

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

VITRIFICAÇÃO E CONGELAÇÃO DE MÓRULAS E
BLASTOCISTOS PRODUZIDOS *IN VIVO* EM *BOS TAURUS* E
BOS INDICUS

Maria Clara Costa Mattos

BOTUCATU - SP

- 2010 -

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE REPRODUÇÃO ANIMAL E RADIOLOGIA VETERINÁRIA

VITRIFICAÇÃO E CONGELAÇÃO DE MÓRULAS E
BLASTOCISTOS PRODUZIDOS *IN VIVO* EM *BOS TAURUS* E
BOS INDICUS

Maria Clara Costa Mattos

Dissertação apresentada junto
ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária para a
obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Sartori Filho

BOTUCATU - SP

- 2010 –

Nome do Autor: Maria Clara Costa Mattos

Título: Vitrificação e congelação de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* em *Bos taurus* e *Bos indicus*

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Roberto Sartori Filho

Presidente e Orientador

Departamento de Zootecnia

ESALQ – USP – Piracicaba

Prof. Dr. João Carlos Pinheiro Ferreira

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária

FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof^a Dr^a Margot Alves Nunes Dode

Membro

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia

Brasília, DF

Data da Defesa: 28 de maio de 2010.

Aos meus amados pais, Ana Silvia e Ocimar

Aos meus avós Maria, Licínio e Lúdia

À minha irmã querida, Isabela

E ao meu grande amor, Vicente

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista – Campus de Botucatu, ao Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária e ao Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade de aprimoramento técnico, científico e acadêmico.

Ao Prof. Roberto Sartori Filho, pela orientação, confiança, companheirismo e amizade. Muito obrigada por participar e auxiliar o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores da Pós-Graduação: João Carlos Pinheiro Ferreira, Sony Dimas Bicudo, Fernanda Landim da Cruz e Alvarenga, Marco Antônio Alvarenga, Nereu Carlos Prestes, Cezinande de Meira, Eunice Oba, Roberto Sartori Filho, Ciro Moraes Barros, Mário de Beni Arrigoni. Especialmente, aos professores Maria Denise Lopes e Frederico Ozanam Papa pela participação e contribuição no meu Exame de Qualificação.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, em especial, aos pesquisadores Maurício Franco Machaim e Margot Alves Nunes Dode, pelas oportunidades concedidas e pelas grandes contribuições científicas. E ao Regivaldo Sousa pelos ensinamentos laboratoriais tão valiosos.

À Rogéria e Wilson, da Fazenda São José – Sindi do ACS, pela oportunidade de realização do experimento e pela grande amizade e acolhida em vosso lar.

Às Fazendas Iracema e Sant'Anna, no município de Lins, SP e à Fazenda Campestre (Jorge), no município de São Pedro, SP pela oportunidade de realização do experimento.

Aos colegas médicos veterinários Adriano Seddon e Leonardo Dantas da Silva, pela disposição e empenho em viabilizar a execução do experimento com a raça Holandês.

À Fazenda Figueira, da Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz”, especialmente ao José Renato (Raí) e à Laísse, que viabilizaram a execução do experimento com a raça Nelore.

A todos os funcionários das fazendas: Joel, Lucas, Sr. Antônio, Gisele, Toninho, Hernando, Sr. Antenor, Nino, Nardão, Diego e Vavá, por auxiliarem no manejo dos animais.

À grande amiga e companheira de equipe Michele Ricieri Bastos, pelo apoio e ajuda incondicional em todas as etapas deste experimento. Sem você não seria possível concretizá-lo!

Aos demais companheiros de equipe que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho: Monique Mendes Guardieiro, José Carvalho, Fernanda Zinsly de Mattos, Amanda Lemes, Roberta Ferreira, Henderson Ayres, Ana Carolina Oliveira e Marcos Biehl.

A todos os estagiários que acompanharam e contribuíram para o desenvolvimento deste experimento: Rafael (UEL), Tito (UNESP, Botucatu), Ricardo (UFMS).

A todos os animais que tornaram possível a realização deste estudo!

Ao Prof. Gerson Barreto Mourão, pela disposição e grandes contribuições na elaboração das análises estatísticas.

À Intervet/Shering-Plough do Brasil e ao Juliano Kummer pela parceria e incentivo científicos, fornecendo os hormônios para sincronização e superovulação das doadoras e receptoras.

Ao Dr. Gilberto Almodin (Ingamed), pela parceria e fornecimento dos meios utilizados na vitrificação dos embriões.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação e do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária: Denise, José Roberto, Maria, Patrícia, Cristina e Edilson, que gentilmente atenderam minhas solicitações. À bibliotecária Rose, pela disponibilidade e confecção da ficha catalográfica.

Aos meus queridos amigos de Botucatu: Ian, Rosiara, Carmo, Mateus, Cely, Rodolfo, Daniel, André, Bethania, Jeanne, Vivi, Ieda, Guta, Bruna e Wollf.

Aos meus pais, Ana Silvia e Ocimar, à minha irmã Isabela e a todos os meus familiares, que sempre me apoiaram e forneceram as ferramentas para mais esta grande conquista. Amo muito vocês!

Ao Vicente (Vi), pelo amor, carinho e companheirismo em todos os momentos. Amo você!

Aos professores doutores componentes da minha banca examinadora pela disponibilidade e colaboração científica com a minha dissertação.

À FAPESP, pela bolsa de estudos e bolsa de Auxílio à Pesquisa oferecidos.

E a todos de alguma forma contribuíram para a realização e o sucesso deste trabalho. Muito obrigada!

