UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

INFLUÊNCIA DO LOCAL DE INOVULAÇÃO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VIVO* E *IN VITRO* SOBRE AS TAXAS DE CONCEPÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS E SUA RELAÇÃO COM A MORFOLOGIA UTERINA

Juliana de Souza Pinto Pieroni
Médica veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Junho de 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

INFLUÊNCIA DO LOCAL DE INOVULAÇÃO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VIVO* E *IN VITRO* SOBRE AS TAXAS DE CONCEPÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS E SUA RELAÇÃO COM A MORFOLOGIA UTERINA

Juliana de Souza Pinto Pieroni

Orientador: Prof.Dr. Paulo Henrique Franceschini

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL
Junho de 2009

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

JULIANA DE SOUZA PINTO PIERONI - nascida em Campinas, São Paulo, no dia 14 de novembro de 1983. Em março de 2002 ingressou no curso de medicina veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Jaboticabal - UNESP. Durante a graduação foi duas vezes bolsista de iniciação cientifica do CNPq, sob a orientação do Prof. Dr. Alvimar José da Costa e realizou estágio de graduação na Minerembryo – Reprodução e Produção Animal, sob a orientação do Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini. Em março de 2007 ingressou no mestrado pelo Programa de Pósgraduação em Medicina Veterinária, área de concentração: Reprodução Animal, em mesma Instituição de ensino, sob orientação do Prof. Dr. Paulo Henrique Franceschini. Durante o mestrado desenvolveu projetos na Agropecuária Agrindus S/A.

"Ando devagar porque já tive pressa
E levo esse sorriso porque já chorei demais
Cada um de nós compõe a sua história,
Cada ser em si carrega o dom de ser capaz
E ser feliz"

Almir Sater e Renato Teixeira

Agradecimentos

Agradeço a Deus por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho durante o mestrado e por ter aprendido tanto nesse período.

Aos meus amados pais, Doris e Carlos Eduardo, por terem me proporcionado uma brilhante formação e por terem me dado imensurável amor e carinho ao longo desses anos.

Aos meus queridos irmãos, Sil, Veri e Dado, pelo companheirismo, convivência e momentos alegres.

Ao Prof. Cocão que não é somente um orientador, é também um amigo e conselheiro que está sempre de prontidão para ouvir e ajudar. Obrigada por ser um verdadeiro educador e nos ensinar a pensar. Obrigada pela confiança e por todos os ensinamentos.

A Profa. Márcia que muito me auxiliou e não mediu esforços para que a parte histológica e de microscopia eletrônica fosse realizada. Obrigada por toda a disponibilidade e carinho.

Ao médico veterinário Carlos Alberto Rodrigues (Carlão). Não tenho palavras para agradecer todo auxílio e aprendizado que você me proporcionou. Simplesmente um exemplo profissional e de caráter que vou levar por toda minha vida. Não preciso dizer que sem você nada teria acontecido.

Ao médico veterinário Ricardo Mancilha que com seu jeito alegre e divertido realizou as inovulações dos embriões produzidos *in vitro* e muito ajudou nas demais etapas do projeto. Foi ótimo trabalhar e aprender com você.

A Fazenda Santa Rita (Agrindus/SA) e todos seus funcionários que permitiram e colaboraram com a realização do presente trabalho. Beco, muito obrigada!!!

Ao Prof. Peixe, outro exemplo de educador; sempre atento, disponível e paciente. Obrigada pelo auxílio.

A querida amiga Alessandra (Da vida) por todas as caronas, ajudas, momentos felizes (muitas gargalhadas) e conversas, muitíssimo obrigada! Não sei como faria sem você. Agradeço também a sua família por terem me recebido tão bem todas as vezes que fiquei em sua casa.

Ao meu namorado Juliano que é muito especial e importante na minha vida. Obrigada por todos os conselhos, pelo companheirismo e pelos momentos felizes que você sempre me proporciona.

Ao amigo Henderson que cedeu vários dias, inclusive fins de semana, para realizar a análise estatística do atual projeto. Muito obrigada pela sua paciência e disponibilidade.

A Profa. Eunice Oba (UNESP-Botucatu) que muito gentilmente realizou as dosagens hormonais do presente trabalho.

Ao Prof. Gener que colaborou para a realização da estatística do presente trabalho.

As queridas amigas Maria Emília e Mabel pela importante ajuda no trabalho, por tudo que vocês me ensinaram durante esse período e principalmente pela amizade e carinho. Vocês são muito especiais.

A República Pokas & Boas (Botafogo, Fiona, Grazi, Josi, Kpitu, Naboua, Molinha, Vivinha e bixete Bilu Bilu) pelos muitos anos de convívio, amizade, aprendizado e festas. A saudade já está enorme, vocês estão pra sempre em meu coração.

A querida amiga Robertinha que esteve sempre disposta a ajudar no trabalho e que várias vezes permitiu que eu utilizasse sua casa para fazer a estatística.

Aos amigos da República Toca do Mé que sempre me receberam muito bem (com muita cerveja, churrasco, linguiça cuiabana e costela recheada) e que muito colaboraram para o meu divertimento durante a faculdade e pós-graduação.

Ao amigo Nicolau com quem compartilhei muitos momentos alegres e angustiantes do meu mestrado. Muito obrigada pelo carinho e pela paciência.

Aos queridos amigos da inesquecível Vet 02! Muito obrigada pela força e por todos os momentos maravilhosos que passamos juntos.

As amigas Nazira, Piçiroca, Plica e Thassila. Amizades para a vida inteira.

Aos Funcionários (Isabel, Roberta, Ivo e Edson) e amigos do Departamento de Reprodução Animal que sempre estiveram disponíveis e prontos para ajudar quando necessário.

Ao Claudinei Cruz que me auxiliou com extrema boa vontade na leitura das lâminas de histologia e que muito me ensinou sobre esse assunto que era tão distante para mim.

Ao Sassá que muito ajudou na busca das novilhas para abate, sendo sempre muito atencioso.

Ao Sr. Orandi que me ensinou a confeccionar as lâminas de histologia e que sempre colocava música clássica pra eu ouvir enquanto as preparava.

A Cláudia e Claudinha responsáveis pela microscopia eletrônica da FCAV.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS..... xii
RESUMO..... xv
ABSTRACT..... xvi
1. INTRODUÇÃO..... 1
2. HIPÓTESES..... 3
3. REVISÃO DE LITERATURA..... 4
3.1 Local de deposição do embrião no útero no momento da transferência de embrião..... 4
3.2 Anatomia vascular da região útero-ovárica e concentração de progesterona..... 7
3.3 Migração intra-uterina..... 9
3.4 Morfologia uterina..... 10
3.5 Microscopia eletrônica de varredura..... 13
4. MATERIAL E MÉTODO..... 15
4.1 Produção *in vivo* e transferência de embriões..... 15
4.1.1 Propriedade onde o trabalho foi realizado e animais utilizados..... 15
4.1.2 Protocolo superovulatório das novilhas doadoras de embriões..... 15
4.1.3 Protocolo superovulatório das vacas não-lactantes doadoras de embriões..... 16
4.1.4 Protocolo superovulatório das vacas em lactação doadoras de embrião..... 19
4.1.5 Colheita dos embriões das doadoras superovuladas..... 21
4.1.6 Congelação dos embriões..... 22
4.1.7 Preparo das receptoras..... 22
4.1.8 Transferência de embriões frescos e congelados/descongelados..... 23
4.1.9 Colheita de dados..... 24
4.2 Produção *in vitro* e transferência de embriões..... 25
4.2.1 Propriedade onde o trabalho foi realizado e animais utilizados..... 25
4.2.2 Preparo das receptoras..... 25

4.2.3 Transferência de embriões PIV..... 25
4.2.4 Colheita de dados..... 26
4.3 Colheita de sangue e dosagem de progesterona..... 27
4.4 Diagnóstico de gestação..... 27
4.5 Morfologia uterina..... 27
4.5.1 Preparo das novilhas para abate..... 27
4.5.2 Histologia uterina..... 28
4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura..... 29
4.6 Análises estatísticas..... 29
4.6.1 Análises estatísticas das transferências de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*..... 29
4.6.2 Análise estatística da dosagem de progesterona..... 31
4.6.3 Análise estatística da contagem dos vasos sanguíneos..... 31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... 32
5.1 Transferência de embriões produzidos *in vivo*..... 32
5.1.1 Dados gerais..... 32
5.1.2 Categoria da doadora..... 46
5.1.3 Sincronia do estro entre receptora e doadora..... 47
5.1.4 Método de sincronização do estro da receptora..... 50
5.1.5 Classificação do corpo lúteo..... 51
5.1.6 Números de eventos reprodutivos..... 55
5.1.7 Números de lactações..... 56
5.1.8 Dias em lactação..... 58
5.1.9 Produção de leite..... 59
5.1.10 Escore de condição corporal..... 60
5.1.11 Temperatura retal..... 61
5.1.12 Estádio de desenvolvimento do embrião..... 64
5.1.13 Classificação do embrião..... 64
5.2 Embriões produzidos *in vitro*..... 68
5.2.1 Dados gerais excluindo embriões provenientes de animais da raça Holandesa..... 68

5.2.2 Dados específicos excluindo embriões obtidos de animais da raça Holandesa..... 71
5.2.2.1 Embriões obtidos de animais de diferentes raças..... 71
5.2.2.2 Estádio de desenvolvimento dos embriões..... 71
5.2.2.3 Classificação do corpo lúteo..... 72
5.2.2.4 Sincronia do estro entre doadora e receptora..... 73
5.2.2.5 Método de sincronização do estro da receptora..... 73
5.2.2.6 Laboratório de produção de embriões..... 78
5.2.2.7 Propriedade..... 78
5.2.3 Dados gerais incluindo os embriões provenientes de animais da raça Holandesa..... 79
5.2.4 Dados específicos incluindo os embriões de animais da raça Holandesa..... 81
5.2.4.1 Embriões obtidos de animais de diferentes raças..... 81
5.2.4.2 Estádio de desenvolvimento do embrião..... 81
5.2.4.3 Classificação corpo lúteo..... 81
5.2.4.4 Sincronia do estro entre doadora e receptora..... 81
5.2.4.5 Método de sincronização do estro da receptora..... 82
5.2.4.6 Laboratório de produção de embriões..... 82
5.2.4.7 Propriedade..... 82
5.3 Dosagem de progesterona..... 85
5.3.1 Receptoras holandesas que receberam embriões produzidos *in vivo.* 85
5.3.2 Receptoras mestiças que receberam embriões produzidos *in vitro.....* 89
5.4 Morfologia uterina..... 92
5.4.1 Microscopia de luz..... 92
5.4.1.1 Contagem dos vasos sanguíneos..... 99
5.4.2 Microscopia eletrônica de varredura..... 101
6. CONCLUSÃO..... 105
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 106

LISTA DE ABREVIATURAS

% - por cento

α - alfa

$=$ - igual

$\geq$ - maior ou igual

$\pm$ - mais ou menos

$\leq$ - menor ou igual

* - interação

< - menor que

>- maior que

BE – benzoato de estradiol

Bi – blastocisto inicial

BL – blastocisto

bST – Somatotrofina recombinante bovina

Bx – blastocisto expandido

cio – dia do cio da receptora em relação à doadora

CL – corpo lúteo

class – classificação

cm – centímetros

cong - congelado

D0 – dia zero

D4 – dia quatro

D6 – dia seis

D7 – dia sete

D8 – dia oito

D9 – dia nove

D10 – dia dez

D15 – dia quinze

D16 – dia dezesseis

D17 – dia dezessete
DEL – dias em lactação
desc - descongelado
doad - doadora
E – endométrio
EC – escore corporal
Ec - estrato compacto
eCG – gonadotrofina coriônica eqüina
ECP – cipionato de estradiol
Ee - estrato esponjoso
Embr – estádio de desenvolvimento do embrião
Ep – época
et al. – e colaboradores
FC – embrião fresco ou congelado/descongelado
FSH – hormônio folículo estimulante
gest - gestacional
GnRH – hormônio liberador de gonadotrofinas
HE – hematoxilina- eosina
i.m. – intramuscular
IA – inseminação artificial
L – luz uterina
lab – laboratório
LH – hormônio luteinizante
loc – local de inovulação
m - manhã
M – miométrio
Me – muscular externa
MEV – microscopia eletrônica de varredura
mg – miligramas
Mi- muscular interna

mL– mililitros

mm – milímetros

Mo – mórula

n^o – número

ng – nanogramas

Nser – número de serviços

P4 – progesterona

PGF2α - prostaglandina F2α

PGK – penicilina G potássica

pH – potencial hidrogeniônico

PIV – produção *in vitro*

prod – produção de leite

prop – propriedade

r – correlação

R^2 - regressão

recep – classe de receptora

S – serosa

sinc – método de sincronização

SP – São Paulo

t - tarde

TC – taxa de concepção

TE – transferência de embrião

temp – temperatura retal

TEs – transferências de embriões

TETF – transferência de embriões em tempo fixo

UI – unidade internacional

µg – microgramas

INFLUÊNCIA DO LOCAL DE INOVULAÇÃO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VIVO* E *IN VITRO* SOBRE AS TAXAS DE CONCEPÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS E SUA RELAÇÃO COM A MORFOLOGIA UTERINA

RESUMO - A transferência de embrião é uma biotecnologia muito utilizada na atualidade, mas pouco se sabe sobre o local ideal para se depositar o embrião no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (CL) e se há alguma alteração morfofuncional ao longo desse corno que possa comprometer ou favorecer o ambiente uterino. Os objetivos do presente experimento foram: avaliar as taxas de concepção após inovulação nos terços cranial, médio e caudal do corno uterino ipsilateral ao CL; analisar a morfologia desses três segmentos tanto do corno uterino adjacente quanto ao oposto ao CL através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura; estabelecer uma relação entre as taxas de concepção e as características morfofuncionais para indicar o local ideal de inovulação. Para isso, 600 embriões produzidos *in vivo* (frescos e congelados/descongelados) e 315 produzidos *in vitro*, foram transferidos para receptoras holandesas e mestiças, respectivamente. O estudo morfológico analisou os úteros de 9 novilhas mestiças abatidas aproximadamente no sétimo dia do ciclo estral, ou seja, simulando uma receptora no dia da inovulação. Os resultados obtidos mostraram que no verão o local de inovulação não influenciou ($P>0,05$) as taxas de concepção das receptoras que receberam embriões produzidos *in vivo*. No inverno melhores taxas de concepção ($P<0,05$) foram alcançadas quando os embriões foram depositados na porção caudal em relação à cranial. Para os embriões produzidos *in vitro*, o local de inovulação ($P>0,05$) não interferiu nos resultados reprodutivos. Por meio da histologia e microscopia eletrônica de varredura foi observado um padrão morfológico similar entre as três porções do corno uterino ipsilateral ao CL. No entanto, a contagem de vasos sanguíneos mostrou uma menor vascularização no corno contralateral em comparação ao ipsilateral ao CL. Neste contexto, conclui-se que as inovulações podem ser realizadas em qualquer porção do corno uterino ipsilateral ao CL, respeitando a morfologia uterina e facilitando a técnica, sem comprometer os resultados reprodutivos.

THE RELATION BETWEEN THE UTERINE MORPHOLOGY AND THE PREGNANCY RATES OBTAINED FROM BOVINE EMBRYOS AFTER THE TRANSFERENCE INTO DIFFERENT PLACES OF THE UTERUS

ABSTRACT- Nowadays the embryo transfer is a biotechnology widely used, however not much is know about the best place to put embryos into the uterine horn ipsilateral to the corpus luteum (CL). In addition, not much is known about the morphological characteristics thorough the uterine horn and if it could improve or damage the uterine environment. The aims of this study were: to investigate the effect of the site of embryo placement (cranial, medial or caudal) into the uterine horn adjacent to the CL on pregnancy rates; to analyze the morphology from these tree portions of the both uterine horns adjacent and opposite to CL using histology and scanning electron microscopy; and establish the relation between pregnancy rates and morphofunctions characteristics to indicate the best place to transfer embryos. In this study 600 *in vivo* produced embryos (fresh and frozen-thawed) and 315 *in vitro* produced embryos were transferred to Holstein and crossbred recipients, in order. Nine crossbred heifers were slaughtered approximately seven days after estrus and the uterus were studied to analyze its morphology at the same time that the embryos have been transferred. The results showed that the site of embryo placement did not influence ($P>0.05$) the pregnancy rates in recipients receiving fresh embryos during summertime. During the winter, the pregnancy rates were greater ($P<0.05$) for fresh embryos transferred into the caudal portion of the uterus horn than cranial portion. For animals that received *in vitro* produced embryo, the site of embryo placement did not interfere ($P>0.05$) in the pregnancy rates. Morphophological characteristics observed by histology and scanning electron microscopy was similar in all parts of the uterine horn ipsilateral to the CL studied. However, the average number of blood vessels counted was lower in the contralateral uterine horn and it showed that the ipsilateral to the CL uterine horn has a better vascularization. Considering the uterine morphology and the results observed in the present study it was concluded that it is possible to transfer embryos in any portion of the CL ipsilateral uterine horn with the same reproductive results.

1. INTRODUÇÃO

A transferência de embrião (TE) é uma biotecnologia amplamente utilizada na atualidade e tem relevante contribuição no melhoramento genético animal, uma vez que aumenta a utilização do potencial genético de fêmeas superiores e diminui o intervalo entre as gerações. Somente no Brasil mais de 260.000 embriões bovinos são transferidos por ano (VIANA & CAMARGO, 2007), o que faz da eficiência da técnica um fator determinante para seu sucesso.

Os embriões produzidos, na maioria das vezes, são provenientes da lavagem uterina de uma doadora superovulada e inseminada artificialmente (produção *in vivo*) ou da fertilização *in vitro* de oócitos originados da aspiração folicular de doadoras (produção *in vitro*).

A técnica de TE habitualmente utilizada em bovinos está bem definida e consiste na inovulação de um embrião no trato reprodutivo de uma fêmea receptora, previamente preparada, que irá completar a gestação. Costumeiramente, a maioria dos técnicos deposita o concepto no terço cranial do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (CL). No entanto, embora esse método seja rotineiramente utilizado, pouco se sabe em relação ao local ideal para se depositar o embrião no corno uterino ipsilateral ao ovário que possui o corpo lúteo (CUTINI et al., 2000).

Na bibliografia consultada, poucos ou inconsistentes são os relatos referentes às taxas de prenhez em relação aos locais do corno uterino em que são depositados os embriões. Outro aspecto a ser considerado é a escassez de informações sobre a morfologia comparativa entre as porções cranial, média e caudal do corno uterino bovino ipsilateral ao CL. A maioria dos estudos nessa área refere-se apenas a uma porção específica do útero bovino. Desconhecendo-se a ocorrência de diferenças morfofuncionais entre essas regiões e até que ponto essa situação pode favorecer ou comprometer a viabilidade do embrião.

Diante de tais fatos, deve-se considerar ainda a maior dificuldade e demora na inovulação na porção cranial do corno uterino em relação ao procedimento de deposição do embrião na porção caudal. Além disso, salienta-se que há uma maior manipulação uterina e ocorrência de possíveis lesões endometriais, principalmente se o

profissional for inexperiente ou caso o útero esteja muito espiralado, o que pode comprometer a prenhez devido à liberação de prostaglandina F2α (PGF2α) (WANN & RANDEL, 1990; SCHRICK et al., 2000). Com isso, é de indubitável importância saber se, na prática, há diferença na taxa de prenhez quando se deposita o embrião nas porções cranial, média ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo.

A partir desse contexto elaboraram-se os seguintes objetivos para o atual projeto de pesquisa:

- Objetivo geral

Estabelecer uma relação entre as taxas de concepção e as características morfofuncionais para que se possa indicar o local ideal de inovulação.

- Objetivos específicos

Avaliar as taxas de concepção após inovulação nos terços cranial, médio e caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, utilizando embriões produzidos *in vivo* (frescos e congelados/descongelados) e produzidos *in vitro*, transferidos respectivamente para receptoras holandesas e mestiças.

Analisar a morfologia dos três diferentes segmentos do corno uterino ipsilateral e contralateral ao corpo lúteo através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura de úteros de novilhas mestiças abatidas no sexto, sétimo e oitavo dia do ciclo estral.

2. HIPÓTESES

- A deposição do embrião no terço cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao CL não influencia as taxas de concepção tanto para os embriões produzidos *in vivo*, sejam frescos ou congelados/descongelados, quanto para os embriões produzidos *in vitro,* transferidos para vacas holandesas e para novilhas mestiças, respectivamente.

- Não há alterações morfológicas entre as porções cranial, média e caudal dos cornos uterinos ipsilaterais ao CL que comprometam ou favoreçam o ambiente uterino local e o desenvolvimento do embrião.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Local de deposição do embrião no útero no momento da TE

Em 1951 foi realizada a primeira transferência de embrião em bovinos (WILLETT et al., 1951) e, a partir dessa data, iniciaram-se estudos com o intuito de aprimorar a técnica e de buscar o local ideal para se depositar o embrião no corno uterino (SREENAN & BEEHAN, 1976; TERVIT et al., 1977; SIEDEL, 1980; CHRISTIE et al., 1980; BEAL et al.,1998 e YAMASHINA, 2002).

A presença do embrião, no 16^{o} dia pós-estro, no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo foi considerada fundamental para prevenir a luteólise em vacas, éguas e porcas, já nas ovelhas o concepto deve estar presente nesse local no 12^{o} dia após a manifestação do cio (NISWENDER et al., 1970; GINTHER, 1974).

Em ovelhas, que tiveram seus cornos uterinos separados cirurgicamente e possuíam CL nos dois ovários, o tecido luteal foi mantido somente no ovário ipsilateral ao corno uterino em que havia o embrião, ocorrendo a regressão do outro (MOOR & ROWSON, 1964). Por outro lado, esses mesmos autores, em 1966, demonstraram que não houve diferença nas taxas de prenhez quando embriões ovinos foram transferidos para o corno ipsilateral ao CL (75%) ou para o contralateral (63%) e sendo assim, concluíram que para o CL ser preservado há a necessidade do embrião ou seus anexos terem contato com o corno ipsilateral ao corpo lúteo.

Em bovinos, verificou-se que as inovulações realizadas no corno ipsilateral ao CL funcional resultaram em um aumento significativo nas taxas de prenhez em relação às realizadas no corno uterino contralateral ao CL (SREENAN, 1976; TERVIT et al., 1977 e SIEDEL, 1980). Tal situação foi atribuída à ação antiluteolítica dos fatores luteotróficos produzidos pelo embrião que, quando depositado no corno contralateral, têm que migrar pelo útero até chegar ao ápice do corno contendo o CL para exercer sua função (BRAND & AKABWAI, 1978). Também foi descrito que as transferências devem ser realizadas no corno ipisilateral ao CL devido ao fato da migração intra-uterina ser considerada rara em embriões bovinos (TERVIT et al., 1977).

Embora se tenha constatado que o corno uterino adjacente ao corpo lúteo é o sítio ideal para inovular, há controvérsias em relação ao local adequado em que o concepto deve ser depositado dentro desse corno, pois poucos e inconclusivos trabalhos foram realizados nessa área específica (CUTINI et al., 2000; MCNAUGHTAN et al., 2004).

Ao investigar o efeito do local de inovulação em gestações gemelares não se encontrou diferença significativa na taxa de prenhez quando embriões foram transferidos bilateralmente para o ápice ou para base do corno uterino por meio de técnica cirúrgica (SREENAN & BEEHAN, 1976). No entanto, o fato de dois embriões terem sido transferidos simultaneamente pode ter afetado os resultados (CHRISTIE et al., 1980).

Por outro lado, em gestações simples, LAWSOW et al. (1975) tentaram comparar a inovulação na porção cranial em relação à porção distal do corno uterino. Entretanto, o corno uterino foi inflado com dióxido de carbono, prejudicando os resultados, pois somente 2,9% das receptoras tornaram-se gestantes. Mas, em outro experimento, esses mesmos autores obtiveram 35% de prenhez ao depositarem os embriões na porção distal do corno.

Outros autores, ao tentar investigar alguns fatores que afetam a sobrevivência embrionária, inovularam, utilizando o método cirúrgico, na porção cranial ou caudal do corno uterino ipisilateral ao CL. Os embriões transferidos para o ápice do corno tiveram uma chance significantemente maior (73,3%, 22/30) de sobrevivência em relação aos transferidos para a base (44,8%, 13/29) (CHRISTIE et al., 1980). Nesse caso, a baixa taxa de prenhez no segundo grupo foi atribuída a um efeito direto da habilidade do embrião em secretar sinais luteotróficos e antiluteolíticos para o ovário no momento da luteólise e que possivelmente isso aconteça devido à distância da região do corno em que o mecanismo de contra corrente para transporte da prostaglandina F2α está agindo (GINTHER, 1974; BRAND & AKABWAI, 1978). Outra possível hipótese é a possibilidade da porção cranial do corno uterino ser um local favorecido do ponto de vista de suprimento de nutrientes para o desenvolvimento inicial do embrião (CHRISTIE et al., 1980).

Com embriões congelados em etilenoglicol, melhores taxas de prenhez foram obtidas quando os embriões foram transferidos para o terço cranial (65,9%, 27/41) em relação ao terço caudal (29,6%, 8/27) do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (BEAL et al.,1998).

Por outro lado, mais recentemente, a transferência de embriões congelados por três métodos diferentes; etilenoglicol com sacarose, etilenoglicol sem sacarose ou glicerol, para base do corno uterino (2 a 4 cm da bifurcação dos cornos) ou para o meio do corno (10 a 15 cm da bifurcação) gerou resultados diferentes. As taxas de prenhez quando se utilizou etilenoglicol+sacarose ou somente glicerol não diferiram significativamente de acordo com o local de inovulação. Em contra partida, as taxas de prenhez para os embriões depositados no terço caudal (68,7% - 136/198) do corno uterino foram mais altas do que para os inovulados no terço médio (31,7% - 40/126), quando 1,5M de etilenoglicol foram usados para congelar os embriões (YAMASHINA, 2002).

Em outro trabalho, com o objetivo de minimizar os efeitos causados pela manipulação dos cornos no momento da transferência, avaliou-se a influência do local de deposição do embrião no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. No entanto, não foi constatada diferença estatística quando os embriões foram depositados no terço médio (44% - 30/68) ou no terço proximal (49,8% -123/ 247) (MCNAUGHTAN et al., 2002).

Diante disso, é importante considerar que para a transferência ser realizada no terço proximal do corno uterino há necessidade de um técnico com habilidade suficiente para manipular corretamente o corno, endireitando-o temporariamente para a passagem do aplicador, pois devido ao diestro os cornos estão em espiral (BEAL et al, 1998). Além disso, uma das variáveis que mais interfere no sucesso da transferência não-cirúrgica é a habilidade do operador, pois o tempo para transpor a cérvix, a possibilidade de inoculação de microorganismos no lúmen uterino e o grau de lesão interna do útero afetam a taxa de concepção (SREENAN & DISIN, 1987).

Por hora também é importante salientar que bons resultados de prenhez podem ser comprometidos devido à manipulação do útero e a passagem do aplicador pela cérvix e pelo corno uterino, o que eleva os níveis de PGF2α na circulação sanguínea

(SCHALLENBERGER et al.,1989, ODENSVI et al., 1993). Alguns autores são ainda mais enfáticos e relatam que pequenas lesões no endométrio causadas pelo aplicador ou mesmo uma pequena manipulação da cérvix ou do útero podem desencadear um aumento da PGF2α no lúmen uterino (WANN & RANDEL, 1990; SCHRICK et al., 2000). Esse hormônio em baixas concentrações estimula a vascularização do endométrio, a manutenção do blastocisto e a implantação do embrião (CHARPIGNY et al., 1997; REESE et al., 1999). Mas por outro lado, o excesso de PGF2α pode ser tóxico para o concepto afetando diretamente seu desenvolvimento e qualidade, além da possibilidade de desencadear uma luteólise prematura (SEALS et al., 1998 e SCENNA et al., 2004). Sendo assim, manter um balanço ideal de PGF2α é necessário para atingir boas taxas de prenhez e, a deposição do embrião na porção caudal do corno poderia evitar essas perdas por aumento da PGF2α.

Inibidores da enzima ciclo-oxigenase-2, como flunixin meglumine, têm sido testados momentos antes das transferências tentando diminuir os efeitos deletérios causados pelo aumento da PGF2α durante a manipulação do trato reprodutivo. No entanto, os resultados ainda são inconsistentes (ELLI et al., 2001; MCNAUGHTAN et al., 2002).

3.2 Anatomia vascular da região útero-ovárica e concentração de progesterona

Diferenças anatômicas e fisiológicas foram constatadas entre artérias ovarianas e uterinas adjacentes e opostas ao ovário contendo o corpo lúteo (GINTHER & DEL CAMPO, 1974; GINTHER, 1974). Um mecanismo de anastomose entre ramificações da artéria uterina e ovárica é significativamente mais proeminente no lado em que o CL está presente em relação ao lado oposto. Aparentemente essa alteração é dinâmica, pois ocorrem mudanças consideráveis no calibre desses vasos quando o lado em que ocorre a ovulação se altera (GINTHER & DEL CAMPO, 1974). Suspeitou-se que o papel fisiológico desse fenômeno fosse contribuir para a preparação da tuba e corno uterino para a gestação ou para auxiliar nas necessidades do corpo lúteo altamente vascularizado (GINTHER, 1974).

A partir dessas descobertas iniciaram pesquisas para esclarecer se há uma distribuição local de progesterona (P4) do corpo lúteo para o corno uterino ipsilateral. Através da laparotomia de 10 vacas, que estavam no 11^{o} dia do ciclo estral, foram retiradas amostras de sangue para dosagem de progesterona da ramificação da veia uterina que drena a porção cranial de cada corno e da veia jugular. Diferença significativa foi encontrada entre a concentração de P4 da veia que drena a porção anterior do corno ipisilateral ao ovário com corpo lúteo (12,9 ng/mL) em relação à mesma veia do corno contralateral (8,2 ng/mL) e também da jugular (7,4 ng/mL). Em seguida, abateram-se as vacas e colheram-se material para dosagem de progesterona que indicaram claramente que as concentrações de P4 na metade cranial do corno uterino e nas artérias uterina e ovárica adjacentes ao ovário com CL são mais altas do que os níveis do lado contralateral (WEEMS et al., 1988).

Em um segundo experimento esses mesmos autores, após colherem sangue da jugular e da primeira ramificação venosa dos cornos uterinos, realizaram uma ligadura do oviduto e após 48 horas obtiveram sangue novamente. Verificou-se que possivelmente há uma distribuição direta de progesterona do corpo lúteo para a porção anterior do corno uterino, através da veia do oviduto, uma vez que nesse local o nível de P4 foi maior (12,6±1,1) do que na jugular (7,2±1,0) e no corno oposto (6,7±1,4) diminuindo significativamente (8,9±1,3) quando se realizou a ligadura do oviduto.

Em ovelhas também foi encontrada concentração de progesterona superior no terço uterino cranial em comparação aos terços médio e caudal do corno adjacente ao ovário com o CL, ou ainda, em relação a qualquer segmento do corno contralateral, tanto no quarto quanto no nono dia pós-estro. A P4 também foi mais alta na primeira ramificação venosa do terço cranial do corno uterino ipsilateral ao CL do que na última ramificação do terço caudal, ou do corno contralateral ou ainda da jugular (WEEMS et al., 1988). Esses dados sustentam a hipótese de que há uma distribuição local de progesterona do corpo lúteo para o ápice do corno uterino ipsilateral através da veia do oviduto em ruminantes (WEEMS et al., 1989).

Essa diferença na concentração de P4 entre os dois cornos uterinos possivelmente pode explicar a maior mortalidade embrionária quando se deposita o

embrião no corno contralateral ao ovário que contém o tecido luteal (WEEMS et al., 1988). Da mesma forma, os maiores níveis de P4 no ápice do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo também foram utilizados como justificativa para os melhores resultados de prenhez que alguns autores obtiveram (SREENAN, 1976; CHRISTIE et al., 1980) quando inovularam na porção cranial (WEEMS et al., 1988).

