

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**FATORES QUE AFETAM A TAXA DE
CONCEPÇÃO APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL
OU TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM VACAS
HOLANDESAS EM LACTAÇÃO**

Daniela Garcia Borges Demétrio

Médica Veterinária

**BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL
2006**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU**

**FATORES QUE AFETAM A TAXA DE
CONCEPÇÃO APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL
OU TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM VACAS
HOLANDESAS EM LACTAÇÃO**

Daniela Garcia Borges Demétrio

Orientador Prof. Ass. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos

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

**BOTUCATU – SÃO PAULO – BRASIL
2006**

Às pessoas que sempre acreditaram em mim...

Minhas fontes de inspiração Valdemar, meu pai e Clarice, minha mãe

Minha eterna companheira e irmã Sarita

Meu grande amor Júlio César

AGRADECIMENTOS

A Deus por sempre me indicar os melhores caminhos.

Ao meu orientador Professor Ass. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos a orientação, o incentivo, a confiança e a amizade.

À Professora Titular Clarice Garcia Borges Demétrio, minha mãe, grande mulher, a ajuda na análise estatística e a imensa paciência.

Ao médico veterinário José Renato Chiari, um amigo, de grande importância na minha formação, responsável pela idéia inicial do projeto e pela coleta dos embriões.

Ao médico veterinário Carlos Alberto Rodrigues que tornou possível este experimento, pelo imenso apoio e pela transferência dos embriões.

À Ricarda o imenso apoio e amizade, um grande exemplo de profissional.

Ao proprietário Roberto Jank Júnior e funcionários da Fazenda Santa Rita, com especial atenção para Beco, Tulina, Toninho e Tonho.

Aos funcionários da Samvet Embriões Jorge, Valter, Rogéria e Michele a grande colaboração e amizade.

À FMVZ, UNESP – Botucatu, especialmente ao Departamento de Reprodução Animal a oportunidade de realização do curso.

Aos amigos Gabriela, Ocilon, Cristina, Paula, Edmundo, Eduardo, Bia, Carol, Vanússia, Valduce, Sérgio, Julião e Débora.

Aos componentes da banca Dr. Roberto Sartori Filho e Prof. Dr. Mário Binelli as valiosas sugestões.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	5
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE ABREVIATURAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
Local.....	17
Período.....	17
Animais	17
Manejo reprodutivo.....	18
Inseminação artificial	19
Superovulação de doadoras e coleta de embriões	19
Transferência de embriões.....	21
Diagnóstico de gestação e morte embrionária tardia	21
Coleta de dados e amostras.....	22
Análise estatística	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
Observação de cio	28
Avaliação de todas as vacas que manifestaram estro	28
Avaliação das vacas com presença de CL no dia 7	31
Avaliação das vacas ovuladas com assincronia igual a zero	38
Morte embrionária tardia	45
5. CONCLUSÃO.....	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Representação do esquema do manejo reprodutivo e divisão dos grupos	19
Figura 2:	Protocolo para superovulação e coleta de doadoras	20
Figura 3:	Representação da assincronia entre receptora e embrião	23
Figura 4:	Representação gráfica da cronologia do experimento e coleta de dados	24
Figura 5:	Análise de correlação entre as covariáveis de todas as vacas	26
Figura 6:	Representação gráfica da probabilidade de concepção aos 25 dias de todas as vacas em relação à temperatura corporal no dia 7, fixados os dias em lactação 136 (mediana) e 272 (2 vezes a mediana)	30
Figura 7:	Representação gráfica da probabilidade de ovulação em relação ao número de dias em lactação	32
Figura 8:	Representação gráfica da probabilidade de concepção aos 25 dias das vacas ovuladas em relação à temperatura corporal do dia 7	35
Figura 9:	Representação gráfica da probabilidade de concepção aos 25 dias das vacas ovuladas em relação à temperatura corporal do dia 14	36
Figura 10:	Representação gráfica da probabilidade de concepção aos 25 dias das vacas ovuladas com assincronia 0 do grupo IA e TE em relação à concentração de P4 do dia 7	41

- Figura 11:** Representação gráfica da probabilidade de concepção aos 25 dias das vacas ovuladas com assincronia 0 do grupo IA e TE em relação à temperatura corporal do dia 7 43
- Figura 12:** Representação gráfica da probabilidade de concepção aos 25 dias das vacas ovuladas com assincronia 0 em relação à produção de leite (LM) 44
- Figura 13:** Representação gráfica da probabilidade de morte embrionária tardia em relação à temperatura corporal do dia 7 46
- Figura 14:** Representação gráfica da probabilidade de morte embrionária tardia em relação à temperatura corporal do dia 14 (fixada a T7 em 38,5°C ou 39,5°C) 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Medidas descritivas das covariáveis quantitativas incluídas em modelos com todas as vacas (ovuladas ou não)	26
Tabela 2:	Medidas descritivas das covariáveis quantitativas incluídas em modelos somente com as vacas ovuladas	27
Tabela 3:	Medidas descritivas das covariáveis quantitativas incluídas em modelos com as vacas ovuladas com assincronia igual a zero	27
Tabela 4:	Medidas descritivas das covariáveis quantitativas incluídas em modelos com as vacas gestantes para avaliação da morte embrionária precoce	27
Tabela 5:	Distribuição da manifestação de cio após aplicação de PGF2 α no dia -3	28
Tabela 6:	Taxas de concepção observadas na TE em relação à assincronia entre receptora e embrião	33
Tabela 7:	Taxas de concepção observadas na TE em diferentes graus (I e II) e estágios de desenvolvimento (M ou BL) do embrião	34
Tabela 8:	Taxas de concepção observadas aos 25 (P25) e 39 (P39) dias de todas as vacas e das vacas ovuladas	38
Tabela 9:	Concentrações séricas de P4 (dia 7) observadas nos diferentes assincronias no grupo IA e TE	39
Tabela 10:	Concentrações séricas de P4 (dia 14) observadas nos diferentes assincronias no grupo IA e TE	39

LISTA DE ABREVIATURAS

BE	Benzoato de estradiol
CL	Corpo lúteo
DEL	Dias em lactação
DPBS	Solução salina tampão Dulbecco (Dulbecco's phosphate buffered saline)
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Grama
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
IA	Inseminação artificial
IM	Intramuscular
IMS	Ingestão de matéria seca
kg	Quilogramas
LM	Produção de leite média durante o experimento
mg	Miligramas
MET	Morte embrionária tardia
ng	Nanogramas
NS	Número de serviços anteriores
P7	Progesterona sérica do sétimo dia do ciclo estral
P14	Progesterona sérica do décimo quarto dia do ciclo estral
P4	Progesterona
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
T7	Temperatura corporal do dia 7
T14	Temperatura corporal do dia 14
TE	Transferência de embriões
UI	Unidade internacional

FATORES QUE AFETAM A TAXA DE CONCEPÇÃO APÓS INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL OU TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM VACAS HOLANDESA EM LACTAÇÃO

RESUMO: O objetivo deste trabalho foi avaliar os fatores que afetam as taxas de concepção (TC) de vacas Holandesas em lactação que receberam IA ou TE. O experimento foi conduzido em uma fazenda localizada em Descalvado, SP, Brasil durante os meses de outubro de 2003 a setembro de 2004. As vacas eram ordenhadas 3 vezes ao dia e alimentadas com ração total devidamente balanceada. Vacas ciclando ($n=1025$) produzindo $33,3 \pm 7,2$ kg de leite por dia com $162 \pm 103,7$ de DEL receberam PGF2 α e foram divididas aleatoriamente em dois grupos: IA ou TE. As vacas que apresentaram estro 48 a 96h após aplicação de PGF2 α receberam IA ($n=227$) 12h após detecção do estro ou TE ($n=160$) 6 a 8 dias após. Todas as vacas da TE receberam embriões frescos (grau I ou II) de vacas Holandesas não lactantes produzidos *in vivo*. Analisou-se a produção de leite média de -7 a 14 dias após o cio. A temperatura corporal foi aferida e amostras de sangue foram coletadas para análise da concentração sérica de P4 por radioimunoensaio. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 25 e 39 dias por ultra-sonografia. Morte embrionária tardia (MET) foi considerada quando as vacas gestantes no dia 25 estavam vazias no dia 39. As variáveis taxa de ovulação, TC e MET foram analisadas pelo modelo logístico (GLM) com finalidade de verificar a influência das covariáveis na probabilidade de sucesso. Os modelos foram ajustados no software R. A taxa de ovulação foi de 84,8% (328/387) e foi afetada negativamente pelo número de dias em lactação ($p=0,05$). Não houve diferenças nas TC do grupo TE em relação à qualidade e estágio do embrião, e assincronia entre doadora e receptora. TC no dia 25, das vacas ovuladas foi 37,9% (74/195) para IA e 59,4% (79/133) para TE ($p<0,01$). Temperatura corporal no dia 7 (T7) influenciou negativamente ($p=0,02$) a TC nos dois tratamentos. Para avaliação da P4, foram consideradas somente as vacas com assincronia zero do grupo IA e TE. Das 191 vacas com assincronia zero, 49,2% (94/191) estavam gestantes aos 25 dias, sendo 37,5% (39/104) no grupo da IA e 63,2% (55/87; $p<0,01$) no grupo da TE. Verificou-se que no grupo IA houve evidência do efeito da P4 do dia 7 ($p=0,03$), T7 ($p=0,09$) e produção de leite ($p=0,04$). No grupo TE não houve evidência do efeito da P7, nem da LM, mas sim da T7 ($p=0,08$). A MET foi 10,8% (8/74) para IA e 21,5% (17/79) para TE ($p=0,06$). Houve tendência de aumento da MET quando as temperaturas corporais do dia 7 ($p=0,10$) foram maiores. A TC no dia 39 das vacas ovuladas foi 33,8% (66/195) para IA e 46,6% (62/133) para TE ($p=0,02$), superior, mesmo após a morte embrionária. Altas temperaturas afetaram TC e MET, independente do tratamento. A produção de leite afetou a probabilidade de concepção na IA, mas não na TE, ou seja, influenciou negativamente antes do dia 7. Os resultados obtidos confirmam a importância da P4 no desenvolvimento embrionário antes do dia 7, já que as vacas do grupo TE não foram influenciadas pela P4, provavelmente porque receberam embrião desenvolvido em condições melhores. A transferência de embriões frescos produzidos em vacas não lactantes pode ser utilizada para evitar os efeitos negativos no desenvolvimento embrionário inicial, aumentando as TC de vacas em lactação.

Palavras chave: transferência de embriões, inseminação artificial, concepção

FACTORS THAT AFFECT CONCEPTION RATE FOLLOWING ARTIFICIAL INSEMINATION OR EMBRYO TRANSFER IN LACTATING HOLSTEIN COWS

ABSTRACT: Objectives of this study were to evaluate factors that could affect conception rates (CR) of AI or ET in lactating Holstein cows. The trial was conducted at a dairy farm in Descalvado, SP, Brazil from October 2003 to September 2004. Cows were milked 3 times a day and fed with TMR composed by corn silage balanced to meet nutritional requirements for lactating dairy cows. Cycling cows (n=1025) producing 33.3 ± 7.2 kg milk/d with 162.0 ± 103.7 DIM received PGF2 α injection and were randomly assigned to received AI or ET. Cows detected in heat between 48 and 96 h after PGF2 α injection (n=387) received AI (n=227) 12 h after heat detection or ET (n=160) 6 to 8 days later. All cows from ET received *in vivo* produced fresh embryos (grade I or II) from non lactating Holstein cows. Milk yield for each cow was recorded -7 to 14 d after estrus. Body temperature was recorded and blood samples were collected on days 7 and 14 to analyze serum P4 concentration by radioimmunoassay. Pregnancy diagnosis was performed by ultrasound on day 25 and 39. Embryonic loss (EL) was considered when cows pregnant on day 25 were not on day 39. The variables ovulation rate, conception rate and embryonic loss were analyzed by logistic model (GLM), to evaluate the influence of covariates on probability of success. The models were adjusted in the public software R. Ovulation rate was 84.8% (328/387) and was only negatively affected (p=0.05) by days in milk. There were no differences in probability of CR when stage and grade of embryo and donor-recipient synchrony were analyzed. CR at day 25 of ovulated cows was 37.9% (74/195) for AI and 59.4% (79/133) for ET (p<0.01). Body temperature at day 7 affected negatively (p=0.02) CR in both treatments. To evaluate P4, only cows with synchrony zero (n=191) were used from both groups and 49.2% (94/191) were pregnant on day 25, 37.5% (39/104) on AI group and 63.2% (55/87; p<0.01) on ET group. On AI group there was evidence of the effect of P4 of day 7 (p=0.03), body temperature on day 7 (p=0.09) and milk production (p=0.04) on probability of CR. On ET group there was only evidence of the effect of body temperature on day 7 (p=0.08) on probability of CR. The EL was 10.8% (8/74) for AI and 21.5% (17/79) for ET (p=0.06), and high BT tended (p=0.10) to increase EL. The CR at day 39 was 33.8% (66/195) for AI and 46.6% (62/133) for ET (p=0.02), still higher, even after embryonic loss. BT effects persist after day 7 because influenced CR and EL in both groups. Milk production affected CR of AI but not ET, suggesting that it affects embryo before day 7. The results from this study confirms the importance of P4 on the early embryonic development, since ET conception rates were not influenced by P4, probably because cows received an embryo developed in adequate conditions. Transfer of fresh embryos produced from non lactating cows should be used to bypass negative effects on initial embryo development, increasing conception rates in lactating cows.

Key words: embryo transfer, artificial insemination, conception

1. INTRODUÇÃO

Vacas leiteiras de alta produção apresentam taxas de concepção abaixo do desejado (Nebel & McGilliard, 1993). A eficiência reprodutiva é um dos fatores que mais contribui para melhorar o desempenho e a lucratividade dos rebanhos leiteiros (Grohn & Rajala-Schultz, 2000).

A produção de leite, o estresse térmico e as enfermidades são alguns dos muitos fatores que podem influenciar a fertilidade (Chebel et al., 2004). A eficiência reprodutiva de vacas de leite de alta produção vem reduzindo nas últimas décadas e está associada com o aumento da produção de leite (Lucy, 2001; Washburn et al., 2002).