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Taxa de concepção de embriões transferidos a fresco <i>versus</i> congelados em glicerol em dois estudos, de 1987 a 1995. Adaptado de Hasler <i>et al.</i> (2001).....	18
Tabela 2 -	Taxas de concepção de embriões taurinos congelados e vitrificados em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário. Adaptado de Loparatova <i>et al.</i> (2006).....	19
Tabela 3 -	Taxa de concepção de mórulas e blastocistos, provenientes de fêmeas da raça HPB, após serem submetidos à congelação tradicional lenta e transferidos em vacas HPB lactantes.....	24
Tabela 4 -	Taxa de concepção aos 25 dias de embriões frescos e congelados oriundos de doadoras da raça HPB.....	25
Tabela 5 -	Taxa de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) dos embriões produzidos <i>in vivo</i> em doadoras da raça Sindi, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados, aos 30 dias após ovulação.....	44
Tabela 6 -	Efeito do grau de qualidade embrionária nas taxas de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) de embriões produzidos <i>in vivo</i> em doadoras da raça Sindi, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados.....	45
Tabela 7 -	Taxa de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) dos embriões produzidos <i>in vivo</i> em doadoras da raça Nelore, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados, aos 30 e 60 dias após ovulação.....	45

Tabela 8 -	Efeito do grau de qualidade embrionária nas taxas de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) de embriões produzidos <i>in vivo</i> em doadoras da raça Nelore, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados.....	46
Tabela 9 -	Taxa de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) de embriões produzidos <i>in vivo</i> por diferentes tratamentos superovulatórios em doadoras da raça Nelore, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados.....	47
Tabela 10 -	Produção embrionária (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) das vacas e novilhas HPB utilizadas no Experimento 3.	47
Tabela 11 -	Taxa de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP), aos 30 e 60 dias dos embriões produzidos <i>in vivo</i> em doadoras da raça Holandês Preto e Branco, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados.....	48
Tabela 12 -	Efeito do grau de qualidade embrionária nas taxas de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) de embriões produzidos <i>in vivo</i> em doadoras da raça Holandês Preto e Branco, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados.....	49
Tabela 13 -	Efeito da categoria animal das receptoras nas taxas de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) aos 30 e 60 dias de embriões produzidos <i>in vivo</i> em doadoras da raça Holandês Preto e Branco (HPB), transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Protocolo de superestimulação ovariana e superovulação conhecido como P24, com retirada do implante de progesterona no dia 7 de manhã e P36, com retirada do implante de progesterona no dia 7 de tarde, conforme Barros & Nogueira (2001).....	9
Figura 2 -	Esquema ilustrativo da indução da ovulação na manhã do dia 8 (LH48) ou na tarde do dia 8 (LH60). No último caso, as IA são realizadas no dia 9 nos períodos da manhã e da tarde, conforme Barros & Nogueira (2001).....	10
Figura 3 -	Esquema ilustrativo do protocolo de superestimulação ovariana e SOV das fêmeas da raça Sindi.....	29
Figura 4 -	Figuras representativas dos compartimentos para vitrificação de embriões em hastes.....	32
Figura 5 -	Esquema ilustrativo da disposição das gotas das soluções de manutenção (SM), solução de vitrificação – 1 (VI-1) e solução de vitrificação – 2 (VI-2) e das etapas da vitrificação em hastes – “Cryotop”.....	33
Figura 6 -	Figura representativa de haste de polipropileno para vitrificação dos embriões.....	33
Figura 7 -	Figura ilustrativa do procedimento final de vitrificação de embriões em hastes.....	34
Figura 8 -	Esquema ilustrativo do primeiro passo da desvitrificação dos embriões.....	36
Figura 9 -	Esquema ilustrativo do segundo e terceiro passos da desvitrificação dos embriões.....	37
Figura 10 -	Esquema ilustrativo do protocolo de superestimulação ovariana e SOV das fêmeas da raça Nelore.....	39
Figura 11 -	Protocolo das receptoras de embriões da raça Nelore, com e sem a aplicação de eCG, 7 dias após a inovulação.....	40

Figura 12 - Esquema ilustrativo do protocolo de superestimulação ovariana e superovulação das vacas da raça HPB.....	42
Figura 13 - Esquema ilustrativo do protocolo de superestimulação ovariana e superovulação das novilhas da raça HPB.....	42

SUMÁRIO

RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Produção <i>in vivo</i> de embriões bovinos	4
2.2. Fatores que influenciam a produção de embriões <i>in vivo</i> em taurinos e zebuínos	4
2.2.1. Controle do crescimento folicular e superestimulação ovariana..	5
2.2.2. Doses de gonadotrofinas.....	6
2.2.3. Indução da ovulação e IATF em fêmeas superestimuladas	8
2.3. Criopreservação de embriões bovinos.....	12
2.3.1. Congelação lenta versus vitrificação	14
2.3.2. Particularidades da criopreservação de embriões taurinos e zebuínos	18
2.3.3. Diferenças morfo-estruturais de embriões frescos e criopreservados	20
2.3.4. Estágio de desenvolvimento embrionário.....	22
3. OBJETIVO.....	26
4. HIPÓTESES.....	26
5. MATERIAL E MÉTODOS	27
5.1. <i>EXPERIMENTO 1: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos in vivo em fêmeas da raça Sindi.....</i>	27
5.2. <i>EXPERIMENTO 2: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos in vivo em fêmeas da raça Nelore</i>	36
5.3. <i>EXPERIMENTO 3: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos in vivo em fêmeas da raça Holandês Preto e Branco.....</i>	39
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	43