Entretanto, esse efeito local da P4 no corno uterino ipsilateral nem sempre parece ser positivo. Ovelhas que tiveram a veia do oviduto adjacente ao ovário da ovulação secionada no 4^{o} ou 5^{o} dia pós-estro, obtiveram taxas de prenhez que aumentaram de 27,5% no grupo controle para 72,7% no grupo cuja veia foi seccionada (GEMMER, 1987). A partir desses dados considerou-se que a progesterona e possivelmente outros produtos ovarianos são distribuídos tanto localmente para o terço cranial do corno que contém o CL, quanto pela circulação sistêmica, o que deve proporcionar um ambiente favorável para a prenhez em todo corno uterino adjacente ao CL (WEEMS et al., 1989).

3.3 Migração intra-uterina

A migração intra-uterina dos embriões é considerada uma importante estratégia para muitas espécies já que possibilita que o embrião “escolha” o melhor local para sua implantação e, em prenhezes múltiplas, permite um eficiente aproveitamento do espaço interno do útero (SCANLON, 1972; DZUIK, 1985 e HAFEZ & HAFEZ, 2004). Esse deslocamento ocorre principalmente devido a contrações no miométrio estimuladas pela liberação de estrógenos e prostaglandinas pelo concepto (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

Em vacas, com ovulação simples e espontânea, a migração intra-uterina é considerada rara e alguns estudos relatam uma migração de 2 a 3% (VALENCIA et al., 1981; GALVAN et al., 1982). No entanto, em um outro trabalho nenhuma migração foi observada em ovulações simples; por outro lado, nas gestações gemelares, em que ocorreram duas ovulações no mesmo ovário, a migração aconteceu em 27,3% dos casos (SCANLON, 1972).

No âmbito das transferências, novilhas que receberam um embrião, produzido *in vitro*, no corno ipsilateral ao CL, tiveram 4,2% (2/48) de taxa de migração intra-uterina.

Já, quando dois embriões foram colocados também no corno adjacente ao CL, a taxa de migração foi de 25% (25/100), sendo que, quando consideradas somente as prenhezes gemelares, a taxa eleva-se para 45% (22/49). Por outro lado, ao considerar prenhezes cujos embriões foram depositados contralateralmente ao CL, a taxa de migração foi de 28,5% para TE simples e 87,5% TE de dois embriões (MCMILLAN & PETERSON, 1999).

Neste contexto, torna-se relevante salientar que os autores consideram a migração intra-uterina o fato da ovulação ou da TE ter ocorrido em um lado e o embrião estar se desenvolvendo no corno contralateral (MALIK et al., 1960; CASIDA et al., 1966; SCANLON, 1972; MCMILLAN & PETERSON, 1999). No entanto, não consideram possíveis deslocamentos que podem ocorrer com o embrião dentro do próprio corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. Sendo assim, a falta de informação sobre esse deslocamento impossibilita inferir sobre a possibilidade de depositar o embrião no terço distal e ele movimentar-se cranialmente, ou vice-versa. No entanto, sabe-se que próximo ao período de adesão (dia 17) o trofoblasto sofre uma hiperplasia aumentando de 3mm (dia 13) para 25 cm, adquirindo uma forma filamentosa que ocupa todo corno ipsilateral ao CL e estende-se para o corno contralateral, bloqueando assim a síntese de PGF2α por todo útero (HAFEZ & HAFEZ, 2004), fato que pode indicar que o local ideal de deposição do concepto não esteja relacionado com o seu local de implantação.

3.4 Morfologia uterina

O útero bovino é composto por dois cornos uterinos, um corpo e uma cérvix. Esse é um órgão altamente capacitado e adaptado a reconhecer e nutrir o produto da fertilização, desde a implantação até o parto (HAFEZ & HAFEZ, 2004), portanto, o seu estudo fornece muitas informações relevantes à avaliação do local ideal para inovulação.

Histologicamente, a estrutura uterina é composta por três camadas: a mucosa ou endométrio, a muscular ou miométrio e a serosa ou perimétrio (SCHWARZE & SCHRÖDER, 1970; PRIEDKALNS & LEISER, 1998; DYCE et al., 2004; KÖNIG & LIEBICH, 2004).

O endométrio é constituído por uma camada espessa na qual o epitélio varia de simples cilíndrico a pseudo-estratificado cilíndrico (BANKS, 1992; PRIEDKALNS & LEISER, 1998; MONTEIRO et al., 2003). Os bordos apicais das células possuem microvilosidades que variam de altura de acordo com a atividade secretora do epitélio, apresentando-se mais longas na fase lútea em relação à fase folicular (STINSON et al., 1962). O tecido sub-epitelial é composto por dois estratos, o compacto ou superficial e o esponjoso ou profundo. O estrato compacto consiste de tecido conjuntivo frouxo, ricamente vascularizado com muitos fibroblastos, macrófagos e mastócitos. A região mais profunda (estrato esponjoso) também é compreendida por tecido conjuntivo frouxo, sendo este menos celularizado. (PRIEDKALNS & LEISER, 1998). Em todo o endométrio estão presentes glândulas uterinas tubulares simples, enoveladas e ramificadas, sendo ausentes na região da carúncula em ruminantes (PRIEDKALNS & LEISER, 1998). Em vacas encontraram um número maior de glândulas endometriais dilatadas e vasos sanguíneos com parede espessada em relação às novilhas (MONTEIRO et al, 2003). O epitélio glandular é simples cilíndrico ciliado e não-ciliado (PRIEDKALNS & LEISER, 1998; MONTEIRO et al, 2003).

Em relação ao miométrio sabe-se que é formado por uma espessa camada circular interna e uma camada longitudinal externa, ambas formadas de células musculares lisas. Entre as duas camadas ou profundamente na camada interna, há uma zona vascular constituída de grandes artérias, veias e vasos linfáticos (DELLMANN & BROWN, 1982; BANKS, 1992; PRIEDKALNS & LEISER 1998; KÖNIG & LIEBICH 2004).

A terceira camada do útero, a serosa, é constituída de tecido conjuntivo frouxo coberto por mesotélio peritoneal, possui numerosos vasos sanguíneos, linfáticos e fibras nervosas (DELLMANN & BROWN, 1982; BANKS, 1992; PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

A morfologia do útero se modifica de acordo com o ciclo estral, essas alterações são provocadas principalmente pelos hormônios ovarianos estradiol e progesterona e estão relacionadas com a espessura e vascularização do endométrio e miométrio, e

com o crescimento das glândulas uterinas (SUNDARAVADANAN & VENKATASWAMY,1973).

Na vaca, nos dias finais do diestro, ocorre regressão da mucosa, com redução na altura do epitélio luminal, e as glândulas uterinas tornam-se curtas com epitélio baixo e sem secreção. Com o início do proestro, sob a influência de estrógeno, o endométrio é restaurado (início da fase proliferativa) (GRUNERT & GREGORY, 1989); a mucosa torna-se espessa, congesta e edematosa com a predominância de células secretoras de muco. Entretanto, a proliferação glandular limita-se a um crescimento linear das glândulas, sem ramificação ou enovelamento. Durante o estro, o edema e a hiperemia endometriais são acentuados (PRIEDKALNS & LEISER, 1998), a mucosa uterina apresenta hipertrofia e hiperplasia de grau considerável, dando a esta fase a denominação de proliferação endometrial (GRUNERT & GREGORY, 1989). No metaestro, o edema diminui e ocorrem hemorragias microscópicas, caracterizando o processo de metrorragia. Na vaca, a metrorragia tem início antes da ovulação, atinge um máximo durante o edema endometrial, sendo mais proeminente nas regiões centrais das carúnculas e termina abruptamente no segundo dia após o estro (PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

Uma invasão de agranulócitos, essencialmente linfócitos, foi notada três a cinco dias após o estro (PRIEDKALNS & LEISER, 1998); no entanto, VANDER WIELEN & KING (1984) não observaram uma variação significativa no número de linfócitos no endométrio durante o ciclo estral. O aumento do número de eosinófilos ocorreu do estro para o meio do ciclo, assim como o número de mastócitos durante o edema endometrial, especialmente nas regiões intercarunculares (PRIEDKALNS & LEISER, 1998). MATSUDA et al. (1983), observaram um aumento significativo do número de eosinófilos no endométrio bovino, durante o estro e o metaestro em relação a outras fases do ciclo estral.

Com o início do diestro, sob a influência da progesterona, o endométrio passa de um estágio proliferativo para um secretor, com espessamento do epitélio glandular, além de ramificação, enovelamento e secreção das glândulas (GRUNERT & GREGORY, 1989). Durante os primeiros 11 dias do diestro, a secreção glandular é

grande, mas se a gestação não acontece ocorre regressão das glândulas juntamente com a luteólise nos últimos três dias do diestro (PRIEDKALNS & LEISER, 1998).

Na porção média dos cornos uterinos de novilhas, vários achados sobre o endométrio foram relatados, tais como, mitoses glandulares durante o proestro e estro, metrorragia e edema no estroma durante o cio e no primeiro dia do ciclo, vacuolização supranuclear no epitélio glandular entre os dias três e sete, infiltração leucocitária no epitélio superficial nos dias sete e oito e mitoses nas células do estroma no estro e meio da fase lútea. Ao contrário das outras fases do ciclo estral, não ocorreram modificações progressivas no endométrio durante a fase lútea tardia (OHTANI et al., 1993).

A maioria dos estudos histológicos do útero refere-se somente à porção média do corno uterino (OHTANI et al., 1993; MONTEIRO et al., 2003), com isso, não se sabe se há diferenças estruturais entre as porções cranial, média ou caudal que possam comprometer ou favorecer o ambiente uterino para sobrevivência e implantação do embrião no momento da transferência. Em relação à comparação dos cornos uterinos ipsilateral e contralateral ao corpo lúteo, não foram encontradas variações histológicas entre as porções médias tanto de vacas quanto de novilhas na fase progestacional (MONTEIRO et al., 2003).

3.5 Microscopia eletrônica de varredura

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi utilizada com excelentes resultados para definir a superfície das células epiteliais do trato reprodutivo feminino de humanos (JOHANNISSON & NELSON, 1972), éguas (SAMUEL et al., 1979; BAGDADI et al., 2004), porcas (WU et al., 1976) e vacas (HAFEZ & KANAGAWA, 1973). Nos bovinos, HAFEZ & KANAGAWA (1973) analisaram fragmentos da submucosa da porção média do corno uterino, o que não revelou muitas informações sobre o epitélio dessa região, demonstrou somente algumas glândulas uterinas. Já nos suínos, a visualização do corpo uterino revelou um epitélio com uma densa população de células secretoras cobertas por microvilos, algumas células ciliadas também foram ocasionalmente encontradas (WU et al., 1976). Uma morfologia semelhante também foi

encontrada no endométrio da égua, que apresentou dois tipos celulares, um coberto por microvilos e outro por cílios. Na superfície uterina também foi possível visualizar a abertura das glândulas endometriais e a organização das células secretoras que se apresentaram em mosaico. A possibilidade de examinar e distinguir essas estruturas torna a MEV uma importante ferramenta para estudo da morfologia tridimensional da superfície endometrial (AL-BAGDADI et al., 2004).

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Produção *in vivo* e transferência de embriões

4.1.1 Propriedade onde o trabalho foi realizado e animais utilizados

Essa etapa do trabalho foi realizada na Fazenda Santa Rita, Agropecuária Agrindus S/A, localizada na Estrada Velha Descalvado/São Carlos, no município de Descalvado-SP (22^{o} 01' 27" S e 47^{o} 53' 19" W) durante os períodos de julho a setembro de 2007 (inverno) e de janeiro a abril de 2008 (verão).

Fêmeas holandesas geneticamente superiores, sendo 18 vacas lactantes, 18 vacas não lactantes e 37 novilhas, foram utilizadas como doadoras para a produção *in vivo* de embriões através da técnica de múltipla ovulação e inseminação artificial em tempo-fixo, com posterior colheita dos embriões. Os embriões produzidos foram transferidos, frescos ou congelados/descongelados, para 600 receptoras holandesas lactantes.

Todos os animais em lactação foram mantidos em *freestalls* (baias de estabulação livre), onde foram alimentados com silagem de milho e concentrado à base de milho, soja, polpa cítrica e caroço de algodão, água e sal mineral à vontade. As novilhas e as vacas não-lactantes foram mantidas em piquetes com pastagem, água e sal mineral à vontade.

4.1.2 Protocolo superovulatório das novilhas doadoras de embriões

Em um dia aleatório do ciclo estral (D0) as novilhas receberam um implante auricular contendo 3mg de Norgestomet[1], 2mg de benzoato de estradiol + 50mg de progesterona[2] i.m. e 5mL Aminopool[3]. No D4 iniciaram-se as oito aplicações decrescentes de FSH[4] a cada 12 horas, totalizando 250 UI. No D6 administrou-se 150µg de d-cloprostenol[5] i.m. pela manhã e pela tarde e foi retirado o implante auricular

[1] Crestar®, Intervet Schering-Plough, Holanda
[2] Index, Brasil
[3] Complexo vitamínico e aminoácidos – Protran, Brasil
[4] Pluset®- Laboratorios Calier, Espanha
[5] Ciosin® – Intervet Schering-Plough, Holanda

no D7 pela tarde. No D8 pela manhã foi aplicado 2,5ml de GnRH[6] e no mesmo dia pela tarde foi realizada a primeira inseminação artificial (IA). No D9 pela manhã realizou-se a segunda IA e a colheita dos embriões foi efetuada no D15 pela manhã (Figura1).

4.1.3 Protocolo superovulatório das vacas não-lactantes doadoras de embriões

No D0, dia aleatório do ciclo estral, pela manhã as doadoras receberam um implante auricular de 3mg de Norgestomet[1], aplicação de solução de 2mg de Benzoato de estradiol + 50mg de progesterona[2] i.m., 5ml de Aminopool[3] e PGK[7]. No D4 pela manhã iniciaram-se as oito aplicações decrescentes de FSH[4] (total de 400 UI) com intervalo de 12 horas, finalizando no D7 pela tarde juntamente com a retirada do implante. Na quinta e na sexta aplicação do FSH foi administrado 150 µg de d-cloprostenol[5]. No D8 pela manhã as doadoras receberam 2,5 ml de GnRH[6], e 12 e 24 horas após o indutor de ovulação realizaram-se as inseminações artificiais. A colheita dos embriões ocorreu no D15 (Figura 2).

[6] Fertagyl® – Intervet Schering-Plough, Holanda
[7] Penicilina G Potássica – infusão uterina – SAMVET, Brasil

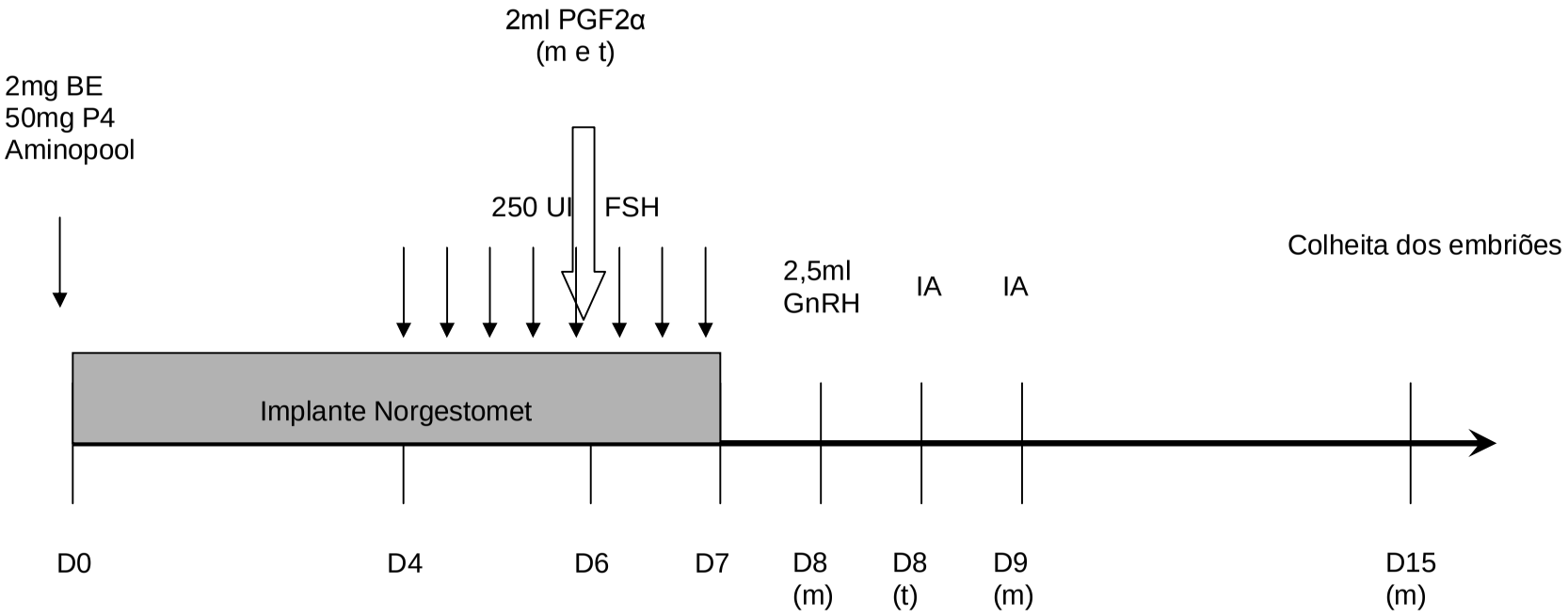


Figura 1. Esquema ilustrativo do protocolo de superovulação aplicado às novilhas doadoras de embriões.

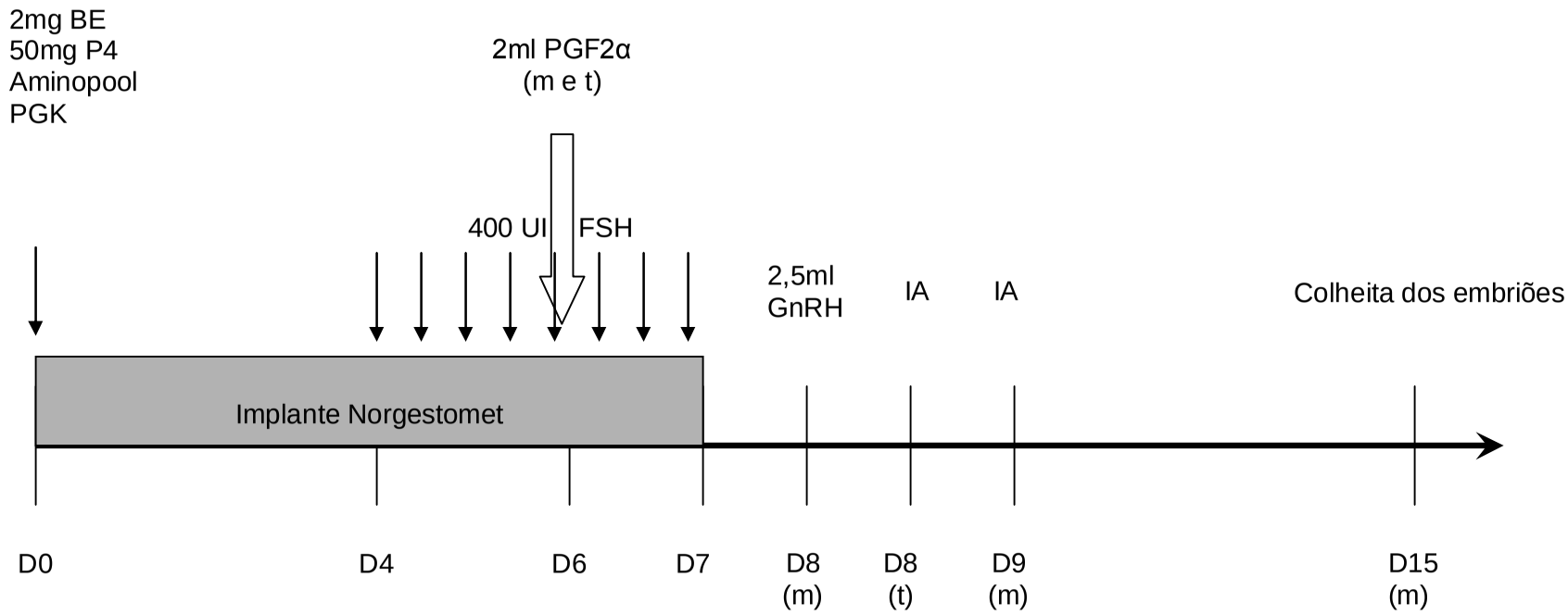


Figura 2. Esquema ilustrativo do protocolo superovulatório aplicado às vacas não-lactantes doadoras de embriões.

4.1.4 Protocolo superovulatório das vacas em lactação doadoras de embrião

No D0, dia aleatório do ciclo estral, à tarde, inseriu-se dois implantes auriculares de 3mg Norgestomet[1], aplicou-se uma solução de 2mg de Benzoato de estradiol + 50mg de progesterona[2], bST[8] e infusão intra-uterina de Metricure[9]. No D4 à tarde iniciaram-se as oito aplicações decrescentes de FSH[4] (total de 500 UI) com intervalo de 12 horas, finalizando no D8 pela manhã juntamente com a retirada dos implantes. Na quinta e na sexta aplicação de FSH foram aplicados 150 µg de d-cloprostenol[5] i.m..No D9 pela manhã foi administrado 2,5 ml do indutor de ovulação. No D9 à tarde foi realizada a primeira IA junto com a administração de bST, a segunda IA ocorreu no D10 pela manhã. A colheita dos embriões foi efetuada no D16 (Figura 3).

[8] bST (somatotrofina bovina recombinante) - Boostin ® – Intervet Schering-Plough, Brasil
[9] Metricure® (Cefapirina benzatínica) - Intervet Schering-Plough, Brasil

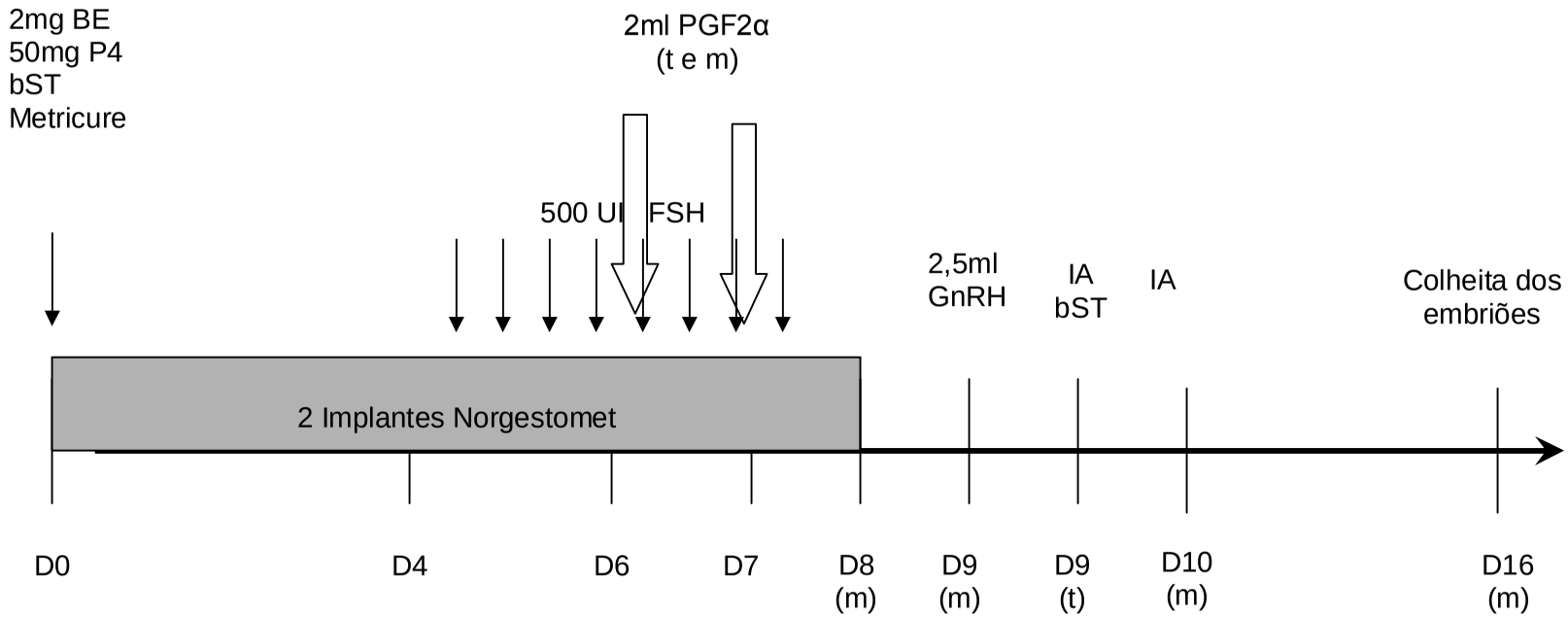


Figura 3. Esquema ilustrativo do protocolo superovulatório utilizado nas vacas lactantes doadoras de embriões.

4.1.5 Colheita dos embriões das doadoras superovuladas

As colheitas dos embriões foram realizadas sete dias após a segunda inseminação artificial das doadoras. Primeiramente, todas as doadoras foram avaliadas pela palpação transretal para verificar a presença de corpos lúteos e quantificá-los. Posteriormente as vacas que responderam ao tratamento superovulatório (presença de um ou mais corpos lúteos) foram submetidas à colheita dos embriões propriamente dita. Inicialmente realizou-se a anestesia epidural com cloridrato de licodaína 2%[10], remoção do conteúdo fecal presente no reto, lavagem e higienização da região perienal. Em seguida dilatou-se a cérvix através da passagem de um expansor para facilitar a introdução da sonda longa de silicone número 18 ou 20. Essa foi introduzida com o auxílio de um mandril até o seu posicionamento no segmento cranial do corno uterino. Seguiu-se a retirada do mandril, insuflação do balão de ar e acoplamento da sonda a uma das extremidades de um tubo de silicone em formato de "Y". As suas outras duas aberturas foram acopladas à bolsa de solução de DMPBS[11] e ao filtro coletor. Com isso, finalmente a lavagem uterina foi efetuada utilizando um total de 500mL da solução. Igual procedimento foi realizado no outro corno uterino.

Após a lavagem dos dois cornos uterinos, o filtro foi levado até o laboratório, seu conteúdo colocado em placas de cultivo celular e se prosseguia a busca pelas estruturas, com a utilização de um estereomicroscópio de luz indireta. As estruturas encontradas foram colocadas em uma outra placa com solução de manutenção TQC Holding Plus[12]. Os embriões viáveis foram classificados de acordo com o grau de desenvolvimento em mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (BL) ou blastocisto expandido (Bx) e de acordo com sua qualidade, sendo grau I, II ou III (IETS, 1998). Após a classificação os embriões passaram por banhos sequenciais no mesmo meio de manutenção e foram envasados em palhetas finas de 0,25 mL para serem transferidos para as receptoras. Caso o número de embriões excedesse o de receptoras aptas a recebê-los, os mesmos eram congelados para posterior utilização.

[10] Lidovet – Bravet, Brasil
[11] DMPBS – Nutricell, Brasil
[12] TQC Holding Plus – Nutricell, Brasil

4.1.6 Congelação dos embriões

Quando houve um número de receptoras disponíveis menor do que o de embriões produzidos, separou-se os de melhor qualidade (graus I e II) para serem congelados. Com isso, após sua classificação os embriões foram transferidos para uma solução de etilenoglicol a 2% e envasados em palhetas finas (0,25mL), em que permaneceram por 9 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram submetidos à curva de congelação controlada pelo aparelho TK2000. Após a finalização desse processo, os embriões congelados foram armazenados em botijão de nitrogênio líquido a -196º C até a sua utilização.

4.1.7Preparo das receptoras

Vacas holandesas repetidoras de serviço, ou seja, que foram submetidas a mais de três eventos reprodutivos (IA ou TE) ou com um número de dias em lactação (DEL) avançado (maior que 200 dias) foram preparadas para receber os embriões produzidos *in vivo.* Esse preparo foi realizado de três maneiras: observação do cio natural das receptoras, indução da ovulação pela administração de 150 µg de d-cloprostenol[5] em vacas que apresentavam CL no momento da avaliação, com posterior observação de estro, ou ainda, utilização de um protocolo hormonal de sincronização para TE em tempo fixo (TETF). Esse foi composto pela inserção de um implante auricular de Norgestomet[1] e aplicação de 2 mg de Benzoato de estradiol[13] i.m., em dia aleatório do ciclo estral (D0); a remoção do implante foi realizada no D8 juntamente com a administração de 150 µg de d-cloprostenol[5], 400 UI de eCG[14] e 1,0 mg de Cipionato de estradiol[15] i.m.; a TETF ocorreu no D17 nas vacas que apresentaram CL (Figura 4).

As vacas observadas em estro foram classificadas de acordo com a sincronia do estro entre a doadora e a receptora, ou seja, vacas que apresentaram cio seis dias antes da TE foram classificadas em –1, as que manifestaram estro sete dias antes da TE foram classificadas em 0 e as que apresentaram estro oito dias antes da TE foram classificadas em +1. Dessa maneira as receptoras estavam sincronizadas com o

[13] Estrogin®, Farmavet, Brasil
[14] Folligon®, Intervet Schering-Plough, Holanda
[15] E.C.P.®, Pfizer Saúde Animal, Brasil

embrião e com a doadora, isto é, o ambiente uterino estava aproximadamente no sétimo dia do ciclo estral.

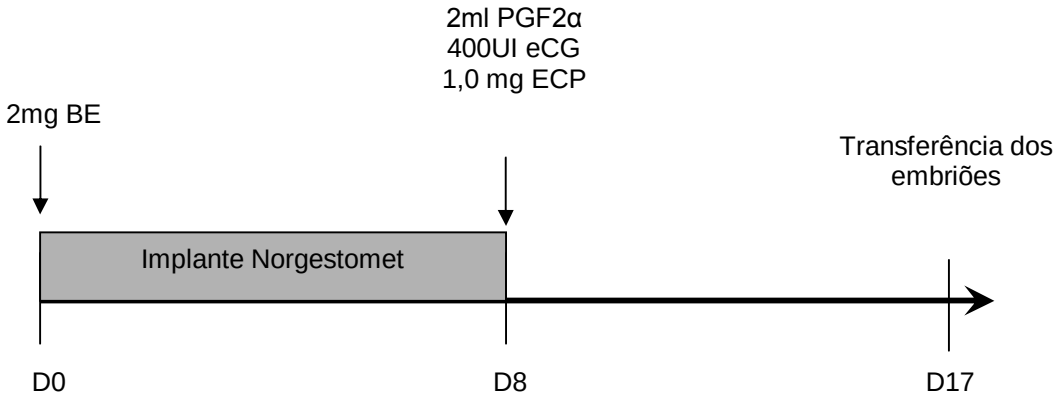


Figura 4. Esquema ilustrativo do protocolo de transferência de embriões em tempo fixo utilizado nas receptoras de embriões produzidos *in vivo*.

4.1.8 Transferência de embriões frescos e congelados/descongelados

No dia da transferência as receptoras detectadas em estro ou tratadas para TETF foram avaliadas para detecção e classificação do corpo lúteo em I, II, III, ou seja, grande, médio e pequeno respectivamente. Nas que estavam aptas a receber o embrião, realizou-se anestesia epidural com a deposição de 5mL de cloridrato de lidocaína a 2%[10] no espaço sacro-coccígeno para relaxamento da região pélvica e fez-se a lavagem da região perineal. Enquanto isso, um auxiliar preparava o aplicador introduzindo a palheta dentro do mesmo e envolvendo-o com a bainha e camisa sanitária. Quando se tratou de embriões congelados, esses foram descongelados imediatamente antes da inovulação, permanecendo 10 segundos a temperatura ambiente e 10 segundos em água também a temperatura ambiente.

No momento da transferência as receptoras foram divididas aleatoriamente nos grupos experimentais de acordo com um delineamento fatorial 2x3 no qual foram considerados o tipo de embrião (fresco ou congelado/descongelado) e o local de inovulação no corno uterino ipsilateral ao CL (porção cranial, média ou caudal) (Figura 5), totalizando 600 transferências entre embriões frescos (300) e congelados/descongelados (300).

Todas as inovulações foram realizadas por somente um profissional, médico veterinário, que possui uma vasta experiência com a técnica de transferência de embriões em bovinos.