O desempenho reprodutivo é afetado por efeitos deletérios do estresse térmico no oócito, na fecundação e no desenvolvimento embrionário inicial (Hansen & Arechiga, 1999). Sartori et al. (2002) e Leroy et al. (2005) demonstraram que os embriões produzidos nas vacas em lactação possuem qualidade inferior aos produzidos em vacas não lactantes, novilhas ou vacas de corte.

Em vacas leiteiras, a correlação entre produção de leite e ingestão de matéria seca (IMS) é alta e positiva (0,88) (Harrison et al., 1990). Vacas em lactação têm o metabolismo aumentado decorrente da alta IMS, o que aumenta a produção de calor, que quando associado às altas temperaturas ambientais causam problemas na manutenção dos processos biológicos (Kadzere et al., 2002). Temperaturas elevadas reduzem a proporção de embriões que continuam o desenvolvimento (Hansen & Arechiga, 1999).

A relação inversa entre a ingestão de alimento e a concentração plasmática de progesterona (P4) foi verificada em estudos realizados por Parr et al. (1993) em ovelhas e Vasconcelos et al. (2003) em vacas. A P4 controla as mudanças do ambiente uterino e influencia o desenvolvimento embrionário (Mann & Lamming, 2001). O diálogo entre as células trofoblásticas embrionárias e as células

epiteliais do endométrio é crítico para a manutenção do corpo lúteo (CL) e para a sobrevivência do embrião (Thatcher et al., 2001).

A transferência de embriões (TE) além de multiplicar os indivíduos geneticamente superiores de um rebanho, pode ser utilizada para minimizar os efeitos negativos da alta produção de leite e do estresse térmico na qualidade do oócito e desenvolvimento embrionário inicial. Considerando-se que o embrião é mais resistente às altas temperaturas em estágios mais avançados de desenvolvimento (Ealy et al., 1993), a transferência de embriões é uma ferramenta que pode ser utilizada para evitar os efeitos deletérios iniciais (Putney et al., 1989; Drost et al., 1999).

A hipótese deste trabalho é que a transferência de embriões frescos produzidos em vacas não lactantes aumenta a taxa de concepção de vacas Holandesas em lactação em comparação à inseminação artificial (IA), pois o embrião não sofre os efeitos deletérios da produção de leite e estresse térmico anteriores ao dia da ovulação.

O objetivo deste experimento foi avaliar os fatores que podem afetar a taxa de concepção de vacas Holandesas em lactação que receberam embrião fresco produzidos em vacas não lactantes, comparadas às vacas em mesmas condições que foram inseminadas após observação de cio.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Vacas com maior produção de leite possuem menor eficiência reprodutiva (Butler, 1998). O aumento do número de serviços por concepção e aumento do intervalo entre partos são alguns dos sinais da redução da eficiência reprodutiva de vacas de leite de alta produção de todo o mundo (Lucy, 2001; Washburn et al., 2002). Lopez-Gatius (2003), num estudo de 10 anos em rebanhos leiteiros da Espanha, observou que para cada 1000 kg de aumento na produção de leite houve redução de 6,0% na taxa de concepção.

A produção de leite está altamente relacionada com a ingestão de matéria seca (Harrison et al., 1990). Vacas em lactação têm o metabolismo aumentado devido à alta ingestão de matéria seca (IMS), que gera um aumento da produção de calor, que quando associado às altas temperaturas ambientais causam problemas na manutenção dos processos biológicos (Kadzere et al., 2002). As vacas de maior produção têm maiores problemas, pois podem ter dificuldades na dissipação do calor produzido (Kadzere et al., 2002).

O aumento da temperatura corporal tem efeitos negativos diretos na função celular (Kadzere et al., 2002). Uma menor eficiência reprodutiva pode ser exacerbada por condições inadequadas de ambiente, como estresse térmico (Thatcher et al. 2006). A elevada produção leiteira exerce efeito negativo na qualidade do ócito e no desenvolvimento embrionário inicial que pode ser potencializado pelo estresse térmico (Hansen & Arechiga, 1999).

Vacas em lactação quando submetidas à temperatura ambiente e umidade relativa do ar elevadas apresentam redução da manifestação de cio, redução das taxas de ovulação e concepção (Hansen & Arechiga, 1999; Washburn et al., 2002; Lopez et al., 2004; Lopez-Gatius et al., 2005). As novilhas, por serem menos susceptíveis a essas variações climatológicas, não alteram os índices reprodutivos no verão. Sartori et al. (2002) observaram que com o aumento da temperatura ambiente, a temperatura corporal de novilhas ($38,7 \pm 0,01^{\circ}\text{C}$) elevou menos ($p < 0,05$) que a de vacas em lactação ($39,3 \pm 0,03^{\circ}\text{C}$).

O estresse térmico e a alta produção de leite também levam à redução da taxa de observação de cio (Washburn et al., 2002), provavelmente devido à diminuição do tempo de manifestação de estro (Lopez et al., 2004). Diferentes tipos de estresse podem levar à falha da ovulação (Lopez-Gatius et al., 2005), que é uma das causas de infertilidade em rebanhos leiteiros (Wiltbank et al., 2002). Lopez-Gatius et al. (2005) observaram falha de ovulação de 3,4% em estações com temperaturas ambientais até 25°C e de 12,4% quando as temperaturas foram superiores a isto.

Os períodos próximos à ovulação até o terceiro dia do desenvolvimento embrionário são muito susceptíveis ao estresse térmico, e temperaturas elevadas reduzem a proporção de embriões que continuam em desenvolvimento (Ealy et al., 1993). Os efeitos do estresse térmico reduzem conforme os embriões se tornam mais desenvolvidos, ou seja, o embrião adquire resistência aos efeitos negativos com o passar do tempo (Ealy et al., 1993; Hansen & Arechiga, 1999). Ju et al. (2005) verificaram que oócitos expostos a 42°C durante quatro horas apresentaram alterações nos componentes responsáveis pela meiose. Apesar de não haver diferença na taxa de clivagem, houve redução da porcentagem de blastocistos produzidos. Os embriões produzidos apresentaram menor número de células, principalmente as trofoblásticas, que são responsáveis pela formação dos anexos fetais. Efeitos de altas temperaturas no desenvolvimento embrionário após o sétimo dia também foram relatados por Ryan et al. (1993).

Sartori et al. (2002) recuperaram embriões e oócitos de vacas e novilhas Holandesas no verão, seis dias após a observação de cio natural e verificaram que a taxa de fecundação foi maior ($p < 0,05$) em novilhas (100,0%) do que em vacas em lactação (55,3%), e a qualidade dos embriões também foi superior ($p < 0,05$) em novilhas (72%) do que em vacas em lactação (33%). Quando compararam vacas lactantes e não lactantes no inverno, a taxa de fecundação não diferiu, porém a qualidade embrionária foi superior ($p = 0,06$) em vacas não lactantes (82%) do que em vacas em lactação (53%). Leroy et al. (2005) observaram que a porcentagem de embriões grau I coletados de vacas em lactação superovuladas (13,1%) foi inferior a de novilhas Holandesas (62,5%) ou vacas de corte (55,0%). Esses dados mostram que a fecundação pode estar sendo comprometida no verão, e que vacas em lactação possuem embriões de menor qualidade.

A produção de leite está altamente relacionada com a ingestão de matéria seca (Harrison et al., 1990). Existe uma relação inversa entre a IMS e a concentração plasmática de P4 em ovelhas (Parr et al., 1993) e em vacas (Vasconcelos et al., 2003). O aumento da IMS leva ao aumento do fluxo sanguíneo para a veia porta hepática (Sangsritavong et al., 2002). Como o fígado é o local de maior metabolização de P4 (Parr et al., 1993), estima-se que o aumento da IMS aumente a taxa de metabolização, devido ao aumento do fluxo sanguíneo para o fígado. A P4 controla as mudanças do ambiente uterino e influencia o desenvolvimento embrionário (Mann & Lamming, 2001; Green et al., 2005; Mann et al., 2006). O diálogo entre as células do trofoblasto embrionário e as células epiteliais do endométrio é crítico para a manutenção do CL e para a sobrevivência do embrião (Thatcher et al., 2001), e essa sincronia entre o ambiente uterino e o embrião é essencial. Stronge et al. (2005) concluíram que a baixa P4 5 a 7 dias após a IA está associada à baixa taxa de fertilidade em vacas em lactação. Mann et al. (2006) observaram que a suplementação de P4 cinco dias após a IA resultou em um maior desenvolvimento do embrião. Esses achados sugerem que a concentração sérica de P4 é importante principalmente nos primeiros dias após a inseminação e talvez seja um dos fatores que determinam o sucesso ou a falha da gestação de vacas em lactação.

A transferência de embriões é uma estratégia utilizada para se ultrapassar os efeitos do estresse térmico ocorridos no oócito e no desenvolvimento embrionário inicial (Putney et al., 1989; Drost et al., 1994; Ambrose et al., 1999). Putney et al. (1989) compararam IA e TE no verão. Embriões frescos produzidos em novilhas foram transferidos em vacas Holandesas em lactação que possuíam CL e comparadas com todas as vacas inseminadas. Houve aumento da taxa de concepção na avaliação da gestação aos 45 dias (13,5% IA x 29,2% TE). Neste trabalho não foi considerada a possível falha de ovulação nas vacas que receberam IA. Drost et al. (1999) compararam embriões congelados-descongelados produzidos *in vivo* ou *in vitro* a partir de ovários de abatedouro com IA no verão. A avaliação da taxa de ovulação foi pela presença do CL em vacas que receberam embrião e medindo a P4 no dia 7 ($>1\text{ng/ml}$) nas vacas inseminadas. Houve um acréscimo da taxa de concepção em relação a IA quando embriões produzidos *in vivo* foram utilizados (35,4% *in vivo* x 18,8% *in vitro* x 21,4% IA). Ambrose et al. (1999)

compararam embriões produzidos *in vitro* a partir de ovários de abatedouro frescos ou congelados-descongelados com IA no verão. As vacas foram sincronizadas com o protocolo Ovsynch e aquelas que possuíam concentrações séricas de P4 $\leq 1,5\text{ng/ml}$ no dia 0 e $\geq 2,0\text{ ng/ml}$ no dia 7 foram comparadas. Houve um acréscimo da taxa de concepção em relação a IA quando embriões produzidos *in vivo* frescos foram utilizados (17,5% fresco x 6,1% congelado-descongelado x 6,7% IA). Sartori et al. (2006) não obtiveram diferenças significativas nas taxas de concepção entre IA (35,6%) e TE (40,3%) durante 365 dias de experimento. Os autores sugerem que não foi verificada diferença possivelmente porque as temperaturas do ano do estudo não foram tão elevadas e porque 78,5% dos embriões utilizados eram congelados.

A mortalidade embrionária ocorre, principalmente, nos primeiros dias após fecundação e durante o processo de placentação (Vanroose et al., 2000; Sartori, 2004). Os fatores que afetam a morte embrionária ainda não estão bem caracterizados. As causas da mortalidade embrionária podem ser classificadas como infecciosas ou não infecciosas. Mais de 70% das causas de morte embrionária são devido a causas não infecciosas, que geralmente são multifatoriais e de difícil diagnóstico (Christianson, 1992 apud Vanroose et al., 2000). Os índices de morte embrionária em vacas em lactação variam de 10 a 60,5% (Vasconcelos et al., 1997; Cartmil et al., 2001; Moreira et al., 2001; Chebel et al., 2003; Chebel et al., 2004; Sartori, 2004; Sartori et al., 2006). No estudo de Chebel et al. (2004) verificou-se que a produção de leite, número de serviços anteriores e número da lactação não afetaram a mortalidade embrionária. Sartori et al. (2006) não obtiveram diferenças nas taxas de morte embrionária entre IA (18,6%) e TE (26,2%).

O uso da transferência de embriões teoricamente poderia restaurar pelo menos parte da fertilidade, já que se evitam os efeitos anteriores ocorridos no desenvolvimento folicular, na fecundação, na ovulação e no desenvolvimento embrionário inicial.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento realizado para atender aos objetivos deste trabalho teve as características que se seguem.

LOCAL

Foi conduzido na Fazenda Santa Rita, localizada em Descalvado, no Estado de São Paulo, Brasil, latitude S 21°54'05", longitude W GR 47°37'26" e altitude 648m.

PERÍODO

O experimento foi realizado durante os meses de outubro de 2003 a setembro de 2004.

ANIMAIS

A fazenda Santa Rita possui um rebanho de aproximadamente 1200 vacas da raça Holandesa (HPB) em lactação. As vacas estão separadas em três barracões tipo "free-stall", cada um deles dividido em duas partes. Os animais têm acesso livre à pista de alimentação de um lado, a uma área central com camas de areia e a um piquete com capim "coast-cross" do outro lado. Os barracões possuem duas linhas de ventiladores, uma direcionada para a pista de alimentação e outra para as camas.

É fornecida ração total à vontade, balanceada de acordo com requisitos nutricionais, com 17,4% de proteína bruta e 14,7% de fibra bruta. O fornecimento é realizado três vezes ao dia, de forma que haja sempre alimento disponível. É composta basicamente por silagem de milho, capim tipo “coast cross” ou “tifton” verde (cortado diariamente), farelo de soja, milho, caroço de algodão, minerais e vitaminas.

Todas as vacas são ordenhadas diariamente, três vezes ao dia num sistema de ordenha com fosso central, tipo “side-by-side”, com capacidade para 16 vacas de cada lado. A sala de espera é ventilada. Cada vaca está identificada com um brinco numerado e um colar magnético. A produção de leite de cada ordenha é registrada através da leitura dos colares e transmitida para um computador (Alpro Transponder®, De Laval, Brasil).

Para o experimento, foram utilizadas 1025 vacas a partir da segunda lactação, com 57 a 547 dias em lactação (DEL), $33,1 \pm 7,2$ kg de leite por vaca por dia, durante 12 meses.