7. RESULTADOS	44
7.1. Experimento 1: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos <i>in vivo</i> em fêmeas da raça Sindi	44
7.2. Experimento 2: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos <i>in vivo</i> em fêmeas da raça Nelore	45
7.3. Experimento 3: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos <i>in vivo</i> em fêmeas da raça Holandês Preto e Branco	47
8. DISCUSSÃO	50
8.1. Experimento 1 e 2: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos <i>in vivo</i> em fêmeas da raça Sindi e Nelore	50
8.2. Experimento 3: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos <i>in vivo</i> em fêmeas da raça Holandês Preto e Branco	53
9. CONCLUSÕES	57
10. CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
11. BIBLIOGRAFIA	60
12. ANEXO I.....	72
13. ANEXO II.....	101

MATTOS, M.C.C. **Vitrificação e congelação de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* em *Bos taurus* e *Bos indicus***. Botucatu, 2010. 120p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

Objetivou-se com o presente estudo avaliar a criotorerância de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* de doadoras da raça Sindi e Nelore (*Bos indicus*) e Holandês Preto e Branco (HPB - *Bos taurus*). No Experimento 1, 24 fêmeas lactantes e não lactantes da raça Sindi foram superovuladas com 100 mg de FSH suíno com protocolos em que as duas últimas aplicações de FSH foram substituídas ou não por 300 UI de eCG. Sete dias após a indução da ovulação, os embriões foram colhidos e avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário e grau de qualidade. Dois terços dos embriões foram destinados à criopreservação, dos quais metade foi congelada pelo método convencional, com curva de resfriamento de $-0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e a outra metade foi vitrificada pela técnica de *Cryotop*. Em seguida, foram descongelados e transferidos para receptoras sincronizadas, de maneira contemporânea aos embriões frescos. No Experimento 2, 31 fêmeas da raça Nelore foram superovuladas com 133 mg de FSH suíno e os dois terços dos embriões colhidos foram criopreservados e transferidos semelhantemente ao Experimento 1. No Experimento 3, 67 vacas lactantes e novilhas da raça HPB foram superovuladas com 500 e 300 UI de FSH suíno, respectivamente, e após a colheita dos embriões foram adotados os mesmos procedimentos realizados nos Experimentos 1 e 2. Os resultados foram analisados por modelos lineares generalizados e estão apresentados na forma de média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão. Nos Experimentos 1 e 2, os embriões transferidos a fresco apresentaram maior taxa de concepção aos 30 dias do que os vitrificados e congelados ($54,8 \pm 7,4^a$, $17,7 \pm 7,3^b$ e $19,5 \pm 6,6\%^b$; respectivamente; $P \leq 0,0013$) na raça Sindi ($n=231$ embriões) e ($46,0 \pm 6,1^a$, $31,2 \pm 5,4^b$ e $28,1 \pm 5,3\%^b$; respectivamente, $P \leq 0,04$) na raça Nelore ($n=297$ embriões). O estágio de desenvolvimento embrionário parece não ter influenciado as taxas de concepção dos embriões zebuínos, especialmente dos criopreservados. No

experimento 3, as taxas de concepção aos 30 dias entre embriões frescos (n=58), vitrificados (n=50) e congelados (n=62) foram semelhantes ($37,4 \pm 12,3$, $24,5 \pm 11,3$ e $21,0 \pm 9,5\%$; respectivamente; $P > 0,15$) e, também, não houve diferença na criotolerância entre mórulas e blastocistos ($P > 0,10$).

Palavras-chave: Produção *in vivo* de embriões; *Bos taurus*, *Bos indicus*, Criopreservação.

MATTOS, M.C.C. **Vitrification and slow freezing of *Bos taurus* and *Bos indicus* *in vivo* produced morulae and blastocysts.** Botucatu, 2010. 120p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the cryotolerance of morulae and blastocysts produced *in vivo* in Sindhi and Nelore (*Bos indicus*) and Holstein (*Bos taurus*) donors. In Experiment 1, 24 lactating and non-lactating Sindhi donors were superovulated with 100 mg porcine FSH with protocols in which the last two FSH treatments were replaced or not by 300 IU eCG. Embryos were collected 7 days after ovulation induction and embryo development and quality degree were assessed. Two thirds of the embryos were cryopreserved, by the conventional freezing or Cryotop method. After that, embryos were thawed and transferred to synchronized recipients, simultaneously to fresh embryos. In Experiment 2, 31 Nelore cows were superovulated with 133 mg porcine FSH and two thirds of the embryos were cryopreserved and transferred similarly to Experiment 1. In Experiment 3, 67 Holstein lactating dairy cows and heifers were superovulated with 500 and 300 IU pFSH, respectively, and the same procedures were performed as in Experiments 1 and 2. Results were analyzed using generalized linear models and are presented as least squares means $\pm$ standard error. In Experiments 1 and 2, fresh embryos had a higher conception rate at Day 30 than those vitrified and frozen (54.8 ± 7.4^a , 17.7 ± 7.3^b and $19.5 \pm 6.6\%^b$; respectively; $P \leq 0.0013$) in Sindhi donors ($n=231$ embryos) and (46.0 ± 6.1^a ; 31.2 ± 5.4^b and $28.1 \pm 5.3\%^b$; respectively; $P \leq 0.04$) in Nelore donors ($n = 297$ embryos). Embryo developmental stage seems to have not influenced conception rates of Zebu embryos, especially cryopreserved ones. Finally, in Experiment 3, conception rates of fresh and cryopreserved embryos were similar (37.4 ± 12.3 , 24.5 ± 11.3 and $21.0 \pm 9.5\%$; respectively, $P > 0.15$) and also no difference was detected for the cryotolerance of morulae versus blastocysts ($P > 0.10$).

Keywords: *In vivo* produced embryos, *Bos taurus*, *Bos indicus*, Cryopreservation.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, composto por aproximadamente 190 milhões de cabeças, sendo representado, principalmente, por gado de corte com predominância da raça Nelore, devido à sua ótima adaptabilidade às regiões brasileiras (VIANA, 2007).