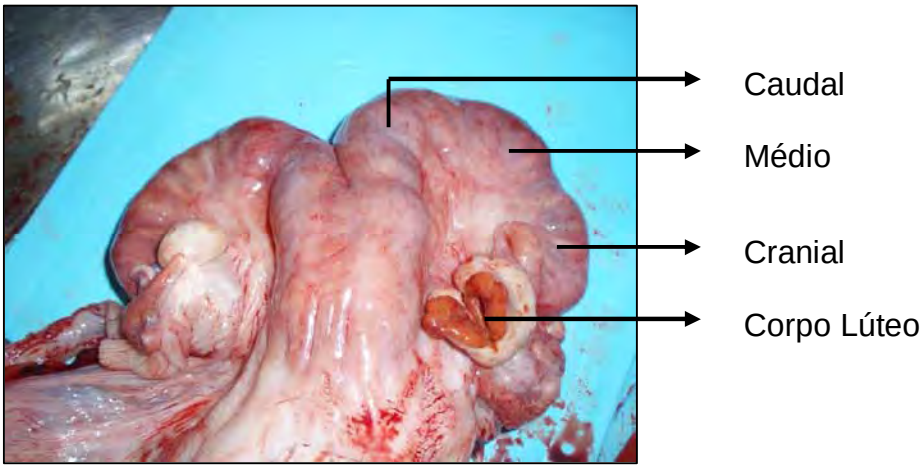


Figura 5. Foto ilustrativa do útero e ovários de novilha, na qual se observa os locais de deposição do embrião no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo.

4.1.9 Colheita de dados

Em todos os dias do experimento, após as inovulações, foram colhidas informações dos animais para posterior utilização nas análises. Sobre as doadoras foi registrada a categoria animal que pertenciam (novilhas, vacas lactantes ou vacas não lactantes). As receptoras foram avaliadas quanto ao número de dias em lactação (DEL), número de lactações, número de serviços (inseminações ou transferências), média diária da produção de leite durante a semana da TE, sincronia doadora-receptora (-1, 0 ou +1), método de sincronização (cio natural, induzido por PGF2α ou TETF), classificação do CL (I,II ou III), escore de condição corporal (1 a 5) e temperatura retal no momento da TE. Também foram compilados os dados de qualidade (I,II ou III) e grau de desenvolvimento (Mo, Bi, BL e Bx) dos embriões inovulados.

4.2 Produção *in vitro* e transferência de embriões

4.2.1 Propriedade onde o trabalho foi realizado e animais utilizados

Essa parte do trabalho foi realizada na Fazenda Santa Rita em Descalvado-SP e na Fazenda Santa Eliza em Analândia-SP entre os meses de outubro de 2007 a julho de 2008.

Um total de 39 doadoras das raças Nelore, Brahman, Girolando e Holandesa foram submetidas ao procedimento de aspiração folicular e tiveram seus oócitos manipulados e fertilizados, com sêmen convencional ou sexado, em dois laboratórios de produção *in vitro* (PIV) de embriões. Esses laboratórios encaminharam os embriões no sétimo dia pós-fertilização para serem transferidos para as receptoras previamente preparadas.

As receptoras utilizadas em ambas as fazendas foram mantidas em pastagem de boa qualidade com água e sal mineral à vontade e exibiam ótimas condições corporais, sanitárias e reprodutivas.

4.2.2 Preparo das receptoras

Trezentas e quinze novilhas mestiças foram utilizadas como receptoras dos embriões produzidos *in vitro*. Essas receptoras manifestaram cio, natural ou induzido pela aplicação 150 µg de d-cloprostenol, seis, sete ou oito dias antes de receberem o embrião, ou ainda foram tratadas para TETF através do seguinte protocolo: inserção de um implante auricular de Norgestomet[1] e aplicação de 2 mg de Benzoato de estradiol[13] i.m., em dia aleatório do ciclo estral (D0); a remoção do implante foi realizada no D8 juntamente com a administação de 150 µg de d-cloprostenol[5], 300 UI de eCG[14] e 1,0 mg de Cipionato de estradiol[15] i.m.; a TETF ocorreu no D17 nas vacas que apresentaram CL (Figura 6).

4.2.3 Transferência de embriões PIV

No dia da transferência, as receptoras detectadas em estro ou tratadas para TETF foram examinadas por palpação transretal para detecção e classificação do corpo lúteo em I, II, III, ou seja, grande, médio e pequeno, respectivamente. Nas que

possuíam CL, realizou-se a anestesia epidural para relaxamento da região pélvica com deposição de 5mL de cloridrato de lidocaína a 2%[10] no espaço sacro-coccígeno e fez-se a lavagem da região perineal. Enquanto isso, o aplicador foi preparado introduzindo a palheta no interior do mesmo e envolvendo-o com a bainha e camisa sanitária.

No momento da inovulação as novilhas foram divididas em três grupos experimentais que receberam os embriões na porção cranial, média ou caudal do corno uterino ipsilateral ao CL.

Todas as inovulações dos embriões produzidos *in vitro* foram realizadas por somente um profissional, médico veterinário, com grande experiência com a técnica de transferência de embriões em bovinos.

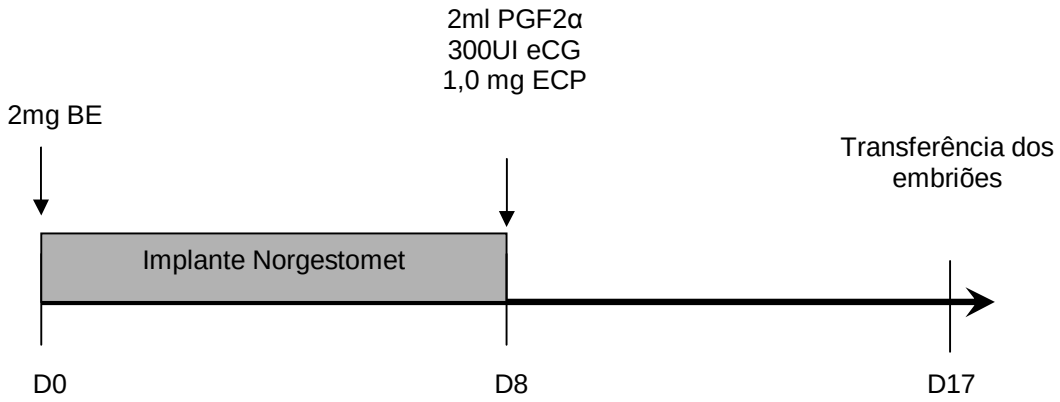


Figura 6. Esquema ilustrativo do protocolo para transferência de embriões em tempo fixo utilizado para as receptoras de embriões produzidos *in vitro*.

4.2.4 Colheita de dados

Nos dias das transferências foram compiladas algumas informações com a finalidade de auxiliar nas posteriores análises dos dados. Informações relativas ao tipo de sêmen utilizado (convencional ou sexado), classificação do CL, sincronia do cio entre a doadora e a receptora (+1, 0 ou –1), método de sincronização da receptora (cio natural, induzido por PGF ou protocolo para TETF), laboratório que produziu o embrião e propriedade em que foram realizadas as inovulações. Também foram armazenados dados sobre os embriões, como grau de desenvolvimento (Mo, Bi, Bl ou Bx) e qualidade (I, II ou III).

4.3 Colheita de sangue e dosagem de progesterona

Em 181 fêmeas que receberam embriões produzidos *in vivo* e 86 inovuladas com embriões produzidos *in vitro* foram colhidas amostras de sangue pela venopunção da veia coccígea com o auxílio de um tubo Vacunteiner sem anticoagulante. Os tubos devidamente identificados foram armazenados em isopor contendo gelo até chegarem ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da FCAV-Jaboticabal, onde foram centrifugados e o soro transferido para ependorfes que foram mantidos no congelador até o momento da dosagem hormonal.

A dosagem hormonal foi realizada no Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP Botucatu. A progesterona foi dosada através de kits em fase sólida da DPC, pelo método de Radioimunoensaio e a leitura foi realizada pelo contador Cobra II GAMA COUNT.

4.4 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação das vacas que receberam embriões produzidos *in vivo* foi realizado entre 25 e 38 dias após o procedimento de TE (taxa de concepção inicial) por ultrassonografia e a confirmação da gestação entre 39 dias e 52 de gestação (taxa de concepção final) por palpação transretal. Já nas fêmeas que foram inovuladas com embriões produzidos *in vitro*, o diagnóstico de gestação por ultrassonografia ocorreu aproximadamente aos 30 dias do procedimento e a confirmação e sexagem ocorreu aos 65 dias de gestação.

4.5 Morfologia uterina

4.5.1 Preparo das novilhas para abate

Vinte e três novilhas mestiças que se encontravam em condições sanitárias e reprodutivas adequadas foram preparadas para serem abatidas, simulando uma receptora de embrião no dia da transferência. Para isso, os animais foram submetidos à palpação transretal para detecção de corpo lúteo e aplicação de 150 µg de d-cloprostenol[5] para lise do CL e indução da ovulação. Nos dias subsequentes os animais foram observados pela manhã e pela tarde para detecção de comportamento do estro.

Onze animais apresentaram cio em três dias diferentes, o que resultou na separação de três grupos experimentais (+1, 0 e –1). Aproximadamente 7 dias após a detecção do cio, as novilhas foram abatidas no Frigorífico Franca Boi, em Franca-SP e tiveram parte de seu aparelho reprodutivo (útero e ovários) separados imediatamente após o abate. Subseqüentemente, realizou-se a observação dessas peças com o intuito de confirmar a integridades das estruturas, bem como a presença de corpo lúteo. Das 11 novilhas detectadas em estro, 2 foram descartadas pois apresentaram CL que aparentou estar em regressão. Dois fragmentos das porções cranial, média e caudal dos cornos uterinos ipsilateral e contralateral ao corpo lúteo foram colhidos e armazenados para serem posteriormente submetidos às técnicas de histologia e microscopia eletrônica de varredura.

4.5.2 Histologia uterina

Imediatamente após a colheita os fragmentos uterinos foram fixados em solução de Bouin por 72 horas. Após a fixação foram realizadas lavagens sucessivas com álcool 70% para retirada do excesso da solução fixadora. Em seguida, iniciou-se a desidratação através de passagens de 30 minutos por álcool 70%, 80%, 90%, 95% e três passagens por álcool absoluto. Subseqüentemente, realizou-se a diafanização, com uma passagem por solução de xilol e álcool, e mais três passagens pelo xilol, de 30 minutos cada. A inclusão foi feita em paraplast[16] e as peças foram submetidas a microtomia, em micrótomo manual, com auxílio de navalhas descartáveis, obtendo-se cortes de 6 μm de espessura que foram corados com Hematoxilina-Eosina (HE). As preparações histológicas foram analisadas e fotomicrografadas em fotomicroscópio (Leica DM 5000B) para a documentação.

Posteriormente a análise geral das lâminas, três campos de cada corte histológico foram fotomicrografados aleatoriamente, em aumento de 100x, para realização da contagem dos vasos sanguíneos. Essa contagem foi realizada com a finalidade de comparar a quantidade de vasos nos diferentes locais do útero (cranial,

[16] Histosec® - Merck, Brasil

médio e caudal) ipsi e contralateral ao corpo lúteo e nos diferentes dias do ciclo estral (sexto, sétimo e oitavo).

4.5.3 Microscopia eletrônica de varredura

Imediatamente após a colheita, as amostras das porções craniais, médias e caudais do corno uterino ipsi e contralateral ao CL, foram colocadas em solução de Glutaraldeido 3% a 0,1 M, em que permaneceram por aproximadamente um mês. Após esse período as peças foram lavadas com solução tampão fosfato com pH 7,4 a 0,1 M e imersas no tetróxido de ósmio, permanecendo por quatro horas. Na sequência, o material foi lavado novamente em solução tampão fosfato, seguindo para o protocolo de desidratação, em que sofreu passagens sucessivas por álcool 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% e duas vezes no álcool 100%, por 15 minutos em cada solução. Os fragmentos desidratados foram para o aparelho de secagem de ponto crítico por um período de 30 minutos. Após a secagem o material passou pela metalização, que se resume a um banho de ouro, realizado no equipamento DESK II Denton Vacuun, por 120 segundos. As eletron micrografias foram realizadas em um Scanning Microscope JSM 5410 da marca Jeol.

4.6 Análises estatísticas

4.6.1 Análises estatísticas das transferências de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*

Na primeira fase do experimento, em que foram realizadas as transferências de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, a unidade experimental “receptora” foi o objeto das medidas repetidas ao longo do tempo. A análise de variáveis contínuas e dados binomiais foi realizada por regressão logística utilizando o proc GLIMMIX do SAS, sendo a unidade experimental “doadora” incluída no modelo estatístico como variável de efeito aleatório.

No âmbito dos embriões produzidos *in vivo*, para a análise dos dados referentes à taxa de concepção inicial, taxa de concepção final e perda gestacional, foram incluídas as informações das doadoras, das receptoras e dos embriões. Sobre as

doadoras a categoria animal foi avaliada (novilha, vaca lactante ou não-lactante). As informações das receptoras foram: local de inovulação (cranial, médio e caudal), época do ano (inverno e verão), número de lactações, número de eventos reprodutivos realizados anteriormente (inseminações e/ou inovulações), número de dias em lactação, método de sincronização da receptora (observação de estro, prostaglandina ou protocolo para TETF), ovário que continha o CL (direito ou esquerdo), qualidade do CL (I, II, III), escore de condição corporal, temperatura retal no momento da inovulação, média da produção de leite na semana da TE e sincronia doadora-receptora (+1, 0, -1). Finalmente em relação aos embriões foram utilizadas informações sobre o estádio de desenvolvimento, qualidade embrionária e tipo de embrião (fresco ou congelado/descongelado). Ainda, as interações das informações foram utilizadas nos modelos estatísticos.

Para construir o modelo final de regressão logística foram removidas, de acordo com os critérios estatísticos de Wald, todas as variáveis com $P > 0,20$. No modelo final de taxa de concepção entre 25 e 38 dias e entre 39 e 52 dias foram incluídas as variáveis: época do ano, número de lactações da receptora, método de sincronização e local de inovulação. Já no modelo final de perda gestacional foram incluídas as variáveis: época do ano, sincronia doadora - receptora, local de inovulação, tipo de embrião e interação local de inovulação com tipo de embrião.

Já em relação às transferências de embriões produzidos *in vitro*, para a análise dos dados referentes à taxa de concepção inicial, taxa de concepção final e perda gestacional foram incluídas informações do local de inovulação no corno uterino, raça do embrião (Girolando, Nelore, Brahman e Holandês), qualidade e estádio de desenvolvimento do embrião, classificação do CL, sincronia doadora-receptora, laboratórios produtores dos embriões e fazendas em que foram realizadas as TE. Os dados dos animais que receberam embriões provenientes de animais da raça Holandesa foram analisados separadamente, uma vez que esses animais foram palpados somente aos 65 dias para diagnóstico de gestação.

Probabilidades de $P < 0,05$ foram consideradas como significantes, e probabilidades entre 0,05 e 0,10 foram discutidas como tendências.

4.6.2 Análise estatística da dosagem de progesterona

Foram realizadas duas análises para a compreensão dos dados obtidos a partir da dosagem de progesterona. Uma por regressão logística utilizando o proc GLIMMIX do SAS, sendo que permaneceram no modelo final as variáveis local de inovulação e concentração de progesterona. E outra em que os modelos de regressão linear foram gerados através do Guided Data Analysis do SAS.

4.6.3 Análise estatística da contagem dos vasos sanguíneos

A análise de variância de medidas repetidas foi o método estatístico usado para avaliar as respostas através do proc GLM do SAS. A comparação de médias aos pares foi feita usando o teste de Tukey, considerando $P<0,05$ como significante.

Para a análise das informações referentes às contagens de vasos sanguíneos foram utilizadas as informações sobre o lado do corno uterino (contra ou ipsilateral ao CL), porção do corno uterino (cranial, média ou caudal), dia da manifestação do cio da novilha (+1, 0 ou –1) e animal utilizado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Transferência de embriões produzidos *in vivo*

5.1.1 Dados gerais

O desempenho reprodutivo das vacas leiteiras tem declinado especialmente nos animais com alto mérito genético para produção de leite (LUCY, 2001; WILTBANK et al., 2006). Com isso, um número cada vez maior de eventos reprodutivos é necessário para tornar uma vaca gestante, gerando assim as repetidoras de serviço ("repeat-breeder") (LAFI & KANEENE, 1992; LUCY, 2001). A causa da repetição de serviço é multifatorial e está muito relacionada com o aumento da produção de leite (DOCHI et al., 2008), falhas na fertilização e mortalidade embrionária precoce, especialmente durante o período de estresse térmico (RUTLEDGE, 2001; SARTORI et al., 2002). De acordo com esses conceitos, a TE apresenta-se como uma alternativa importante para minimizar os eventuais efeitos do ambiente uterino e da lactação sobre o desenvolvimento embrionário inicial, evitando dessa forma, a mortalidade embrionária precoce e, consequentemente, promovendo maiores taxas de prenhez (RUTLEDGE, 2001; RODRIGUES et al., 2008). Considerando esse contexto e a realidade da propriedade em questão, são realizadas transferências de embriões, produzidos *in vivo,* visando aumentar a eficiência reprodutiva das receptoras repetidoras de serviço e aumentar o ganho genético do rebanho.

Das seiscentas receptoras utilizadas no experimento, sete foram excluídas para a análise dos dados obtidos, uma vez que não continham as informações relevantes à análise. Com isso, 593 animais foram efetivamente utilizados, sendo que 298 receberam embriões frescos, dentre os quais 100 foram inovulados no segmento cranial, 99 no médio e 99 no caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. Os embriões congelados/descongelados totalizaram 295, sendo que 100 foram inovulados no terço cranial, 98 no médio e 97 na porção caudal do corno uterino adjacente ao corpo lúteo. Os dados como escore corporal, número de lactações, número de serviços, produção de leite, dias em lactação e temperatura retal da receptora, foram agrupados em classes para realizar a análise estatística.

A análise dos dados mostrou que as receptoras estavam bastante homogêneas dentro dos grupos experimentais. As variáveis número de lactações, dias em lactação, produção de leite, número de serviços, classificação do CL, escore de condição corporal e temperatura retal mantiveram-se bastante estáveis dentro de cada grupo, como é possível visualizar na Tabela 1. O estádio de desenvolvimento dos embriões também foi distribuído de forma equilibrada entre os grupos experimentais (Tabela 2).

Tabela 1. Média ± erro padrão das variáveis de caracterização das receptoras que receberam embriões produzidos *in vivo* em relação aos locais de inovulação para os quais foram transferidos (FCAV–UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Local de Inovulação (n)			P
	Cranial (200)	Médio (197)	Caudal (196)	
Número de lactações (Δ)	2,2 ± 0,08 (1-6)	2,17 ± 0,08 (1-7)	2,28 ± 0,09 (1-8)	0,17
DEL (Δ)	352,25 ± 12,14 (119-1163)	333,97 ± 10,64 (62-830)	346,67 ± 10,86 (91-1180)	0,52
Produção de leite (Δ)	24,73 ± 0,67 (2,8-51,9)	23,74 ± 0,66 (3,1-45,6)	24,77 ± 0,59 (2,6-41,5)	0,44
Número de serviços (Δ)	5,8 ± 0,23 (0-22)	5,93 ± 0,22 (0-18)	5,75 ± 0,21 (0-17)	0,83
Grau CL (Δ)	1,5 ± 0,04 (1-3)	1,47 ± 0,04 (1-3)	1,50 ± 0,04 (1-3)	0,60
Escore corporal (Δ)	2,65 ± 0,02 (2-3,5)	2,60 ± 0,02 (2-3,5)	2,66 ± 0,02 (2-3,5)	0,14
Temperatura retal (Δ)	38,98 ± 0,05 (37,5-41,1)	38,98 ± 0,05 (37,5-41,3)	38,95 ± 0,061 (36,7-41,1)	0,84

Tabela 2. Ocorrência, em porcentagem, do estádio de desenvolvimento dos embriões produzidos *in vivo* em relação aos três locais de inovulação para os quais foram transferidos (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Local de Inovulação			P
	Cranial	Médio	Caudal	
Mórula (Δ)	67,00% (134/200)	58,88% (116/197)	61,73% (121/196)	0,18
Blastocisto inicial (Δ)	18,50% (37/200)	22,84% (45/197)	20,40% (40/196)	0,53
Blastocisto (Δ)	10,50% (21/200)	17,26% (34/197)	14,80% (29/196)	0,12
Blastocisto expandido (Δ)	4,00% (8/200)	1,02% (2/197)	3,06% (6/196)	0,21

Considerando todas as transferências, a taxa de concepção (TC) inicial foi de 36,09% (214/593) e a final foi de 28,84% (171/593), resultando em uma perda gestacional de 20,09% (43/214) (Figura 7). Esses resultados mostraram-se inferiores aos obtidos em um estudo retrospectivo realizado na mesma propriedade entre os anos de 2001 e 2006, uma vez que a taxa de concepção média nesse período foi de 41,9% (2041/4871) para embriões transferidos tanto frescos quanto congelados/descongelados (RODRIGUES et al., 2007a). A perda gestacional apresentou-se dentro da normalidade ao considerar um levantamento feito por SARTORI et al. (2008), que consideraram vários estudos sobre mortalidade embrionária/fetal em vacas lactantes, e encontrou valores médios entre 15% e 30%.

A taxa de concepção entre 25 e 38 dias para os embriões frescos e congelados, foi de 35,23% (105/298) para os frescos e de 36,95% (109/295) para congelados/descongelados. A taxa de concepção final foi de 30,20% (90/298) para os embriões frescos e 27,46% (81/295) para os congelados/descongelados. A perda gestacional alcançou valores de 14,29% (15/105) e 25,69% (28/109), respectivamente para os embriões previamente mencionados (Figura 8). Da mesma maneira, para os embriões frescos e congelados/descongelados, verificou-se um decréscimo na taxa de concepção no período experimental, uma vez que as médias alcançadas na propriedade entre os anos de 2001 e 2006 foram de 43,85% (1155/2634) para os embriões transferidos frescos e de 39,52% (884/2237) para os transferidos congelados/descongelados (RODRIGUES et al., 2007b). Embora os resultados foram inferiores ao histórico da propriedade, ainda foram superiores aos 20,4% (28/137) alcançados por DOCHI et al. (2008), ao transferir embriões congelados/descongelados para receptoras holandesas “repeat-breeders”. A perda gestacional obtida a partir das receptoras que receberam embriões congelados/descongelados foi similar a alcançada por outro estudo que encontrou uma mortalidade de 26,2% em vacas holandesas lactantes que foram submetidas a TE (SARTORI et al., 2006).

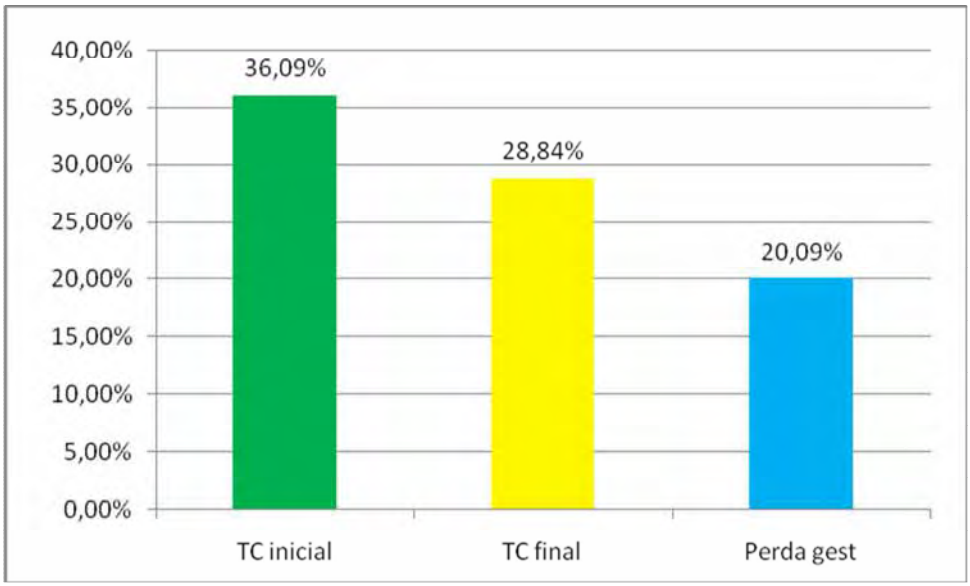


Figura 7. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo,* tanto no inverno quanto no verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

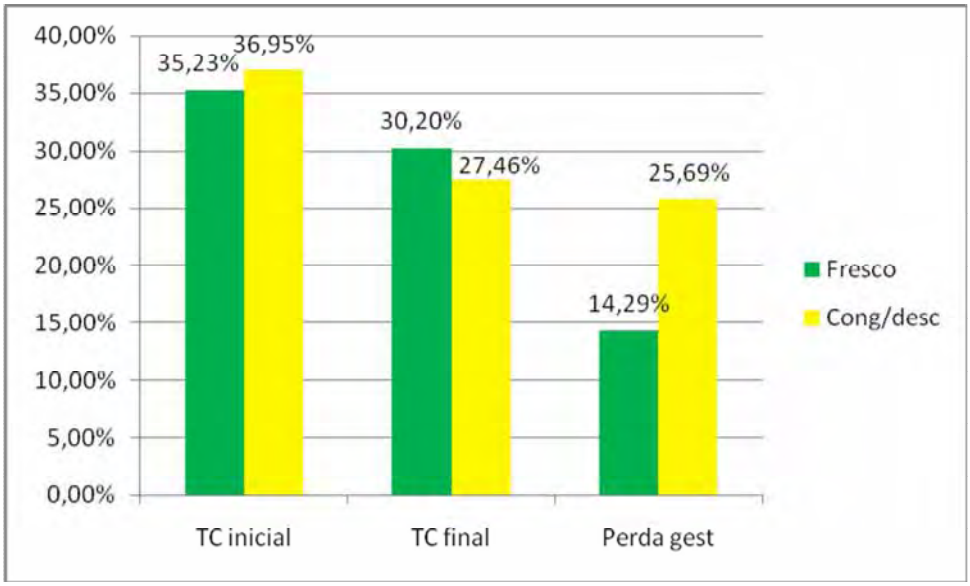


Figura 8. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo,* considerando o tipo de embriões: frescos ou congelados/descongelados, tanto no inverno quanto no verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

Devido à rotina da propriedade as transferências foram efetuadas em duas épocas distintas do ano (inverno e verão) e ao fazer a análise dos dados notou-se que houve interação entre essa variável e o local de inovulação no corno uterino para taxa de concepção inicial (P=0,009) e final (P=0,007) como demonstra a Tabela 3. Assim, todas as informações subseqüentes foram analisadas separando as duas estações do ano. Para perda gestacional não ocorreu interação entre a estação do ano e o local de inovulação (P=0,26). Observou-se que, independente do local de inovulação, a perda gestacional manteve-se estável (P=0,92) para as porções cranial (18,57%), média (21,62%) e caudal (20,00%) (Tabela 4), o que revela de maneira importante e confirma a hipótese inicial do projeto, de que o local de inovulação não influencia na mortalidade embrionária. Em contra partida, o inverno apresentou uma tendência (P=0,08) em ter maiores perdas gestacionais do que no verão, como se pode observar na Tabela 5.

Tabela 3. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a época do ano (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Estação do Ano						P		
	Inverno			Verão					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Época	Loc	Ép*Loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	21,87% (14/64)	35,38% (23/65)	42,37% (25/59)	41,17% (56/136)	38,64% (51/132)	32,85% (45/137)	0,13	0,3	0,009
TC final (prenhes/inovuladas)	15,62% [b] (10/64)	23,07% (15/65)	35,59% (21/59)	34,56% [a] (47/136)	32,57% (43/132)	25,55% (35/137)	0,03	0,39	0,007
Perda gestacional (perda/prenhes)	28,57% (4/14)	34,78% (8/23)	16,00% (4/25)	16,07% (9/56)	15,68% (8/51)	22,22% (10/45)	0,08	0,92	0,27

Letras minúsculas distintas em um mesmo local diferem significativamente entre si para diferentes estações, na mesma linha, com P=0,03.

Tabela 4. Perda gestacional das receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* de acordo com o local de inovulação no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Local de Inovulação			P
	Cranial	Médio	Caudal	
Perda gestacional (perda/prenhes)	18,57% (13/70)	21,62% (16/74)	20,00% (14/70)	0,92

Tabela 5. Perda gestacional das receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* de acordo com a estação do ano em que os embriões foram inovulados (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Estação do Ano		P
	Inverno	Verão	
Perda gestacional (perda/prenhes)	25,80% (16/63)	17,76% (27/152)	0,08

Ao analisar as TC obtidas historicamente na propriedade, verificou-se que as mesmas no inverno (42,37%, 550/1298) são similares às do verão (42,22%, 630/1492) (RODRIGUES et al., 2007c). No entanto, ao comparar esses resultados com os alcançados no presente experimento (inverno de 2007 e verão de 2008) verificou-se que as taxas de concepção foram inferiores ao histórico da propriedade. Além disso, no inverno a TC final (24,47%, 46/188) foi numericamente menor que no verão (30,86%, 125/405).

Acredita-se que a principal causa de se ter obtido resultados inferiores no período experimental em relação à média histórica da fazenda, tanto para a totalidade dos embriões transferidos, quanto para os embriões frescos e congelados/descongelados separadamente, foi devido a um problema nutricional que ocorreu com os animais pouco tempo antes do início do experimento. Infelizmente esse contratempo prejudicou toda a reprodução da propriedade, comprometendo os resultados das TE (s) e também das IA (s). O primeiro período experimental, inverno de 2007, iniciou-se pouco tempo após o percalço nutricional, fato que possivelmente explica a taxa de concepção inferior e a tendência de maior perda gestacional nessa época em relação ao verão subsequente. Salienta-se que vacas holandesas de alta produção sofrem muito com o estresse térmico e com isso os melhores resultados reprodutivos normalmente são alcançados no inverno, período em que a temperatura e umidade são mais baixas (SARTORI et al., 2002; LÓPEZ-GATIUS et al., 2003; GARCÍA- INPIERTO et al., 2006; ROTH, 2008).

Ao considerar as variáveis embrião (fresco e congelado/descongelado) e local de inovulação (cranial, médio e caudal), verificou-se que não houve interação entre as duas variáveis como se pode visualizar nas Tabelas 6 e 7. Desta forma, os dados dos embriões frescos e congelados/descongelados foram agrupados para as demais análises. Ao contrário do que se verifica na literatura para embriões de gado leiteiro (HASLER, 2001; CHEBEL et al., 2008) e de gado de corte (SPELL., 2001), não houve diferença nas taxas de concepção entre os embriões frescos e congelados/descongelados, nas duas estações estudadas (Tabelas 8 e 9). Esse fato possivelmente ocorreu porque os embriões de melhor qualidade foram congelados

para terem maiores chances de sobreviverem após a descongelação, o que pode explicar a ausência de diferença nas taxas de concepção, uma vez que os piores embriões foram inovulados frescos e os de melhor qualidade sofreram o processo de congelação/descongelação. Em relação à perda gestacional, notou-se uma tendência em maiores perdas para os embriões congelados/descongelados, como se visualiza na Tabela 8 e 9. Esses valores são esperados, uma vez que VASCONCELOS et al. (2006) encontraram 21,90% de perda para embriões transferidos frescos e SARTORI (2006) encontrou valores superiores (26,20%) para embriões transferidos descongelados.