MANEJO REPRODUTIVO

As vacas em lactação do rebanho da Fazenda Santa Rita são manejadas às sextas-feiras, a cada 14 dias. É utilizada ultra-sonografia para diagnóstico de gestação precoce (25 a 32 dias) e re-confirmação de prenhez (33 a 39 dias). A avaliação de regressão uterina em vacas com mais de 30 dias pós parto e indução de cio com PGF2 α de vacas vazias com presença de CL é feita por palpação retal. Vacas com DEL maior que 55 dias são liberadas para o primeiro serviço.

O presente trabalho consistiu no uso de vacas vazias em um dos dois manejos mensais. Vacas com CL detectado a partir da palpação retal, receberam PGF2 α , 250 μ g D-clorprostenol (Ciosin®, Schering-plough, Brasil) e foram divididas, neste dia, em dois grupos IA ou TE, aleatoriamente, levando em consideração dias em lactação.

As vacas que apresentaram estro 48 a 96 horas (dias -1 a +1) após a PGF2 α , foram inseminadas 12 horas após a observação do cio (grupo IA) ou receberam um embrião 6, 7 ou 8 dias após o cio (grupo TE; Figura 1).

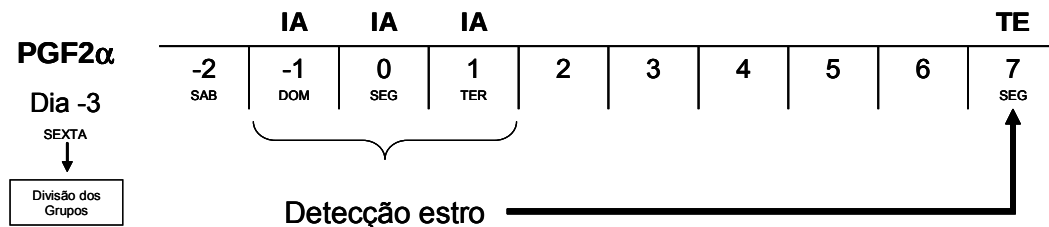


Figura 1: Representação do esquema do manejo reprodutivo e divisão dos grupos

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

No total, 527 vacas foram alocadas ao grupo da IA. A inseminação era realizada por dois técnicos, 12 horas após a detecção do estro. O sêmen dos touros utilizados no experimento foi o daqueles que possuíam as maiores taxas de concepção no manejo geral da fazenda. Foram utilizados 5 touros diferentes (Cevis, Thomahawk, Pat, Marshall, Aaron).

SUPEROVULAÇÃO DE DOADORAS E COLETA DE EMBRIÕES

Os embriões foram produzidos na Central de Reprodução Bovina Samvet Embriões, Fazenda Jacaúna, localizada a 5 km da Fazenda Santa Rita. As doadoras foram vacas da raça Holandesa, não lactantes e foram programadas para ser inseminadas no dia do cio das receptoras de assincronia 0 (dia 0); doadoras e receptoras foram devidamente sincronizadas.

Para sincronização e superovulação das doadoras utilizou-se o protocolo descrito a seguir. A indução do início de uma nova onda folicular foi realizada através da aplicação de 2mg de benzoato de estradiol (BE 1mg/ml Index, Brasil) associada à utilização de um implante vaginal de P4 (CIDR®, 1,9g, Pfizer, Brasil).

No quarto dia iniciou-se a aplicação de 350 UI IM de FSH (Pluset®, Calier, Brasil), diluídas em 20ml de solução fisiológica, divididos em oito aplicações, doses decrescentes, com 12h de diferença entre elas. No sexto dia do protocolo, realizou-se a aplicação de uma dose (250µg de D-clorprostenol) de PGF2 α (Ciosin®, Schering-plough, Brasil). No sétimo dia, o implante vaginal de P4 foi removido. A ovulação foi sincronizada com uma aplicação de 0,50µg de GnRH (Fertagyl®, Intervet, Brasil) na manhã do oitavo dia to protocolo, seguida de duas inseminações 12 e 24 horas após. Para a inseminação foi usado sêmen de touros com histórico de boa produção de estruturas viáveis. Foram utilizados 5 touros (Maxie, Thomahawk, Pat, Marshall, Aaron). As coletas de embriões foram realizadas 6,5 dias após a primeira inseminação (Figura 2).

Manhã	2 mg BE				4ml FSH	3ml FSH	2ml FSH	1 ml FSH	GnRH	IA 7:00							Coleta
Tarde					4ml FSH	3 ml FSH	2 ml FSH + PGF2 α	1 ml FSH	IA 19:00								
DIA	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16


 Dispositivo intravaginal de P4 – Remoção manhã dia 7

Figura 2: Protocolo para superovulação e coleta de doadoras

As coletas de embriões foram realizadas pelo sistema não cirúrgico de Sugie desenvolvido em 1972 (Kanagawa et al., 1995), adaptado. Consiste no uso de um sistema fechado composto por um equipo com três vias que acopla: um litro de DPBS (Nutricell®, Brasil) para realizar as lavagens do útero, um filtro tipo millipore® para reter os embriões e um cateter de duas vias que fica fixado no útero para possibilitar as lavagens. Após anestesia peridural da doadora, fixa-se o cateter no terço final cranial do corno uterino direito, onde se realizam aproximadamente, 10 lavagens com 50ml de DPBS. Repete-se o mesmo procedimento no outro corno.

O filtro após coleta era dirigido para o laboratório onde se fazia uma procura sob um estereomicroscópio com aumento de 50 vezes. As estruturas encontradas eram colocadas em uma solução de manutenção (TQC®, AB Technology, Nutricell, Brasil) e mantidos em temperatura ambiente. As estruturas

inviáveis (não fecundadas e degeneradas) eram desprezadas e os embriões viáveis eram avaliados. Somente as mórulas e blastocistos classificados como grau I e II (Wright, 1998) foram utilizados para transferência a fresco neste experimento.

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Um total de 498 vacas foi alocado no grupo TE. A presença de CL foi avaliada antes da transferência de embriões nas receptoras que apresentaram cio. A avaliação foi realizada por ultra-som (Aloka SSD 500 V; Aloka Co. Ltda., Tokyo, Japão) equipado com probe linear retal de 5 MHz. Somente as vacas que possuíam CL receberam embrião. Após anestesia epidural, os embriões grau I (excelente) ou II (bom), frescos produzidos das doadoras Holandesas não lactantes foram transferidos a fresco no terço final do corno uterino ipsilateral ao ovário com CL presente. A transferência dos embriões foi realizada por um técnico especializado, pelo método transcervical (não cirúrgico).

DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO E MORTE EMBRIONÁRIA TARDIA

O diagnóstico de gestação foi realizado em duas fases, aos 25 e 39 dias, por ultra-som equipado com probe linear retal de 5MHz. A presença de líquido no corno ipsilateral ao CL avaliado no dia 7, consistiu em gestação no 25º dia. No 39º dia de gestação avaliou-se a presença do feto com batimento cardíaco.

Considerou-se taxa de concepção a razão entre o número de vacas gestantes no grupo IA ou TE sobre o número total de vacas no grupo IA ou TE.

A presença da gestação no 25º dia e ausência no 39º foi considerada morte embrionária tardia (MET).

COLETA DE DADOS E AMOSTRAS

Com o intuito de responder aos objetivos deste trabalho, foram mensuradas covariáveis conforme descrito a seguir.

A data do cio serviu para avaliar a influência da estação (EST) na concepção. Os dados foram divididos em primavera (setembro, outubro e novembro), verão (dezembro, janeiro e fevereiro), outono (março, abril e maio) e inverno (junho, julho e agosto).

O valor do DEL e do número de serviços anteriores ao experimento (NS) serviram para verificar se havia diferenças nas taxas de concepção nas diferentes fases da lactação.

A taxa de ovulação foi avaliada por ultra-sonografia. As vacas ovuladas do grupo IA ou TE foram as que apresentaram CL no dia 0, em que se realizou a TE, ou seja, 6, 7 ou 8 dias após a manifestação do estro.

Iniciou-se a avaliação da média de produção de leite diária sete dias antes da aplicação de PGF2 α até sete dias após a TE (LM). Com o intuito de verificar se havia algum ponto mais crítico que poderia interferir na concepção dividiu-se a produção de leite da seguinte forma: L0 (produções diárias médias dos sete dias antes da aplicação de PGF2 α), L7 (dia do estro até o dia da TE) e L14 (sete dias após a TE).

A temperatura corporal foi avaliada pela temperatura retal no grupo IA e TE, no dia da TE (T7) e sete dias após (T14), com o intuito de verificar a influência da temperatura corporal na concepção. Foram utilizados termômetros de mercúrio, aferidos mensalmente antes da utilização.

Os touros utilizados para produção dos embriões ou para IA foram registrados; assim como a qualidade e estágio de desenvolvimento dos embriões inovulados.

O dia do cio (-1, 0 ou +1) foi anotado para cálculo da assincronia (Figura 3). Os embriões foram transferidos no dia 7, ou seja, assincronia entre o cio da

receptora e o embrião foi classificado em +1 (TE 8 dias após o cio), 0 (TE 7 dias após o cio) e -1 (TE 6 dias após o cio).

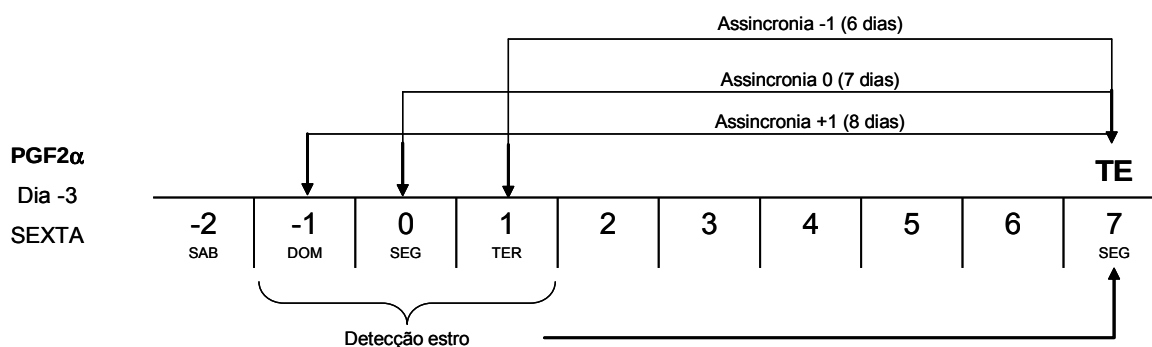


Figura 3: Representação da assincronia entre receptora e embrião

As coletas de sangue foram realizadas no dia 7 (dia da TE; P7) e sete dias após (P14), para avaliação da concentração sérica de P4. Os tubos sem anti-coagulante eram depositados em gelo após a coleta do sangue na veia coccígea e centrifugados a 1200g durante 15 minutos para separação do soro. As amostras de soro foram armazenadas a -20°C até realização da análise de P4 por radioimunoensaio (Coat a Count® - Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, USA). Os coeficientes de variação intraensaio foram 4,15%, 6,30%, 4,79% e 3,78% e o interensaio foi 15,63% e a sensibilidade foi 0,01ng/ml.

Para realização da análise da concentração sérica de P4, foram escolhidas somente as vacas que manifestaram estro no dia 0 (a diferença entre a data do cio e a data da coleta de sangue igual a sete dias), com o intuito de evitar possíveis diferenças na concentração sérica de P4, pois todas as coletas de sangue foram realizadas no dia 7, dia da inovulação, e as datas de cio variaram.

A Figura 4 ilustra a cronologia do experimento e a coleta de dados e amostras.

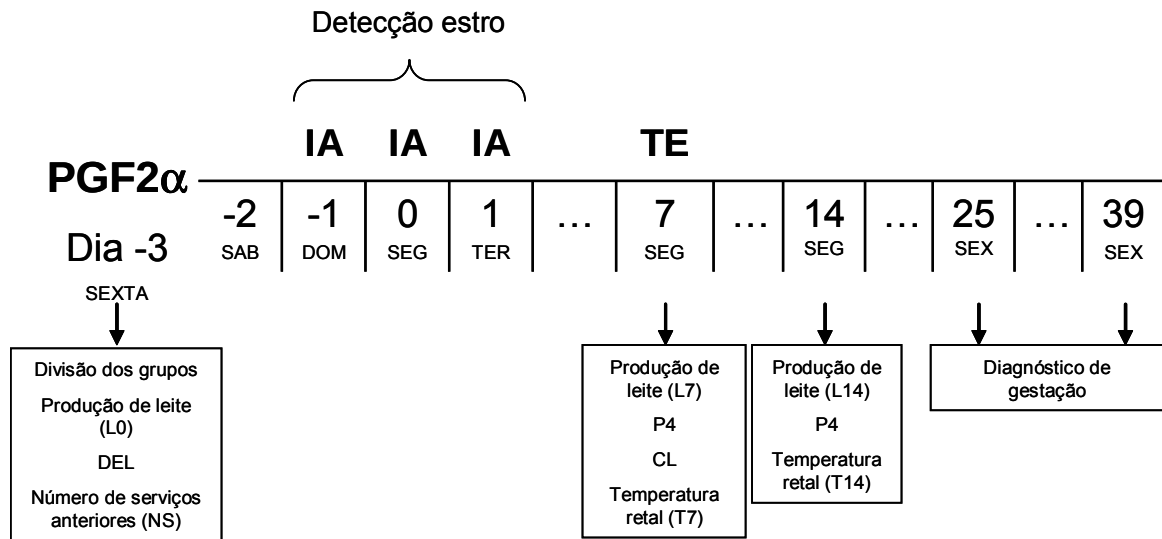


Figura 4: Representação gráfica da cronologia do experimento e coleta de dados

ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis respostas, concepção aos 25 dias e aos 39 dias (para todas as vacas ou somente para vacas ovuladas), taxa de ovulação e morte embrionária, obtidas no experimento descrito, são variáveis binárias, isto é, variáveis cujos valores observados podem ser representados por 0 ou 1. Em geral, assume-se que variáveis desse tipo têm distribuição Bernoulli que é um caso particular de modelos lineares generalizados (Demetrio, 2001). Se é suposto que Y_i , $i = 1, 2, \dots, n$, representa uma das variáveis medidas e que $Y_i \sim \text{Bernoulli}(\pi_i)$, sendo π_i a probabilidade de sucesso (probabilidade de ovulação, prenhez ou de morte embrionária), a função de probabilidade de Y_i é calculada por:

$$P(Y_i = y_i) = \pi_i^{y_i} (1 - \pi_i)^{1-y_i}, \quad y_i = 0, 1.$$

O modelo linear generalizado permite modelar as probabilidades de sucesso π_i em termos de variáveis explanatórias x_i (efeitos de tratamentos e covariáveis) através de $\eta_i = g(\pi_i) = x_i' \beta$, em que g é uma função de ligação adequada e β é o vetor de parâmetros. A função de ligação mais comum para dados binários é logit, isto é, $g(\pi_i) = \ln[\pi_i/(1 - \pi_i)]$, mas outras escolhas comuns são

probito e complemento log-log. Estimados os parâmetros, pode-se estimar a probabilidade de sucesso através de $\hat{\pi}_i = \frac{\exp(\hat{\eta}_i)}{1 + \exp(\hat{\eta}_i)}$ (no caso da função logit) que plotado como função de uma das covariáveis é uma curva sigmóide (ou um segmento da sigmóide).