A demanda crescente por animais de elevado mérito genético tem impulsionado o uso de técnicas avançadas de biotecnologia, notadamente aquelas associadas à reprodução, tais como a produção de embriões por superovulação (SOV), produção *in vitro* de embriões (PIVE), transferência nuclear, clonagem, entre outras.

A necessidade de utilização dessas biotécnicas tem se difundido amplamente entre os criadores de bovinos de elite, como forma de recompor e melhorar as linhagens populacionais. Estas técnicas trouxeram uma velocidade significativa à pressão da seleção genética, e sendo utilizadas de maneira consciente tornar-se-ão uma ferramenta de grande valia à pecuária nacional.

A transferência de embriões bovinos (TE) no Brasil foi iniciada na década de 70, primeiramente, utilizando embriões importados e, posteriormente, coletados no país. Esta atividade desenvolveu-se gradualmente, assumindo grande importância econômica. E, nos últimos anos, novas biotecnologias foram desenvolvidas e incorporadas, ampliando o conceito da TE, dentre as quais a fecundação *in vitro* (FIV) ou PIVE revolucionou o mercado e o país tornou-se o maior produtor mundial de embriões bovinos, respondendo por aproximadamente um quarto do total das transferências realizadas no mundo (VIANA, 2007).

Outra característica do mercado atual é o predomínio das transferências realizadas “a fresco” tanto na TE convencional quanto na FIV, em função dos resultados insatisfatórios obtidos com a congelamento de embriões taurinos e zebuínos. Fato este, que alavancou o mercado de receptoras no país, incluindo fornecimento e/ou hospedagem dos animais, sincronização de estros, inovulação dos embriões, diagnóstico de gestação e sexagem fetal.

Existem diferenças claras no que se refere aos grupos genéticos *Bos taurus* e *Bos indicus*. O zebu tem alta tolerância ao clima tropical (adaptabilidade e rusticidade), apresentando uma excelente adaptação ao

nosso país. A dinâmica folicular no *Bos indicus* é caracterizada pela ocorrência de duas, três ou quatro ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral (RHODES *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 1997; MOLLO *et al.*, 2007), as quais são similares às relatadas para raças européias (SAVIO *et al.*, 1988; SIROIS *et al.*, 1988; SARTORI *et al.*, 2004). Apesar da similaridade no padrão da dinâmica de crescimento folicular, diferenças importantes na fisiologia e no comportamento reprodutivo entre *Bos taurus* e *Bos indicus* são relatadas. Os animais zebuínos apresentam, em comparação aos taurinos, um diâmetro menor do folículo dominante e corpo lúteo (FIGUEIREDO *et al.*, 1997; PINHEIRO *et al.*, 1998), menor duração do estro e alta incidência de estros noturnos (BARROS *et al.*, 1995; PINHEIRO *et al.*, 1998), maior número de folículos menores que 5 mm de diâmetro (SEGERSON *et al.*, 1984; BURATINI Jr. *et al.*, 2000; BARUSELLI *et al.*, 2007) e menor capacidade de secreção de LH (RHODES *et al.*, 1995).

Com relação à produção embrionária, também, existem diferenças marcantes entre taurinos e zebuínos, principalmente, no que se refere às características ultra-estruturais do embrião em diferentes fases do desenvolvimento (mórulas e blastocistos; VISINTIN *et al.*, 2002).

Neste contexto, a criopreservação de embriões é uma ferramenta indispensável, pois permite estocar a produção excedente, visto que muitas vezes não há disponibilidade de receptoras para inovulação. Ademais, esta técnica oferece uma diminuição do custo de transporte do material genético e proporciona uma maior segurança zôo-sanitária na comercialização, uma vez que estes embriões, quando manipulados segundo as normas da Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS), podem impedir a disseminação de várias doenças.

Dessa maneira, torna-se fundamental a discussão das diferenças morfo-estruturais entre embriões taurinos e zebuínos e da capacidade de criotolerância desses embriões em diferentes estágios de desenvolvimento, que, também, competem para o sucesso da técnica de criopreservação a ser implementada.

A presente revisão de literatura visa analisar comparativamente a produção *in vivo* de embriões *Bos taurus* e *Bos indicus*, bem como as suas

características pertinentes à criotolerância embrionária, de maneira a contribuir com os avanços nesta área tão promissora e de fundamental importância no panorama da pecuária nacional.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção *in vivo* de embriões bovinos

A produção *in vivo* de embriões bovinos através da indução de ovulações múltiplas ou SOV é comumente denominada TE e consiste na estimulação dos ovários da fêmea bovina através do uso de gonadotrofinas. A SOV tem por objetivo estimular o crescimento e a maturação de vários folículos ovarianos simultaneamente. E, após a detecção do estro ou indução da ovulação, a fêmea é inseminada artificialmente ou recebe a monta natural. Os embriões são colhidos 6 a 8 dias após e transferidos a receptoras sincronizadas ou criopreservados.

Na espécie bovina, a primeira TE foi realizada ainda na metade do último século. Em termos comerciais, a TE em bovinos iniciou-se nos Estados Unidos durante a década de 70. Nesta época, os embriões ainda eram colhidos através de laparotomia mediana, o que limitava a difusão desta biotécnica. Ainda na metade dos anos 70, técnicos desenvolveram o método de colheita não cirúrgica, embora a transferência dos embriões para receptoras (inovulação) continuava sendo realizada através de laparotomia do flanco sob anestesia local. No final desta mesma década, a colheita e a transferência passaram a ser realizadas unicamente por via transcervical. Este fato foi decisivo para a expansão da TE no setor produtivo e a criação do “comércio” de embriões, tão comum nos dias de hoje.