Tabela 6. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o tipo de embrião: fresco ou congelado/descongelado, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Tipo de embrião (inverno)						P		
	Fresco			Congelado/descongelado					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	FC	loc	FC*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	25,00% (9/36)	34,21% (13/38)	43,24% (16/37)	17,86% (5/28)	37,04% (10/27)	40,91% (9/22)	0,82	0,04	0,89
TC final (prenhes/inovuladas)	13,89% (5/36)	28,95% (11/38)	40,54% (15/37)	17,86% (5/28)	14,81% (4/27)	27,27% (6/22)	0,29	0,03	0,31
Perda Gestacional (perda/prenhes)	44,44% (4/9)	15,38% (2/13)	6,00% (1/16)	0,00% (0/5)	60,00% (6/10)	33,33% (3/9)	0,09	0,33	0,99

Tabela 7. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o tipo de embrião: fresco ou congelado/descongelado, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Tipo de embrião (verão)						P		
	Fresco			Congelado/descongelado					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	FC	loc	FC*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	39,06% (25/64)	34,43% (21/61)	33,87% (21/62)	43,06% (31/72)	42,25% (30/71)	32,00% (24/75)	0,18	0,31	0,74
TC final (prenhes/inovuladas)	34,37% (22/64)	31,15% (19/61)	29,03% (18/62)	34,72% (25/72)	33,80% (24/71)	22,67% (17/75)	0,74	0,21	0,68
Perda Gestacional (perda/prenhes)	12,00% (3/25)	9,52% (2/21)	14,29% (3 /21)	19,35% (6/31)	20,00% (6/30)	29,17% (7/24)	0,07	0,64	0,93

Tabela 8. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo*, considerando o tipo de embrião: fresco ou congelado/descongelado, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Tipo de embrião (inverno)		
	Fresco	Cong/desc	P
TC inicial (prenhes/inovuladas)	33,64% (37/110)	31,58% (24/76)	0,82
TC final (prenhes/inovuladas)	27,27% (30/110)	19,75% (15/76)	0,29
Perda gest (perda/prenhes)	18,92% (7/37)	37,50% (9/24)	0,09

Tabela 9. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo*, considerando o tipo de embrião: fresco ou congelado/descongelado, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Tipo de embrião (verão)		
	Fresco	Cong/desc	P
TC inicial (prenhes/inovuladas)	36,26% (66/182)	38,97% (83/213)	0,18
TC final (prenhes/inovuladas)	31,87% (58/182)	30,05% (64/213)	0,74
Perda gest (perda/prenhes)	12,12% (8/66)	22,89% (19/83)	0,07

Ao unificar os dados dos embriões frescos e congelados/descongelados notou-se similares (P>0,05) taxas de concepção inicial e final para os distintos locais de inovulação, bem como semelhante perda gestacional durante o verão (Tabela 10 e Figura 9). Esse relevante resultado comprova a hipótese inicial do presente trabalho, já que a deposição dos embriões nas porções cranial, média e caudal do corno uterino ipsilateral ao CL não influenciou nas taxas de concepção e na perda gestacional durante o verão. Esse fato vai ao encontro dos resultados alcançados por MCNAUGHTAN et al. (2002), no entanto, contraria os trabalhos mais antigos (BRAND & AKABWAI, 1978; CHRISTIE et al., 1980; WEEMS et al., 1988; BEAL et al., 1998) que provavelmente foram os responsáveis por disseminar a idéia de que o local ideal para inovulação é a porção cranial do corno uterino ipsilateral ao CL.

Por outro lado, surpreendentemente no inverno melhores taxas de concepção foram alcançadas quando os embriões foram depositados no terço caudal (42,37%) do corno uterino ipsilateral ao CL em relação ao terço cranial (20,97%) tanto para a taxa de concepção inicial quanto para a final (Tabela 11 e Figura 10).

Tabela 10. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos in vivo para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Local de inovulação (Verão)			P
	Cranial	Médio	Caudal	
TC inicial (prenhes/inovuladas)	41,79% (56/134)	38,58% (49/127)	32,84% (44/134)	0,31
TC final (prenhes/inovuladas)	35,07% (47/134)	32,28% (41/127)	25,37% (34/134)	0,21
Perda gestacional (perda/prenhes)	16,07% (9/56)	16,33% (8/49)	22,73% (10/44)	0,64

Tabela 11. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos in vivo para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Local de inovulação (Inverno)			P
	Cranial	Médio	Caudal	
TC inicial (prenhes/inovuladas)	20,97% [b] (13/62)	35,38% [ab] (23/65)	42,37% [a] (25/59)	0,04
TC final (prenhes/inovuladas)	14,52% [b] (9/62)	23,08% [ab] (15/65)	35,59% [a] (21/59)	0,03
Perda gestacional (perda/prenhes)	30,77% (4/13)	34,78% (8/23)	16,00% 4/25)	0,33

Letras minúsculas distintas em uma mesma linha diferem significativamente entre si para os diferentes locais de inovulação, com P<0,05.

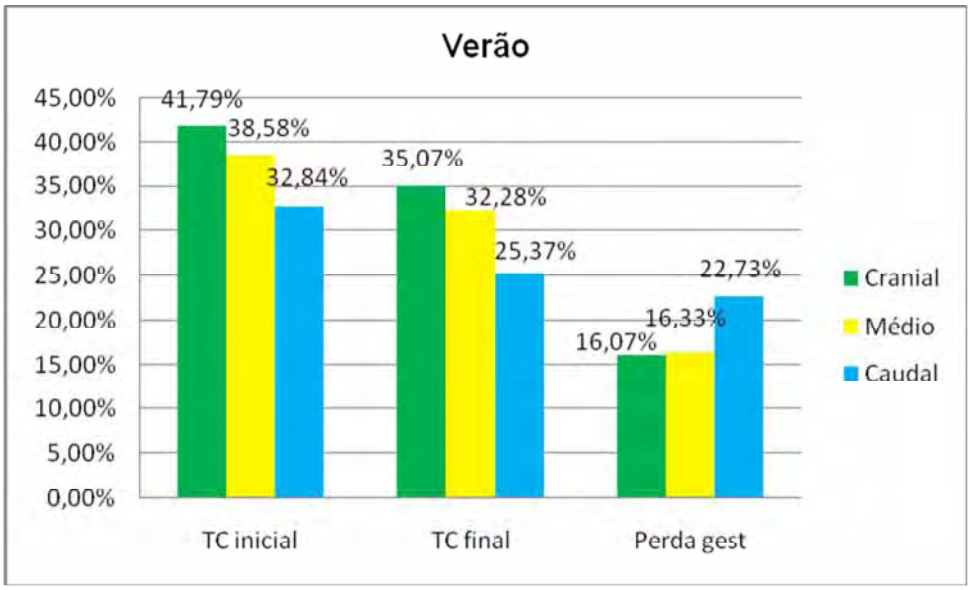


Figura 9. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

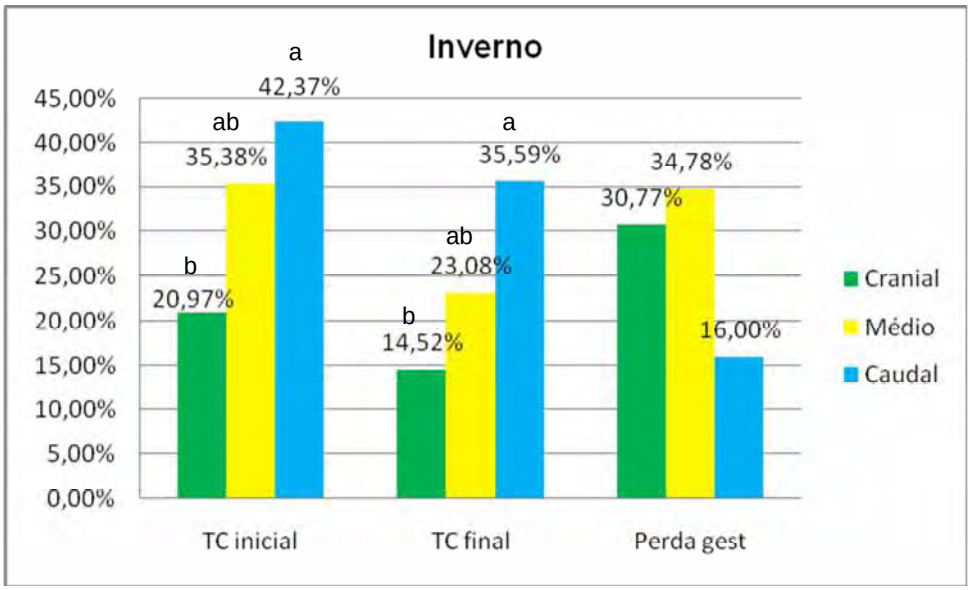


Figura 10. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

Os resultados obtidos durante o inverno aproximam-se somente dos alcançados por YAMASHINA (2002), que encontrou uma melhor taxa de prenhez ao depositar embriões na porção caudal em relação à média. Os resultados obtidos no presente experimento demonstram que a TC obtida com inovulação na porção média não é estatisticamente diferente das demais, ainda que numericamente superior a porção cranial. No entanto, esses resultados contradizem todos os autores (BRAND & AKABWAI, 1978; CHRISTIE et al., 1980; WEEMS et al., 1988; BEAL et al., 1998) que defenderam a porção cranial do corno uterino como local ideal em que o embrião deve ser depositado, e também muitos profissionais que difundiram e defenderam essa técnica.

Deve-se salientar que os estudos mais antigos (BRAND & AKABWAI, 1978; CHRISTIE et al., 1980) foram realizados utilizando a transferência de embriões pelo método cirúrgico, o que certamente pode influenciar nos resultados em relação ao local de inovulação. Pois, com essa técnica, não se tem a manipulação da cérvix e a passagem do aplicador pelo corno uterino como acontece com o método utilizado atualmente, a TE não-cirúrgica. Está provado que essa manipulação desencadeia a liberação de PGF2α e consequentemente compromete o desenvolvimento do embrião e a viabilidade do corpo lúteo (WANN & RANDEL, 1990; SCHRICK et al., 2000; SEALS et al., 1998 e SCENNA et al., 2004). Esse fato, juntamente com os resultados obtidos no presente experimento durante o inverno e os alcançados por YAMASHIMA (2002) podem ser grandes indicativos de que para as transferências não-cirúrgicas o local ideal de inovulação não é o mesmo que para as transferências cirúrgicas.

Acredita-se que durante o inverno a melhor taxa de concepção ao inovular na porção caudal seja decorrente da menor manipulação uterina em relação à deposição dos embriões no terço cranial. Possivelmente, essa maior manipulação tenha exercido um impacto negativo superior, em virtude dos animais já estarem estressados devido ao problema nutricional. Por outro lado, deve-se atentar que o número de receptoras que entraram no experimento durante o inverno foi inferior (aproximadamente 62 animais/grupo) ao do verão, fato que exige um maior cuidado ao interpretar os resultados.

Sabe-se que a habilidade do profissional que realiza as inovulações influencia nas taxas de concepção (SREENAN & DISIN, 1987), porém somente um médico veterinário, com grande experiência em transferência de embriões, realizou todo experimento. A partir disso, pode-se inferir que provavelmente um técnico com menos habilidade iria manipular mais o útero e possivelmente causar pequenas lesões o que desencadearia a liberação de PGF2α e comprometeria a gestação (WANN & RANDEL, 1990; SCHRICK et al., 2000). Sendo assim, os resultados apresentados pelo presente projeto respaldam o trabalho dos profissionais menos experientes, uma vez que mostra que a TE pode ser realizada no terço caudal do corno uterino, evitando uma manipulação inadequada, sem prejudicar a eficiência da técnica ou até mesmo melhorando-a.

Os resultados alcançados mostraram que a prenhez não difere de acordo com o local de inovulação e que no inverno obteve-se melhores taxas ao se depositar o concepto na porção caudal. Esses dados quebram um paradigma, pois mostram que a porção cranial não resultou em melhores taxas de concepção e vão contra a afirmativa que possivelmente consolidou a porção cranial do corno uterino como ideal para inovulação, ou seja, de que maior concentração de progesterona intra-uterina na porção cranial seja responsável por melhores taxas de concepção ao se depositar o embrião nesse local (SREENAN & BEEHAN, 1976; CHRISTIE et al., 1980; WEEMS et al., 1988).

Por outro lado, o local de deposição do embrião parece ser menos relevante para determinar o sucesso da gestação do que a capacidade do embrião em liberar interferon-tau (IFN-τ) e do ambiente uterino da receptora em reconhecer e conduzir a gestação. Uma vez que o sucesso da prenhez é fruto de uma importante sinalização entre embrião e receptora (GARCÍA-ISPIERTO et al., 2006) e a repetição de estro está relacionada com falhas no reconhecimento materno da prenhez ou na liberação de IFN-τ pelo embrião (DOCHI et al., 2008). O IFN-τ atua localmente no endométrio inibindo os receptores de oxitocina e, consequentemente, bloqueando a secreção de PGF2α (ROBINSON et al., 1999). Sabe-se que a maior produção de INF- τ coincide com a transição morfológica do embrião de um formato esférico para um filamentoso e

que isso ocorre entre o 14º ao 18º dia de gestação (MANN & LAMMING, 2001). Quanto maior o tamanho do trofoblasto, maior a produção de IFN- τ pelo embrião (ROBINSON et al., 2006), com isso, nota-se a importância de se transferir um embrião de boa qualidade que irá crescer e produzir INF-τ de forma satisfatória para sinalizar a prenhez.

A sincronização do desenvolvimento embrionário com o preparo do endométrio da receptora é um fator crucial para o sucesso da gestação. Além do INF- τ muitas outras moléculas participam desse processo, como: hormônios esteróides, prostaglandinas, peptídeos hormonais, citocinas e fatores de crescimento. Um grande número de moléculas já foi isolado das células do trofoblasto, entre elas vale salientar as glicoproteínas associadas à prenhez, proteína do leite uterino, ciclooxigenase, matrix-metaloproteinases e lactogênico placentário (HASHIZUME, 2007).

Ao analisar todas as demais características das receptoras utilizadas no presente experimento notou-se que não houve interação tripla (P>0,05) entre a variável estudada, o local de inovulação e a época do ano, tanto para taxa de concepção inicial, quanto para a final e para perda gestacional, como se visualiza na Tabela 12. Com isso, na sequência serão analisadas todas as variáveis separadamente e sua relação com o local de inovulação.

Tabela 12. Resultados estatísticos (P) para as interações triplas de todas as características, considerando o local de inovulação, a época do ano e a variável estudada, para taxa de concepção inicial, final e perda gestacional (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

Variável	P (variável*local inovulação*época do ano)		
	TC inicial	TC final	Perda gest
Tipo de embrião: fresco ou cong/desc	0,90	0,56	0,69
Categoria da doadora	0,36	0,80	1,00
Método de sincronização	0,12	0,14	0,69
Sincronia doadora-receptora	0,41	0,27	0,96
Estádio de desenvolvimento embrionário	0,90	0,99	0,87
Qualidade do embrião	0,08	0,18	0,94
Escore de condição corporal	0,61	0,92	0,35
Temperatura retal	0,30	0,34	0,90
Classe das receptoras	0,19	0,46	0,47
Número de serviços das receptoras	0,75	0,62	0,70
Dias em lactação	0,53	0,17	0,98
Produção de leite	0,57	0,65	0,49
Classificação do corpo lúteo	0,76	0,80	0,57

5.1.2 Categoria da doadora

Foram utilizadas como doadoras de embriões fêmeas de três categorias distintas: novilhas, vacas lactantes e vacas não lactantes. Não foi observada interação entre as taxas de concepção e a perda gestacional considerando as três categorias de doadoras em relação aos três locais de deposição dos embriões tanto no inverno quanto no verão. A categoria da doadora isoladamente também não influenciou as taxas de concepção. (Tabela 13 e 14). Normalmente, espera-se que doadoras não-lactantes e novilhas produzam embriões de qualidade superior (SARTORI et al., 2002a; CHEBEL et al., 2007) e que consequentemente resultem em melhores taxas de concepção em relação às lactantes. No entanto, possivelmente não foi detectada essa variação pois as três classes de doadoras foram submetidas a protocolos superovulatórios específicos que visam anular os efeitos negativos de cada categoria animal.

5.1.3 Sincronia do estro entre receptora e doadora

Não foi observada interação (P>0,05) entre o dia da manifestação do estro da receptora e o local de inovulação dos embriões no corno uterino, como se pode visualizar nas Tabelas 15 e 16. A sincronia doadora-receptora isoladamente não afetou as taxas de concepção durante o inverno, porém influenciou a perda gestacional nessa época do ano, uma vez que ocorreu uma maior mortalidade dos embriões inovulados em receptoras do dia +1 em relação ao dia 0. Todavia esses dados devem ser analisados com muito cuidado, quanto a sua confiabilidade, uma vez que há um baixo número de animais nesses grupos (Tabela 17). Por outro lado, no verão, notou-se uma taxa de concepção inicial superior ao inovular embriões em receptoras que manifestaram estro 24 horas antes da doadora (Tabela 18). Entretanto, o número de animais desse grupo experimental é bastante inferior ao dos demais grupos, fato que pode indicar uma ocorrência ao acaso, uma vez que nesta mesma propriedade e considerando um número elevado de animais (aproximadamente 1000 por grupo) RODRIGUES et al. (2007d) demonstraram que houve uma melhor taxa de concepção quando utilizaram receptoras do Dia 0 em relação às do Dia -1 e uma tendência das do Dia +1 também serem superiores as do Dia -1. Em outro experimento realizado na mesma propriedade, não foi verificada influência do dia da manifestação do estro em relação à taxa de concepção das receptoras (DEMETRIO et al., 2007).

Tabela 13. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a categoria da doadora: novilha, vaca lactante e vaca não-lactante, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Categoria da doadora (inverno)									P		
	Novilha			Lactante			Não-lactante					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	doad	loc	doad*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	24,14% (7/29)	38,23% (13/34)	40,74% (11/27)	20,00% (5/25)	38,09% (8/21)	36,36% (8/22)	20,00% (2/10)	20,00% (2/10)	60,00% (6/10)	0,88	0,04	0,59
TC final (prenhes/inovuladas)	20,69% (6/29)	20,59% (7/34)	33,33% (9/27)	16,00% (4/25)	28,57% (6/21)	36,36% (8/22)	0,00% (0/10)	20,00% (2/10)	40,00% (4/10)	0,79	0,03	0,89
Perda Gestacional (perda/prenhes)	14,29% (1/7)	46,15% (6/13)	18,18% (2/11)	20% (1/5)	25,00% (2/8)	0% (0/0)	100,00% (2/2)	0,00% (0/0)	33,33% (2/6)	0,22	0,33	0,94

Tabela14. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a categoria da doadora: novilha, vaca lactante e vaca não-lactante, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Categoria da doadora (verão)									P		
	Novilha			Lactante			Não lactante					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	doad	loc	doad*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	37,93% (22/58)	32,78% (20/61)	34,37% (22/64)	47,37% (18/38)	36,36% (16/44)	34,78% (16/46)	40,00% (16/40)	55,56% (15/27)	25,93% (7/27)	0,64	0,31	0,30
TC final (prenhes/inovuladas)	32,76% (19/58)	24,59% (15/61)	26,56% (17/64)	39,47% (15/38)	31,82% (14/44)	28,26% (13/46)	32,50% (13/40)	51,85% (14/27)	18,52% (5/27)	0,19	0,21	0,17
Perda Gestacional (perda/prenhes)	13,64% (3/22)	25,00% (5/20)	22,72% (5/22)	17% (3/18)	12,50% (2/16)	18,75% (3/16)	18,75% (3/16)	6,67% (1/15)	28,57% (2/7)	0,82	0,64	0,68

Tabela 15. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a sincronia doadora-receptora: 0, +1, -1, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Sincronia doadora-receptora (inverno)									P		
	0			+1			-1					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	cio	loc	cio*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	17,95% (7/39)	35,71% (15/42)	47,62% (20/42)	31,25% (5/16)	37,50% (6/16)	23,08% (3/13)	12,50% (1/8)	28,57% (2/7)	50,00% (2/4)	0,95	0,04	0,37
TC final (prenhes/inovuladas)	17,95% (7/39)	26,19% (/1142)	40,48% (17/42)	6,25% (1/16)	12,50% (2/16)	15,38% (2/13)	12,50% (1/8)	28,57% (2/7)	50,00% (2/4)	0,10	0,03	0,99
Perda Gestacional (perda/prenhes)	0,00% (0/0)	26,67% (3/15)	15,00% (3/20)	80% (4/5)	66,67% (4/6)	33% (1/3)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,02	0,33	0,99

Tabela 16. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a sincronia doadora-receptora: 0, +1, -1, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Sincronia doadora-receptora (verão)									P		
	0			+1			-1					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	cio	loc	cio*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	37,79% (33/87)	32,56% (28/86)	34,83% (31/89)	46,15% (18/39)	47,50% (19/40)	23,26% (10/43)	50,00% (5/10)	66,67% (4/6)	80,00% (4/5)	0,05	0,31	0,12
TC final (prenhes/inovuladas)	32,18% (28/87)	29,07% (25/86)	25,84% (23/89)	41,03% (16/39)	40,00% (16/40)	18,60% (8/43)	30,00% (3/10)	33,33% (2/6)	80,00% (4/5)	0,36	0,21	0,08
Perda Gestacional (perda/prenhes)	15,15% (5/33)	10,71% (3/18)	25,80% (8/31)	11,11% (2/18)	15,79% (3/19)	20,00% (2/10)	40,00% (2/5)	50,00% (2/4)	0,00% (0/0)	0,47	0,64	0,98

Tabela 17. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos in vivo, considerando a sincronia entre doadora-receptora, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Sincronia doadora-receptora (inverno)			
	-1	0	1	P
TC inicial (prenhes/inovuladas)	27,78% (5/18)	33,61% (41/122)	31,11% (14/45)	0,94
TC final (prenhes/inovuladas)	27,78% (5/18)	27,87% (34/122)	11,11% (5/45)	0,10
Perda gest (perda/prenhes)	0,00%[ab] (0/5)	17,07%[b] (7/41)	64,28%[a] (9/14)	0,02

Letras minúsculas distintas em uma mesma linha diferem significativamente entre si, com P<0,05.

Tabela 18. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos in vivo, considerando a sincronia entre doadora-receptora, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Sincronia doadora-receptora (verão)			
	-1	0	1	P
TC inicial (prenhes/inovuladas)	61,9%[a] (13/21)	35,43%[b] (90/254)	38,33%[b] (46/120)	0,05
TC final (prenhes/inovuladas)	42,86% (9/21)	29,13% (74/254)	32,50% (39/120)	0,36
Perda gest (perda/prenhes)	30,77% (4/13)	17,78% (16/90)	15,22% (7/46)	0,46

Letras minúsculas distintas em uma mesma linha diferem significativamente entre si, com P≤0,05.

5.1.4 Método de sincronização do estro da receptora

Para sincronizar as receptoras com as doadoras foram utilizados três métodos que consistiram em observação do cio natural, aplicação de PGF2α com posterior observação de estro e protocolo para TETF. Os métodos mostraram-se semelhantemente eficientes para as taxas de concepção inicial e final, bem como para perda gestacional durante o inverno (Tabela 20). No entanto, no verão o método de sincronização afetou (P=0,01) as taxas de concepção inicial e final, uma vez que a observação de cio natural e a administração de PGF2α implicaram em resultados superiores (Tabela 19). BARUSELLI et al. (2003) conseguiram melhores taxas de concepção quando utilizaram somente a PGF2α em comparação com um protocolo

que usou um indutor de ovulação (Protocolo “Ovsynch”). Esses resultados podem ser atribuídos ao fato de ovulações naturais, ou após a administração de PGF2α serem provenientes de um folículo de maior diâmetro, uma vez que esse tem que produzir estradiol suficiente para induzir o pico de LH e consequentemente a ovulação. Ao utilizar um indutor de ovulação, normalmente essa ocorre a partir de um folículo de menor diâmetro. Dessa maneira, folículos maiores tendem a gerar corpos lúteos maiores que produzem mais progesterona. No entanto a utilização de eCG no protocolo de TETF (como foi feito no presente experimento) auxilia o crescimento do folículo dominante e consequentemente desencadear um efeito luteotrófico positivo (BARUSELLI et al., 2000). CAIROLI et al. (2006) demonstraram não haver diferenças na taxa de prenhez comparando estro espontâneo ou induzido por PGF2α, como também foi observado nos dados do presente experimento. Esses dados inconclusivos demonstram a necessidade de mais estudos comparativos entre os três métodos de sincronização do estro para que realmente se estabeleça a maneira mais eficiente de sincronizar o estro e a que resulta em um número maior de prenhezes. Por outro lado, a interação entre local de inovulação e método de sincronização do estro não foram significativos para as taxas de concepção e para perda gestacional em ambas as épocas do ano, como se pode visualizar nas Tabelas 20 e 21.

5.1.5 Classificação do corpo lúteo

Sabe-se que o tamanho do corpo lúteo influencia positivamente a sua produção de progesterona (AMBROSE et al., 1999; SPELL et al., 2001; BARUSELLI et al., 2003), no entanto resultados contraditórios são encontrados quando se relaciona a concentração de progesterona com as taxas de prenhez. BARUSELLI et al. (2003) observaram uma correlação positiva entre concentração de progesterona e taxas de concepção. Por outro lado, outros pesquisadores (AMBROSE et al., 1999; SPELL et al., 2001) não verificaram diferença na concentração de progesterona plasmática entre as receptoras que se tornaram ou não prenhes, o que foi confirmado pelos resultados obtidos neste projeto, uma vez que o grau do CL isoladamente não alterou os resultados reprodutivos. Todavia poucas receptoras apresentaram CL de grau 3, ou

seja, de tamanho inferior, o que torna essa comparação pouco fidedigna. De forma semelhante, o tamanho do corpo lúteo também não influenciou (P>0,05) as taxas de concepção inicial e final bem como a perda gestacional de acordo com os três locais de inovulação (Tabelas 22 e 23). Salienta-se que no momento da TE todas as receptoras receberam 1 mL de GnRH[6] com a finalidade de causar a ovulação do folículo dominante e consequentemente desencadear a formação de um corpo lúteo acessório. Esse procedimento pode mascarar a relação entre tamanho do CL e produção de progesterona, uma vez que o tecido luteal palpado no dia da TE pode ser posteriormente acrescido pelo desenvolvimento de outro CL.

Tabela 19. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos in vivo, considerando o método de sincronização do estro, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Método de sincronização (verão)			
	Cio natural	PGF2	TETF	P
TC inicial (prenhes/inovuladas)	48,15%[a] (39/81)	45,90%[a] (28/61)	32,41%[b] (82/253)	0,01
TC final (prenhes/inovuladas)	40,74%[a] (33/39)	37,70%[a] (23/61)	26,09%[b] (66/253)	0,01
Perda gest (perda/prenhes)	15,38% (6/39)	17,86 (5/28)	19,51% (16/82)	0,83

Letras minúsculas distintas em uma mesma linha diferem significativamente entre si, com P<0,05.

Tabela 20. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o método de sincronização da receptora: cio natural, PGF2α e TETF, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Método de sincronização (inverno)									P		
	Cio natural			PGF2α			TETF					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	sinc	loc	sinc*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	29,63% (8/27)	36,36% (8/22)	41,17% (7/17)	27,27% (3/11)	35,71% (5/14)	25,00% (4/16)	11,54% (3/26)	34,48% (10/29)	53,85% (14/26)	0,75	0,04	0,27
TC final (prenhes/inovuladas)	18,52% (5/27)	31,82% (7/22)	35,29% (6/17)	18,82% (2/11)	14,29% (2/14)	25,00% (4/16)	11,54% (/326)	20,69% (6/29)	42,31% (11/26)	0,56	0,03	0,68
Perda Gestacional (perda/prenhes)	37,50% (3/8)	12,50% (1/8)	14,29% (1/7)	33% (1/3)	60,00% (3/5)	0% (0/0)	0,00% (0/0)	40,00% (4/10)	21,43% (3/14)	0,78	0,33	0,75

Tabela 21. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o método de sincronização da receptora: cio natural, PGF2α e TETF, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Método de sincronização (verão)									P		
	Cio natural			PGF2α			TETF					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	sinc	loc	sinc*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	70,00% (14/20)	40,00% (14/35)	38,71% (12/31)	37,04% (10/27)	58,33% (7/12)	50,00% (11/22)	35,95% (32/89)	35,29% (30/85)	26,19% (22/84)	0,01	0,31	0,13
TC final (prenhes/inovuladas)	60,00% (12/20)	31,43% (11/35)	35,48% (11/31)	29,63% (8/27)	50,00% (6/12)	40,91% (9/22)	30,34% (27/89)	30,59% (26/85)	17,86% (15/84)	0,01	0,21	0,11
Perda Gestacional (perda/prenhes)	14,29% (2/14)	21,43% (3/14)	8,33% (1/12)	20% (2/10)	14,28% (1/7)	18,18% (2/11)	15,62% (5/32)	13,33% (4/30)	31,81% (7/22)	0,82	0,64	0,53

Tabela 22. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos in vivo para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando as a classificação do corpo lúteo das receptoras durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Classificação do corpo lúteo (inverno)									P		
	1			2			3					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	CL	loc	CL*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	26,64% (8/30)	35,29% (12/34)	41,93% (13/31)	16,67% (5/30)	35,48% (11/31)	42,86% (12/28)	0,00% (0/2)	. .	. .	0,91	0,04	0,7
TC final (prenhes/inovuladas)	16,67% (5/30)	20,59% (7/34)	32,26% (10/31)	13,33% (4/30)	25,81% (8/31)	39,29% (11/28)	0,00% (0/0)	. .	. .	0,94	0,03	0,75
Perda Gestacional (perda/prenhes)	37,50% (3/8)	41,67% (5/12)	23,08% (3/13)	20,00% (1/5)	27,27% (3/11)	8,33% (1/12)	. .	. .	. .	0,18	0,33	0,94

Tabela 23. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos in vivo para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando as a classificação do corpo lúteo das receptoras durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Classificação do corpo lúteo (verão)									P		
	1			2			3					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	CL	loc	CL*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	40,30% (27/67)	42,86% (30/70)	35,61% (26/73)	43,55% (27/62)	35,85% (19/53)	25,92% (14/54)	25,00% (1/4)	0,00% (0/4)	57,14% (4/7)	0,73	0,31	0,57
TC final (prenhes/inovuladas)	34,33% (23/67)	37,14% (26/70)	26,03% (19/73)	35,48% (22/62)	28,30% (15/53)	22,22% (12/54)	25,00% (1/4)	0,00% (0/0)	42,86% (3/7)	0,80	0,21	0,8
Perda Gestacional (perda/prenhes)	14,81% (4/27)	13,33% (4/30)	26,92% (7/26)	18,52% (5/27)	21,05% (4/19)	14,29% (2/14)	0,00% (0/1)	. .	25,00% (1/4)	0,99	0,64	0,87

5.1.6 Números de eventos reprodutivos

O número de serviços, ou seja, número de eventos reprodutivos (IA ou TE) que a receptora foi submetida anteriormente foi separado em duas classes, sendo uma composta pelas fêmeas que receberam três ou menos eventos e a outra classe que englobou os animais com quatro ou mais serviços, ou seja, as vacas consideradas repetidoras de estro. Na literatura encontram-se relatos tanto de melhores taxas de concepção entre animais que foram submetidos a uma menor quantidade de serviços (DOCHI et al., 2008), quanto dos que não manifestaram essa diferença (GARCÍA-ISPIERTO et al., 2006). Porém, no presente trabalho essa divisão mostrou-se equivalente para as taxas de concepção inicial e final e também para perda gestacional. Esse resultado demonstra que a técnica da transferência de embriões pode ser uma alternativa interessante para viabilizar a gestação em vacas com diversas e diferentes quantidades de eventos reprodutivos. Essa constatação vai ao encontro da premissa levantada por HANSEN & BLOCK (2004) que acreditaram que a TE competirá com a IA, principalmente quando a técnica de sexagem de espermatozóides for aperfeiçoada (SARTORI, 2007).

Neste caso, o local de deposição do concepto também não sofreu influência do número de eventos reprodutivos previamente realizados com a receptora, como mostra as Tabelas 24 e 25.

Tabela 24. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o número de serviços das receptoras, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Número de serviços das receptoras (inverno)						P		
	≤3			≥4					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Nser	loc	Nser*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	16,67% (2/12)	43,75% (7/16)	30,00% (3/10)	23,07% (12/52)	32,65% (16/49)	44,90% (22/49)	0,86	0,04	0,46
TC final (prenhes/inovuladas)	16,67% (2/12)	31,25% (5/16)	30,00% (3/10)	15,38% (8/52)	20,41% (10/49)	36,73% (18/49)	0,66	0,03	0,67
Perda Gestacional (perda/prenhes)	0,00% (0/0)	28,57% (2/7)	0,00% (0/0)	33,33% (4/12)	37,50% (6/16)	18,18% (4/22)	0,27	0,33	0,99

Tabela 25. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o número de serviços das receptoras, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Número de serviços das receptoras (verão)						P		
	≤3			≥4					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Nser	loc	Nser*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	29,41% (10/34)	33,33% (10/30)	34,28% (12/35)	45,54% (46/101)	40,59% (41/101)	32,35% (33/102)	0,13	0,31	0,70
TC final (prenhes/inovuladas)	26,47% (9/34)	23,33% (7/30)	28,57% (10/35)	37,62% (38/101)	35,64% (36/101)	24,51% (25/102)	0,16	0,21	0,64
Perda Gestacional (perda/prenhes)	10,00% (1/10)	30,00% (3/10)	16,67% (2/10)	17,39% (8/46)	12,19% (5/41)	24,24% (8/33)	0,82	0,64	0,29

5.1.7 Números de lactações

As receptoras foram divididas a partir do número de lactação em primíparas e multíparas para facilitar a visualização estatística. Não ocorreu interação entre as classes de receptoras e os três locais de inovulação tanto para as taxas de concepção inicial e final, bem como a perda gestacional. O mesmo aconteceu no inverno com as classes das receptoras isoladamente, uma vez que se mostraram similares para os resultados de concepção e mortalidade gestacional (Tabela 26 e 27). Contudo, no verão observou-se que as primíparas obtiveram melhores taxas de concepção em relação às multíparas (Tabela 28), fato que era de se esperar uma vez que animais com mais lactações, ou seja, mais velhos apresentam um maior risco de baixas taxas de prenhez. Sabe-se que um aumento de uma unidade no número de lactações, aumenta em 1,24 vezes o risco de decréscimo na fertilidade dos animais (GARCÍA-ISPIERTO et al., 2006), e isso é mais evidente no verão, uma vez que o estresse térmico afeta mais as multíparas do que as primíparas.

