F. M.; FITZPATRICK, L. A.; ENTWISTLE, K. W. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, p. 41-49, 1995.
- RIBADU, A. Y.; WARD, W. R.; DOBSON, H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. **Veterinary Record.**, v. 135, p. 452-457, 1994.
- ROBERTS, R. M.; EALY, A. D.; ALEXENKO, A. P.; HAN, C. S.; EZASHI, T. Trophoblast interferons. **Placenta**, v. 20, p. 259-264, 1999.
- SANTIAGO, L. L.; TORRES, C. A. A.; NOGUEIRA, E. T.; URIBE-VELÁQUEZ, L. F.; CECON, P. R.; SANTIAGO, S. L. Níveis plasmáticos de estrógeno e progesterona em novilhas Nelore superovuladas com 250 e 500 UI de FSH. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 324, 2000.
- SAS Institute Inc., **SAS user's guide: statistics**, version 6.12 Cary, N.C., 1996.
- SAUMANDE, J.; BATRA, S. K. Superovulation in the cow: comparison of oestradiol-17 $\beta$  and progesterone patterns in plasma and milk of cows induced to superovulate, relationship with ovarian responses. **Journal of Endocrinology**, v. 107, n. 2, p. 259-264, 1985.
- SAUMANDE, J.; TAMBOURA, D.; CHUPIN, D. Changes in milk and plasma concentration of progesterone in cows after treatment to induce superovulation and their relationships with number of ovulations and embryo collected. **Theriogenology**, v. 23, p. 719-731, 1985.
- SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 663-671, 1988.
- SEGERSON, E. C.; HNASSEN, T. R.; LIBBY, D. W. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal Animal Science**, v. 59, p. 1026-1046, 1984.
- SEIDEL, G. E. Critical review of embryo transfer procedures with cattle. In: MASTROIANNI, L. Jr.; BIGGERS, J. D. (Eds). **Fertilization and Embryonic development in vitro**. New York: Plenum Press, 1980, p. 323-353.
- SEIDEL Jr, G. E.; SEIDEL, S. M. The embryo transfer industry. In: **New technologies in animal breeding**. New York: Academic Press, p. 41-80, 1981.

## Bibliográficas

- SHEA, B. F. Evaluating the bovine embryo. **Theriogenology**, v. 15, n. 1, p. 31-35, 1981.
- SILVA, J. C. C. **Fatores que influenciam a produção de embriões de vacas Nelore (*B. taurus indicus*) superovuladas**. 2002. 46 p. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- SILVA, J. C.; COSTA, L. L.; SILVA, J. R. Plasma progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 58, p. 51-59, 2002.
- SILVA, R. C. P.; LUERSEN, F.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. Transferência de embriões em tempo fixo: incremento no aproveitamento de receptoras através da avaliação ultra-sonográfica. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 31, p. 584, 2003.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988.
- SOLANO, R. F.; SOUSA, A. O.; PEREIRA, S. H.; SOLANO, G.; ZAYNETTE, T. F.; CHOW, L. A. Avaliação das perdas embrionárias em receptoras através do retorno ao estro, ultra-sonografia e mensuração dos níveis plasmáticos de progesterona. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 31, p. 600, 2003.
- SPANO, A. A.; SILVA, A. A. M. R. Níveis plasmáticos de progesterona durante o ciclo estral e na fase inicial da gestação em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*). **Ars Veterinária**, v. 8, p. 131-141, 1992.
- SPELL, A. R.; BEAL, W. E.; CORAH, L. R.; LAMB, G. C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 287-297, 2001.
- SPRECHER, D. J.; NEBEL, R. L.; WHITMAN, S. S. The predictive value, sensitivity and specificity of palpation per rectum and transrectal ultrasonography for the determination of bovine luteal status. **Theriogenology**, v. 31, p. 1165-1172, 1989.
- SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G. Factors affecting pregnancy rates following embryo transfer in the cow. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 99-113, 1987.
- SUNDERLAND, S. J.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 3, p. 547-555, 1994.
- TAKEDA, T.; HALLWOELL, S. V.; MC CAULEY, A. D.; HASLER, J. F. Pregnancy rates with intact and split bovine embryos transferred surgically and nonsurgically. **Theriogenology**, v. 25, n. 1, p. 204, 1986.

## Bibliográficas

- THIBIER, M.; NIBART, M. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals. **Animal Reproduction Science**, v. 28, n. 1, p. 139-148, 1992.
- TOM, J. W.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P. Quantitative echotexture analysis of bovine corpora lutea. **Theriogenology**, v. 49, p. 1345-1352, 1998.
- VALE FILHO, V. R.; PINHEIRO, L. E. L.; BASRUR, P. K. Reproduction in Zebu Cattle. In: MORROW, D. A. **Current Therapy in Theriogenology 2**. Diagnosis, treatment and prevention diseases in small and large animals. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1986, p. 437-442.
- VIANA, J. H. M. **Avaliação ultra-sonográfica de estruturas ovarianas em doadoras e receptoras de embrião**. 1996. 120 p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Zootecnia, Viçosa – MG. Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 3, 1999.
- WEHRMAN, M. E.; ROBERSON, M. S.; CUPP, A. S.; KOJIMA, F. N.; STUMPF, T. T.; WERTH, L. A. et al. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 $\beta$ -estradiol and increases conception in cows. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 214-220, 1993.
- WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E.; MELVIN, E. J.; KOJIMA, F. N.; KINDER, J. E. Development of a persistent ovarian follicle and associated elevated concentrations of 17 $\beta$  estradiol preceding ovulation does not alter the pregnancy rate after embryo transfer in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1413-1421, 1997.
- WILTBANK, M. C. Cell types and hormonal mechanisms associated with mid cycle corpus luteum function. **Journal Animal Science**, v. 72, p. 1873-1883, 1994.
- WILTBANK, M. C.; SHIAO, T. F.; BERGFELT, D. R.; et al. Prostaglandin F-2 $\alpha$  receptors in the early bovine corpus luteum. **Biological of Reproduction**, v. 52, p. 74-78, 1995.
- WINDER, M. G.; LEWIS, P. E.; BRYNER, R. W.; BAKER, R. D.; INSKEEP, E. K.; BUTCHER, B. L. Effect of age and norgestomet on endocrine parameters and production of embryos in superovulated beef cows. **Journal Animal Science**, v. 66, p. 1974-1981, 1988.
- WRIGHT, J. M. Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. **Theriogenology**, v. 15, p. 43-56, 1981.
- WRIGHT, J. M. Commercial freezing of bovine embryos in straws. **Theriogenology**, v. 23, n. 1, p. 17-19, 1985.