2.2. Fatores que influenciam a produção de embriões *in vivo* em taurinos e zebuínos

A variabilidade na produção de embriões por doadora está diretamente relacionada à variabilidade de resposta ovariana ao protocolo superestimulatório à base de gonadotrofinas. Cerca de 20 a 30% dos animais não respondem a protocolos superestimulatórios e/ou não produzem embriões viáveis, sendo este um dos grandes entraves dos programas de TE comerciais (BARROS & NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI *et al.*, 2006).

Existem muitas diferenças fisiológicas e reprodutivas entre os grupos genéticos taurino e zebuino que devem ser levadas em consideração para a obtenção de resultados satisfatórios. Dentre elas, pode-se destacar: diâmetro

folicular no momento do desvio, no momento da aquisição da capacidade ovulatória, sensibilidade às gonadotrofinas e duração do estro. Tais diferenças são fundamentais para a otimização dos protocolos superestimulatórios e superovulatórios nessas subespécies (BARUSELLI *et al.*, 2006).

A partir da caracterização da dinâmica folicular em fêmeas *Bos taurus* (SIROIS *et al.*, 1988; GINTHER *et al.*, 1989) e *Bos indicus* (BARROS *et al.*, 1995; FIGUEIREDO *et al.*, 1997) tornou-se possível o controle farmacológico do crescimento folicular e ovulação, viabilizando a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Similarmente, este controle farmacológico passou a ser utilizado para otimizar os protocolos de superestimulação ovariana e SOV em doadoras de embrião (BARROS & NOGUEIRA, 2001).

2.2.1. Controle do crescimento folicular e superestimulação ovariana

O início do tratamento superestimulatório com gonadotrofinas é um quesito essencial para a otimização da produção de embriões *in vivo*. Protocolos convencionais de superestimulação ovariana utilizavam o dia do estro como referência (estro base) e o tratamento com gonadotrofinas era iniciado no meio do ciclo estral (8 a 12 dias pós ovulação). Um dos grandes entraves deste protocolo era a necessidade de observação de estro e, também, a grande variabilidade individual relacionada ao dia da emergência da segunda onda folicular (BARUSELLI *et al.*, 2006).

Muitos estudos demonstraram a importância em se iniciar a superestimulação ovariana no momento da emergência da onda folicular (NASSER *et al.*, 1993; ADAMS *et al.*, 1994; MAPLETOFT *et al.*, 2002) e que a ausência de um folículo dominante neste período melhora a resposta superestimulatória e aumenta o número de embriões colhidos (LIMA *et al.*, 2007).

Métodos mecânicos, através da ablação do folículo dominante, ou farmacológicos, através da utilização do GnRH ou do estradiol associado à progesterona, que têm por objetivo controlar a emergência de uma nova onda folicular, foram desenvolvidos nos últimos 10 anos (BARUSELLI *et al.*, 2006).

Uma das principais estratégias utilizadas para a sincronização da emergência da onda folicular em taurinos e zebuínos é a utilização de uma fonte de liberação lenta de progesterona em associação ao estradiol. Bó *et al.* (1993; 1995) testaram a associação do estradiol a uma fonte de progesterona para induzir a atresia do folículo dominante e sincronizar uma nova onda folicular em fêmeas taurinas. Foi observado que a sincronização e emergência de uma nova onda folicular ocorreu, aproximadamente, 4 a 5 dias após essa associação.

Outro estudo com novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus* mantidas em condições subtropicais, também testou a associação do estradiol a uma fonte de progesterona e não foram encontradas diferenças entre o intervalo para a emergência de uma nova onda folicular entre essas categorias animais ($3,1 \pm 0,1$; $3,3 \pm 0,1$ e $3,2 \pm 0,1$ dias; $n = 23$; $P > 0,05$; respectivamente). No entanto, as novilhas *Bos indicus* apresentaram o recrutamento de um maior número de folículos em relação às novilhas *Bos taurus* ($33,4 \pm 3,2$ vs. $25,4 \pm 2,5$; $P \leq 0,05$; respectivamente), sugerindo uma maior probabilidade de resposta superestimulatória às gonadotrofinas pelas novilhas *Bos indicus* (CARVALHO *et al.*, 2008).

De fato, aproximadamente 20 a 30 folículos (3 a 4 mm de diâmetro) emergem durante cada onda de crescimento folicular em fêmeas taurinas (ADAMS *et al.*, 1994) e muitos deles têm potencial de atingir tamanho pré-ovulatório quando estimulados através da administração exógena de gonadotrofinas. Por outro lado, em fêmeas zebuínas, a emergência de uma onda folicular conta com aproximadamente 45 folículos de 3 a 4 mm de diâmetro (BURATINI *et al.*, 2000). Desse modo, pode-se sugerir que zebuínos apresentam maior chance em responder a um protocolo superestimulatório e superovulatório do que taurinos, que irá refletir diretamente no número de estruturas totais e embriões viáveis.

2.2.2. Doses de gonadotrofinas

Fisiologicamente, sabe-se que o hormônio folículo estimulante (FSH), produzido na hipófise anterior, é responsável pela estimulação do crescimento folicular ovariano. Em protocolos de superestimulação ovariana, busca-se a

estimulação de um maior número possível de folículos de uma mesma onda de crescimento folicular, garantindo o desenvolvimento como também a ovulação de tais folículos pela aplicação exógena de hormônios. Portanto, é importante que a SOV seja iniciada antes do período dominância folicular estar estabelecido (MAPLETOFT *et al.*, 2002).