Tabela 26. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando as classes de receptoras: primíparas ou multíparas, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Classe das receptoras (inverno)						P		
	Primípara			Multípara					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	recep	loc	recep*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	29,63% (8/27)	39,29% (11/28)	36,84% (7/19)	16,22% (6/37)	32,43% (12/37)	45,00% (18/40)	0,60	0,04	0,51
TC final (prenhes/inovuladas)	18,52% (5/27)	25,00% (7/28)	31,58% (6/19)	13,51% (5/37)	21,62% (8/37)	37,50% (15/40)	0,99	0,03	0,85
Perda Gestacional (perda/prenhes)	37,50% (3/8)	36,36% (4/11)	14,28% (1/7)	16,67% (1/6)	33,33% (4/12)	16,67% (3/18)	0,58	0,33	0,68

Tabela 27. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando as classes de receptoras: primíparas ou multíparas, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Classe das receptoras (verão)						P		
	Primípara			Multípara					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	recep	loc	recep*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	40,91% (18/44)	55,26% (21/38)	44,12% (15/34)	41,30% (38/92)	31,91% (30/94)	29,13% (30/103)	0,02	0,31	0,12
TC final (prenhes/inovuladas)	38,64% (17/44)	44,74% (17/38)	32,35% (11/34)	32,61% (30/92)	27,66% (26/94)	23,30% (24/103)	0,04	0,21	0,28
Perda Gestacional (perda/prenhes)	5,56% (1/18)	19,05% (4/21)	26,67% (4/15)	21,05% (8/38)	13,33% (4/30)	20,00% (6/30)	0,87	0,64	0,53

Tabela 28. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos in vivo, considerando a classe de receptoras, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Classe das receptoras (verão)		
	Primípara	Multípara	P
TC inicial (prenhes/inovuladas)	47,27%[a] (52/110)	34,03%[b] (97/285)	0,02
TC final (prenhes/inovuladas)	39,09%[a] (43/110)	27,72%[b] (79/285)	0,04
Perda gestacional (perda/prenhes)	17,31% (9/52)	18,56% (18/97)	0,88

Letras minúsculas distintas em uma mesma linha diferem significativamente entre si, com P<0,05.

5.1.8 Dias em lactação

O número de dias de permanência em lactação das receptoras foi organizado em dois grupos, um composto pelas receptoras que estavam com trezentos ou menos dias em lactação e o outro que englobou as fêmeas com mais de trezentos e um dias em lactação. No entanto, em ambas as estações do ano a interação entre o local de inovulação e a maior ou menor permanência dos animais em lactação não resultaram em influências significativas nas taxas de concepção inicial, final e na perda gestacional. Da mesma maneira o DEL isoladamente não afetou os resultados reprodutivos (Tabelas 29 e 30). O mesmo ocorreu em um trabalho em que a variação de 48 a 396 dias em lactação não alterou os resultados de prenhez após inovulação (GARCÍA-ISPIERTO et al., 2006). Não obstante a esses achados, um experimento realizado entre 2003 e 2004 na mesma propriedade, revelou que receptoras com mais dias em lactação tiveram maiores chances de se tornar prenhes do que as com um DEL inferior (VASCONCELOS et al., 2006). No entanto, isso possivelmente ocorreu pois a média do DEL das receptoras utilizadas no experimento mencionado foi inferior (DEL=189) ao dos animais utilizados no presente projeto (Tabela 1). Portanto, havia um número maior de receptoras que possivelmente ainda estavam sofrendo as consequências do balanço energético negativo, o que provavelmente não ocorreu no presente trabalho.

Tabela 29. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o número de dias em lactação das receptoras, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Dias em lactação (inverno)						P		
	≤ 300			≥301					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	DEL	loc	DEL*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	28,57% (6/21)	32,00% (8/25)	47,06% (8/17)	16,67% (7/42)	37,50% (15/40)	40,47% (17/42)	0,61	0,04	0,54
TC final (prenhes/inovuladas)	28,57% (6/21)	20,00% (5/25)	41,18% (7/17)	7,14% (3/42)	25,00% (10/40)	33,33% (14/42)	0,23	0,03	0,15
Perda Gestacional (perda/prenhes)	0,00% (0/0)	37,50% (3/8)	12,50% (1/8)	57,14% (4/7)	33,33% (5/15)	17,65% (3/17)	0,25	0,33	0,93

Tabela 30. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o número de dias em lactação das receptoras, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Dias em lactação (verão)						P		
	≤ 300			≥301					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	DEL	oc	DEL*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	36,51% (23/63)	36,62% (26/71)	38,16% (29/76)	45,83% (33/72)	41,38% (24/58)	26,23% (16/61)	0,91	0,31	0,20
TC final (prenhes/inovuladas)	31,75% (20/63)	29,57% (21/71)	31,58% (24/76)	37,50% (27/72)	36,21% (21/58)	18,03% (11/61)	0,94	0,21	0,25
Perda Gestacional (perda/prenhes)	13,04% (3/23)	19,23% (5/26)	17,24% (5/29)	18,18% (6/33)	12,50% (3/24)	31,25% (5/16)	0,57	0,64	0,53

5.1.9 Produção de leite

Durante as semanas em que foram realizadas as TE foram armazenados os dados da média diária da produção de leite das receptoras, e esses foram separados em dois grupos: alta produção, ou seja, maior que 30 litros por dia e baixa produção, que foi composto pelos animais com média igual ou menor que 29,9 litros diários. Porém, a análise dos dados demonstrou que, independente da quantidade de leite produzido as receptoras tornaram-se igualmente gestantes ou sofreram semelhantes perdas gestacionais, como pode ser visualizado nas Tabelas 31 e 32. Nessas tabelas também pode-se observar que não ocorreu interação entre a variável estudada e o local de inovulação no corno uterino. Esses dados são semelhantes aos encontrados por DEMETRIO et al. (2007) e CHEBEL et al. (2008), uma vez que não revelaram influência da produção de leite nos resultados reprodutivos. Por outro lado, tendência ($P<0,10$) em diminuição da TC inicial e final e probabilidade ($P<0,05$) de maiores perdas gestacionais foram encontradas em vacas com maior produção de leite, em um trabalho anterior realizado na mesma propriedade (VASCONCELOS et al., 2006).

Tabela 31. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a produção de leite diária das receptoras, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Produção de leite diária (inverno)						P		
	≤ 29,9			≥ 30					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	prod	loc	prod*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	20,51% (8/39)	31,71% (13/41)	47,50% (19/40)	21,74% (5/23)	41,67% (10/24)	31,58% (6/19)	0,79	0,04	0,38
TC final (prenhes/inovuladas)	12,82% (5/39)	24,39% (10/41)	40,00% (16/40)	17,39% (4/23)	20,83% (5/24)	26,32% (5/19)	0,41	0,03	0,59
Perda Gestacional (perda/prenhes)	37,50% (3/8)	23,07% (3/13)	15,79% (3/19)	20,00% (1/5)	50,00% (5/10)	16,67% (1/6)	0,52	0,33	0,42

Tabela 32. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a produção de leite diária das receptoras, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Produção de leite diária (verão)						P		
	≤ 29,9			≥ 30					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	prod	loc	prod*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	43,43% (43/99)	40,82% (40/98)	34,07% (31/91)	37,14% (13/35)	31,03% (9/29)	30,23% (13/43)	0,27	0,31	0,95
TC final (prenhes/inovuladas)	38,38% (38/99)	34,69% (35/98)	25,27% (23/91)	25,71% (9/35)	24,14% (7/29)	25,58% (11/43)	0,21	0,21	0,63
TC inicial (prenhes/inovuladas)	11,63% (5/43)	15,00% (5/40)	28,06% (8/31)	30,77% (4/13)	22,22% (2/9)	15,38% (2/13)	0,46	0,64	0,28

5.1.10 Escore de condição corporal

Para uma melhor análise dos dados o EC das receptoras foi agrupado em duas classes: escore baixo, que engloba os animais classificados em 2,5 ou menos e escore alto, que abrange os animais com uma classificação maior que 2,5. Ao se fazer a análise estatística, não foi encontrada interação entre o local de inovulação e o EC em ambas as estações do ano. As classes de escore corporal isoladamente também não se mostraram significativas para as taxas de concepção inicial e final, bem como para perda gestacional (Tabelas 33 e 34). Normalmente o escore de condição corporal é uma relevante característica para reprodução de gado leiteiro (BURKE et al., 1996; AMBROSE et al., 1999; SARTORI, 2007). No entanto, no presente experimento as receptoras estavam com o escore corporal entre 2 e 3,5, ou seja, não havia animais

muito magros (escore 1-1,5) e também gordos (escore 4-5), por isso não se notou a interferência da condição corporal nos resultados reprodutivos.

5.1.11 Temperatura retal

As temperaturas retais das receptoras foram divididas em três classes: de 36,7 a 38,6^{o} C, de 38,7 a 39,0^{o} C e de 39,1 a 41,3^{o} C. A interação entre o local de inovulação e a temperatura retal não diferiu estatisticamente para os resultados reprodutivos alcançados, como pode ser visto nas Tabelas 35 e 36. No entanto, no verão, época em que se diagnosticou uma maior quantidade de animais com temperaturas elevadas, devido ao estresse térmico, foi observado que altas temperaturas retais diminuiram significativamente a taxa de concepção inicial em relação aos animais que apresentaram temperaturas normais (38,7 e 39,0^{o}C) (Tabela 37). Esses dados sustentam os obtidos por DEMETRIO et al. (2007), que ao aferirem a temperatura retal no dia da inovulação, obtiveram uma correlação negativa ($P<0,05$) entre altas temperaturas e taxa de prenhez aos 28 dias. Também foi encontrado tendência ($P<0,10$) em influenciar a taxa de concepção e a perda gestacional (VASCONCELOS et al., 2006). Sabe-se que elevadas temperaturas nos primeiros dias do desenvolvimento embrionário reduzem a quantidade de embriões que continua a desenvolver-se (EALY et al., 1993).

Tabela 33. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando as classes de escore de condição corporal, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Escore corporal (inverno)						P		
	Baixo			Alto					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	EC	loc	EC*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	26,67% (8/30)	34,15% (14/41)	33,33% (8/24)	17,86% (5/28)	44,44% (8/18)	40,74% (11/27)	0,84	0,04	0,34
TC final (prenhes/inovuladas)	23,33% (7/30)	26,83% (11/41)	29,17% (7/24)	10,71% (3/28)	22,22% (4/18)	33,33% (9/27)	0,40	0,03	0,32
Perda Gestacional (perda/prenhes)	12,50% (1/8)	21,43% (3/14)	12,50% (1/8)	40,00% (2/5)	50,00% (4/8)	18,18% (2/11)	0,08	0,33	0,74

Tabela 34. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando as classes de escore de condição corporal, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Escore corporal (verão)						P		
	Baixo			Alto					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	EC	loc	EC*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	46,67% (28/60)	44,78% (30/67)	30,77% (20/65)	36,36% (12/33)	39,29% (11/28)	21,87% (7/32)	0,12	0,31	099
TC final (prenhes/inovuladas)	41,67% (25/60)	37,31% (25/67)	21,54% (14/65)	33,33% (11/33)	35,71% (10/28)	18,75% (6/32)	0,31	0,21	0,96
Perda Gestacional (perda/prenhes)	10,71% (3/28)	16,67% (5/30)	30,00% (6/30)	8,33% (1/12)	9,09% (1/110	14,29% (1/7)	0,40	0,64	0,92

Tabela 35. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando as classes de temperatura retal das receptoras durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Temperatura retal (inverno)									P		
	36,7≤T<38,6			38,7≤T<39,0			39,1≤T<41,3					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	temp	loc	temp*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	19,23% (5/26)	36,00% (9/25)	41,38% (12/29)	27,27% (6/22)	30,77% (8/26)	29,41% (5/17)	21,43% (3/14)	46,15% (6/13)	55,55% (5/9)	0,33	0,04	0,72
TC final (prenhes/inovuladas)	7,69% (2/26)	28,00% (7/25)	34,48% (10/29)	27,27% (6/22)	15,38% (4/26)	23,53% (4/17)	14,28% (2/14)	30,77% (4/13)	55,55% (5/9)	0,27	0,03	0,14
Perda Gestacional (perda/prenhes)	60,00% (3/5)	22,22% (2/9)	16,67% (2/12)	0,00% (0/0)	50,00% (4/8)	20,00% (1/5)	33,33% (1/3)	33,33% (2/6)	0,00% (0/0)	0,80	0,33	0,83

Tabela 36. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando as classes de temperatura retal das receptoras durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Temperatura retal (verão)									P		
	36,7≤T<38,6			38,7≤T<39,0			39,1≤T<41,3					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	temp	loc	temp*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	42,11% (8/19)	50,00% (6/12)	17,39% (4/23)	57,89% (11/19)	52,00% (13/25)	36,84% (7/19)	31,58% (12/38)	35,13% (13/37)	28,95% (11/38)	0,05	0,31	0,68
TC final (prenhes/inovuladas)	36,84% (7/19)	33,33% (4/12)	8,70% (2/23)	47,37% (9/19)	44,00% (11/25)	21,05% (4/19)	31,58% (12/38)	29,73% (11/37)	23,68% (9/38)	0,17	0,21	0,67
Perda Gestacional (perda/prenhes)	12,50% (1/8)	33,33% (2/6)	50,00% (2/4)	18,18% (2/11)	15,38% (2/13)	42,86% (3/7)	0,00% (0/0)	15,38% (2/13)	18,18% (2/11)	0,16	0,64	0,88

Tabela 37. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos in vivo, considerando a temperatura retal, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Temperatura retal (verão)			
	36,7≤T<38,6	38,7≤T<39,0	39,1≤T<41,3	P
TC inicial (prenhes/inovuladas)	32,07%[ab] (17/53)	50,00%[a] (30/60)	32,43%[b] (36/111)	0,05
TC final (prenhes/inovuladas)	22,64% (12/53)	38,33% (23/60)	28,83% (32/111)	0,17
Perda gestacional (perda/prenhes)	29,41% (5/17)	23,33% (7/30)	11,11% (4/36)	0,16

Letras minúsculas distintas em uma mesma linha diferem significativamente entre si, com P<0,05.

5.1.12 Estádio de desenvolvimento do embrião

O estádio de desenvolvimento dos embriões de gado leiteiro não demonstrou influenciar nas taxas de prenhez (HASLER, 2001; DEMETRIO et al., 2007; CHEBEL et al., 2008), fato similar ao encontrado no presente trabalho, em que nenhum dos quatro graus de desenvolvimento dos embriões alterou as taxas de concepção inicial e final, bem como a perda gestacional (P>0,05). Nesse caso também não foi encontrada interação entre essa variável e o local de inovulação (Tabela 38 e 39). O estádio de desenvolvimento do embrião foi um fator considerado ao decidir quais embriões seriam congelados e quais seriam inovulados frescos, uma vez que já se provou que embriões com maior grau de desenvolvimento resultam em inferiores taxas de concepção após descongelamento, quando comparados com os embriões mórula (RODRIGUES et al., 2007b).

5.1.13 Classificação do embrião

Essa característica foi de extrema importância para a escolha dos embriões que seriam congelados ou transferidos frescos em dias em que o número de receptoras era inferior ao dos embriões produzidos. Dessa maneira, os embriões de grau 3 eram transferidos frescos e os de grau 1 e 2 congelados para terem melhores chances de sobreviveram após esse processo. A partir disso, verificou-se que a classificação do embrião não interferiu de forma significativa nas taxas de concepção e na mortalidade

gestacional de acordo com os locais de inovulação. Observou-se também que as três qualidades dos embriões inovulados resultaram em similares taxas de concepção inicial e final e o mesmo ocorreu para perda gestacional, como se visualiza nas Tabelas 40 e 41. O resultado presente é concordante com o de DEMETRIO et al. (2007) e se contrapõe com outros trabalhos encontrados na literatura (HASLER, 2001; CHEBEL et al., 2008), uma vez que embriões grau I, produzidos *in vivo*, tanto frescos quanto congelados/descongelados, normalmente resultam em melhores taxas de concepção quando comparado aos demais. Possivelmente essa disparidade de resultados deve ter ocorrido em função de, no presente experimento, ter-se obtido uma quantidade inferior de embriões grau 1 em relação aos demais.

Tabela 38. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o estádio de desenvolvimento do embrião, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Estádio de desenvolvimento embrionário (inverno)												P		
	Mórula			Blastocisto inicial			Blastocisto			Blastocisto expandido					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Embr	loc	Embr*loc
TC inicial (pren/inov)	22,72% (10/44)	26,09% (12/46)	40,00% (16/40)	20,00% (2/10)	54,54% (6/11)	50,00% (5/10)	20,00% (1/5)	57,14% (4/7)	33,33% (2/6)	20,00% (1/5)	100,0% (1/1)	66,67% (2/3)	0,32	0,04	0,79
TC final (pren/inov)	13,63% (6/44)	17,39% (8/46)	35,00% (14/40)	20,00% (2/10)	36,36% (4/11)	40,00% (4/10)	20,00% (1/5)	28,57% (2/7)	16,67 (1/6)	20,00% (1/5)	100,0% (1/1)	66.67 (2/3)	0,22	0,03	0,91
Perda Gest (perda/pren)	40,00% (4/10)	33,33% (4/12)	12,50% (2/16)	0% (0/0)	33,33% (2/6)	20,00% (1/5)	0,00% (0/0)	50,00% (2/4)	50,00% (1/2)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,88	0,33	0,99

Tabela 39. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o estádio de desenvolvimento do embrião, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Estádio de desenvolvimento embrionário (verão)												P		
	Mórula			Blastocisto inicial			Blastocisto			Blastocisto expandido					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Embr	loc	Embr*loc
TC inicial (pren/inov)	35,56% (32/90)	35,71% (25/70)	33,33% (27/81)	40,74% (11/27)	44,12% (15/34)	23,33% (7/30)	62,50% (10/16)	40,74% (11/27)	39,13% (9/23)	100,0% (3/3)	0,00% (0/1)	66,67% (2/3)	0,17	0,31	0,55
TC final (pren/inov)	30,00% (27/90)	28,57% (20/70)	23,46% (19/81)	40,74% (11/27)	38,23% (13/34)	20,00% (6/30)	37,50% (6/16)	37,04% (10/27)	34,78% (8/23)	100,0% (3/3)	0,00% (0/1)	66,67% (2/3)	0,11	0,21	0,84
Perda Gest (perda/pren)	15,62% (5/32)	20,00% (5/25)	29,63% (8/27)	0% (0/0)	13,33% (2/15)	14,28% (1/7)	40,00% (4/10)	9,09% (1/11)	11,11% (1/9)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,57	0,64	0,56

Tabela 40. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a qualidade do embrião: 1, 2 ou 3, durante o inverno (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Classificação do embrião (Inverno)									P		
	1			2			3					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	class	loc	classl*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	23,08% (3/13)	42,85% (3/7)	22,22% (2/9)	12,50% (3/24)	43,75% (14/32)	41,93% (13/31)	29,63% (8/27)	23,08% (6/26)	52,63% (10/19)	0,89	0,04	0,18
TC final (prenhes/inovuladas)	23,08% (3/13)	14,28% (1/7)	22,22% (2/9)	8,33% (2/24)	28,12% (9/32)	32,26% (10/31)	18,52% (5/27)	19,23% (5/26)	47,37% (9/19)	0,85	0,03	0,40
Perda Gestacional (perda/prenhes)	0,00% (0/0)	66.67% (2/3)	0,00% (0/0)	33,33% (1/3)	35,71% (5/14)	23,08% (3/13)	37,50% (3/8)	16,67% (1/6)	10,00% (1/10)	0,78	0,33	0,95

Tabela 41. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras Holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a qualidade do embrião: 1, 2 ou 3, durante o verão (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Classificação do embrião (Verão)									P		
	1			2			3					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	classl	loc	class*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	54,54% (6/11)	28,57% (2/7)	50,00% (7/14)	43,53% (37/85)	41,38% (36/87)	34,18% (27/79)	32,50% (13/40)	34,21% (13/38)	25,00% (11/44)	0,17	0,31	0,54
TC final (prenhes/inovuladas)	45,45% (5/11)	28,57% (2/7)	50,00% (7/14)	36,47% (31/85)	35,63% (31/87)	25,32% (20/79)	27,50% (11/40)	26,32% (10/38)	18,18% (8/44)	0,12	0,21	0,51
Perda Gestacional (perda/prenhes)	16,67% (1/6)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	16,22% (6/37)	13,89% (5/36)	25,93% (7/27)	15,38% (2/13)	23,08% (3/13)	27,27% (3/11)	0,51	0,64	0,99

5.2 Embriões produzidos *in vitro*

Foram realizadas 315 transferências de embriões PIV, sendo que 109 foram inovulados na porção cranial, 105 na média e 101 na caudal. Desse total, 58 foram da raça Girolando, 76 Nelore, 114 Brahman e 67 Holandesa. No entanto, as receptoras inovuladas com os embriões da raça Holandesa foram examinadas somente aos 65 dias pós-transferência e desta forma não foi possível obter os dados de taxa de concepção aos 30 dias e perda gestacional. Consequentemente, os dados foram analisados em duas etapas, uma que abrangeu os embriões Girolando, Nelore e Brahman e com isso obteve-se as taxas de concepção aos 30 e 65 dias e a perda gestacional. E uma segunda etapa que incluiu os embriões transferidos de todas as raças, mas que somente a taxa de concepção aos 65 dias foi estudada.

5.2.1 Dados gerais excluindo embriões provenientes de animais da raça Holandesa

Mediante a análise dos dados verificou-se que as receptoras estavam bastante homogêneas dentro dos três grupos analisados. As variáveis sêmen sexado e estádio de desenvolvimento dos embriões apresentaram-se de forma equilibrada dentro dos grupos experimentais, como se pode verificar na Tabela 42.

Tabela 42. Freqüência, em porcentagem, da distribuição das variáveis de caracterização dos embriões produzidos *in vitro* em relação dos locais de inovulação para os quais foram transferidos, excluindo os embriões da raça Holandesa (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Local de inovulação (n)			P
	Cranial (86)	Médio (83)	Caudal (79)	
Sêmen sexado	23,25%	24,10%	22,78%	0,98
Blastocisto inicial	16,28%	16,87%	20,25%	0,74
Blastocisto	32,56%	33,73%	34,18%	0,97
Blastocisto expandido	51,16%	49,39%	45,57%	0,76

No geral, excluindo os animais que receberam embriões provenientes da raça Holandesa, a taxa de concepção aos 30 dias foi de 38,71% (96/248) e na confirmação aos 65 dias foi de 36,29% (90/248), resultando em uma perda gestacional de 6,25%

(6/96) (Figura11). Como já se esperava, a perda gestacional das receptoras mestiças foi muito inferior a das vacas holandesas, repetidoras de serviço, uma vez que se encontra na literatura valores de mortalidade entre 4,4% e 15,5% (ZANENGA & PEDROSO, 1995; REIS et al., 2004)

Ao analisar as informações considerando os três grupos de interesse, obteve-se uma taxa de concepção aos 30 dias de 37,21% para os embriões depositados na porção cranial, 45,78% para os da média e 32, 91% para os da caudal. A confirmação aos 65 dias resultou em taxas de concepção de 33,72% no terço cranial, 42,17% no terço médio e 32, 91% no terço caudal. A perda gestacional entre 30 e 65 dias de gestação foi de 9,37% para o segmento cranial, 7,89% para o médio e não houve perda no segmento caudal (Figura 12). Não foi observada diferença estatística quanto ao local de inovulação tanto para as taxas aos 30 e 65 dias quanto para perda gestacional (Tabela 43).

Esses resultados confirmam a hipótese inicial de que não há diferença nas taxas de concepção e perda gestacional de acordo com os três locais de inovulação para embriões produzidos *in vitro*, fato que vai de acordo com os dados obtidos por YAMASHINA (2002) e MCNAUGHTAN et al. (2002), mas que contrariam todos outros trabalhos encontrados na literatura (BRAND & AKABWAI, 1978; CHRISTIE et al., 1980; WEEMS et al., 1988; BEAL et al., 1998) (Vide discussão realizada no item 5.1.1). No entanto, é importante ressaltar que, embora não estatisticamente significativo, observou-se numericamente uma melhor taxa de concepção inicial e final ao se depositar os embriões produzidos *in vitro* no terço médio do corno uterino ipsilateral ao CL, fato não descrito anteriormente na literatura consultada.

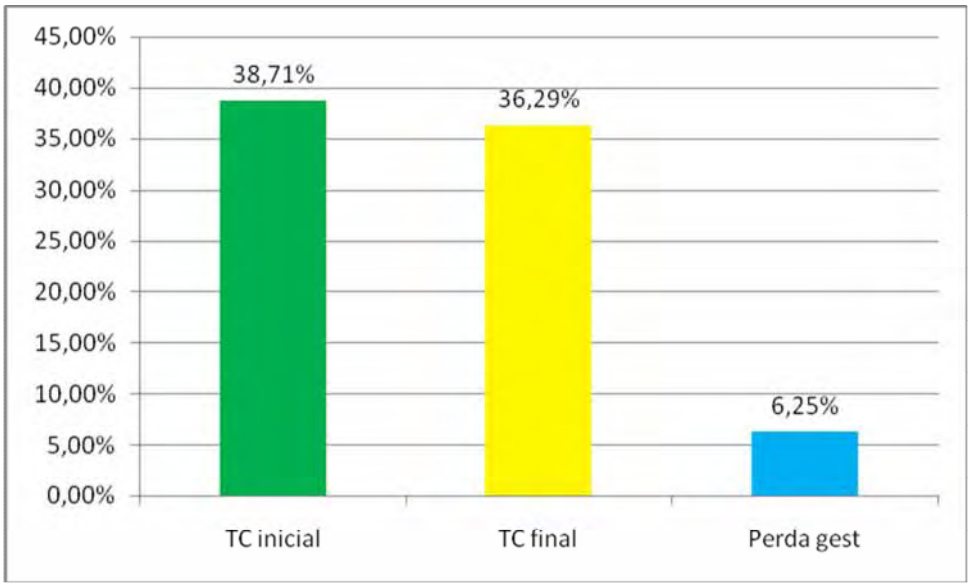


Figura 11. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

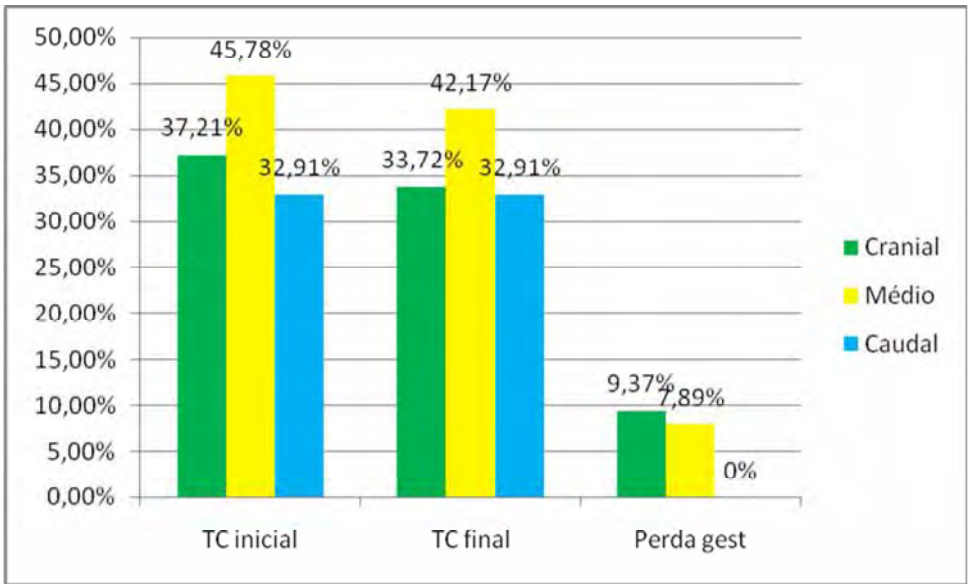


Figura 12. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

Tabela 43. Taxa de concepção aos 30 e 65 dias de gestação e perda gestacional de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou distal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, excluindo os embriões da raça Holandesa (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Local de inovulação			P
	Cranial	Médio	Caudal	
TC inicial (prenhes/inovuladas)	37,21% (32/86)	45,78% (38/83)	32,91% (26/79)	0,26
TC final (prenhes/inovuladas)	33,72% (29/86)	42,17% (35/83)	32,91% (26/79)	0,42
Perda gestacional (perda/prenhes)	9,37% (3/32)	7,89% (3/38)	0% (0/26)	0,97

5.2.2 Dados específicos excluindo embriões obtidos de animais da raça Holandesa

5.2.2.1 Embriões obtidos de animais de diferentes raças

As três diferentes raças das doadoras que forneceram os embriões que foram inovulados não influenciaram nas taxas de concepção aos 30 e 65 dias de gestação, bem como a perda gestacional. O local de inovulação e a interação local e raça também não apresentaram significância (P>0,05) em relação aos itens previamente mencionados, como é possível visualizar na Tabela 45. Esses resultados foram similares ao encontrado por PEIXOTO et al. (2007), uma vez que não obtiveram diferenças nas taxas de prenhez ao utilizar embriões das raças Guzerá, Nelore e Gir e mostram que independente da raça da doadora as taxas de prenhez das receptoras não são alteradas.

5.2.2.2 Estádio de desenvolvimento dos embriões

De acordo com o local de inovulação e a interação do local com o grau de desenvolvimento do embrião não foram observadas diferenças significativas em ambas as taxas de concepção e na perda gestacional (Tabela 46), demonstrando que independentemente do estádio de desenvolvimento embrionário, as taxas de concepção de acordo com os três locais de inovulação são similares. Por outro lado, considerando somente o estádio de desenvolvimento embrionário, houve influência

tanto nas taxas de concepção aos 30 dias quanto aos 65 dias, sendo que as melhores taxas de concepção aos 30 dias foram atingidas pelos blastocistos (43,37%), que diferiram estatisticamente dos blastocistos iniciais (25,00%). Na confirmação tanto os blastocistos (39,76%) quanto os blastocistos expandidos (39,67%) resultaram em melhores taxas de prenhez em relação aos blastocistos iniciais (20,45%) (Tabela 44). Esses resultados se contrapõem aos obtidos por PEIXOTO et al. (2007) que detectaram melhores taxas de prenhez quando embriões mórula e blastocisto inicial foram transferidos para receptoras *Bos indicus x Bos taurus*. Não obstante, outro trabalho demonstrou que não houve influência do grau de desenvolvimento dos embriões sobre a taxa de prenhez (SPELL et al., 2001). Evidencia-se, dessa forma, uma clara variação de resultados em relação ao estádio de desenvolvimento dos embriões.

Tabela 44. Taxa de concepção aos 30 e 65 dias de gestação de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* de acordo com o grau de desenvolvimento do embrião inovulado, desconsiderando os embriões da raça Holandesa (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Estádio de desenvolvimento do embrião			P
	Bi	BL	Bx	
TC inicial (prenhes/inovuladas)	25,0%[b] (11/44)	43,37%[a] (36/83)	40,5%[ab] (49/121)	0,04
TC final (prenhes/inovuladas)	20,45%[b] (9/44)	39,76%[a] (33/83)	39,67%[a] (48/121)	0,04

Letras minúsculas distintas em uma mesma linha diferem significativamente entre si, com P=0,04.