Neste trabalho, foi considerado o modelo logístico (ligação logit), e como covariáveis foram consideradas: tratamento, estação do ano, DEL, número de serviços anteriores (NS), produção de leite (L0, L7, L14 e LM), temperatura corporal (T7 e T14), concentração de P4 sérica (P7 e P14), touro, qualidade do embrião, estágio de desenvolvimento do embrião, assincronia (receptora e embrião) e interações. Para as covariáveis quantitativas foram considerados efeitos lineares e quadráticos. Entretanto, verificou-se a existência de correlação alta (Figura 5) entre as covariáveis DEL (DIM) e número de serviços anteriores (NS), e entre as produções médias diárias de leite L0, L7, L14 e LM, o que indica que se deve usar no modelo somente uma dentre as correlacionadas. O uso de mais de uma delas no modelo pode trazer problemas de multicolinearidade e não convergência no processo de ajuste. Nas Tabelas 1, 2, 3 e 4 são apresentadas algumas medidas descritivas das covariáveis quantitativas.

A seleção das covariáveis foi feita através da comparação da deviance (uma generalização da soma de quadrados) referente à covariável testada com o valor de $\chi^2_{v,p}$ com v graus de liberdade e a um nível de significância 100p%. Baseia-se na inclusão e exclusão de covariáveis e interações.

Os modelos foram ajustados usando-se o *software* de domínio público R (www.r-project.org), (Venables & Ripley, 2002).

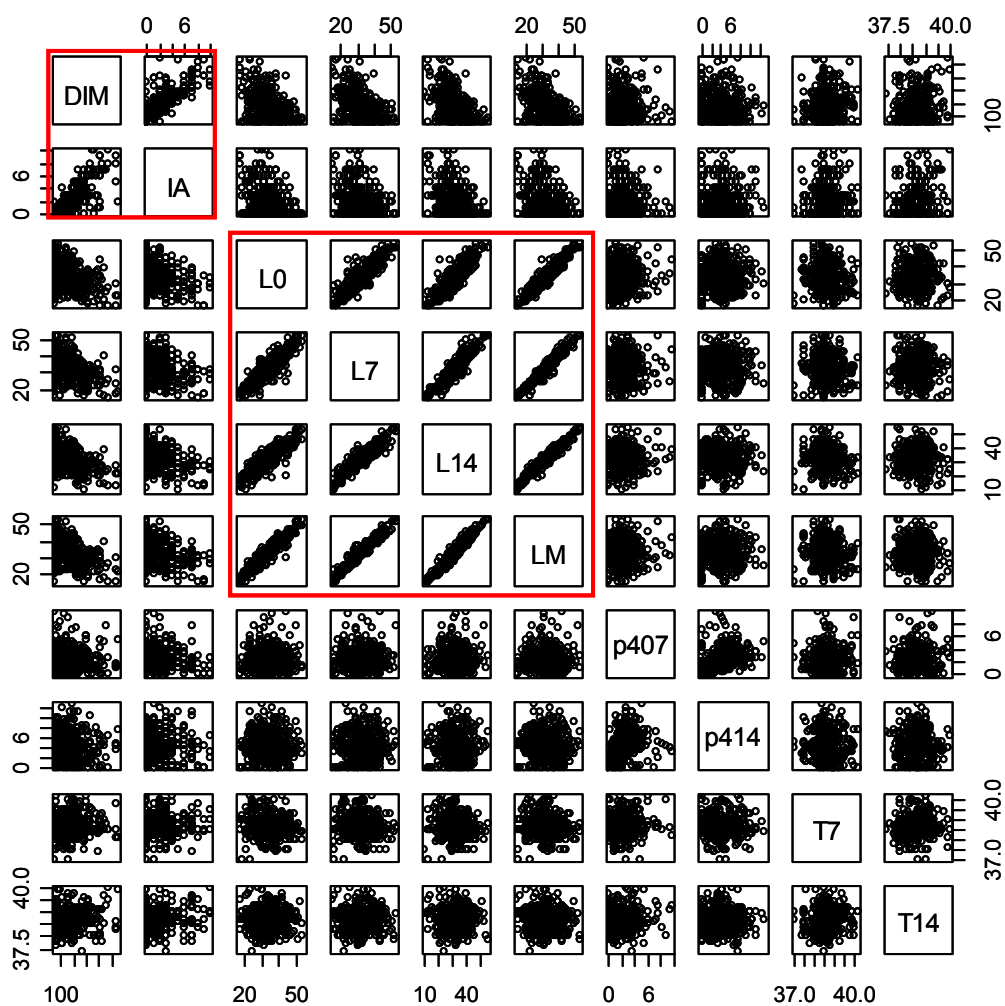


Figura 5: Análise de correlação linear entre as covariáveis de todas as vacas (linhas vermelhas que circundam os gráficos indicam correlação alta), onde DIM é igual DEL, L0

Tabela 1: Medidas descritivas das covariáveis quantitativas incluídas em modelos com todas as vacas ovuladas ou não (n=387)

Covariável	Mínimo	Máximo	Mediana	Média
Dias em lactação (DEL)	57	547	137	165 ± 103
Num. de serviços (NS)	0	10	1,0	1,8 ± 2,2
Produção de leite (L0)	16,7	54,2	33,8	34,2 ± 7,5
Produção de leite (LM)	14,8	53,5	33,0	33,3 ± 7,3
Temperatura retal (T7)	37,0	40,2	38,6	36,6 ± 0,5
Temperatura retal (T14)	37,4	40,0	38,7	38,7 ± 0,4

Tabela 2: Medidas descritivas das covariáveis quantitativas incluídas em modelos somente com as vacas ovuladas (n=328)

Covariável	Mínimo	Máximo	Mediana	Média
Dias em lactação (DEL)	57	547	136	162 ± 100
Num. de serviços (NS)	0	10	1,0	1,7 ± 2,0
Produção de leite (L7)	16,1	52,1	32,7	32,9 ± 7,3
Produção de leite (L14)	9,8	55,5	33,2	32,8 ± 7,6
Produção de leite (LM)	15,5	53,3	33,1	33,3 ± 7,1
Temperatura retal (T7)	37,4	40,2	38,6	38,6 ± 0,5
Temperatura retal (T14)	37,4	40,0	38,7	38,7 ± 0,4

Tabela 3: Medidas descritivas das covariáveis quantitativas incluídas em modelos com as vacas ovuladas com assincronia igual a zero (n=191)

Covariável	Mínimo	Máximo	Mediana	Média
Dias em lactação (DEL)	57	547	136	169 ± 111
Produção de leite (LM)	15,5	49,5	32,7	32,7 ± 6,9
Temperatura retal (T7)	37,4	40,0	38,6	38,6 ± 0,5
Temperatura retal (T14)	37,7	40,0	38,7	38,7 ± 0,4
Concentração sérica P4 (P7)	0,51	9,9	1,91	2,33 ± 1,50
Concentração sérica P4 (P14)	0,00	12,13	4,27	4,75 ± 2,45

Tabela 4: Medidas descritivas das covariáveis quantitativas incluídas em modelos com as vacas gestantes para avaliação da morte embrionária (n= 35)

Covariável	Mínimo	Máximo	Mediana	Média
Dias em lactação (DEL)	58	547	132	167 ± 109
Produção de leite (LM)	15,5	53,3	32,7	33,0 ± 7,2
Temperatura retal (T7)	37,5	39,9	38,5	39,9 ± 0,4
Temperatura retal (T14)	37,6	40,0	38,7	40,0 ± 0,4

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

OBSERVAÇÃO DE CIO

Foram realizadas 1025 aplicações de PGF2 α em vacas com CL presente (avaliado por palpação retal no dia -3), em que 498 eram do grupo IA e 527 do grupo TE. A distribuição dos cios observados está na Tabela 5. No total, 37,8% (387/1025) das vacas foram observadas em estro.

Tabela 5: Distribuição da manifestação de cio após aplicação de PGF2 α no dia -3

Dia	-1	0	+1
%	25%	57%	18%
	(96/387)	(221/387)	(70/387)

Taxas de observação de cio menores do que 50% são comumente observadas em rebanhos leiteiros e estão associadas à alta produção de leite (Washburn et al 2002). Lopez et al. (2004) observaram uma diminuição no tempo de manifestação do estro nas vacas que produziam mais de 39,5 kg de leite por dia e associaram à redução da concentração de estradiol circulante. A avaliação do CL foi feita por palpação retal. Isso pode ter afetado a taxa de manifestação de cio, pois nem todos os corpos lúteos palpáveis são responsivos à PGF2 α (Momont & Seguin, 1984).

AValiação de todas as vacas que manifestaram estro

A análise de todas as vacas que manifestaram estro foi realizada com o intuito de se comparar adequadamente o que é feito na prática (fazendas de leite comerciais que utilizam transferência de embriões). Normalmente se compara a

concepção das vacas inseminadas (todas as que manifestaram estro) com a concepção das vacas inovuladas (com presença de CL). Comparou-se aqui a taxa de concepção entre IA e TE de todas as vacas que manifestaram estro.

Das 387 vacas que manifestaram estro, 39,5% (153/387) estavam gestantes aos 25 dias, sendo no grupo da IA 32,6% (74/227) e no grupo da TE 49,4% (79/160).

As covariáveis consideradas no ajuste do modelo logístico para a variável resposta probabilidade de concepção aos 25 dias de gestação foram estação, tratamento, DEL ou número de serviços (NS), produção de leite (LM ou L7 ou L14), temperatura corporal (T7 e T14), touro e interações. Apesar de embriões não terem sido inovulados em vacas sem a presença de CL, consideraram-se todos os animais na avaliação (IA e TE). Também não foram incluídos no modelo os valores da concentração de P4, já que os mesmos estão relacionados à taxa de ovulação.

Verificou-se que não houve evidência de efeito da estação e da produção de leite na taxa de concepção, havendo, porém, evidência do efeito de tratamento ($p=0,0005$) e da interação entre DEL e T7 ($p=0,03$).

As probabilidades de concepção nos dois tratamentos como função da T7 e DEL podem ser estimadas através das equações:

$$\text{Probabilidade de concepção IA} = \frac{\exp(-20,33 + 0,51.T7 + 0,20.DEL - 0,01.T7.DEL)}{1 + \exp(-20,33 + 0,51.T7 + 0,20.DEL - 0,01.T7.DEL)} e$$

$$\text{Probabilidade de concepção TE} = \frac{\exp(-19,56 + 0,51.T7 + 0,20.DEL - 0,01.T7.DEL)}{1 + \exp(-19,56 + 0,51.T7 + 0,20.DEL - 0,01.T7.DEL)},$$

cuja representação gráfica como função da temperatura corporal do dia 7, em duas situações diferentes de DEL é mostrada na Figura 6.

Verificou-se que com o aumento da temperatura corporal houve maior redução da probabilidade de concepção aos 25 dias quanto maior o DEL. Chebel et al. (2004) também observaram que as taxas de concepção em vacas com maior DEL foram inferiores.

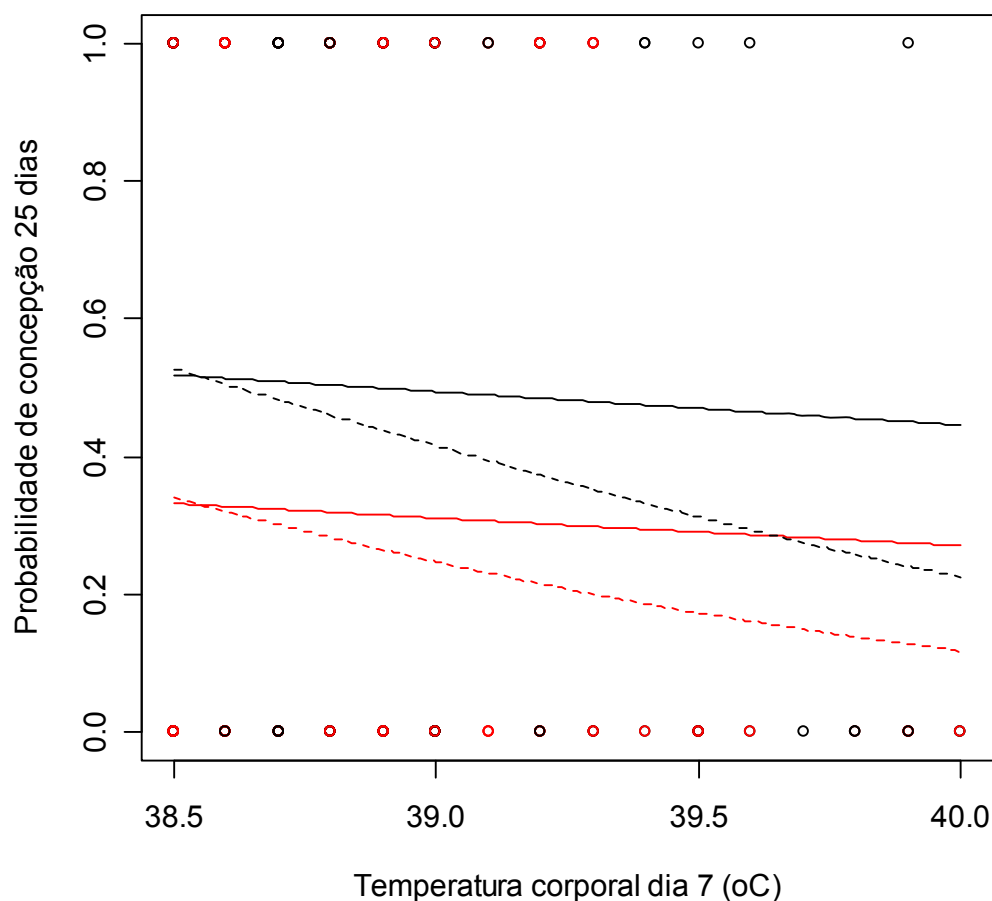


Figura 6: Representação gráfica da probabilidade de concepção aos 25 dias de todas as vacas em relação à temperatura corporal no dia 7, fixados os dias em lactação 136 (mediana) e 272 (2 vezes a mediana), em que “—” representa a probabilidade esperada para IA com 136 DEL, “—” para TE com 136 dias, “---” para IA com 272 dias, “----” para TE com 272 dias e “○” representam os dados observados para IA e “○” para TE

Das 387 vacas que manifestaram estro, 33,1% (128/387) estavam gestantes aos 39 dias, sendo no grupo da IA 29,1% (66/227) e no grupo da TE 38,8% (62/160). Houve evidência da diferença entre IA e TE ($p=0,05$), mesmo considerando que as vacas do grupo TE sem CL não foram inovuladas e estão incluídas nesta análise, e que houve morte embrionária entre os dias 25 e 39. A

única covariável considerada no ajuste do modelo logístico para a variável resposta probabilidade de concepção aos 39 dias de gestação foi tratamento. As demais covariáveis não foram incluídas devido à dependência da variável resposta aos valores de P25 analisados anteriormente, porque vacas vazias que não conceberam ou que tiveram morte embrionária estariam sendo avaliadas da mesma maneira.