Dentre as gonadotrofinas utilizadas com maior eficiência para superestimulação ovariana, destacam-se a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e o FSH (MAPLETOFT *et al.*, 2002).

A eCG é produzida nos cálices endometriais de éguas prenhes entre o 42º e o 150º dia de gestação, possuindo efeito semelhante ao FSH, embora também possua ação similar ao LH. Este hormônio tem a conveniência da facilidade de aplicação, pois é administrado em dose única. Como desvantagens do uso da eCG na SOV, destacam-se a obtenção de resultados heterogêneos, variabilidade entre partidas do produto e meia vida prolongada. Tais efeitos colaterais indesejáveis podem acarretar falhas de ovulação, resposta superovulatória excessiva, ou ainda, a possibilidade formação de anticorpos, diminuindo a resposta superovulatória após tratamentos subsequentes (BECKERS *et al.*, 1995; ROY *et al.*, 1999; MAPLETOFT *et al.*, 2002).

O protocolo de SOV com eCG consiste na aplicação única intramuscular (i.m.) de aproximadamente 1500 a 2000 UI para novilhas e 2000 a 3000 UI para vacas, dependendo da raça e sub-espécie (BARUSELLI *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2007).

O FSH, extraído da hipófise de suínos (FSH-P), é a gonadotrofina mais utilizada nos programas de SOV e possui um efeito superior na produção de embriões em relação à eCG. No entanto, também apresenta variação na resposta superovulatória, que pode ser devido às diferenças individuais entre doadoras, raça, pureza e dose do produto. Por outro lado, devido à sua meia vida curta (≤ 5 horas), há a necessidade de aplicação a cada 12 horas, durante o período de SOV, além de ter um custo superior à eCG (MAPLETOFT *et al.*, 2002).

A dose de FSH-P varia conforme o produto, a categoria, o estado fisiológico, o escore de condição corporal (ECC), a raça e a individualidade da

doadora, sendo que para as raças zebuínas utiliza-se uma dose menor (aproximadamente 50% a menos) do que para as taurinas e as novilhas necessitam de doses menores do que as vacas. Além disso, estudos recentes têm demonstrado resultados similares no número ou porcentagem de embriões viáveis produzidos por colheita quando a dose de FSH utilizada foi reduzida consideravelmente em relação à dose recomendada na bula dos produtos comerciais (MAPLETOFT *et al.*, 2002; BARUSELLI *et al.*, 2006; SOUZA *et al.*, 2007).

Os protocolos de SOV com FSH são similares aos empregados com eCG, entretanto, ao invés de se fazer apenas uma única aplicação i.m. do produto, no caso do FSH recomenda-se fazer oito aplicações com 12 horas de intervalo e em doses decrescentes (40% da dose total no primeiro dia de tratamento, 30% no segundo, 20% no terceiro e 10% no quarto dia).

2.2.3. Indução da ovulação e IATF em fêmeas superestimuladas

A detecção do estro é um dos grandes entraves para sucesso das diversas biotécnicas de reprodução assistida e, particularmente, em fêmeas superestimuladas, cujo momento do estro, o pico de LH endógeno e a ovulação são muito variáveis (BÓ *et al.*, 2006). É consenso que a observação de estro em *Bos indicus* é complicada e sujeita a falha humana, principalmente, porque a duração do estro desses animais é curta e, muitas vezes, ocorre no período noturno (PINHEIRO *et al.*, 1998). Por outro lado, em *Bos taurus*, especialmente fêmeas de elevada produção leiteira e manejadas sob condições de confinamento, também exibem sinais pouco evidentes de estro (LOPEZ *et al.*, 2004).

Ademais, sugeriu-se que os folículos não ovulados, após superestimulação com gonadotrofinas, possam ter apresentado desenvolvimento anormal, ou ainda, não tinham quantidade suficiente de receptores de LH para responder de maneira efetiva ao pico pré-ovulatório de LH (XU *et al.*, 1995; LIU *et al.*, 1998).

Por esta razão, muitos estudos foram desenvolvidos a fim de implementar a indução da ovulação e a IATF em fêmeas zebuínas e taurinas

superestimuladas. Após a sincronização da emergência da onda folicular com a associação do estrógeno e do implante de progesterona (dia 0), o tratamento superestimulatório é iniciado no dia 4 e injeções de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) são realizadas no dia 6. A denominação desses protocolos é caracterizada de acordo com a retirada do implante de progesterona em relação às aplicações de $PGF_{2\alpha}$. Dessa forma, quando o implante de progesterona é removido no dia 7 de manhã, o protocolo é denominado P24, ou seja, a fonte progesterona é removida 24 horas após a aplicação da $PGF_{2\alpha}$. Entretanto, quando o implante de progesterona é removido no dia 7 de tarde, o protocolo é denominado P36 (Figura 1). A indução da ovulação é realizada no dia 8 e as IA após 12 e 24 horas. Não foram encontradas diferenças no número de embriões transferíveis entre os tratamentos P24 e P36 (BARROS & NOGUEIRA, 2001; ZANENGA *et al.*, 2003, BARUSELLI *et al.*, 2006).