5.2.2.3 Classificação do corpo lúteo

As taxas de concepção aos 30, 60 dias e perda gestacional não se alteraram em função da qualidade do corpo lúteo. Da mesma forma, o local de inovulação também não influenciou os resultados de acordo com a classificação do CL. Interação entre essas duas variáveis também não foi encontrada tanto para mortalidade embrionária quanto para taxas de concepção inicial e final (Tabela 47). No entanto, nota-se que numericamente os resultados obtidos foram superiores quando as receptoras possuíam CL de grau 1 em relação aos de grau 2 e principalmente em relação aos de grau 3. Sabe-se que há uma relação positiva entre o diâmetro do CL e a concentração de

progesterona sistêmica (SPELL et al., 2001; BARUSELLI et al., 2003). Entretanto, esse fato nem sempre é verdadeiro quando se correlaciona com taxa de prenhez, uma vez que há trabalhos que mostram que não há uma ligação entre essas duas variáveis (SPELL et al., 2001; MCNAUGHTAN et al., 2004) e há outros que observam essa influência (BARUSELLI et al., 2003). Dessa maneira, fica difícil afirmar se os resultados obtidos no presente experimento não foram significativos em virtude do baixo número de receptoras que apresentaram CL de grau 3 ou se isso realmente não tem uma correlação.

5.2.2.4 Sincronia do estro entre doadora e receptora

O dia de manifestação do estro da receptora, o local de deposição do embrião e a interação entre o local de deposição do concepto e a sincronia doadora-receptora não foram diferentes significativamente para as taxas de concepção inicial e final, bem como para perda gestacional (Tabela 48). Esses resultados são similares aos encontrados por alguns autores, que não obtiveram diferença nas taxas de concepção quando a variação entre o estro da receptora (*Bos indicus* x *Bos taurus*) e da doadora foi de mais ou menos 24 horas (HASLER, 2001; SPELL et al., 2001). Por outro lado, PEIXOTO et al. (2007) encontraram melhores taxas de prenhez quando as inovulações foram realizadas em novilhas mestiças que manifestaram estro 24 horas antes da doadora. Neste experimento, numericamente, os melhores resultados foram alcançados quando as receptoras foram classificadas em 0 e +1. Todavia houve reduzido número de animais classificados em -1, o que compromete a comparação adequada entre essas classes.

5.2.2.5 Método de sincronização do estro da receptora

Os três métodos utilizados para sincronizar o estro das receptoras (observação de cio natural, aplicação de PGF2α e protocolo para TETF) resultaram em similares taxas de concepção aos 30 e 60 dias de gestação. Também não houve interação entre o método de sincronização do estro e o local de inovulação (Tabela 49). Esses resultados foram diferentes aos das receptoras holandesas que receberam embriões

produzidos *in vivo* (Item 5.1.4), uma vez que, para esses animais, o cio natural ou induzido por PGF2α resultou em melhores taxas de concepção em relação à TETF. Todavia, a maioria das receptoras inovuladas com embriões produzidos *in vitro* recebeu o protocolo para TETF, com isso os demais grupos ficaram com um número reduzido de animais, o que compromete a comparação estatística entre os métodos de sincronização.

Tabela 45. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a raça da doadora e excluindo os embriões da raça Holandesa (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Raça da doadora									P		
	Girolando			Nelore			Brahman					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	raça	local	raça*local
TC inicial (prenhes/inovuladas)	35,00% (7/20)	65,00% (13/20)	22,00% (4/18)	45,00% (18/40)	36,84% (14/38)	44,00% (16/36)	26,92% (7/26)	44,00% (11/25)	24,00% (6/25)	0,15	0,06	0,07
TC final (prenhes/inovuladas)	20,00% (4/20)	50,00% (10/20)	22,22% (4/18)	45,00% (18/40)	36,84% (14/38)	44,00% (16/36)	26,92% (7/26)	44,00% (11/25)	24,00% (6/25)	0,30	0,13	0,18
Perda gestacional (perda/prenhes)	42,84% (3/7)	23,08% (3/10)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,99	1,00	1,00

Tabela 46. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o estádio de desenvolvimento do embrião, exceto os da raça Holandesa (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Estádio de desenvolvimento do embrião									P		
	Blastocisto inicial			Blastocisto			Blastocisto expandido					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Embr	local	Embr*local
TC inicial (prenhes/inovuladas)	28,57% (4/14)	28,57% (4/14)	18,75% (3/16)	42,86% (12/28)	42,86% (12/28)	44,44% (12/27)	36,37% (16/44)	53,66% (22/41)	30,56% (11/36)	0,08	0,43	0,68
TC final (prenhes/inovuladas)	21,43% (3/14)	21,43% (3/14)	18,75% (3/16)	35,72% (10/28)	39,29% (11/28)	44,44% (12/27)	36,37% (16/44)	51,22% (21/41)	30,56% (11/36)	0,07	0,73	0,66
Perda gestacional (perda/prenhes)	25,00% (1/4)	25,00% (1/4)	0,00% (0/0)	17% (2/12)	8,33% (1/12)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	4,54% (1/22)	0,00% (0/0)	0,99	0,99	0,99

Tabela 47. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o grau do corpo lúteo, exceto os da raça Holandesa (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Classificação do corpo lúteo									P		
	1			2			3					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	class	local	class*local
TC inicial (prenhes/inovuladas)	44,18% (19/43)	45,95% (17/37)	42,86% (15/35)	31,43% (11/35)	46,34% (19/41)	25,71% (9/35)	25,00% (2/8)	40,00% (2/5)	22,22% (2/9)	0,19	0,38	0,82
TC final (prenhes/inovuladas)	39,53% (17/43)	45,95% (17/37)	42,86% (15/35)	28,57% (10/35)	39,02% (16/41)	25,71% (9/35)	25,00% (2/8)	40,00% (2/5)	22,22% (2/9)	0,14	0,67	0,96
Perda gestacional (perda/prenhes)	10,53% (2/19)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	9% (1/11)	15,79% (3/19)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,99	0,99	1,00

Tabela 48. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a sincronia doadora-receptora, exceto os embriões da raça Holandesa (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Sincronia doadora-receptora									P		
	0			+1			-1					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	cio	local	cio*local
TC inicial (prenhes/inovuladas)	37,50% (27/72)	49,31% (36/73)	34,33% (23/67)	57,14% (4/7)	50,00% (25/50)	20,00% (4/20)	0,00% (0/5)	0,00% (0/6)	33,33% (2/6)	1,00	0,99	0,87
TC final (prenhes/inovuladas)	33,33% (24/72)	45,21% (33/73)	34,33% (23/67)	57,14% (4/7)	50,00% (25/50)	20,00% (4/20)	0,00% (0/5)	0,00% (0/6)	33,33% (2/6)	0,99	0,99	0,82
Perda gestacional (perda/prenhes)	11,11% (3/27)	8,33% (3/36)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,99	1,00	0,99

Tabela 49. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o método de sincronização da receptora: cio natural, PGF2α ou TETF, exceto para os embriões da raça Holandesa (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Método de sincronização da receptora									P		
	Cio			PGF2α			TETF					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	sincr	local	sincr*local
TC inicial (prenhes/inovuladas)	28,57% (2/7)	33,33% (2/6)	0,00% (0/3)	33,33% (5/15)	53,85% (7/13)	38,46% (5/13)	40,98% (25/61)	47,55% (29/61)	33,33% (20/60)	0,99	0,67	0,96
TC final (prenhes/inovuladas)	28,57% (2/7)	33,33% (2/6)	0,00% (0/3)	33,33% (5/15)	53,85% (7/13)	38,46% (5/13)	36,06% (22/61)	42,62% (26/61)	33,33% (20/60)	0,87	0,66	0,97
Perda gestacional (perda/prenhes)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0% (0/0)	0,00% (0/0)	0% (0/0)	12,00% (3/25)	10,34% (3/29)	0,00% (0/0)	1,00	0,99	1,00

5.2.2.6 Laboratório de produção de embriões

Considerando os laboratórios que produziram os embriões *in vitro,* notou-se na análise que o local de deposição dos embriões teve uma variação significativa (P=0,04) na taxa de concepção aos 30 dias de gestação. Infelizmente é difícil saber as causas dessa variação, uma vez que não se tem acesso a produção dos embriões dentro dos laboratórios. No entanto o mesmo não ocorreu na confirmação da gestação e na perda gestacional. Os dados dos laboratórios isoladamente não resultaram diferenças significativas nas taxas de concepção inicial e final, como pode ser observado na Tabela 50.

Tabela 50. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o laboratório que realizou a PIV e excluindo os embriões da raça Holandesa (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Laboratório						P		
	1			2					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	lab	local	lab*local
TC inicial (prenhes/inovuladas)	35,00% (7/20)	65,00% (13/20)	22,22% (4/18)	37,88% (25/66)	39,68% (25/63)	36,06% (22/61)	0,81	0,04	0,09
TC final (prenhes/inovuladas)	20,00% (4/20)	50,00% (10/20)	22,22% (4/18)	37,88% (25/66)	39,68% (25/63)	36,06% (22/61)	0,25	0,11	0,2
Perda gestacional (perda/prenhes)	42,86% (3/7)	23,08% (3/13)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	1	0,98	1

5.2.2.7 Propriedade

Ao analisar os dados de acordo com as propriedades em que foram realizadas as transferências, nota-se que o local de inovulação e a interação entre local de inovulação e propriedade não diferiram para as taxas de concepção inicial, final e para perda gestacional como pode ser visto na Tabela 51. No entanto, a variável fazenda quando analisada separadamente, apresentou uma tendência (P=0,076) em influenciar as taxas de concepção aos 30 dias, uma vez que 41,86% das receptoras foram diagnosticadas gestantes na fazenda A e na fazenda B esse valor foi de 31,58% (Tabela 52). Por outro lado, no momento da confirmação aos 65 dias essa tendência não foi mantida (P=0,15). Similar ao que aconteceu com HASLER, 2001, esses resultados demonstram a importância do manejo dentro da propriedade, uma vez que

os resultados de prenhez podem ser comprometidos de acordo com a fazenda em que os embriões são transferidos.

Tabela 51. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a fazenda em que foram realizadas as inovulações e excluindo os embriões da raça Holandesa (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Propriedade						P		
	1			2					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	prop	local	prop*loc
TC inicial (prenhes/inovuladas)	41,67% (25/60)	46,55% (27/58)	37,04% (20/54)	26,92% (7/26)	44,00% (11/25)	24,00% (6/25)	0,12	0,17	0,67
TC final (prenhes/inovuladas)	36,67% (22/60)	41,38% (24/58)	37,04% (20/54)	26,92% (7/26)	44,00% (11/25)	24,00% (6/25)	0,28	0,25	0,56
Perda gestacional (perda/prenhes)	12,00% (3/25)	11,11% (3/24)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,00% (0/0)	0,98	0,99	0,99

Tabela 52. Taxa de concepção aos 30 dias de gestação de receptoras de embriões mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* de acordo com a fazenda em que foram inovulados, desconsiderando os embriões da raça Holandesa (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Propriedade		P
	A	B	
Taxa de concepção aos 30 dias (prenhes/total)	41,86% (72/172)	31,58% (24/76)	0,076

5.2.3 Dados gerais incluindo os embriões proveniente de animais da raça Holandesa

Ao incluir na análise os embriões da raça Holandesa também foi observada homogeneidade no âmbito dos embriões inovulados nos três grupos experimentais, como pode ser visto na Tabela 53.

Tabela 53. Freqüência, em porcentagem, da distribuição das variáveis de caracterização dos embriões produzidos *in vitro* de acordo com os locais de inovulação para os quais foram transferidos, incluindo os embriões Holandeses (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Local de inovulação (n)			P
	Cranial (109)	Médio (105)	Caudal (101)	
Sêmen sexado	39,45%	40,00%	39,60%	0,99
Mórula	0,00%	3,81%	1,98%	0,75
Blastocisto inicial	23,85%	25,71%	30,69%	0,52
Blastocisto	33,03%	29,52%	29,70%	0,83
Blastocisto expandido	43,12%	40,95%	37,62%	0,72

Como citado anteriormente, a análise contento a totalidade dos embriões pode ser somente realizada considerando a taxa de concepção aos 65 dias. Sendo assim, como se esperava e de acordo com a hipótese inicial do trabalho, constatou-se que o local de inovulação não influenciou a taxa de concepção (P=0,52), uma vez que 34,86%, 40,00% e 30,69% das receptoras tornaram-se gestantes ao receber um embrião na porção cranial, média e caudal, respectivamente (Tabela 54). Da mesma maneira que ocorreu ao excluir os animais da raça Holandesa, notou-se numericamente um aumento na taxa de concepção aos 65 dias quando os embriões foram depositados na porção média do corno uterino ipsilateral ao CL (Figura 13). Esse fato é de extrema relevância, uma vez que quebra o paradigma inicial de que os melhores resultados são alcançados quando os embriões são depositados na porção cranial. Verificar mais detalhes sobre a discussão desse tópico no item 5.1.1.

Tabela 54. Taxa de concepção aos 65 dias de gestação de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* de acordo com o local do corno uterino em que foram inovulados, incluindo os embriões da raça Holandesa (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Local de inovulação			P
	Cranial	Médio	Caudal	
TC final (prenhes/inovuladas)	34,86% (38/109)	40,00% (42/105)	30,69% (31/101)	0,52

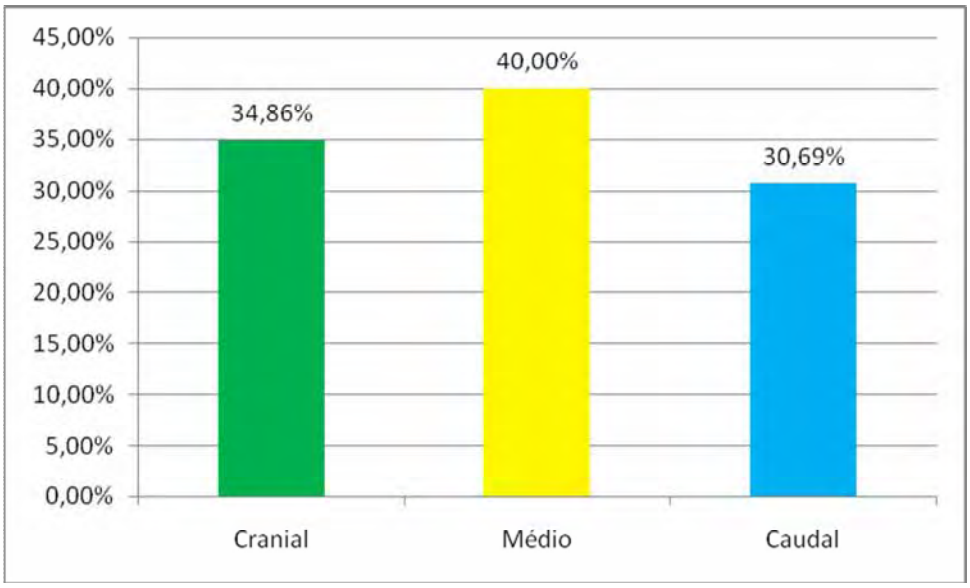


Figura 13. Taxa de concepção final de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

5.2.4 Dados específicos incluindo os embriões de animais da raça Holandesa

Em relação aos dados específicos analisados acrescentando as receptoras que receberam embriões da raça Holandesa, notou-se que não ocorreram muitas alterações quando comparado à análise previamente realizada, que excluiu os animais que receberam embriões dessa raça, como pode ser visto a seguir.

5.2.4.1 Embriões obtidos de animais de diferentes raças

Os embriões das raças Girolando, Nelore, Brahman e Holandesa comportaram-se de maneira semelhantes em relação às taxas de concepção aos 65 dias de gestação e de acordo com os locais de inovulação, não ocorrendo interação entre as duas variáveis (Tabela 57).

5.2.4.2 Estádio de desenvolvimento do embrião

A taxa de concepção final não diferiu estatisticamente de acordo com o local de inovulação e com o estádio de desenvolvimento dos embriões inovulados, da mesma forma, não ocorreu interação entre as duas variáveis, fato demonstrado na Tabela 58.

5.2.4.3 Classificação do corpo lúteo

A taxa de concepção aos 65 dias de gestação não variou de acordo com a classificação do corpo lúteo. Com o local de deposição do embrião também não ocorreu diferença significativa, e o mesmo aconteceu com a interação entre as duas variáveis (Tabela 59). No entanto, novamente salienta-se o menor número de receptoras que possuíam CL de grau 3, fato que pode alterado a qualidade da análise.

5.2.4.4 Sincronia do estro entre doadora e receptora

A manifestação do estro nos dias 0, +1 e –1, em relação ao estro da doadora, comportou-se de maneira semelhante em relação às taxas de concepção aos 65 dias de gestação e de acordo com o local de inovulação, não ocorrendo interação entre as duas variáveis (Tabela 60).

5.2.4.5 Método de sincronização do estro da receptora

Tanto o estro natural, quanto o induzido por PGF2α ou por protocolo para TETF resultaram sem semelhantes taxas de concepção final, fato que se repetiu em relação ao local de inovulação dos embriões no corno uterino (Tabela 61).

5.2.4.6 Laboratório de produção de embriões

O laboratório que produziu os embriões não afetou o diagnóstico de gestação aos 65 dias. O mesmo fato também ocorreu com o local de inovulação que resultou em taxas similares para as três porções, fato que pode ser visualizado na Tabela 55.

Tabela 55. Taxa de concepção final de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o laboratório em que foram realizadas as PIV (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Laboratório						P		
	1			2					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	lab	local	lab*local
TC final (prenhes/inovuladas)	20,00% (4/20)	50,00% (10/20)	22,22% (4/18)	38,20% (34/89)	37,65% (32/85)	32,53% (27/83)	0,35	0,10	0,36

5.2.4.7 Propriedade

As propriedades nas quais foram realizadas as transferências não influenciaram as taxas de concepção de acordo com o local de inovulação no corno uterino. Também não ocorreu interação entre as duas variáveis analisadas (Tabela 56).

Tabela 56. Taxa de concepção final de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a fazenda em que foram realizadas as inovulações (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Propriedade						P		
	Cranial		Médio		Caudal				
	1	2	1	2	1	2	prop	loc	prop *loc
TC final (prenhes/inovuladas)	37,35% (31/83)	26,92% (7/26)	38,75% (31/80)	44,00% (11/25)	32,89% (25/76)	24,00% (6/25)	0,41	0,22	0,51

Tabela 57. Taxa de concepção final de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a raça do embrião (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Raça												P		
	Girolando			Nelore			Brahman			Holandesa					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Raça	Local	Raça*local
TC final (prenhes/inovuladas)	20,00% (4/20)	50,00% (10/20)	22,22 (4/18)	45,00% (18/40)	7,93% (3/38)	44,44% (16/36)	26,92% (7/26)	44,00% (11/25)	24,00% (6/25)	39,13% (9/23)	31,81% (7/22)	22,72% (5/22)	0,46	0,19	0,31

Tabela 58. Taxa de concepção final de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o estádio de desenvolvimento do embrião (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Estádio de desenvolvimento do embrião												P		
	Mórula			Blastocisto inicial			Blastocisto			Blastocisto expandido					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Embr	Local	Emb*local
TC final (prenhes/inovuladas)	. .	50,00% (2/4)	0,00% (0/2)	26,92% (7/26)	25,93% (7/27)	19,35% (6/31)	36,11% (13/36)	38,71% (12/31)	46,67% (14/30)	38,30% (18/47)	48,84% (21/43)	28,95% (11/38)	0,10	0,99	0,64

Tabela 59. Taxa de concepção final de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o grau do corpo lúteo (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Classificação do corpo lúteo									P		
	1			2			3					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	class	Local	class*local
TC final (prenhes/inovuladas)	37,74% (20/53)	40,00% (18/45)	39,13% (18/46)	34,04% (16/47)	40,74% (22/54)	22,22% (10/45)	22,22% (2/9)	33,33% (2/6)	30,00% (3/10)	0,36	0,67	0,69

Tabela 60. Taxa de concepção final de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando a sincronia do cio ente doadora e receptora (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Sincronia receptora-doadora									P		
	0			+1			-1					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	cio	Local	cio*local
TC final (prenhes/inovuladas)	36,71% (29/79)	41,67% (35/84)	37,84% (28/74)	40,00% (6/15)	40,00% (4/10)	7,14% (1/14)	15,38% (2/13)	27,27% (3/11)	16,67% (2/12)	0,17	0,20	0,44

Tabela 61. Taxa de concepção final de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro* para o segmento cranial, médio ou caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, considerando o método de sincronização das receptoras: cio natural, PGF2α ou TETF (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Método de sincronização									P		
	Cio			PGFα			TETF					
	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	Cranial	Médio	Caudal	sincr	Local	sincr*local
TC final (prenhes/inovuladas)	28,57% (2/7)	33,33% (2/6)	0% (0/3)	33,33% (10/30)	44,44% (12/27)	29,63% (8/27)	36,06% (22/61)	42,62% (26/61)	33,33% (20/60)	0,97	0,78	0,99

5.3 Dosagem de progesterona

5.3.1 Receptoras holandesas que receberam embriões produzidos *in vivo*

Ao analisar os dados por meio de regressão logística através do GLIMMIX, SAS e agrupando as concentrações de progesterona em classes observou-se que não houve uma correlação estatística entre as classes de concentração de progesterona, no sétimo dia do ciclo estral, e as taxas de concepção, bem como perda gestacional, como se pode visualizar na Tabela 62. No entanto, é interessante observar que foi diagnosticado prenhez em receptoras com concentrações séricas abaixo de 1ng/mL de progesterona, embora a taxa de concepção para esses animais foi numericamente inferior ao das demais receptoras. Alguns autores consideram tal resultado como um erro na dosagem hormonal (AMBROSE et al., 1999) e desconsideram esses animais. No entanto, há indícios de que a prenhez de receptoras com menos de 1ng/mL são mais frequentes do que se encontra na literatura (OBA, 2009). Normalmente relacionam-se altas concentrações de progesterona com altas taxas de prenhez (AMBROSE et al., 1999; BARUSELLI et al., 2000). Todavia, o presente resultado mostra que possivelmente a quantidade de progesterona que está ligada aos receptores uterinos tem maior importância do que a concentração de progesterona sérica.

Tabela 62. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo*, considerando a classe de concentração de progesterona (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Classe de progesterona (ng/mL)						P
	0 - 0,9	1 - 1,9	2 - 2,9	3 - 3,9	4 - 4,9	>5	
TC inicial (prenhes/inovuladas)	16,67% (3/18)	34,69% (17/49)	28,20% (11/39)	32,26% (10/31)	28,57% (6/21)	55,55% (10/18)	0,28
TC final (prenhes/inovuladas)	16,67% (3/18)	32,65% (16/49)	20,51% (8/39)	16,13% (5/31)	14,29% (3/21)	38,89% (7/18)	0,35
Perda Gestacional (perda/prenhes)	0,00% (0/3)	5,88% (1/17)	27,27% (3/11)	50,00% (5/10)	50,00% (3/6)	30,00% 3/10)	0,45

Por outro lado, quando se analisa a progesterona isoladamente, ou seja, sem agrupar em classes, verifica-se tendência (P<0,10) da concentração hormonal em

influenciar a taxa de concepção inicial e a perda gestacional. Já para taxa de concepção final não se observa essa relação (P=0,65).

Em uma segunda análise, em que modelos de regressão linear foram gerados através do Guided Data Analysis do SAS, encontrou-se uma tendência (P=0,07) de que a concentração de progesterona influencia na taxa de concepção inicial, entretanto, foi encontrado um R^2 ajustado de 0,01, o que demonstra que somente 1% da prenhez é devido à concentração de progesterona no sétimo dia do ciclo estral (Figura 14). Dessa maneira, obteve-se a seguinte equação da reta para probabilidade de taxa de concepção inicial:

Concepção= 22,94 + 3,25 x Progesterona

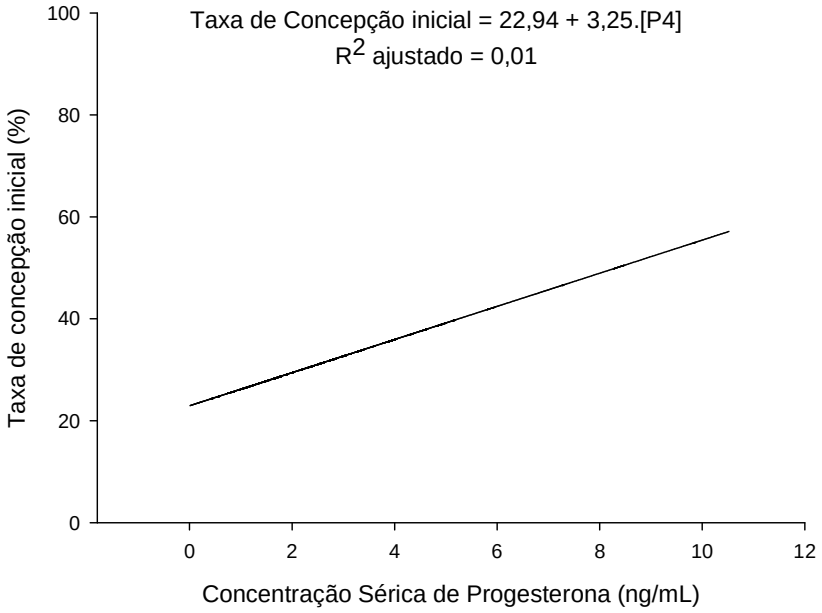


Figura 14. Gráfico da probabilidade da taxa de concepção inicial das receptoras holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo*, de acordo com a concentração sérica de progesterona (P=0,07) (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

Para taxa de concepção final não foi verificada diferença estatística (P= 0,47, R^2= -0,003) de acordo com a concentração de progesterona. No entanto para perda gestacional notou-se que a progesterona influencia (P=0,01, R^2= 0,13) de maneira quadrática, ou seja, tanto o excesso, quanto a baixa concentração de progesterona

interferem de forma negativa na perda gestacional, conforme pode ser visualizado na Figura 15.

A equação da reta para probabilidade de perda gestacional obtida com os resultados do presente trabalho está exposta a seguir:

Perda gestacional= -27,53 + 28,51 x Progesterona – 2,63 x Progesterona ^{2}

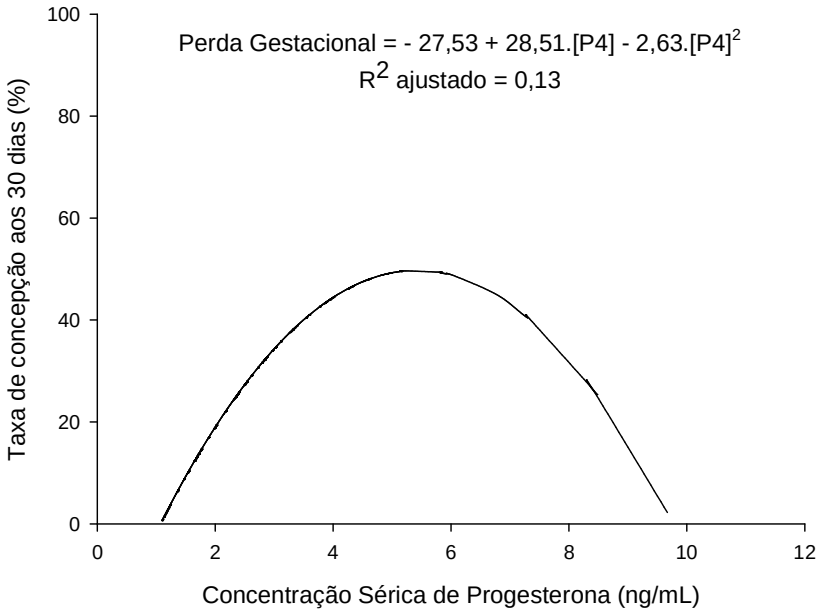


Figura 15. Gráfico da probabilidade de perda gestacional das receptoras holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo*, de acordo com a concentração sérica de progesterona (P=0,07) (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

Essa influência negativa de altas concentrações de progesterona já foi descrita anteriormente por NOGUEIRA et al. (2004), que verificaram que concentrações de progesterona acima de 6 ng/mL foram prejudiciais para as taxas de prenhez em receptoras de embriões. Fato que talvez possa indicar novamente que a progesterona que está ligada aos receptores intra-uterinos seja mais relevante do que a concentração sérica desse hormônio.

DEMETRIO et al. (2007) realizaram a dosagem hormonal na mesma propriedade do presente estudo e não encontraram influência da concentração de P4 na taxa de

concepção de receptoras no sétimo dia do ciclo estral. Sabe-se que a progesterona controla o ambiente uterino e influencia o desenvolvimento embrionário (MANN & LAMMING, 2001; GREEN et al., 2005), ela também altera o ambiente do oviduto e age diretamente nos primeiros dias de crescimento do concepto, consequentemente aumentando a liberação de interferon-τ (GREEN et al., 2005; MANN et al., 2006). Com isso, acredita-se que a progesterona seja mais importante durante a primeira semana do desenvolvimento embrionário, ou seja, mais relevante nas doadoras do que nas receptoras.

Ao verificar a influência do local de inovulação nas receptoras em que foram realizadas as dosagens hormonais, verificou-se uma diferença significativa na taxa de concepção inicial (P=0,04) e uma tendência (P=0,08) na taxa de concepção final e perda gestacional. Esse fato já era esperado, uma vez que as amostras de sangue foram colhidas somente durante o inverno, época em que se verificou uma melhor taxa de concepção inicial e final quando os embriões foram depositados na porção caudal em relação à cranial.

Contudo, notou-se ausência de interação entre o local de inovulação e a concentração de progesterona para taxa de concepção inicial (P=0,30), taxa de concepção final (P=0,53) e para perda gestacional (P=0,13). Esse achado é muito importante, uma vez que demostra que independente da concentração de progesterona sistêmica, a taxa de prenhez de acordo com o local de inovulação não se altera.

Como já foi discutido nos itens 5.1.5 e 5.2.2.3, na literatura há indicativos de que o tamanho do corpo lúteo influencia a concentração de progesterona. Os dados obtidos no presente experimento mostraram que realmente há uma correlação negativa baixa (r= - 0,14) e uma tendência (P=0,06) em CL de grau três, ou seja, de menor tamanho, em produzir uma menor quantidade de progesterona.

Relativamente à concentração de progesterona e a produção de leite, notou-se ausência de correlação entre essas duas variáveis (P=0,94, r= 0,005). Na literatura há relatos que vacas leiteiras de alta produção apresentam uma menor concentração plasmática de progesterona (VASCONCELOS et al., 1999) uma vez que possuem um

elevado fluxo sanguíneo para o fígado e assim, uma alta metabolização desse hormônio (SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003).

Com a finalidade de buscar uma explicação para a diferença na taxa de concepção encontrada entre as receptoras que foram sincronizadas com protocolo para TETF e as que manifestaram estro natural ou induzido por PGF2α (item 5.1.4), analisou-se se a concentração de progesterona variou de acordo com o tratamento. No entanto, os dados mostraram que não houve diferença (P=0,96) na concentração de progesterona em relação ao método de sincronização das receptoras.

5.3.2 Receptoras mestiças que receberam embriões produzidos *in vitro*

Ao agrupar as concentrações de progesterona em classes observou-se que não houve uma correlação estatística entre as classes de concentração de progesterona no sétimo dia do ciclo estral e as taxas de concepção, bem como perda gestacional, como se pode visualizar na Tabela 63. Nesses animais também se diagnosticou prenhez mesmo com concentrações séricas de P4 inferiores a 1ng/mL.

Tabela 63. Taxa de concepção inicial, final e perda gestacional de receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro*, considerando a classe de concentração de progesterona (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Classe de progesterona (ng/mL)					P
	0 - 0,9	1 - 1,9	2 - 2,9	3 - 4,9	>5	Classe P4
TC inicial (prenhes/inovuladas)	28,57% (4/14)	52,00% (13/25)	42,86% (9/21)	42,86% (6/14)	41,67% (5/12)	0,47
TC final (prenhes/inovuladas)	21,43% (3/14)	36,00% (9/25)	38,09% (8/21)	42,86% (6/14)	41,67% (5/12)	0,10
Perda Gestacional (perda/prenhes)	25,00% (1/4)	30,77% (4/13)	11,11% (1/9)	0,00% (0/6)	0,00% (0/5)	0,08

Quando se analisa a progesterona isoladamente, ou seja, sem agrupar em classes, verifica-se que não há diferença (P>0,10) na taxa de concepção inicial e final de acordo com a progesterona. No entanto, nota-se uma tendência (P=0,08) da progesterona influenciar nos resultados de perda gestacional.