Compararam-se todas as vacas que manifestaram estro e mesmo assim observou-se a superioridade da TE na probabilidade de concepção aos 25 e 39 dias.

AVALIAÇÃO DAS VACAS COM PRESENÇA DE CL NO DIA 7

A análise das vacas ovuladas, ou seja, com presença de CL no dia 7 (avaliado por ultra-sonografia) foi realizada visando comparar adequadamente as taxas de concepção entre IA e TE.

Taxa de ovulação

Das 387 vacas que manifestaram estro após a aplicação de PGF2 α , 84,8% (328/387) possuíam CL no dia 7, sendo no grupo da IA 85,9% (195/227) e no grupo da TE 83,1% (133/160).

As covariáveis consideradas no ajuste do modelo logístico para a variável resposta probabilidade de ovulação foram estação, DEL ou número de serviços anteriores (NS), L0 e interações. Não houve evidência de efeito da estação e da produção de leite na probabilidade de ovulação, havendo, porém, evidência do efeito do DEL ($p=0,05$).

A probabilidade de ovulação como função do número de dias em lactação pode ser estimada através da equação:

$$\text{Probabilidade de ovulação} = \frac{\exp(2,05 + 0,002 \cdot \text{DEL})}{1 + \exp(2,05 + 0,002 \cdot \text{DEL})}$$

cujas representações gráficas são mostradas na Figura 7.

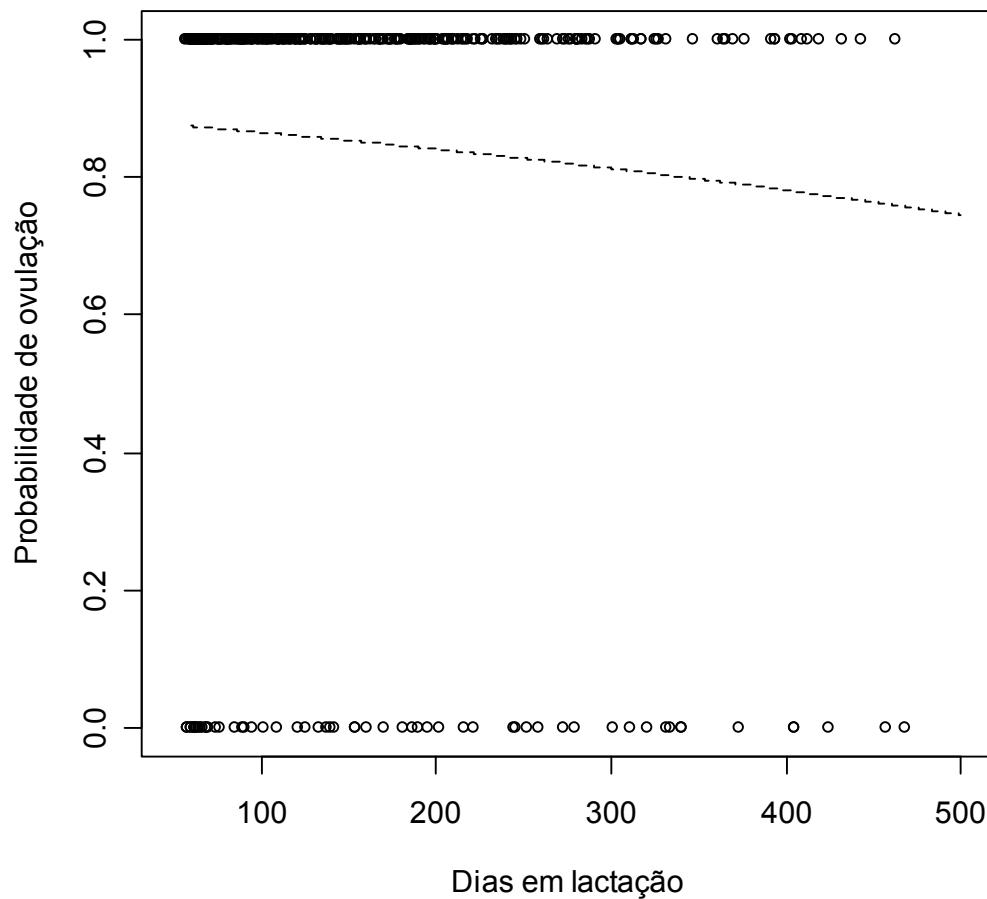


Figura 7: Representação gráfica da probabilidade de ovulação em relação ao número de dias em lactação, em que “-----” representa a probabilidade esperada e “o” representam os dados observados

Verificou-se que com o aumento do DEL, houve evidência da redução da probabilidade de ovulação. A probabilidade de ovulação em uma vaca com DEL=60 é de 87,4%, enquanto que na vaca com DEL=350 é de 79,7%.

Há poucos trabalhos mostrando fatores que influenciam a taxa de ovulação. Diferentes formas de estresse podem levar à falha da ovulação, um fator importante a ser considerado ao se avaliar causas de infertilidade em rebanhos leiteiros. Lopez-Gatius et al. (2005) não encontraram evidências de efeito da produção de leite e do número de serviços anteriores na taxa de ovulação, porém

verificaram que existe uma chance 3,9 vezes maior da falha da ovulação em estações quentes em relação a estações frias.

A redução da taxa de ovulação em vacas de maior DEL pode ser um dos motivos pelo qual vacas se tornam “repeat-breeders”, já que vacas com sucessivas falhas de concepção, poderiam ser decorrentes de falhas de ovulação anteriores. Esses dados sugerem que parte da falha de concepção, ao analisar todas as vacas que manifestaram estro, pode ser consequência de falhas na ovulação, conforme dados mostrados na Figura 6, em que se observou a redução da probabilidade de concepção em vacas com maior DEL.

Na transferência de embriões, há prévia avaliação da presença do CL no momento da inovulação e, portanto, a melhoria da taxa de concepção por não considerar as vacas não ovuladas no cálculo.

Avaliação da assincronia e da qualidade e estágio do embrião no grupo TE

Para a avaliação dos efeitos do embrião (grau e qualidade) e assincronia entre receptora e embrião na taxa de concepção foram analisados somente os dados das vacas inovuladas (grupo TE com CL presente no dia 7).

As covariáveis consideradas no ajuste do modelo logístico para a variável resposta probabilidade de concepção foram assincronia, grau do embrião, estágio de desenvolvimento do embrião e interações. Não houve evidência de efeito de grau e estágio de desenvolvimento do embrião, nem da assincronia entre receptora e embrião na probabilidade de concepção aos 25 dias de gestação. O fato de não ter havido diferença na probabilidade de concepção pode ter sido porque foram utilizados somente embriões de grau I (excelente) ou II (bom), no estágio de mórula ou blastocisto inicial, transferidos principalmente em receptoras que estavam em assincronia zero (57%).

Tabela 6: Taxas de concepção observadas na TE em relação à assincronia entre receptora e embrião

Embrião	-1	0	+1
%	45,5% (10/22)	63,2% (55/87)	58,3% (14/24)

Tabela 7: Taxas de concepção observadas na TE em diferentes graus (I e II) e estágios de desenvolvimento (M ou BL) do embrião

Embrião	I Excelente	II Bom	TOTAL
Mórula	78,3% (18/23)	56,4% (44/78)	61,7% (62/101)
Blastocisto	33,3% (4/12)	65,0% (13/20)	53,1% (17/32)
TOTAL	62,9% (22/35)	58,2% (57/98)	59,4% (79/133)

Não houve diferença ($p > 0,10$)

Probabilidade de concepção aos 25 dias de gestação

Das 387 vacas que manifestaram estro, 84,8% (328/387) ovularam. Das 328 vacas que ovularam, 46,6% (153/328) estavam gestantes aos 25 dias, sendo no grupo da IA 37,9% (74/195) e no grupo da TE 59,4% (79/133).

As covariáveis consideradas no ajuste do modelo logístico para a variável resposta probabilidade de concepção aos 25 dias de gestação para as vacas ovuladas foram tratamento, estação, DEL ou NS, produção de leite (LM, L7 ou L14), temperatura corporal (T7 e T14), touro e interações. Não houve evidência de efeito da estação, da produção de leite, touro e DEL na probabilidade de concepção aos 25 dias, havendo, porém, evidência do efeito de tratamento ($p = 0,0001$) e do efeito quadrático da temperatura corporal do dia 7 ($p = 0,02$). As probabilidades de concepção nos dois tratamentos como função da T7 podem ser estimadas através das equações:

$$\text{Probabilidade de concepção IA} = \frac{\exp(-1095,35 + 57,08.T7 - 0,74.T7^2)}{1 + \exp(-1095,35 + 57,08.T7 - 0,74.T7^2)} e$$

$$\text{Probabilidade de concepção TE} = \frac{\exp(-1094,44 + 57,08.T7 - 0,74.T7^2)}{1 + \exp(-1094,44 + 57,08.T7 - 0,74.T7^2)},$$

cujas representações gráficas são mostradas nas Figuras 8 e 9.

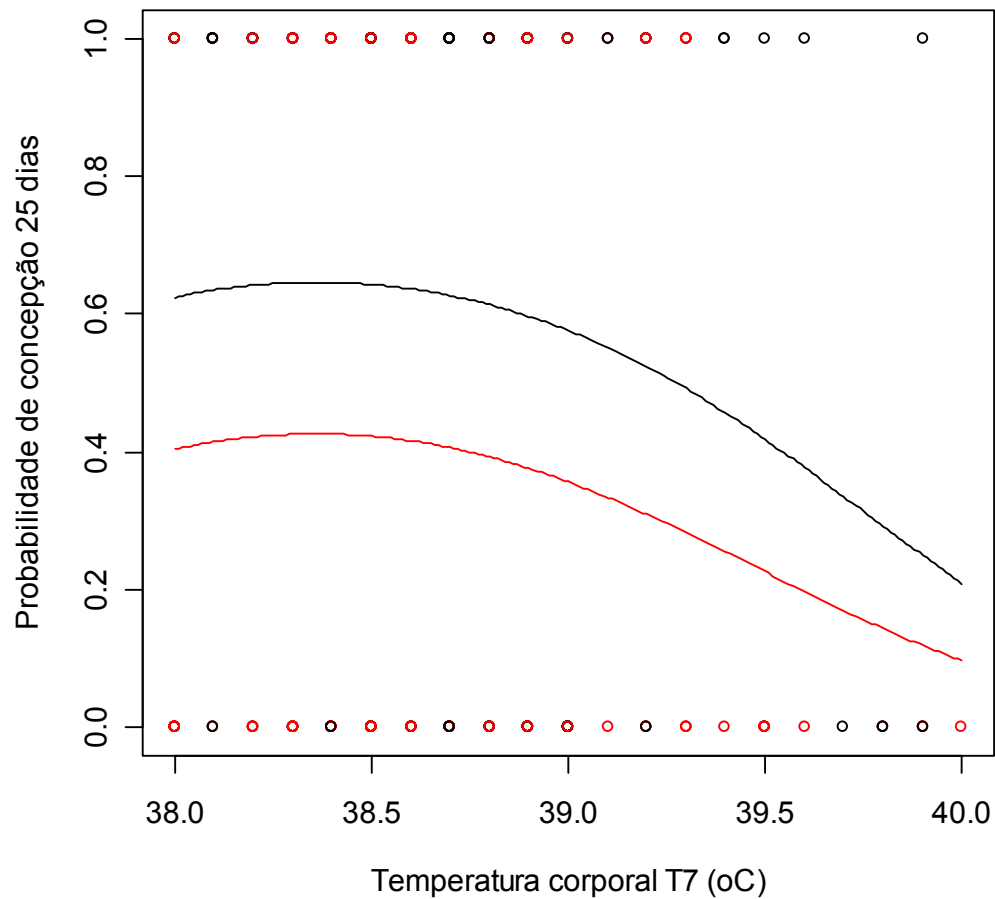


Figura 8: Representação gráfica da probabilidade de concepção aos 25 dias das vacas ovuladas em relação à temperatura corporal do dia 7 (T7), em que “—” representa a probabilidade esperada para IA em relação a T7, “—” para TE em relação a T7 e “○” representam os dados observados de T7 para IA, e “○” para TE