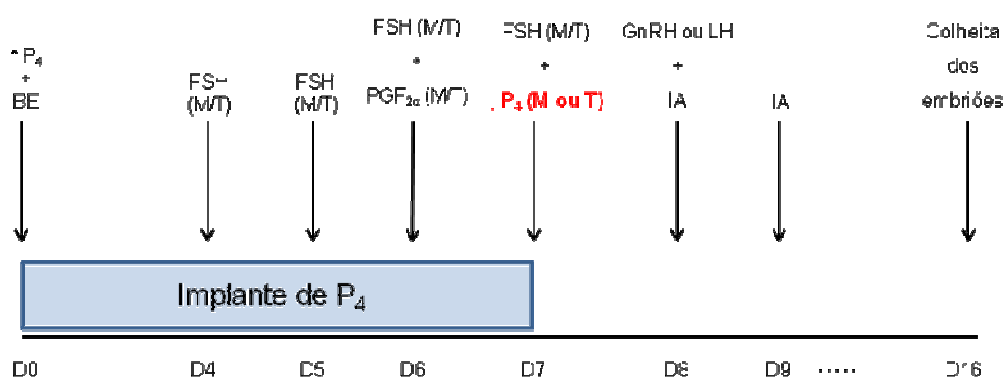


FIGURA 1. Protocolo de superestimulação ovariana e SOV conhecido como P24, com retirada do implante de progesterona no dia 7 de manhã e P36, com retirada do implante de progesterona no dia 7 de tarde, conforme Barros & Nogueira (2001).

Nesses estudos, a manutenção do dispositivo de progesterona 24 ou 36 horas após a aplicação da $PGF_{2\alpha}$, objetivou controlar de maneira mais precisa o pico pré-ovulatório de LH (endógeno) e viabilizar a IATF após a SOV (BARROS & NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI *et al.*, 2006). A taxa de embriões viáveis não aumentou quando o protocolo P36 foi associado à IATF em relação ao protocolo clássico P36 com detecção de estro. Entretanto, a utilização de

IATF contribuiu para facilitar o manejo dos animais, dispensando a observação de estro (NOGUEIRA *et al.*, 2002).

A indução da ovulação nesse protocolo, geralmente é realizada com LH ou GnRH, 12 horas após a remoção da fonte de progesterona, ou seja, 48 horas após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ (LH48; Figura 2). A ovulação ocorre cerca de 24 a 36 horas após a indução com LH e os animais podem ser inseminados em tempo fixo 12 e 24 horas após a indução da ovulação. (NOGUEIRA & BARROS, 2003).

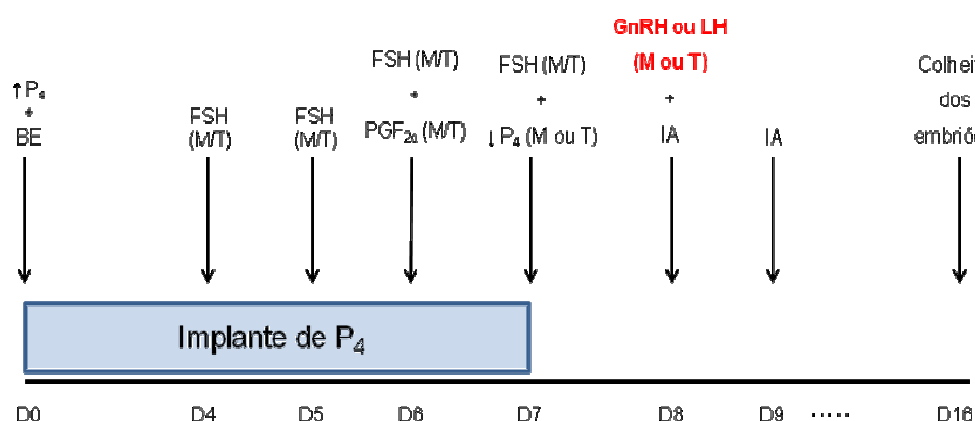


FIGURA 2. Esquema ilustrativo da indução da ovulação na manhã do dia 8 (LH48) ou na tarde do dia 8 (LH60). No último caso, as IA são realizadas no dia 9 nos períodos da manhã e da tarde, conforme Barros & Nogueira (2001).

Em um estudo recente que avaliou a indução da ovulação 48 ou 60 horas após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ em doadoras da raça Nelore, ou seja, 12 ou 24 horas após a última aplicação de FSH e retirada do implante de progesterona, o atraso na indução da ovulação (grupo LH60) aumentou o número de embriões degenerados em relação ao grupo LH48 ($1,5 \pm 0,3$ vs. $0,6 \pm 0,3$; $P \leq 0,008$; respectivamente) e diminuiu o número de embriões viáveis ($3,1 \pm 0,5$ vs. $6,2 \pm 1,0$; $P \leq 0,004$; respectivamente). Estes resultados podem ser explicados pelo aumento do intervalo entre a primeira e última ovulação no grupo LH60 ($21,0 \pm 1,7$ vs. $15,0 \pm 2,1$; h; $P \leq 0,02$), ou seja, provavelmente alguns folículos desse grupo ovularam com o pico pré-ovulatório de LH endógeno, que ocorreu antes do momento da indução da ovulação com LH exógeno (BARUSELLI *et al.*, 2006).

Em raças taurinas, o protocolo P36 é mais eficaz quando a indução da ovulação é realizada 60 horas após a administração da $\text{PGF}_{2\alpha}$ (LH60), resultando numa melhor resposta superovulatória e maior número de embriões viáveis. Rodrigues *et al.*, (2005) observaram uma redução dos folículos não ovulados ($> 8 \text{ mm}$) no dia da colheita de embriões dos animais em que a indução da ovulação foi realizada 60 horas após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ ao invés de 48 horas ($3,5 \pm 0,5$ vs. $1,7 \pm 0,3$; $P \leq 0,05$; respectivamente). Entretanto, não foram observadas diferenças entre o número de corpos lúteos, números de estruturas totais e embriões viáveis. Martins *et al.*, (2005), em um delineamento experimental do tipo *cross-over* com vacas da raça Holandês Preto e Branco (HPB) superovuladas e inseminadas artificialmente em tempo fixo, observaram o aumento do número de embriões transferíveis quando o LH foi administrado 60 horas após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$ do que 48 horas após ($4,9 \pm 0,9$ vs. $2,3 \pm 0,5$; $P \leq 0,05$; respectivamente). O número de embriões de qualidade excelente ($4,0 \pm 0,8$ vs. $1,6 \pm 0,4$; $P \leq 0,05$) e congeláveis ($4,7 \pm 0,9$ vs. $2,1 \pm 0,5$; $P \leq 0,05$) também foi maior para o grupo LH60.