Através do Guided Data Analysis do SAS, também não se observou uma influência da progesterona na taxa de concepção inicial (P=0,70, R^2= -0,01) e final

(P=0,22, R^2= 0,01). Considerando a perda gestacional encontrou-se uma tendência (P=0,07, R^2= 0,06) de influência da progesterona, uma vez que conforme aumenta a progesterona tente a diminuir a mortalidade. Nesse caso, os valores máximos de P4 dosados não ultrapassaram 6ng/mL, o que explica a ausência de toxicidade pelo excesso de hormônio, como ocorreu com as receptoras holandesas. Observa-se esse fato na Figura16 e através da seguinte equação da reta de probabilidade de perda gestacional:

Perda gestacional=32,23 – 5,87 x Progesterona

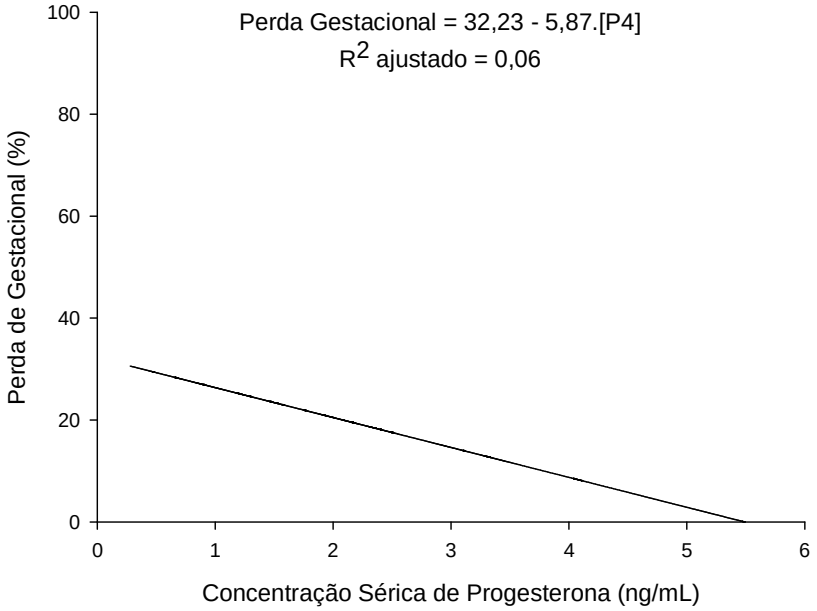


Figura 16. Gráfico da probabilidade de perda gestacional das receptoras mestiças após transferência de embriões produzidos *in vitro*, de acordo com a concentração sérica de progesterona (P=0,07) (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

Nos animais em que foi dosada a progesterona notou-se que o local de inovulação isoladamente não influenciou nas taxas de concepção inicial (p=0,50), final (P=0,21) e perda gestacional (P=0,79), como era de se esperar, uma vez que na totalidade das receptoras inovuladas com embriões produzidos *in vitro* também não ocorreu essa diferença (item 5.2.1). Da mesma forma, não se verificou interação (P>0,05) entre o local de inovulação e concentração de progesterona para os resultados reprodutivos.

Similarmente ao que ocorreram com as receptoras holandesas, as novilhas mestiças apresentaram uma correlação negativa baixa (P=0,03, r= -024) entre o tamanho do corpo lúteo e a concentração sérica de P4. Verificou-se que CL de grau 1 produziu mais progesterona do que o de grau 3.

O método de sincronização da receptora, cio natural, induzido pela aplicação de PGF2α ou tratamento para TETF, também não influenciou na concentração sérica de progesterona.

5.4 Morfologia uterina

5.4.1 Microscopia de luz

As seis porções, craniais, médias e caudais dos cornos uterinos ipsilateral e contralateral ao corpo lúteo, das novilhas que foram abatidas na fase no sexto, sétimo e oitavo dias do ciclo estral (fase progestacional), apresentaram um padrão morfológico similar.

No útero das novilhas puderam-se observar as três principais camadas. Internamente o endométrio (E) ou mucosa que reveste a luz uterina (L), seguido pelo miométrio (M) ou muscular e finalizando com a camada de revestimento externo, o perimétrio ou serosa (S) (Figuras 17 a 19), similar ao que já foi descrito anteriormente (SCHWARZE & SCHRÖDER, 1970; PRIEDKALNS & LEISER, 1998; DYCE, SACK, WENSING, 2004; KÖNIG & LIEBICH, 2004).

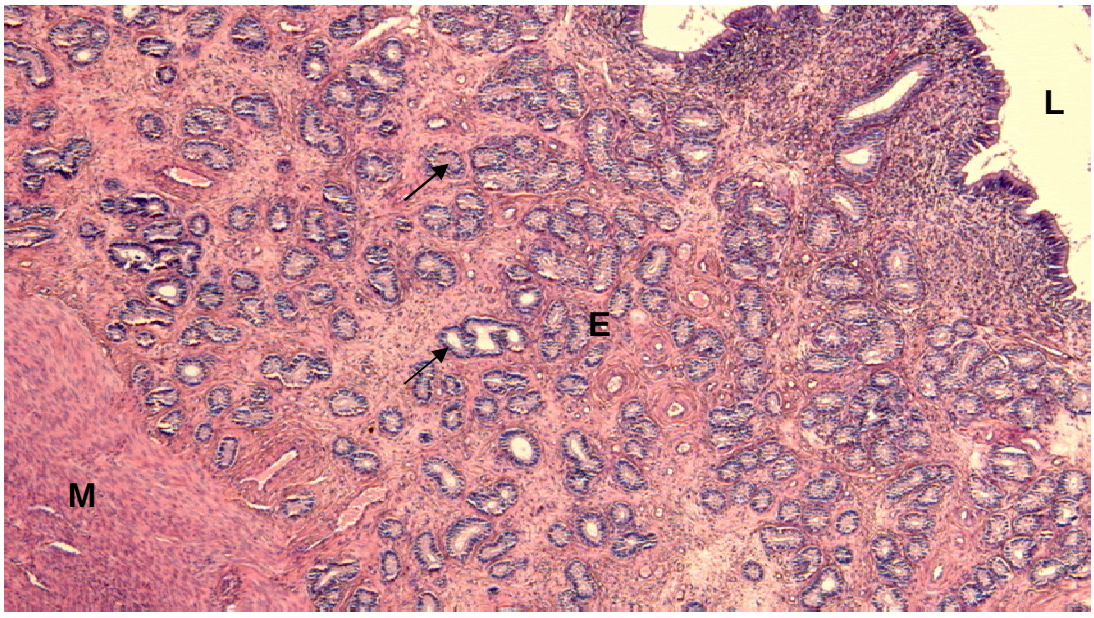


Figura 17. Fotomicrografia de corte transversal da porção cranial do corno uterino contralateral ao corpo lúteo de novilha no oitavo dia do ciclo estral, mostrando a luz uterina (L), o endométrio (E) com as glândulas endometriais (setas) e a muscular (M). HE, 50x (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

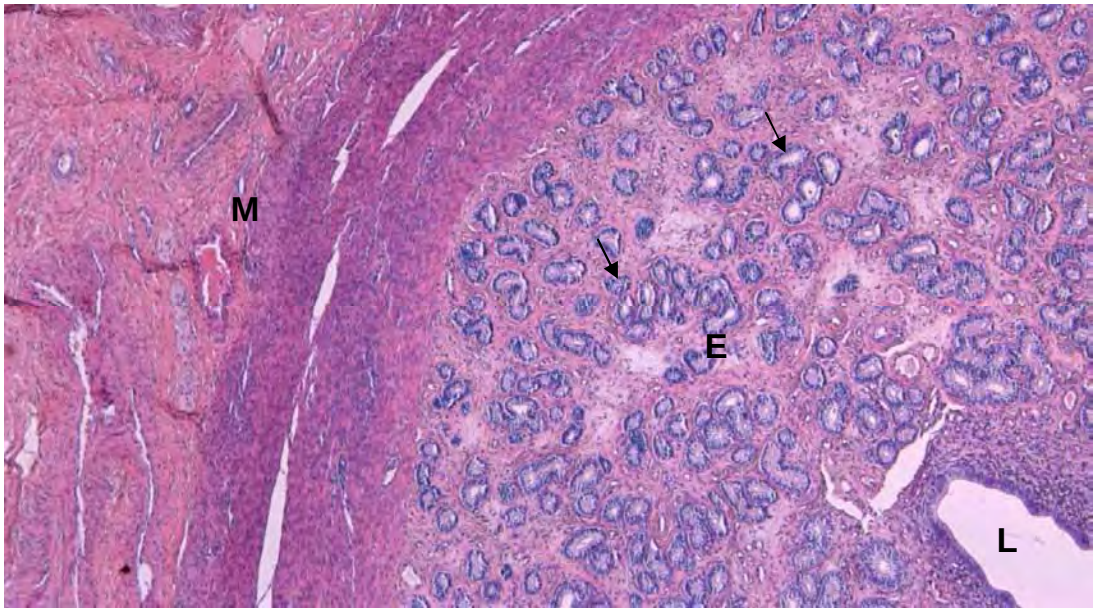


Figura 18. Fotomicrografia de corte transversal da porção média do corno uterino contralateral ao corpo lúteo de novilha no oitavo dia do ciclo estral, mostrando a luz uterina (L), o endométrio (E) com as glândulas endometriais (setas) e a muscular (M). HE, 50x (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

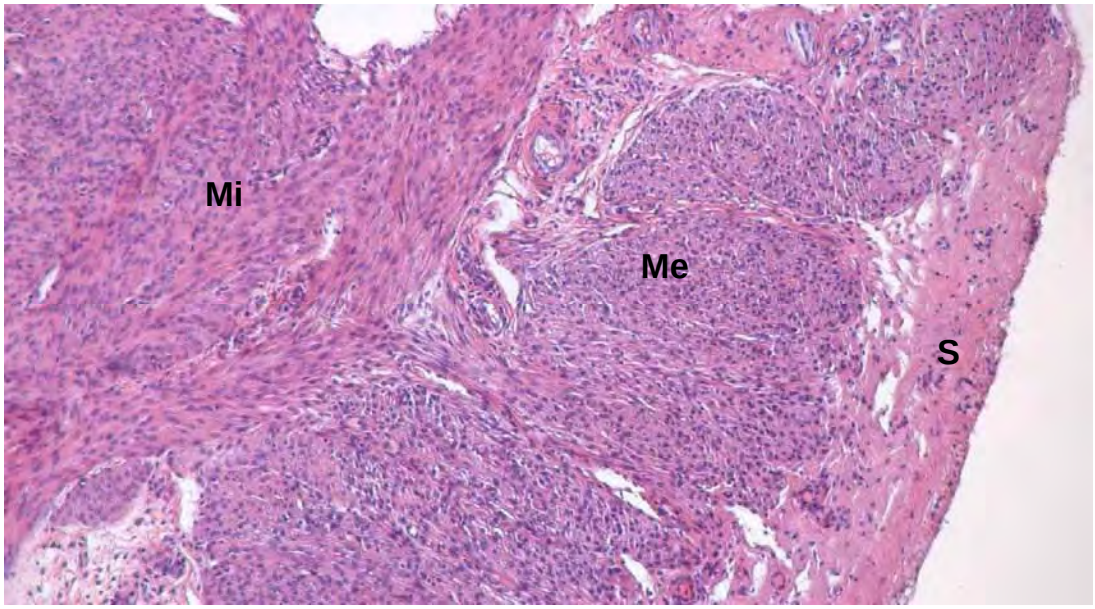


Figura 19. Fotomicrografia de corte transversal da porção média do corno uterino contralateral ao corpo lúteo de novilha no sétimo dia do ciclo estral, mostrando a muscular interna com fibras circulares (Mi), a muscular externa com fibras longitudinais (Me) e a serosa (S). HE, 100x (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009)..

Como já era de se esperar, pois fora descrito por outros autores (BANKS, 1992; PRIEDKALNS & LEISER, 1998; MONTEIRO et al., 2003), o endométrio revelou-se composto principalmente por um epitélio cilíndrico simples ciliado e não-ciliado, intercalado com algumas porções de epitélio pseudoestratificado, com núcleo em diferentes posições. Logo abaixo ao epitélio há uma lâmina basal bastante delgada (Figura 20). Não houve diferença na caracterização do epitélio em relação aos locais do útero onde os fragmentos foram colhidos (porções craniais, médias e caudais do corno uterino contra e ipsilateral ao CL) e em relação ao dia do ciclo estral em que as novilhas foram abatidas. Essa importante observação suporta a hipótese inicial do presente trabalho, uma vez que se esperava ausência de variações histológicas entre as três porções estudadas. E sustenta os resultados obtidos na prática, com as transferências de embriões, de que se pode inovular em qualquer local do corno uterino ipsilateral ao CL sem comprometer os resultados, já que as características morfofuncionais favorecem todo corno uterino ipsilateral ao CL.

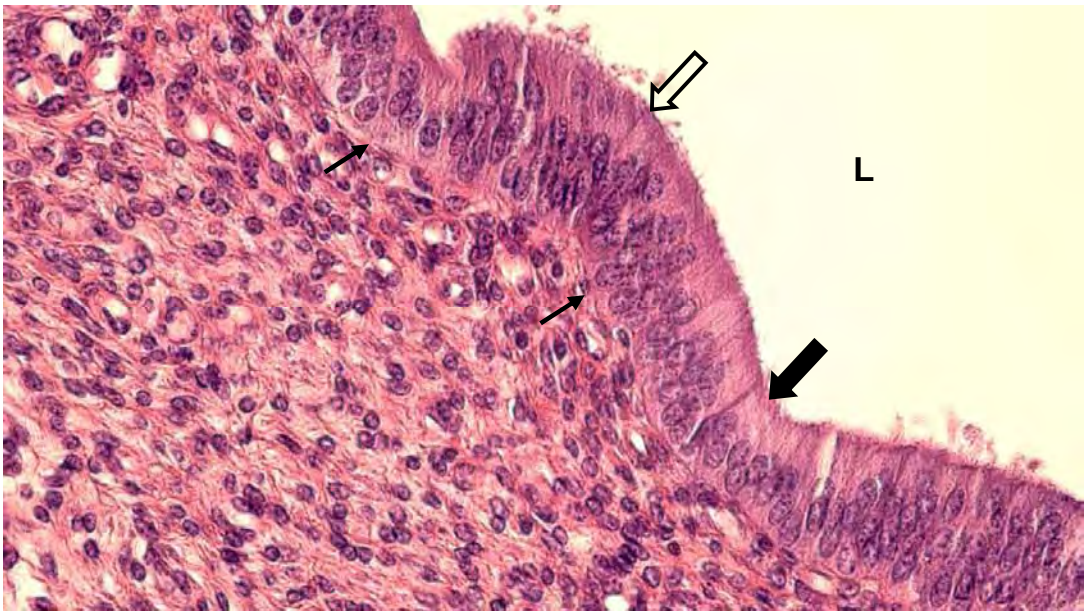


Figura 20. Fotomicrografia de corte transversal da porção cranial do corno uterino contralateral ao corpo lúteo de novilha no sétimo dia do ciclo estral, mostrando a luz uterina (L), o epitélio cilíndrico simples (seta cheia) e o pseudoestratificado (seta vazada), além da lâmina basal (seta pequena). HE, 400x (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

Na porção sub-epitelial do endométrio encontrou-se dois estratos: o estrato compacto, altamente celularizado, e o esponjoso em que há uma densidade celular menor (Figura 21). Ambos formam uma espessa área de tecido conjuntivo frouxo composto por fibras elásticas e colágenas envolvendo vasos sanguíneos (artérias e veias) de diferentes calibres (Figura 22 e 23) e glândulas endometriais. Em relação aos vasos sanguíneos, aparentemente notou-se uma diferença em relação à quantidade, de acordo com o corno uterino (ipsilateral ou contralateral ao CL) em que o fragmento foi colhido.

Figura 21. Fotomicrografia de corte transversal da porção cranial do corno uterino contralateral ao corpo lúteo de novilha no oitavo dia do ciclo estral, mostrando a luz uterina (L), o estrato compacto (Ec) e o esponjoso do endométrio (Ee) e as aberturas das glândulas endometriais (setas). HE, 50x (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

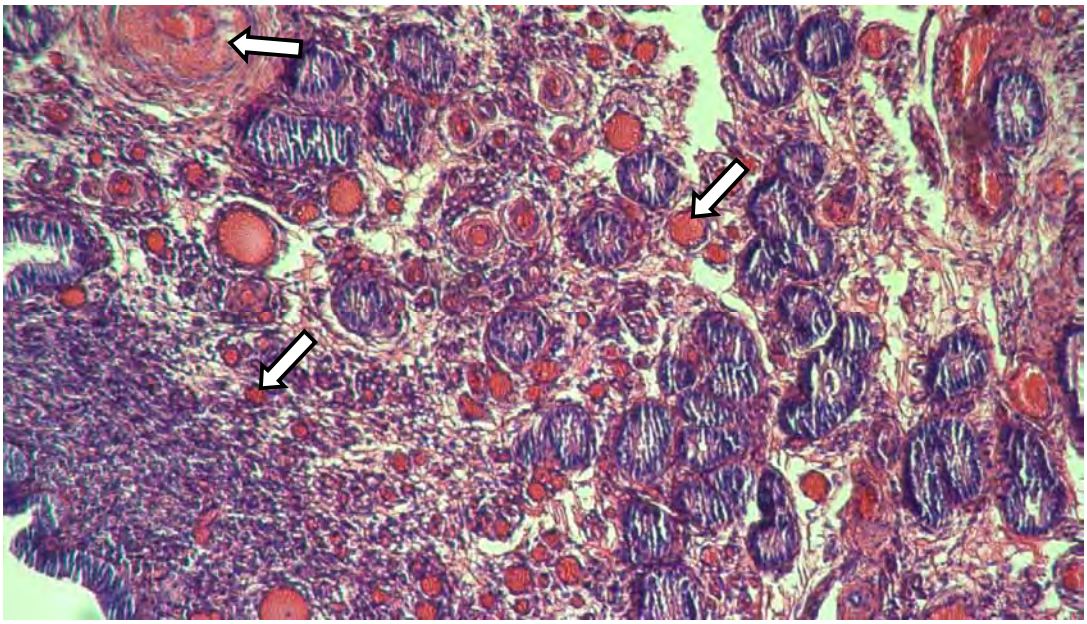


Figura 22. Fotomicrografia de corte transversal da porção média do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo de novilha no sexto dia do ciclo estral, mostrando os vasos sanguíneos (setas). HE, 100x (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

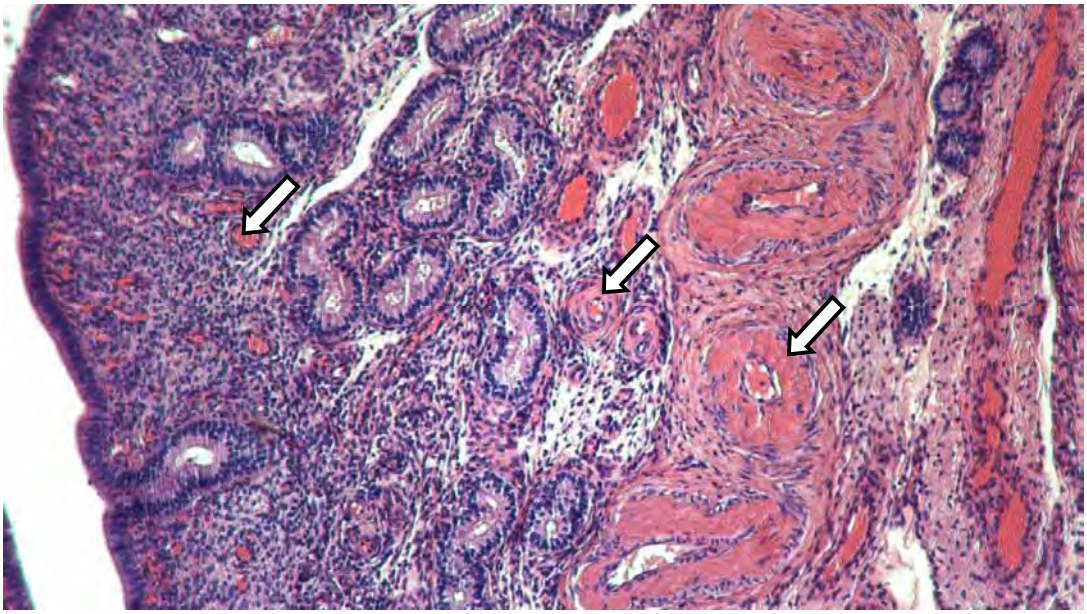


Figura 23. Fotomicrografia de corte transversal da porção caudal do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo de novilha no sexto dia do ciclo estral, mostrando os vasos sanguíneos (setas). HE, 100x (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

As glândulas endometriais apresentaram tamanhos e formatos irregulares, como pode ser visualizado nas Figuras 17 e 18, e são compostas por células com citoplasma

róseo e núcleos posicionados na porção mediana. O epitélio glandular mostrou-se cilíndrico simples com áreas ciliadas e não-ciliadas, como ilustram as Figuras 24 e 25. Esse padrão glandular já foi descrito por MONTEIRO et al. (2003), no entanto somente a porção média do corno uterino tinha sido analisada. As glândulas endometriais depositam seus produtos de secreção na luz uterina, como se pode observar na Figura 21. O tamanho e quantidade das glândulas endometriais não diferiram em relação às três porções uterinas observadas, tanto do lado adjacente ao corpo lúteo quanto do lado oposto ao mesmo, conforme era esperado na hipótese do presente projeto. Da mesma forma, nenhuma alteração foi encontrada em relação ao dia do ciclo estral em que as novilhas foram abatidas.

A camada muscular é bastante espessa e composta por duas subcamadas, uma interna de fibras circulares e outra externa de fibras longitudinais. Em alguns locais há presença de feixes de fibras oblíquas (Figura 17 a 19 e 26). A serosa, a camada mais externa, apresenta-se espessa e constituída basicamente por tecido conjuntivo frouxo e vasos sanguíneos (Figura 19 e 26). Essas características se mostraram semelhantes ao descrito anteriormente (DELLMANN & BROWN, 1982; BANKS, 1992; PRIEDKALNS & LEISER (1998).

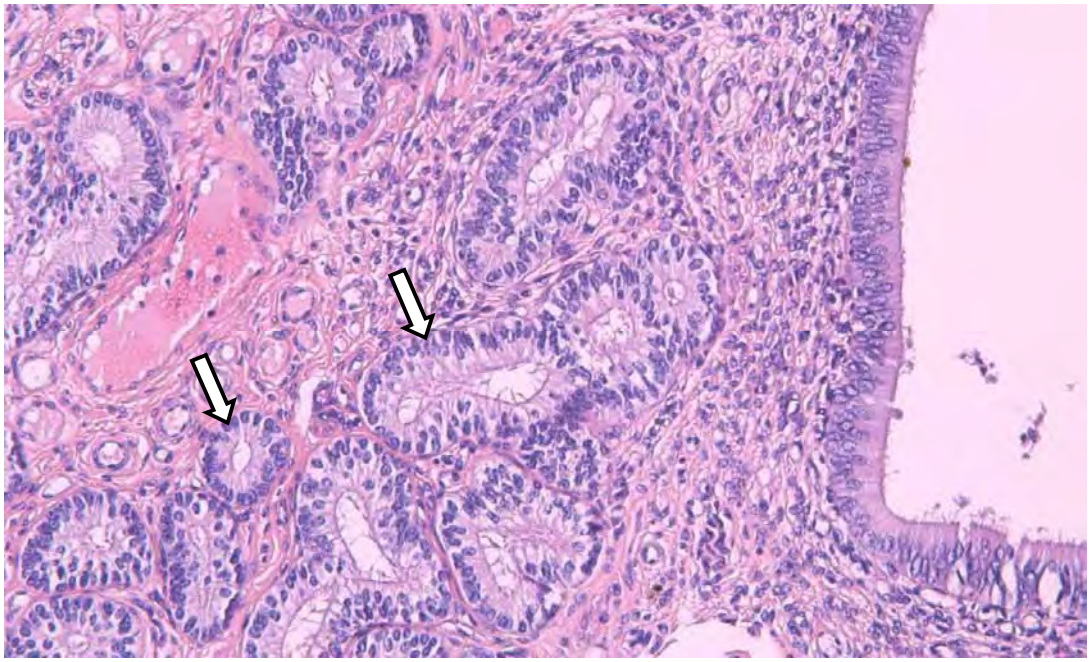


Figura 24. Fotomicrografia de corte transversal da porção média do corno uterino contralateral ao corpo lúteo de novilha no oitavo dia do ciclo estral, mostrando as glândulas endometriais (setas). HE, 200x (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

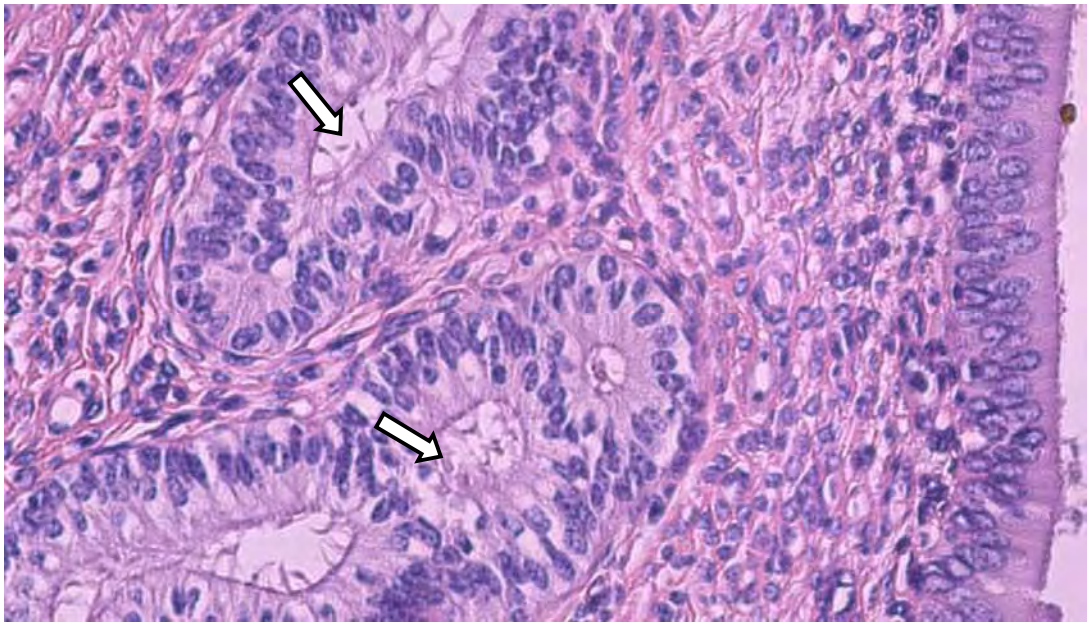


Figura 25. Fotomicrografia de corte transversal da porção média do corno uterino contralateral ao corpo lúteo de novilha no oitavo dia do ciclo estral, mostrando o epitélio glandular cilíndrico simples com cílios (setas). HE, 400x (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

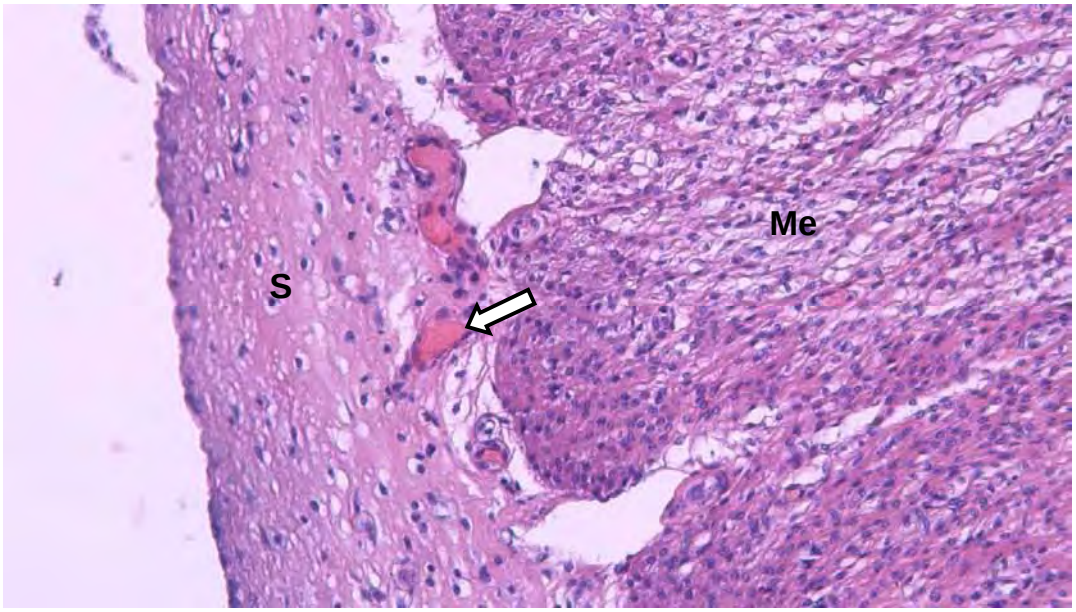


Figura 26. Fotomicrografia de corte transversal da porção média do corno uterino ipisilateral ao corpo lúteo de novilha no oitavo dia do ciclo estral, mostrando a muscular externa (Me), a serosa (S) e vasos sanguíneos (seta). HE, 20x (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

5.4.1.1 Contagem dos vasos sanguíneos

Após a observação geral de todas as lâminas histológicas notou-se uma aparente diferença na quantidade de vasos em relação aos locais do corno uterino, por isso fez-se a contagem dessas estruturas e subseqüente análise estatística.

Uma primeira análise estatística demonstrou que o dia do ciclo estral das novilhas não interferiu significativamente (P=0,93) na quantidade de vasos sanguíneos. Fato que sustenta os dados encontrados na prática uma vez que, para as novilhas mestiças que receberam embriões produzidos *in vitro,* não houve diferença nas taxas de concepção de acordo com o dia da manifestação do estro e não ocorreu interação entre essa variável e o local de inovulação no corno uterino (itens 5.2.2.4 e 5.2.4.4). Considerando esse resultado foi realizada uma segunda análise em que o dia da manifestação de estro foi retirado do modelo estatístico.

Nessa segunda análise verificou-se que existe uma interação significativa (P<0,01) entre as três porções do corno uterino e a presença ou ausência do corpo lúteo. Com isso, a interpretação da significância desses dois termos isoladamente fica prejudicada. No entanto, ao analisar os resultados de acordo com a interação, verificou-

se que no corno em que há presença do corpo lúteo não houve diferença na quantidade de vasos, ou seja, há estatisticamente uma mesma quantidade de vasos sanguíneos que nutrem as porção cranial (130,98 ± 4,64), média (126,09± 4,64) e caudal (119,91± 4,64) adjacentes ao CL. Em contra partida, o corno uterino oposto ao CL há diferença (P<0,01) na quantidade de vasos sanguíneos entre os três terços uterinos, como pode ser visto na Tabela 64. Nesta mesma tabela pode-se observar que comparando as mesmas porções ipsilateral e contralateral ao corpo lúteo há uma maior vascularização no terço cranial e caudal do lado do CL em relação aos mesmos locais do lado oposto (P<0,01). Relativamente à porção média não foi notada diferença significativa entre os dois cornos uterinos (P=0,96).

Tabela 64. Contagem de vasos sanguíneos (média ± erro padrão) do útero de novilhas mestiças abatidas no sexto, sétimo ou oitavo dia do ciclo estral, de acordo com as porções craniais, médias e caudais do corno uterino ipsilateral e contralateral ao corpo lúteo (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

	Porção do útero		
	Cranial	Média	Caudal
Ipsilateral ao CL	130,98 ± 4,64 ^{A}	126,09± 4,64	119,91± 4,64 ^{A}
Contralateral ao CL	93,65± 4,64$^{b\ B}$	120,67± 4,64^{a}	71,11± 4,64$^{c\ B}$

Letras minúsculas distintas em uma mesma linha diferem significativamente entre si para diferentes locais do útero, com P<0,01.
Letras maiúsculas distintas em uma mesma coluna diferem significativamente entre si para ausência ou presença de CL em determinado local do útero, com P<0,01.