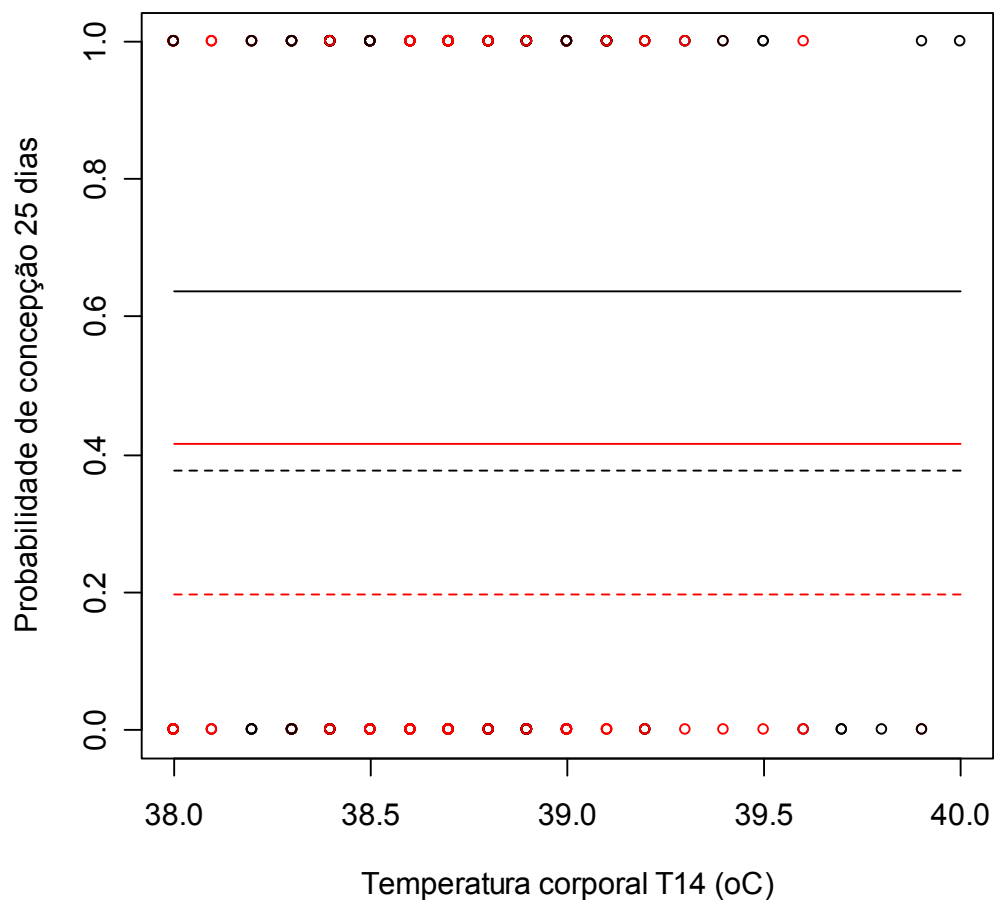


Figura 9: Representação gráfica da probabilidade de concepção aos 25 dias das vacas ovuladas em relação à temperatura corporal do dia 14 (T14), em que “—” representa a probabilidade esperada para IA em relação a T14, fixada T7 em 38,6°C, “—” para TE em relação a T14, fixada T7 em 38,6°C, “- - - -” para IA em relação a T14, fixada T14 em 39,6°C, “- - - -” para TE em relação a T14, fixada T14 em 39,6°C, e “o” representam os dados observados de T14 para IA, e “o” para TE

Verificou-se que altas temperaturas corporais no dia 7 reduziram a probabilidade de concepção aos 25 dias na IA e na TE (Figura 8), porém o mesmo não ocorreu com a T14 (Figura 9). A temperatura do dia 14 não afetou a probabilidade de concepção aos 25 dias, independentemente do que ocorreu no dia 7, ou seja, concepção alta devido à T7 baixa não sofreu influência da temperatura do

dia 14. Esses dados sugerem que o efeito da temperatura na probabilidade de concepção ocorre antes do dia 14.

Dados de literatura mostram que períodos próximos à ovulação até o terceiro dia do desenvolvimento embrionário são muito susceptíveis ao estresse térmico, e temperaturas elevadas reduzem a proporção de embriões que continuam em desenvolvimento (Ealy et al., 1993). Os efeitos do estresse térmico reduzem conforme os embriões se tornam mais desenvolvidos, ou seja, o embrião adquire resistência aos efeitos negativos com o passar do tempo (Ealy et al., 1993; Hansen & Arechiga, 1999). Observou-se neste trabalho que a temperatura corporal elevada pode continuar influenciando negativamente mesmo após o terceiro dia, já que foi detectado efeito da T7. Efeitos da temperatura aferida no dia 14 não foram detectados. A temperatura alta no dia 7 influenciou negativamente as taxas de concepção na IA e na TE, de maneira semelhante, porém a concepção da TE se manteve maior que na IA.

Probabilidade de concepção aos 39 dias de gestação

Das 328 vacas que ovularam, 39,0% (128/328) estavam gestantes aos 39 dias, sendo no grupo da IA 33,8% (66/195) e no grupo da TE 46,6% (62/133).

Houve evidência da diferença entre IA e TE ($p=0,02$). A covariável considerada no ajuste do modelo logístico para a variável resposta probabilidade de concepção aos 39 dias de gestação foi tratamento. As demais covariáveis não foram incluídas devido à dependência da variável resposta aos valores de P25 analisados anteriormente, porque vacas vazias que não conceberam ou que tiveram morte embrionária estariam sendo avaliadas da mesma maneira.

Na Tabela 8 estão representadas as taxas de concepção observadas aos 25 e 39 dias de gestação incluindo todas as vacas que manifestaram estro e as vacas com presença de CL no dia 7 (ovuladas).

Tabela 8: Taxas de concepção observadas aos 25 (P25) e 39 (P39) dias de todas as vacas e das vacas ovuladas

	TODAS AS VACAS QUE MANIFESTARAM ESTRO		TODAS AS VACAS OVULADAS	
	Concepção aos 25 dias (%)	Concepção aos 39 dias (%)	Concepção aos 25 dias (%)	Concepção aos 39 dias (%)
IA	32,6 (74/227)	29,1 (66/227)	37,9 (74/195)	33,8 (66/195)
TE	49,4 (79/160)	38,8 (62/160)	59,4 (79/133)	46,6 (62/133)
p	0,0005	0,05	0,0001	0,02

A análise das vacas ovuladas foi realizada visando comparar adequadamente as taxas de concepção entre IA e TE. Normalmente se compara a concepção das vacas inseminadas (todas as que manifestaram estro) com a concepção das vacas inovuladas (com presença de CL). Nesta análise, comparando-se as vacas ovuladas (grupo IA e TE) verificou-se que a superioridade da TE em relação a IA, na probabilidade de concepção aos 25 e 39 dias se manteve.

Os dados do presente trabalho mostram que o embrião fresco (de vacas não lactantes) melhora a concepção de vacas Holandesas em lactação, em relação à IA. Maiores temperaturas corporais no dia 7 afetaram negativamente tanto a IA quanto a TE. Como não foi verificada evidência no efeito de DEL na probabilidade de concepção, a utilização da TE em vacas com DEL baixo, poderia minimizar problemas futuros de fertilidade, pois vacas se tornariam gestantes mais cedo.

AValiação das vacas ovuladas com assincronia igual a zero

Com o intuito de avaliar as vacas ovuladas em condições semelhantes, foram analisadas somente as vacas que manifestaram estro no dia 0, ou seja, vacas com assincronia igual a zero (diferença entre a data do cio e a data da inovulação

igual a 7 dias), evitando assim, diferenças na concentração sérica de P4 (diferenças existentes entre a data do cio e a de coleta, pois todas as coletas de sangue foram realizadas no dia 7, dia da inovulação, e as datas de cio variaram ± 1 dia). As Tabelas 9 e 10 mostram as diferenças nas concentrações de P4 observadas em diferentes assincronias na IA e na TE.

Tabela 9: Concentrações séricas de P4 (P7) observadas nas diferentes assincronias no grupo IA e TE

	-1		0		+1	
	Gestante	Não Gestante	Gestante	Não Gestante	Gestante	Não Gestante
IA	2,19 $\pm$ 1,85	1,46 $\pm$ 0,73	2,75 $\pm$ 1,98	2,03 $\pm$ 1,35	3,24 $\pm$ 2,26	2,86 $\pm$ 1,63
TE	1,70 $\pm$ 0,76	2,46 $\pm$ 1,14	2,42 $\pm$ 1,39	2,33 $\pm$ 1,20	2,11 $\pm$ 0,97	3,02 $\pm$ 1,10
Todas	2,00 $\pm$ 1,69	1,82 $\pm$ 1,68	2,56 $\pm$ 1,59	2,13 $\pm$ 1,65	2,78 $\pm$ 1,43	2,89 $\pm$ 1,70
Geral	1,90 $\pm$ 1,59		2,34 $\pm$ 1,57		2,84 $\pm$ 1,59	

Tabela 10: Concentrações séricas de P4 (P14) observadas nas diferentes assincronias no grupo IA e TE

	-1		0		+1	
	Gestante	Não Gestante	Gestante	Não Gestante	Gestante	Não Gestante
IA	3,10 $\pm$ 1,99	4,06 $\pm$ 1,87	5,04 $\pm$ 2,48	4,64 $\pm$ 2,90	5,69 $\pm$ 2,88	4,22 $\pm$ 2,00
TE	4,33 $\pm$ 2,14	6,35 $\pm$ 2,53	4,98 $\pm$ 2,16	4,22 $\pm$ 1,85	5,22 $\pm$ 2,60	6,36 $\pm$ 1,50
Todas	3,59 $\pm$ 2,43	4,89 $\pm$ 2,58	5,01 $\pm$ 2,32	4,50 $\pm$ 2,55	5,50 $\pm$ 2,30	4,69 $\pm$ 2,38
Geral	4,33 $\pm$ 2,47		4,75 $\pm$ 2,45		5,04 $\pm$ 2,32	

Foram utilizadas 191 vacas com assincronia zero nos grupos IA e TE. Das 191 vacas, 49,2% (94/191) estavam gestantes aos 25 dias, sendo 37,5% (39/104) no grupo da IA e 63,2% (55/87; $p < 0,01$) no grupo da TE. Aos 39 dias 49,2% (94/191) das vacas estavam gestantes, sendo 31,7% (33/104) no grupo da IA e 51,7% (45/87; $p < 0,01$) no grupo da TE.

As covariáveis consideradas no ajuste dos modelos logísticos para a variável resposta probabilidade de concepção aos 25 dias de gestação para IA e TE foram tratamento, estação, produção de leite (LM), DEL ou NS, temperatura corporal (T7 e T14), concentração de P4 plasmática (P7 e P14), touro e interações.

Verificou-se que no grupo IA houve evidência do efeito da concentração de P4 do dia 7 ($p=0,03$), efeito quadrático de temperatura corporal do dia 7 ($p=0,09$) e efeito da produção de leite (LM; $p=0,04$). No grupo TE não houve evidência do efeito da P7, nem da LM, mas sim do efeito quadrático da T7 ($p=0,08$). As probabilidades de concepção nos dois tratamentos como função da concentração de P4 (P7), temperatura corporal (T7) e produção de leite (LM) podem ser estimadas através das equações:

$$\text{Probabilidade de concepção IA} = \frac{\exp(-1507 + 0,36.P7 + 78,6.T7 - 1,02.T7^2 - 0,07.LM)}{1 + \exp(-1507 + 0,36.P7 + 78,6.T7 - 1,02.T7^2 - 0,07.LM)} e$$

$$\text{Probabilidade de concepção TE} = \frac{\exp(-1507 + 78,6.T7 - 1,02.T7^2)}{1 + \exp(-1507 + 78,6.T7 - 1,02.T7^2)},$$

cujas representações gráficas são mostradas nas Figuras 10, 11 e 12.

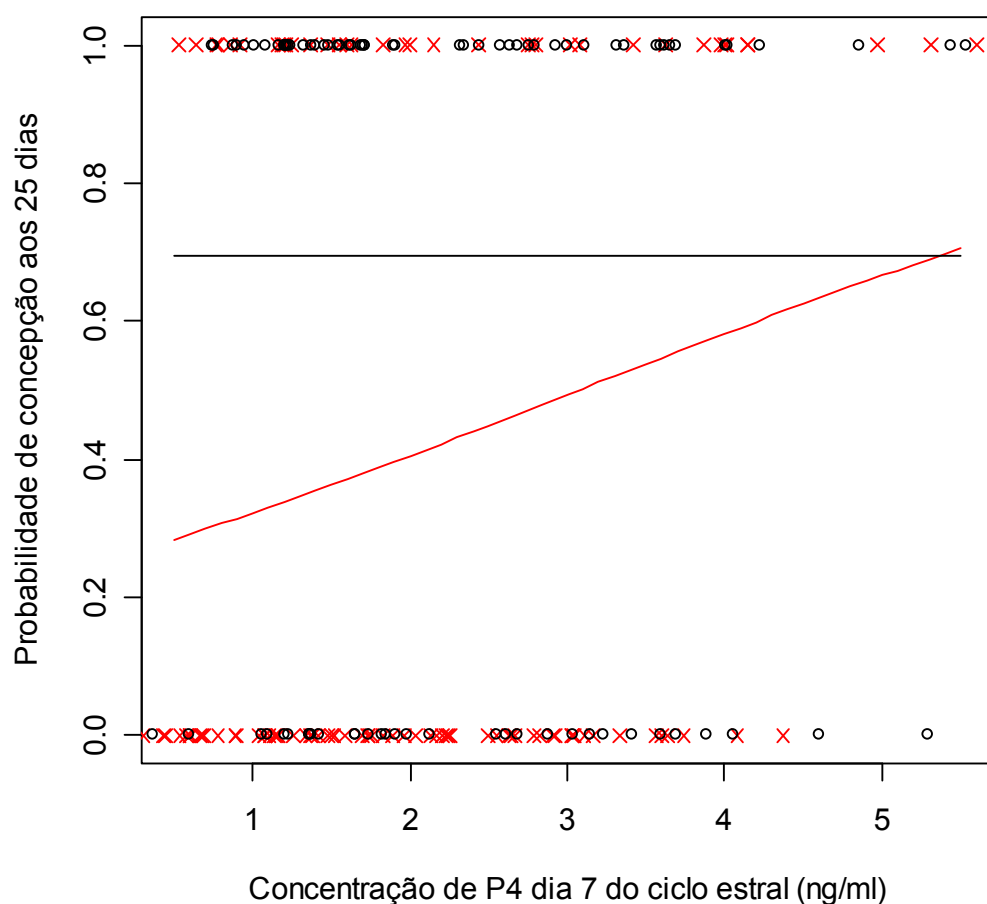


Figura 10: Representação gráfica da probabilidade de concepção aos 25 dias das vacas ovuladas com assincronia 0 do grupo IA e TE em relação à concentração de P4 do dia 7, em que “—” representa a probabilidade esperada para IA em relação a P7 (com T7 fixada em 38,5°C e LM fixada em 32,7kg), e “—” representa a probabilidade esperada para TE (com T7 fixada em 38,5°C), e “x” representam os dados observados para IA, “o” para TE

Verificou-se que quanto maior a concentração sérica de P4 no dia 7, maior a probabilidade de concepção aos 25 dias no grupo IA, enquanto que no grupo TE, não houve efeito da concentração de P4 no dia 7 na probabilidade de concepção. Não foi verificada influência da concentração sérica de P14 na probabilidade de concepção aos 25 dias em nenhum dos grupos. Esses dados

sugerem que efeito positivo de maiores concentrações séricas de P4 nos primeiros dias do desenvolvimento embrionário, já que influenciou no dia 7 no grupo IA e não no grupo TE e não influenciou no dia 14 em ambos os grupos.

A menor concentração de P4 após a IA, pode levar a redução do desenvolvimento embrionário e da taxa de sobrevivência (Mann & Lamming, 2001; Green et al., 2005). Estudos de Green et al. (2005) demonstraram que a P4 além de agir diretamente no desenvolvimento embrionário, também altera o ambiente do oviduto, agindo de forma indireta no desenvolvimento embrionário inicial. A P4 controla as mudanças do ambiente uterino, além de influenciar o desenvolvimento embrionário (Mann & Lamming, 2001; Green et al., 2005, Mann et al., 2006). Mann et al. (2006) estudando suplementação com P4 exógena em duas fases do ciclo estral, observaram que a inserção do dispositivo intravaginal de P4 (CIDR®) entre os dias 5 e 9 do ciclo estral promoveu aumento do comprimento do embrião no 16º dia após a inseminação, em comparação ao grupo controle (sem suplementação de P4) e ao grupo que foi tratado com o dispositivo intravaginal entre os dias 12 e 16 do ciclo estral. Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a importância da P4 no desenvolvimento embrionário até do sétimo dia, já que as vacas do grupo TE não foram influenciadas pela concentração sérica de P4, pois receberam embrião desenvolvido em condições melhores.

Essas informações são importantes, pois ajudam a entender os mecanismos envolvidos na menor concepção em vacas com alta produção de leite, já que essas são mantidas em dietas de alta densidade nutricional e apresentam aumento do fluxo sanguíneo hepático e alta taxa de metabolização de P4 (Sangsritavong et al., 2002; Parr et al., 1993), conseqüentemente baixa concentração desse hormônio, o que pode estar relacionado à redução da fertilidade (Lucy 2001; Washburn et al., 2002).

Essas informações permitem sugerir a utilização da transferência de embriões frescos produzidos em vacas não lactantes como ferramenta para aumento das taxas de concepção de vacas de alta produção.

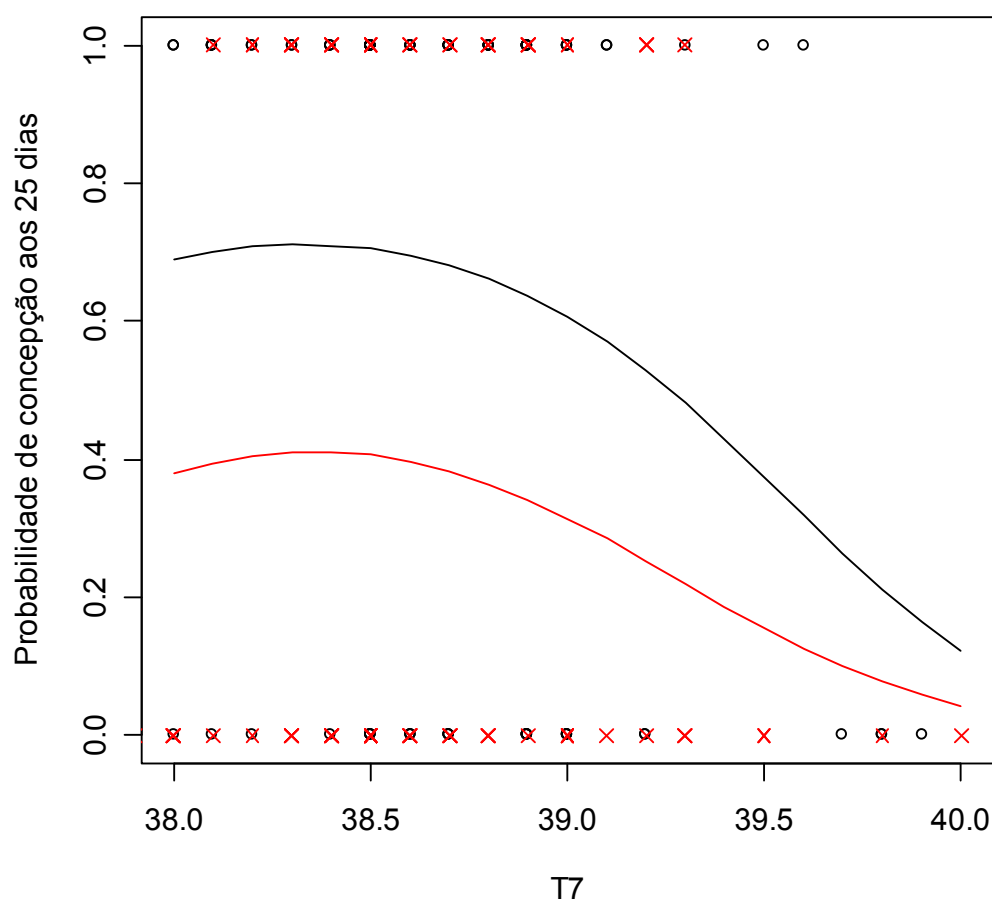


Figura 11: Representação gráfica da probabilidade de concepção aos 25 dias das vacas ovuladas com assincronia 0 do grupo IA e TE em relação à temperatura corporal do dia 7, em que “—” representa a probabilidade esperada para IA em relação a T7 (com P7 fixada em 1,91ng/ml e LM fixada em 32,7kg), e “—” representa a probabilidade esperada para TE, e “x” representam os dados observados para IA, “o” para TE

Novamente verificou-se que maiores temperaturas corporais no dia 7 reduziram a probabilidade de concepção aos 25 dias na IA e na TE; enquanto que a temperatura corporal avaliada no dia 14 não influenciou. O estresse calórico atua retardando o desenvolvimento do embrião ou causando sua morte nos primeiros 14 dias (Ryan et al., 1993).

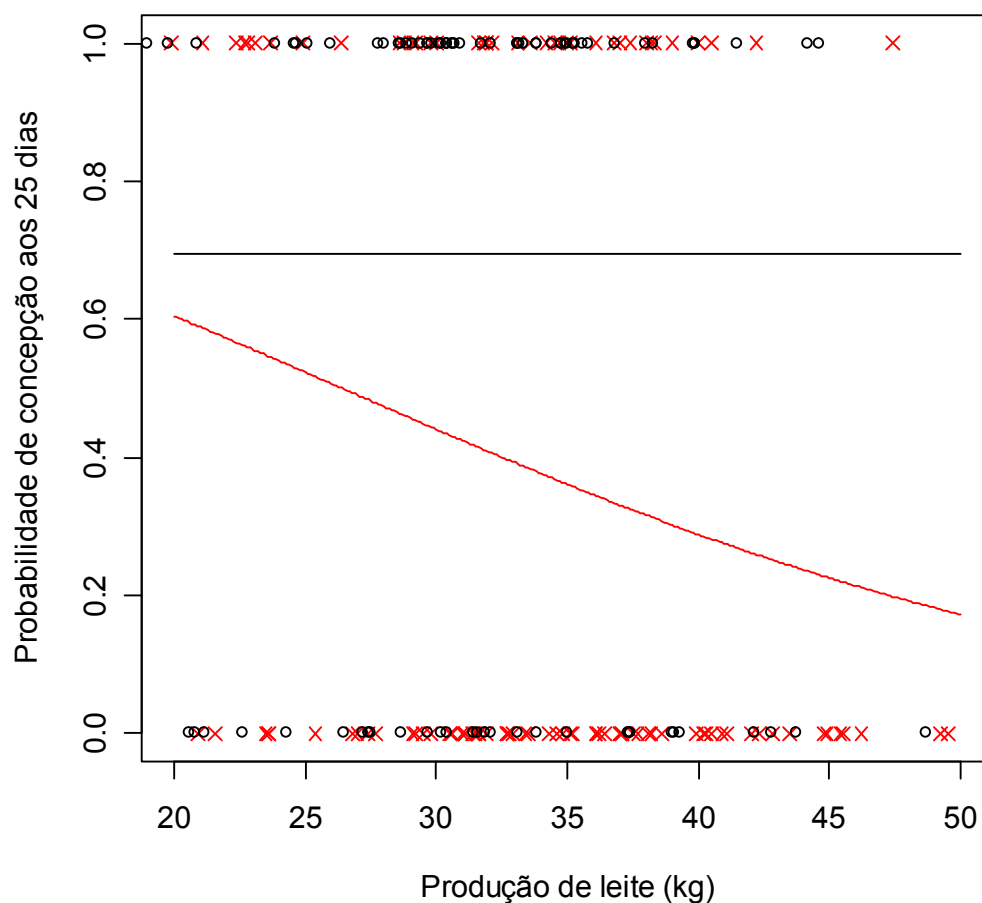


Figura 12: Representação gráfica da probabilidade de concepção aos 25 dias das vacas ovuladas com assincronia 0 em relação à produção de leite (LM), em que “—” representa a probabilidade esperada para IA em relação à LM (com T7 fixada em 38,5°C e P7 fixada em 1,91ng/ml), e “—” representa a probabilidade esperada para TE (com T7 fixada em 38,5°C), e “X” representam os dados observados para IA, “O” para TE

Verificou-se que o aumento da produção de leite afeta negativamente a probabilidade de concepção aos 25 dias na IA, mas não na TE. Esses dados sugerem que a produção de leite está influenciando negativamente antes do dia 7, ou seja, no desenvolvimento folicular, fecundação e/ou desenvolvimento inicial do

embrião. Sartori et al. (2002) e Leroy et al. (2005) demonstraram que os embriões produzidos nas vacas em lactação possuem qualidade inferior aos produzidos em vacas não lactantes, novilhas ou vacas de corte. Novamente a TE pode ultrapassar esse efeito.

Os dados aqui apresentados mostram que a utilização de TE deve ser estimulada como ferramenta para aumentar concepção em vacas de leite de alta produção.

MORTE EMBRIONÁRIA TARDIA

Das 153 vacas gestantes aos 25 dias de gestação, 25 se encontravam vazias no 39º dia, 10,8% (8/74) na IA e 21,5% (17/79) na TE.

As covariáveis consideradas no ajuste do modelo logístico para a variável resposta morte embrionária tardia foram tratamento, estação, DEL, produção de leite (LM), temperatura corporal (T7 e T14) e interações. Não houve evidência de efeito da estação, da produção de leite e do DEL na probabilidade de MET, havendo, porém, tendência de efeito de T7 ($p=0,10$) e do efeito de tratamento ($p=0,06$).

As probabilidades de MET para os dois tratamentos como função da T7 podem ser estimadas através das equações:

$$\text{Probabilidade de MET IA} = \frac{\exp(-36,23 + 0,88.T7)}{1 + \exp(-36,23 + 0,88.T7)} e$$

$$\text{Probabilidade de MET TE} = \frac{\exp(-35,41 + 0,88.T7)}{1 + \exp(-35,41 + 0,88.T7)},$$

cujas representações gráficas são mostradas nas Figuras 13 e 14.