Essas informações são muito relevantes pois a maior quantidade de vasos sanguíneos no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo em relação ao corno contralateral sustenta as afirmações de que o embrião deve ser depositado no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (NISWENDER et al., 1970; GINTHER, 1974; SREENAN, 1976; TERVIT et al., 1977; SIEDEL, 1980), uma vez que, por ter essa menor vascularização no corno contralateral, pode-se supor que há uma menor nutrição para o concepto.

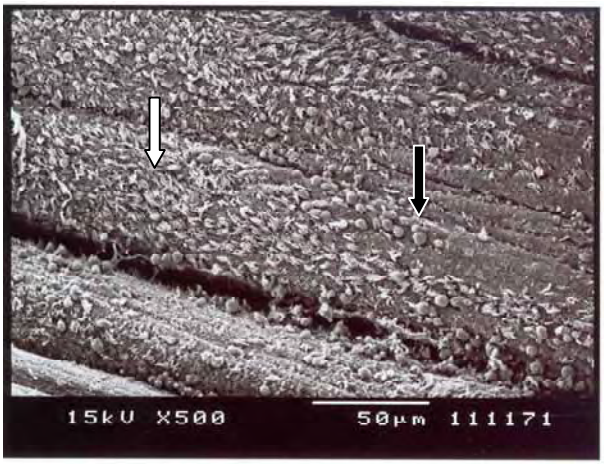
Por outro lado, a similar quantidade de vasos nos três segmentos do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo apóia a hipótese inicial de que não há alteração morfofuncional entre essas três porções que comprometam o ambiente uterino e consequentemente a concepção. Esse resultado também sustenta os dados obtidos na

prática, uma vez que, com os embriões produzidos *in vivo* (no verão) e *in vitro* não houve diferença nas taxas de concepção quando as inovulações foram realizadas nas três porções uterinas estudadas. Esse dado também pode sugerir que, durante o inverno, a melhor taxa de concepção quando os embriões foram depositados na porção caudal em relação à cranial seja realmente devido à menor manipulação uterina, uma vez que a quantidade de vasos que nutrem esses locais são as mesmas.

No entanto, há uma outra abordagem a ser discutida em relação à contagem de vasos sanguíneos; o embrião é 100% *non-self* para a receptora, ou seja, seu material genético é totalmente diferente. Com isso, acredita-se que boa parte da perda gestacional seja decorrente da ação das células do sistema imunológico contra o embrião recém transferido (Érica 2009, comunicação pessoal). Com isso, a porção caudal, por ter uma quantidade numericamente inferior de vasos sanguíneos em relação às demais do corno uterino ipsilateral ao CL, pode ser o local ideal para se inovular uma vez que essa menor vascularização culmina em uma menor quantidade de células de defesa que estarão agindo nesse local do útero. Essa constatação pode ser uma alternativa que explica a melhor taxa de concepção obtida no inverno ao se depositar o embrião na porção caudal.

5.4.2 Microscopia eletrônica de varredura

A superfície endometrial do útero das novilhas abatidas simulando uma receptora de embrião apresentou-se revestida por dois tipos de células: as ciliadas e as não-ciliadas ou secretoras, fato similar ao útero das porcas (WU et al., 1976) e das éguas (BAGDADI et al., 2004). As células secretoras ocupam a maior parte da superfície endometrial e são cobertas por uma camada de microvilos com variadas densidades. Já as células ciliadas estão presentes em menores quantidades e se encontram na maioria das vezes agrupadas em determinadas áreas (Figura 27 a 30). Esse achado reforça a característica epitelial visualizada na histologia (item 5.4.1), já que se encontrou presença de cílios em algumas áreas.



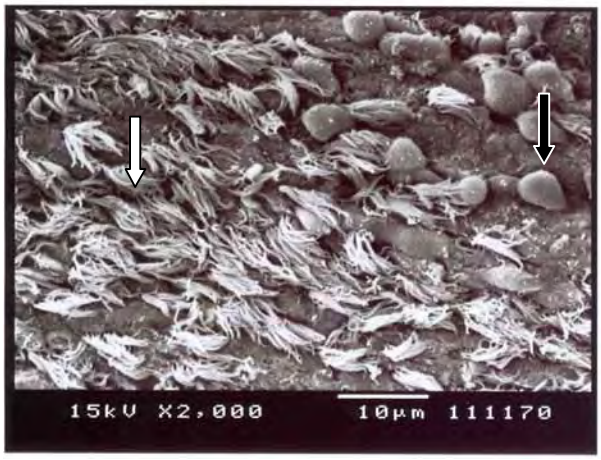


Figura 27 e 28. Eletromicrografia de varredura do endométrio, na porção média do corno uterino contralateral ao corpo lúteo, de novilha no oitavo dia do ciclo estral, na qual se verifica células ciliadas (seta branca) e não ciliadas (seta preta). 500X (esquerda), 2000x (direita) (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009)..

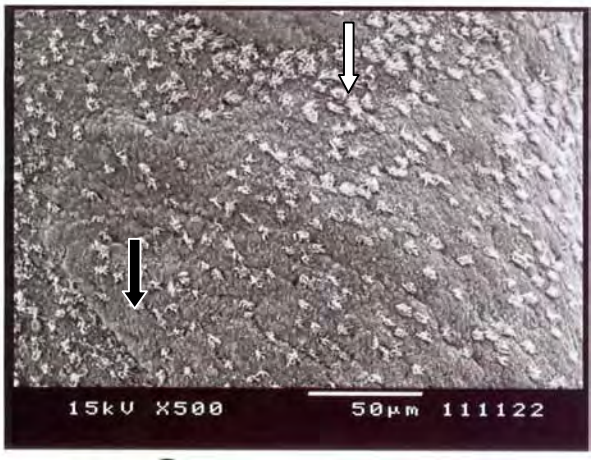


Figura 29 e 30. Eletromicrografia de varredura do endométrio, na porção média do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, de novilha no oitavo dia do ciclo estral, na qual se verifica células ciliadas (seta branca) e não ciliadas (seta preta). 500X (esquerda), 2000x (direita) (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

A questão da migração intra-uterina (item 3.3) pode ser repensada a partir dessa presença dos cílios e dos microvilos ao longo do endométrio, uma vez que a existência desses componentes possibilita inferir que haja uma movimentação do embrião dentro do corno uterino. Caso isso ocorra, fica claro que o local de deposição do embrião não implica necessariamente no sítio em que ele irá permanecer para sua nutrição ou fixação. E mostra que, embora a migração de um corno para o outro seja considerada

rara (VALENCIA et al., 1981; GALVAN et al., 1982), ela realmente pode acontecer ao longo do corno uterino ipsilateral ao CL.

Da mesma maneira que BAGDADI et al. (2004) descreveu a organização celular no endométrio das éguas, nas novilhas também foi observada uma sutil disposição em formato de mosaico das células secretoras, como pode ser observado nas Figuras 31 e 32.

Similar ao que foi encontrado à microscopia de luz, através da MEV também foi possível notar a presença de vasos sanguíneos e hemácias dispersas, o que revela uma intensa vascularização do endométrio (Figura 33 e 34). No entanto, com a histologia pôde-se quantificar os vasos, fato que não é tão confiável na MEV devido ao grande aumento utilizado.

Figura 31. Eletromicrografia de varredura do endométrio, na porção caudal do corno uterino contralateral ao CL, de novilha no sétimo dia do ciclo estral, evidenciando células secretoras organizadas em mosaico (seta branca). 2000X (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

Figura 32. Eletromicrografia de varredura do endométrio, na porção caudal do corno uterino ipsilateral ao CL, de novilha no oitavo dia do ciclo estral, evidenciando células secretoras organizadas em mosaico (seta branca). 2000X (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

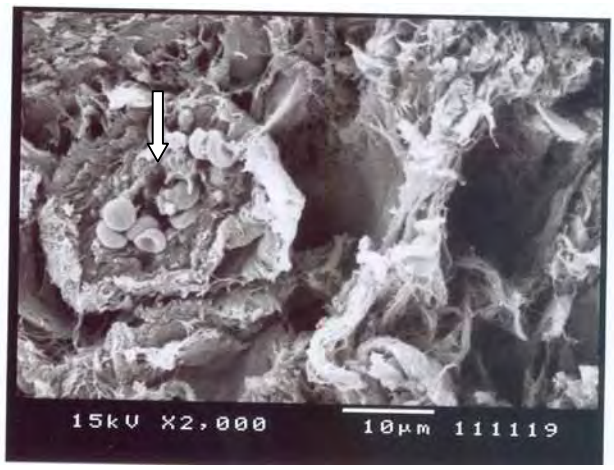


Figura 33. Eletromicrografia de varredura do endométrio, na porção cranial do corno uterino ipsilateral ao CL, de novilha no sexto dia do ciclo estral, evidenciando um vaso sanguíneo (seta branca). 2000X (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

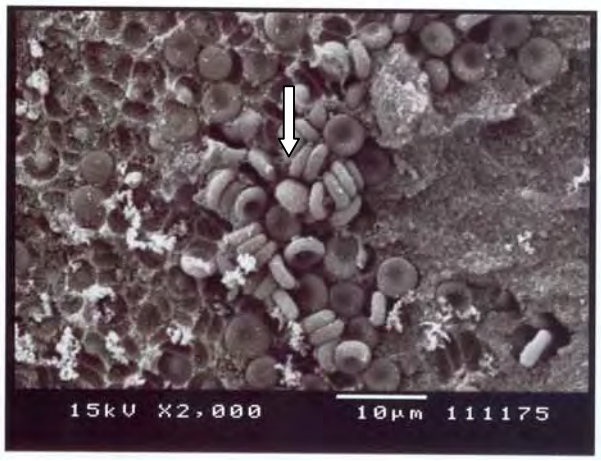


Figura 34. Eletromicrografia de varredura do endométrio, na porção cranial, do corno uterino ipsilateral ao CL, de novilha no oitavo dia do ciclo estral, na qual se verifica hemácias (seta branca). 2000X (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

Por meio da MEV não foi observada diferença entre as seis porções uterinas analisadas. Da mesma forma, não se notou diferença na superfície epitelial entre as novilhas que manifestaram estro no sexto, sétimo ou oitavo dia do ciclo estral, como pode ser observado nas Figuras 35 e 36.

Figura 35. Eletromicrografia de varredura do endométrio, na porção cranial do corno uterino ipsilateral ao CL, de novilha no sexto dia do ciclo estral. 2000X (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

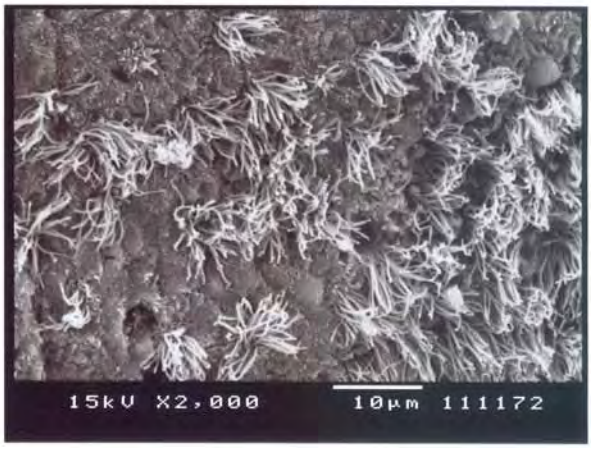


Figura 36. Eletromicrografia de varredura do endométrio, na porção média do corno uterino contralateral ao CL, de novilha no sétimo dia do ciclo estral. 2000X (FCAV – UNESP, Campus de Jaboticabal/2009).

Esses achados, juntamente com os obtidos através da microscopia de luz, indicam que a hipótese inicial do trabalho é verdadeira, uma vez que não houve diferença morfofuncional entre as porções cranial, média e caudal do corno uterino ipsilateral ao CL que possam favorecer ou prejudicar o ambiente uterino e consequentemente a concepção. Dessa maneira acredita-se que se pode depositar os embriões em qualquer porção do corno uterino ipsilateral ao CL. Contudo, ressalta-se que se faz necessário a utilização de outras técnicas, como microscopia eletrônica de transmissão e imunohistoquímica, para se estudar mais detalhadamente esses segmentos do corno uterino e determinar com mais precisão se há, ou não, diferença morfofuncional entre eles.

6. CONCLUSÃO

Considerando os resultados obtidos e de acordo com os objetivos delineados pode-se concluir que:

- o local de inovulação no corno uterino ipsilateral ao CL não afetou as taxas de concepção de receptoras holandesas após transferência de embriões produzidos *in vivo* (frescos e congelados/descongelados) durante o verão. Durante o inverno, melhores resultados foram alcançados ao se depositar os embriões na porção caudal em relação à cranial do corno uterino ipsilateral ao CL.
- para embriões produzidos *in vitro* as inovulações nas porções cranial, média ou caudal do corno uterino ipsilateral ao CL não alteraram as taxas de concepção das receptoras mestiças.
- a morfologia dos três segmentos do corno uterino ipsilateral e contralateral ao corpo lúteo de novilhas abatidas simulando uma receptora de embrião mostraram-se semelhantes à microscopia de luz e à eletrônica de varredura. Contudo, a contagem de vasos sanguíneos apresentou uma menor vascularização no corno contralateral em relação ao ipsilateral ao corpo lúteo.
- recomenda-se inovular em qualquer segmento do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo, uma vez que as taxas de concepção não são comprometidas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS[17]

AL-BAGDADI, F.K.; EILTS, B.E.; RICHARDSON, G.F. Scanning electron microscopy of the endometrium of mares infused with gentamicin. **Microscopy and Microanalysis** v.10, p.280–285, 2004.

AMBROSE, J.D.; DROST, M.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J.J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; THATCHER, M.J.; KASSA, T.; BINELLI, M.; HANSEN, P.J.; CHENOWETH, P.J.; THATCHER, W.W. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n.11, p.2369-2376, 1999.

BANKS, W.J. Sistema Reprodutor Feminino. In: --- **Histologia Veterinária Aplicada**. 2 ed. São Paulo: Manole, cap. 27, p. 565 – 588, 1992.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; BÓ, G.A.; COSTA NETO, W.P.; GRANDINETTI, R.R. Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de P4 e taxa de prenhez. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS.** v. 28, p. 218, 2000.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T; BERBER, R.C.A.; VALENTIM, R.; CARVALHO FILHO, A.F.; COSTA NETO, W.P. Follicular dynamics and pregnancy rate in embryo recipient (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) treated with “Ovsynch” protocol for fixed-time embryo transfer. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 96-106, 2003.

BEAL W.E.; HINSHAW R.H.; WHITMAN S.S. Evaluating embryo freezing method and the site of embryo deposition on pregnancy rate in bovine embryo transfer. **Theriogenology,** v**.**49, p.241, 1998.

[17] De acordo com as normas da ABNT, 2003.

BRAND, A.; AKABWAI, D. Some aspects of non-surgical embryo transfer in cattle. **Veterinary Science Communications**, v.2, p. 23-37, 1978.

BURKE, J. M., DE LA SOTA, R. L., RISCO, C. A., STAPLES, C. R., SCHMITT, E. J.-P., THATCHER, W. W. Evaluation of Timed Insemination Using a Gonadotropin-Releasing Hormone Agonist in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v.79, p. 1385-1393, 1996.

CAIROLI, F>; MOLLO, A.; VERONESI, M.C.; RENAVILLE, B.; FAUSTINI, M.; BATTOCCHIO, M. Comparison between cloprostenol-induced and spontaneous oestrus fertility in dairy cows. **Reproduction Domestic Animals**.v.41, p. 175-179, 2006.

CASIDA L.E., WOODY, C. O, POPE A. L. Inequalityin function of the right and left ovaries and uterine horns of the ewe. **Journal of Animal Science,** v.29, p.48, 1966.

CHARPIGNY G.; REINAUD P.; TAMBY J.P.; CREMINON C.; GUILLOMOT M. Cyclooxygenase-2 unlie clyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1032-1040, 1997.

CHEBEL, R.C.; DEMÉTRIO, D.G.B.; METZGER, J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. **Theriogenology**, v. 69, p. 98–106, 2008

CHRISTIE W.B.; NEWCOMB R.; ROWSON L.E.A. Non-surgical transfer of bovine eggs:Investigation of some factors affecting embryo survival. **The Veterinary Record,** v.106, p.190-193, 1980.

CUTINI A.; TERUEL M.; CABODEVILA J. **Revista Taurus**, v.7, p. 28-39, 2000.

DEMETRIO, D.G.B.; SANTOS, R.M.; DEMETRIO, C.G.B AND. VASCONCELOS, J.L.M. Factors Affecting Conception Rates Following Artificial Insemination or Embryo Transfer in Lactating Holstein Cows **Journal of Dairy Science**.V. 90,:P. 5073–5082, 2007

DELLMANN H.D. & BROWN E. M. **Histologia Veterinária,** p.269-272, 1982.

DOCHI, O.; TAKAHASHI, K.; HIRAI, T.; HAYAKAWA, H.; TANISAWA, M., YAMAMOTO, Y., KOYAMA, H. The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breedind dairy cattle. **Theriogenology**, v.69, p.124-128, 2008.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. Pelve e órgãos reprodutores das fêmeas ruminantes. In**: Tratado de anatomia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.676-678, 2004.

DZUIK P.J. Effect of migration, distribution and spacing of pig embryos on pregnancy and fetal survival. **Journal of Reproduction and Fertility** v.33, p.57-63, 1985.

EALY, A.D.; DROST, M.;HANSEN, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal of Dairy Science**. V.76, p. 2899-2905, 1993.

ELLI, M.; GAFFURI B.; FRIGERIO A.; ZANDERDELLI M.; COVINI, D.; CANDIANI, M.; VIGNALI, M. Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. **Reproduction**, v.121, p. 151-154, 2001.

GALVAN A.; VALENCIA .I; CONSTANTINO DL. Observations on genital organs of beef cows slaughtered at an abattoir. **Veterinaria –Mexico**, v.13, p.7-12, 1982.

GARCÍA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P. ; YÁNIZ, J.L.; NOGAREDA, C.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; DE RENSIS., F. Relationship betweem heat

stress during the Peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle. **Theriogenology**, v.65, p.799-807, 2006.

GEMMER K.R.C. Effect of oviductal vein resection on embryonic survival in the ewe and PGF2α challenge during midpregnancy in sheep. **MS Thesis, University of Hawaii**, **Manoa**, p. 88, 1987.

GINTHER O.J. Internal regulation of physiological processes through local venoarterial pathways: a review. **Journal of Animal Science**, v. 39, p.550-564, 1974.

GINTHER O.J.;DEL CAMPO C.H. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the uterus: Cattle. **American Journal Veterinary Research,** v. 35, p.193, 1974.

GREEN, M. P., M. G. HUNTER, AND G. E. MANN. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on d 5 of pregnancy in dairy cows. **Animal Reproduction. Science** .v. 88, p.179–189, 2005.

GRUNERT, E.; GREGORY, R.M. **Diagnóstico e Terapêutica da Infertilidade na Vaca**. 2 ed. Porto Alegre: Sulina, p.163, 1989.

HAFEZ B., HAFEZ E.S.E. **Reprodução Animal**, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; H. KANAGAWA. Scanning electron microscopy of the bovine reproductive tract in female. **Cornell Veterinary** v.63, p.469-482, 1973.

HANSEN PJ, BLOCK J. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. ***Reprod Fertil Dev***, v.16, p.1-14, 2004.

HASHIZUME, K. Analysis oh uteroplacental-specific molecules and their functions during implantation and placentation in the bovine. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n.1, 2007.

HASLER, J.F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1401-1415, 2001

JOHANNISSON, E.; NILSSON, L. Scanning electron microscopic study of the human endometrium. **Fertility and Sterility**, v.23, p.613-625,1972.

KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. Aparelho genital feminino. In: **Anatomia dos animais domésticos,** 1. ed. São Paulo: Artmed, v. 2, p.141-144, 2004.

LAFI, S. Q., KANEENE, J. B. Epidemiological and economic study of the repeat breeder syndrome in Michigan dairy cattle. I economic modeling. **Prev. Vet. Med**, v. 14, p. 87-98, 1992.

LAWSON, R.A.S.; ROWSON, L.E.A.; MOOR, R.M.; TERVIT, H.R. Experiments on egg transfer in cow and ewe: dependence of conception rate on the transfer procedure and stage of the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility,** v.45, p.101-107, 1975.

LÓPEZ-GATIUS, F. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. **Theriogenology,** v. 63, p. 89-99, 2003.

LUCY, M.C. Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will it End? **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1277-1293, 2001.

MALIK, P.S.; SENGAR, O.P.S.; SINGH, S.N. Structure and abnormalities of the female genitalia in Indian buffalo (*Bos bubalis*). **Angra University Journal of Research Science,** v.9, p.271, 1960.

MANN, G. E., AND LAMMING, G.E. Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in the cow. **Reproduction**, v. 121, p.175–180, 2001.

MANN, G.E.; FRAY, M.D., LAMMING, G.E. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-t production in the cow. **The Veterinary Journal**. V. 171, p. 500-503, 2006.

MATSUDA, H.; OKUDA, K.; IMORI, T. Tissue concentrations of eosinophils in the bovine oviduct and uterus at different stages of the oestrous cycle. **Research in Veterinary Science**, v. 34, p. 369-370, 1983.

MCMILLAN W.H. & PETERSON A.J. Transuterine embryo migration in recipient cattle. **Theriogenology** v.51, p.1577-1586, 1999.

MCNAUGHTAN J.W.; SILCOX R.W.; EGGETT D.L.; ABEL T.; YELLAND R.J.; LINGARD S.; COATES S. The effect of prostaglandin inhibitor rates of heifer embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v.57, p.551, 2002.

MCNAUGHTAN J.W.; SILCOX R.W.; EGGETT D.L.; ABEL T.; YELLAND R.J.; LINGARD S.; COATES S. The effect of prostaglandin inhibitor rates of heifer embryo transfer recipients. **Thesis submitted to the faculty of Brigham Young University**, 2004.

MONTEIRO C.M.; FRIAS E.C.; PERRI S.H.V.; SOUZA W.M. Estudo das características histológicas do útero e tubas uterinas de vacas e novilhas da raça Nelore (*Bos*

primigenius indicus). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.40, p.45-54, 2003.

MOOR, R. M. & ROWSON,L. E. A. local maintenance of the corpus luteum in sheep with embryo transferred to various isolated portions of the uterus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.12, p. 539-550, 1964.

NISWENDER, G.D. & DZIUK, P.J. A study of the unilateral relationship between the embryo and the corpus luteum by egg transfer in the ewe. **Anatomic Research** v.154, p.394, 1970.

NOGUEIRA MF, MELO DS, CARVALHO LM, FUCK EJ, TRINCA LA, BARROS CM. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2alpha and eCG? **Theriogenology.** v. 61, p.1283-90, 2004

OBA, E. **Comunicação pessoal**, 2009.

ODENSVIK K.; DUCHENS M.; GUSTAFSSON H. Does mechanical manipulation of the reproductive organs cause a prostaglandin release in the heifer during embryo transfer? **Acta Veterinary Scand**, v.34, p.219-221, 1993.

OTHANI, S.; OKUDA, K.; NISHIMURA, K.; MOHRI, S. Histological changes in bovine endometrium during the estrous cycle. **Theriogenology**, v.39, p.1033-1042, 1993.

PEIXOTO, M.G.; BERGMANN, J.A.; SUYAMA, E.; CARVALHO, M.R.; PENNA, V.M. Logistic regression analysis of pregnancy rate following transfer of Bos indicus embryos into Bos indicus x Bos taurus heifers. **Theriogenology**, v. 67, N. 2, p. 287-292, 2007.

PRIEDKALNS, J.; LEISER, R. Female reproductive system. In: DELLMANN, H.T., EURELL, J.A.C. **Textbook of veterinary histology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p.247–269, 1998.

REESE J., BROWN N., PARIA B.C., MORROW J., DAY S.K. COX-2 compensation in uterus of COX-1 deficient mice during the pre-implantaton prriod. **Molecular and Cellular Endocrinology,** v.150, p.23-31, 1999.

REIS EL, NASSER LF, NICHI M, BARUSELLI PS. Embryonic mortality in recipients (Bos indicus x Bos taurus) superovulated with eCG. **Acta Scientiae Veterinariae.** v. 32, p.198, 2004.

ROBINSON, R.S.; FRAY, M.D.; WATHES, D.C.; LAMMING, G.E.; MANN, G.E. In vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic traphoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p.470-474, 2006.

RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TEIXEIRA, A. A.; MANCILHA, R. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. 2007a. Taxa de concepção à inseminação artificial e à transferência de embriões em vacas holandesas de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35. p. s1254, 2007a.

RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TEIXEIRA, A. A.; MANCILHA, R. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S., 2007c. Taxa de concepção de embriões frescos e criopreservados transferidos em vacas holandesas de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35. p. s1256, 2007b.

RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TEIXEIRA, A. A.; MANCILHA, R. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA,A. H.; BARUSELLI, P. S. 2007b. Comparação entre a taxa de concepção após inseminação artificial ou a transferência de embriões em vacas

holandesas de alta produção repetidoras de serviço. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35. p. s1255, 2007c.

RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TEIXEIRA, A. A.; MANCILHA, R. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. 2007d. Efeito da sincronia entre a doadora e a receptora na taxa de concepção após transferência de embriões frescos e criopreservados em vacas holandesas de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**,. v. 35. p. s1257, 2007d.

RODRIGUES C. A.; TEIXEIRA, A.A ;SOUZA, A.H.; FERREIRA, R.M.; AYRES, H.;BARUSELLI, P.S. Fatores que influenciam o sucesso de programas de IATF em gado de leite. **Simpósio internacional de reprodução aplicada**, v.3, p.133-144, 2008.

ROTH, Z. Heat stress, the follicle, and its enclosed oocyte: mechanisms and potential strategies to improve fertility in dairy cows. **Reproduction of Domestic Animals.** v.43, p.238-244, 2008.

RUTLEDGE, J.J. Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. **Theriogenology**, v.55, p.105-111, 2001.

SAMUEL, C.A.; RICKETTS, S.W.; ROSSDALE, P.D.; STEVEN, D.H.; THURLEY, K.W. Scanning electron microscope studies of the endometrium of the cyclic mare. **Journal of Reproduction and Fertility** v.27, p.287–292, 1979.

SANGSRITAVONG, S., D. K. COMBS, R. SARTORI, L. E. ARMENTANO, AND M. C. WILTBANK. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17*β* in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. v. 85, p. 2831–2842, 2002.

SARTORI R, SARTOR-BERGFELT R, MERTENS SA, GUENTHER JN, PARRISH JJ, WILTBANK MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2803-2812, 2002 a.

SARTORI, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.153-159, 2007.

SARTORI, R., ROSA, G. J. M., WILTBANK, M. C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating cows and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science** v.85, p. 2813-2822, 2002.

SARTORI, R.; GUMEN, A.; GUENTHER, J.N.; SOUZA, A.H.; CARAVIELLO, D.Z.; WILTBANK, M.C. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 65, n.7, p.1311-1321, 2006.

SCANLON, P.F. Frequency of transuterine migration of embryos in ewes and cows. **Journal of Animal Science**, v.34, p.791-794,1972.

SCENNA, F.N.; EDWARDS, J.L.; HOCKETT, M.E.; SAXTON, A.M.; SCHRICK, F.N. Detrimental effects of prostaglandin F2 Alpha on preimplantation bovine embryos. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, v.73, p.215-226, 2004.

SCHALLENBERGER, E.; SCHAMS, D.; MEYER, H.H. Sequences of pituitary, ovarian and uterine hormone secretion during the first 5 weeks of pregnancy in dairy cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.37, p.277-286, 1989.

SCHRICK, F.N.; HOCKETT, M.E.; TOWNS, T.M.; EDWARDS, J.L.; WEHRMAN, M.E., WERT, N.E. Prostaglandin F2alpha appears to directly influence early embryonic

survival in cattle: Would administration of Flunixin Meglumine be beneficial during embryo transfer? **Proceedings, American Embryo Transfer Association**, p.9, 2000.

SCHWARZE, E.; SCHRÖDER, L. Órganos genitales femeninos. In: **Compendio de anatomia veterinaria: sistema visceral**. Zaragoza: Acribia, v. 2, p. 281-286, 1970.

SEALS, R.C.; LEMASTER, J.W., HOPKINS, F.M.; SCHRICK, F.N. Effects of elevated concentration of prostaglandin F2alpha on pregnancy rates in progestogen supplemented cattle. **Prostaglandins,** v.56, p.377-389, 1998.

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**. Plenum Press, p.323-353, 1980.

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, n. 2, p. 287-297, 2001

SREENAN, J.M. & BEEHAN D. Effect of site of transfer on pregnancy and twinning rates following bilateral egg transfer in cow. **Journal of Reproduction and Fertility,** v.48, p.223-224,1976.

SREENAN J.M. & DISIN M.G. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. **Theriogenology,** v.27, p.99-113, 1987.

SREENAN, J.M. **Proceedings of the 8th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**, Krakow. v.3, p.269, 1976.

STINSON, A. W.; WEBER, A,F.; ZEMJANIS, R. The bovine endometrium-an electron microscopy study. **American Journal of Veterinary Research,** v. 97, p. 1164-1182, 1962.

SUNDARAVADANAN, V.K.; VENKATASWAMY, V. Histology and histochemistry of bovine oviduct**. Mysore Journal of Agricultural Science**, v. 7, p. 650-656, 1973.

TERVIT, H. R.; HAVIK, P.G.; SMITH J.F. Egg transfer in cattle: Pregnancy rate following transfer to the uterine horn ipsilateral or contralateral to the functional corpus luteum. **Theriogenology**, v.7, p.3-10, 1977.

VALENCIA, J.; CONSTANTINO, D.L.;CUEVAS, J. Losses from the slaughter of pregnant cows, ewes and goats. **Memoria Asociacion-Latinoamericana-de-Production-Animal**, v.16, p.129- 130, 1981.

VANDER WIELEN, A.L.; KING, G.J. Intraepithelial lymphocytes in the bovine uterus during the oestrous cycle and early gestation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 457-462, 1984.

VASCONCELOS, J.L.M.; SILCOX,R.W.; ROSA, G.J.M.; PURSLEY, J.R AND WILTBANK, M. C.Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrus cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology** v.52, p.1067–1078, 1999.

VASCONCELOS, J. L. M.; SANGSRITAVONG, S.; TSAI, S.J.; AND WILTBANK, M. C. Acute reduction in serum progesterone concentration after feed intake in dairy cows. **Theriogenology,** v. 60, p.795–807, 2003.

VASCONCELOS, J.L.M.; DEMÉTRIO, D.G.B.; SANTOS, R.M.; CHIARI, J.R.; RODRIGUES C.A.; SÁ FILHO O.G. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. **Theriogenology**, v. 65, p. 192–200, 2006.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de Embriões Bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.915-924, 2007.

WANN, R.A.; RANDEL, R.D. Effect of uterine manipulation 35 days after parturition on plasma concentration of 13,14-dihydro-15-eto prostaglandin F2alpha in multiparous and primiparous Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v.68, p.1389-1394, 1990.

WEEMS, C.W.; LEE, C.N.; WEEMS, Y.S.; VINCENT, D.L. Distribution of progesterone to the uterus and associated vasculature of cattle. **Endocrinology Japon**, v.35, p. 625-630, 1988.

WEEMS, C.W.; WEEMS, Y.S.; LEE, C.N.; VINCENT, D.L. Progesterone in uterine and arterial tissue and in jugular and uterine venous plasma of sheep. **Biology of reproduction,** v.40, p.1-6, 1989.

WILTBANK M, LOPEZ H, SARTORI R, SANGSRITAVONG S, GUMEN A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v.65, p.17-29, 2006.

WILLETT E.L. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. **Science**, v.113, p. 247, 1951.

WU, A. S. H.; CARLSON, S. D.; FIRST N. L. Scanning electron microscopic study of the porcine oviduct and uterus. **Journal of Animal Science** v.42, p.804-809, 1976.

YAMASHINA H. Pregnancy rates and uterine-horn positions for transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Journal of Japanese Veterinary Medical Association**, v. 55, p. 719-722, 2002.

ZANENGA CA, PEDROSO MF. Early pregnancy check by ultrasound scanning in bovine embryo transfer. **ARS Veterinaria** 1995; 11: 151 (Abstract).