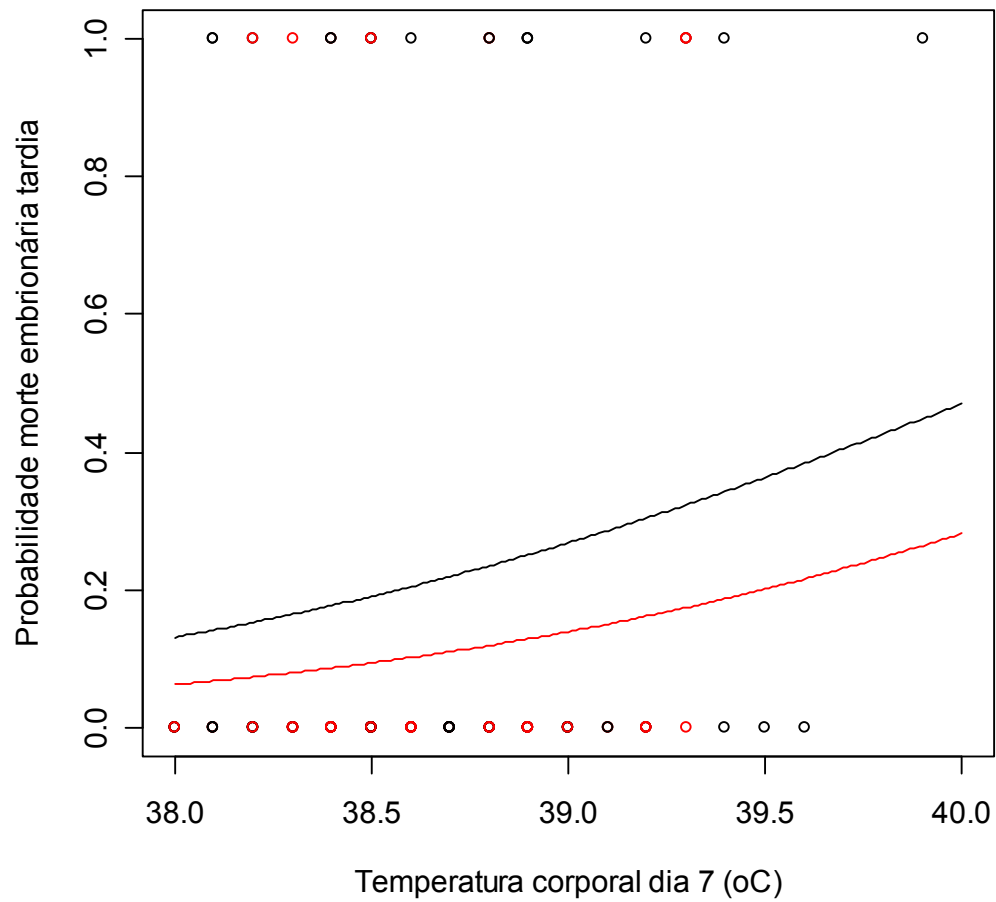


Figura 13: Representação gráfica da probabilidade de MET em relação à temperatura corporal do dia 7 (T7) em que “—” representa a probabilidade esperada para IA em relação a T7, “—” para TE em relação a T7, e “o” representam os dados observados para IA e “o” para TE

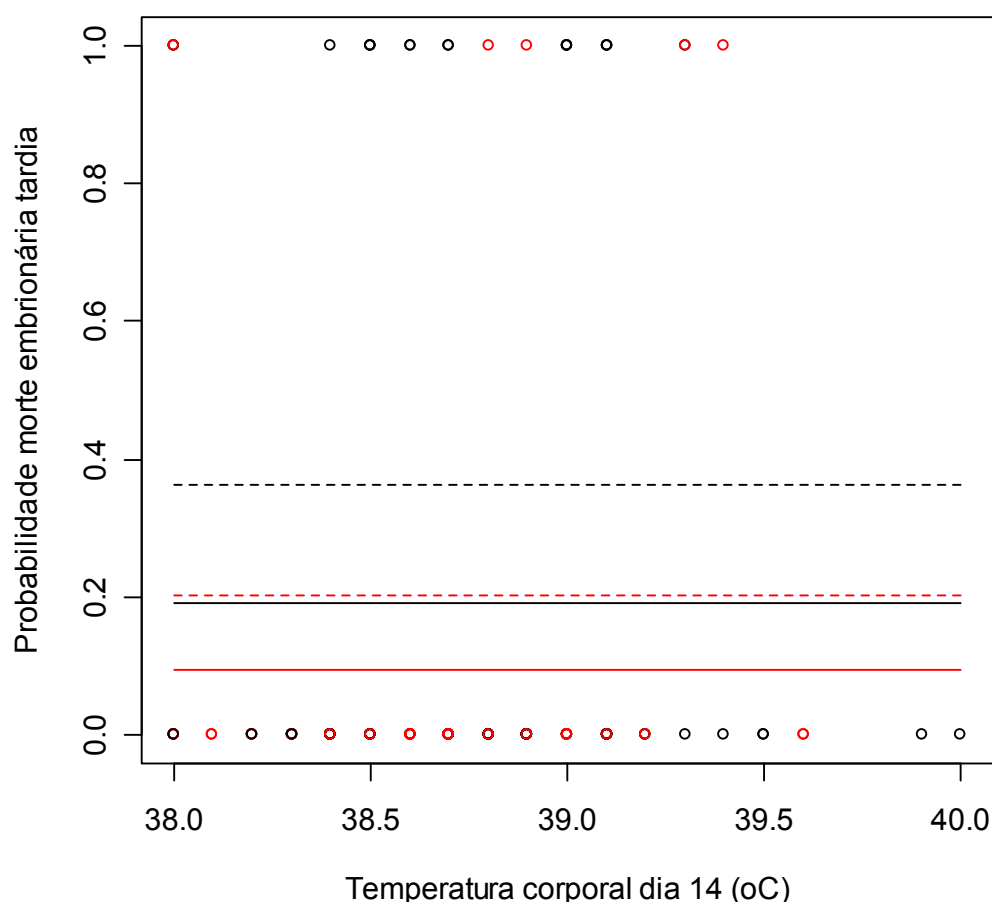


Figura 14: Representação gráfica da probabilidade de MET em relação à temperatura corporal do dia 14 (fixada a T7 em 38,5°C ou 39,5°C), em que “—” representa a probabilidade esperada para IA em relação a T14, fixada a temperatura em 38,5°C, “——” para TE, fixada a temperatura em 38,5°C, e “- - - -” para IA, fixada a temperatura em 39,5°C, “- - - -” para TE, fixada a temperatura em 39,5°C e “○” representam os dados observados para IA, “○” para TE

Verificou-se que com o aumento da temperatura corporal no dia 7, houve aumento da MET. A temperatura do dia 14 não afetou a MET, independentemente do que ocorreu no dia 7, ou seja, MET alta devido à temperatura corporal alta no dia 7 não sofreu influência da temperatura do dia 14. Esses resultados mostram um efeito residual da temperatura do dia 7 e mostram novamente a influência negativa

das altas temperaturas na fase inicial. Os fatores que afetam a MET ainda não estão bem caracterizados (Chebel et al., 2004). A morte embrionária é uma variável difícil de ser estudada, devido grande numero de fatores que podem interferir. Mais de 70% das causas de morte embrionária são devido a causas não infecciosas, que geralmente são multifatoriais e de difícil diagnóstico (Christianson, 1992 apud Vanroose et al., 2000). Os índices de morte embrionária em vacas em lactação variam de 10 a 60,5% (Vasconcelos et al., 1997; Cartmil et al., 2001; Moreira et al., 2001; Chebel et al., 2003; Chebel et al., 2004; Sartori, 2004; Sartori et al., 2006).

Sartori et al. (2006) não obtiveram diferenças significativas nas taxas de morte embrionária entre IA (18,6%) e TE (26,2%), apesar da diferença numérica. Possíveis causas da maior morte embrionária no grupo TE continuam indefinidas neste trabalho.

5. CONCLUSÃO

A transferência de embriões frescos produzidos em vacas Holandesas não lactantes é uma ferramenta importante para aumentar a probabilidade de concepção de vacas Holandesas em lactação.

Uma das grandes vantagens da TE em relação à IA é que na TE há prévia avaliação da presença do CL no momento da inovulação. A avaliação da taxa de ovulação pode minimizar o decréscimo da probabilidade de concepção por falhas de ovulação, fator não avaliado quando se utiliza IA.

Os efeitos negativos da produção de leite e de altas temperaturas ambientais podem prejudicar o desenvolvimento folicular, a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial. A grande importância da TE, é que o embrião é transferido sete dias após o estro, e, portanto sai em vantagem, porque o embrião produzido de vacas não lactantes não passou por esses efeitos negativos iniciais. Verificou-se que a produção de leite afeta a probabilidade de concepção na IA, mas não na TE. Esses dados são interessantes, pois mostram que a produção de leite está influenciando negativamente antes do dia 7.

Maior probabilidade de concepção na TE foi observada em todas as situações colocadas no presente trabalho, mostrando que a TE possui vantagens sobre a IA. Apesar disso, maiores temperaturas corporais avaliadas no dia 7 afetaram negativamente da mesma maneira a IA e a transferência de embriões, reduzindo a probabilidade de concepção e aumentando a probabilidade de morte embrionária. A avaliação da temperatura corporal no dia 7 é importante para predizer a probabilidade de concepção.

Verificou-se que quanto maior a concentração sérica de P4 no dia 7, maior a probabilidade de concepção no grupo IA, enquanto que no grupo TE, não houve efeito da concentração de P4 no dia 7 na probabilidade de concepção. Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam a importância da P4 no desenvolvimento embrionário antes do sétimo dia, já que as vacas do grupo TE não foram influenciadas pela concentração sérica de P4, pois receberam embrião desenvolvido em condições melhores.

Apesar da maior morte embrionária na TE, a probabilidade de concepção na TE permaneceu superior à IA. Maiores temperaturas corporais significam maior probabilidade de morte embrionária. Possíveis causas da maior morte embrionária no grupo TE continuam indefinidas neste trabalho.

Os dados aqui apresentados mostram que a utilização da transferência de embriões frescos produzidos em vacas não lactantes deve ser estimulada como ferramenta para aumentar concepção em vacas de leite de alta produção.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambrose JD, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML, Thatcher MJ, Kassa T, Binelli M, Hansen PJ, Chenoweth PJ, Thatcher WW. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat stressed dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 1999; 82:2369-2376.

Butler WR. Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 1998; 81:2533–2539.

Cartmil JA, El- Zarkouny SZ, Hensley SZ, Rozell TG, Smith JF, Stevenson JS. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperatures before or after calving or both. *J. Dairy Sci.* 2001; 84:799-806.

Chebel RC, Santos JEP, Cerri RLA, Galvao KN, Junchem SO, Thatcher WW. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2003; 60:1389-1399.

Chebel RC, Santos JEP, Reynolds JP, Cerri RLA, Junchem SO, Overton M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 2004; 84:239-255.

Demetrio CGB. Modelos lineares generalizados. 46^a Reunião anual da RBRAS, Piracicaba 2001; 113p.

Drost M, Ambrose JD, Thatcher MJ, Cantrell CK, Wolfsdorf KE, Hasler JF, Thatcher WW. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. *Theriogenology* 1999; 52:1161-1167.

Ealy AD, Drost M, Hansen PJ. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.* 1993; 76:2899-2905.

Green MP, Hunter MG, Mann GE. Relationships between maternal hormone secretion and embryo development on day 5 of pregnancy in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 2005; 88:179-189.

Grohn YT, Rajala-Schultz PJ. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61:6505-6514.

Hansen PJ, Arechiga CF. Strategies for managing reproduction in heat-stressed dairy cow. *J. Anim. Sci.* 1999; 77 (suppl.2):36-50.

Harrison RO, Ford SP, Young JW, Conley AJ, Freeman AE. Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 1990; 73:2749-2758.

Ju JC, Jiang S, Tseng JK, Parks JE, Yang X. Heat shock reduces developmental competence and alters spindle configuration of bovine oocytes. *Theriogenology* 2005; 64:1677-1689.

Kadzere CT, Murphy MR, Silanikove N, Maltz E. Heat stress in lactating dairy cows: a review. *Livestock production science* 2002; 77:59-91.

Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N. Manual of bovine embryo transfer. Japan Livestock Technology Association 1995; 432p.

Leroy JLMR, Opsomer G, De Vliegher S, Vanholder T, Goossens L, Geldhof A, Bols PEJ, De Kruif A, Van Soom A. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. *Theriogenology* 2005; 64:2022-2036.

Lopez-Gatius F. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology* 2003; 60:89-99.

Lopez-Gatius F, Lopez Bejar M, Fenech M, Hunter RHF. Ovulation failure and double ovulation in dairy cattle: risks factors and effects. *Theriogenology* 2005; 63:1298-1307.

Lopez H, Satter LD, Wiltbank MC. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 2004; 81:209-223.

Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? J. Dairy Sci. 2001; 84:1277-1293.

Mann GE, Lamming GE. Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in the cow. Reproduction 2001; 121:175-180.

Mann GE, Fray MD, Lamming GE. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon- τ production in the cow. The Veterinary Journal, in press, 2006.

Momont HW, Seguin BE. Influence of day of estrous cycle on response to PGF $_{2\alpha}$ products: implications for AI programs for dairy cattle. 10th Proc. Internat. Congr. Animal Reproduct, Urbana-Champaign, IL, 1984.

Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a time of artificial insemination protocol in lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 2001; 84:1646-1659.

Nebel RL, McGilliard ML. Interactions of of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. J. Dairy Sci. 1993; 76:3257-3268.

Parr RA, Davis IF, Miles MA, Squires TJ. Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. Res. Vet. Sci. 1993; 55: 306-310.

Putney DJ, Drost M, Thatcher WW. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. Theriogenology 1989; 31(4):765-778.

Ryan DP, Prichard JF, Kopel E, Godke RA. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. Theriogenology 1993; 39:719-737.

Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE, Wiltbank MC. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. J. Dairy Sci. 2002; 85:2831-2842.

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. *J. Dairy Sci.* 2002; 85:2803-2812.

Sartori R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae* 2004; 32:35-50.

Sartori R, Gumen A, Guenther JN, Souza AH, Caraviello DZ, Wiltbank MC. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology*, in press, 2006.

Stronge AJH, Sreenan JM, Diskin MG, Mee JF, Kenny DA, Morris DG. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology* 2005; 64:1212-1224.

Thatcher WW, Guzeloglu A, Mattos R, Binelli M, Hansen TR, Pru JK. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 2001; 56:1435-1450.

Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR, JEP Santos. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 2006; 65:30-44.

Vanroose G, Kruif A, Van Soom A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. *Anim. Reprod. Sci.* 2000; 60-61:131-143.

Vasconcelos JLM, Silcox RW, Lacerda JA, Pursley JR, Wiltbank MC. Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to heat stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. *Biol. Reprod.* 1997; 56(1):140.

Vasconcelos JLM, Sangsritavong S, Tsai SJ, Wiltbank MC. Acute reduction in serum progesterone concentration after feed intake in dairy cows. *Theriogenology* 2003; 60:795-807.

Venables WN, Ripley BD. *Modern applied statistics with S*, 4th ed. New York: Springer-Verlag 2002; 495p.

Washburn SP, Silvia WJ, Brown CH, McDaniel BT, McAllister AJ. Trends in reproductive performance in southeastern holstein and jersey dhi herds. J. Dairy Sci. 2002; 85:244-251.

Wiltbank MC, Gumen A, Sartori R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. Theriogenology 2002; 57:21-52.

Wright JM. Ilustrações fotográficas do estágio de desenvolvimento do embrião e códigos de qualidade. Manual da sociedade internacional de transferência de embriões 1998; 3:171-174.