Essas diferenças encontradas com relação ao momento mais apropriado para a indução da ovulação em fêmeas taurinas e zebuínas superestimuladas devem-se às diferenças na fisiologia do crescimento folicular dessas duas subespécies, especialmente, ao diâmetro do folículo dominante no momento do desvio e à aquisição da capacidade ovulatória. O diâmetro médio do folículo dominante no momento do desvio é de 8,5 mm nas raças taurinas (GINTHER *et al.*, 1996; SARTORI *et al.*, 2001) e de 6,0 a 6,3 mm nas raças zebuínas (GIMENES *et al.*, 2005a; SARTORELLI *et al.*, 2005). Além disso, a capacidade ovulatória é adquirida quando o folículo dominante atinge 10 mm de diâmetro em vacas da raça HPB (SARTORI *et al.*, 2001) e entre 7 e 8,4 mm em novilhas Nelore (GIMENES *et al.*, 2005b). Sendo assim, o atraso na indução da ovulação em fêmeas taurinas tem por objetivo proporcionar maior tempo para que a maioria dos folículos superestimulados atinja a capacidade ovulatória e tornem-se passíveis de ovular frente ao estímulo do agente indutor da ovulação (GnRH ou LH).

Com o objetivo de melhorar a resposta superestimulatória das doadoras de embriões *Bos indicus*, alguns estudos preconizaram alterações no protocolo

superestimulatório à base de gonadotrofinas, com a finalidade de aumentar o crescimento folicular, a taxa de ovulação e a produção embrionária. Barros *et al.* (2007) testaram a substituição das duas últimas aplicações de FSH-P por eCG em vacas Nelore e observaram melhora na resposta superestimulatória (folículos ≥ 6 mm no momento da indução da ovulação) dos animais tratados com FSH-P/eCG em relação aos animais tratados apenas com FSH-P ($21,05 \pm 2,76$ vs. $15,25 \pm 2,06$; $P < 0,01$; respectivamente). O número total de estruturas colhidas, também, foi maior no grupo FSH-P/eCG ($10,0 \pm 1,48$ vs. $6,65 \pm 1,18$; $P \leq 0.03$). No entanto, o número de embriões viáveis não diferiu entre os tratamentos. Outro estudo semelhante com novilhas Nelore não corroborou tais informações (SARTORI *et al.*, 2009).

Como a dose de FSH-P no último dia do tratamento superestimulatório equivale a 10% do total de FSH-P administrado ao animal, acredita-se que a substituição por eCG, neste momento, possa ter a função de aumentar o crescimento folicular e, conseqüentemente, a taxa de ovulação, principalmente pela atividade de LH mimetizada pelo eCG após a fase de desvio folicular, refletindo positivamente na produção embrionária. Estudos semelhantes vêm sendo conduzidos com vacas holandesas e de outras raças, para confirmar este efeito potencialmente benéfico do eCG no tratamento superestimulatório de fêmeas *Bos taurus*.

2.3. Criopreservação de embriões bovinos

Nas ultimas décadas, vários avanços na área da produção animal foram alcançados. O primeiro grande passo foi obtido com o sucesso da criopreservação dos gametas masculinos. Isso permitiu a comercialização nacional e internacional de sêmen de animais geneticamente superiores, contribuindo desta forma, para um ganho genético nos rebanhos mundiais tanto de corte quanto de leite. Com o desenvolvimento das técnicas de TE e PIVE tornou-se possível, que fêmeas de alto valor genético também contribuísem de forma mais efetiva para o melhoramento genético, pois, semelhante ao que aconteceu com o sêmen, foi possível a comercialização deste material genético através de embriões criopreservados (RUMPF *et al.*, 2004).

Os primeiros relatos de criopreservação de embriões de mamíferos foram realizados por Whittingham *et al.*, em 1972 com embriões de camundongo. Em 1973, Wilmut e Rowson obtiveram o primeiro bezerro proveniente de um embrião congelado, descongelado e transferido para uma receptora. Desde então, inúmeros trabalhos têm sido desenvolvidos por pesquisadores de todo mundo visando melhorar os métodos de criopreservação, de forma a diminuir os danos que este procedimento causa ao embrião.

A criopreservação é um procedimento que expõe o embrião a várias fases de congelação pela ação de fatores físicos, químicos e biológicos. Esses fatores podem causar lesão na zona pelúcida, membrana ou citoesqueleto celular e distúrbios metabólicos. Tais defeitos celulares levam à perda do controle celular e, eventualmente, à morte por apoptose ou necrose (LANDIM-ALVARENGA *et al.*, 2007).

Durante a criopreservação, três tipos de danos podem ser distinguidos de acordo com as faixas de temperatura que o embrião atravessa: temperaturas entre +15 e -5°C, a crioinjúria afeta predominantemente as gotas lipídicas citoplasmáticas e os microtúbulos, incluindo o fuso meiótico (AMAN & PARKS, 1994; LEIBO *et al.*, 1996). Enquanto que este último pode ser reversível, o primeiro é irreversível e, ovócitos ricos em lipídeos e embriões de algumas espécies podem não sobreviver após o processo de criopreservação (VAJTA & NAGY, 2006). Entre -5 e -80°C, a formação de cristais de gelo extra e, predominantemente, intracelular é a principal forma de crioinjúria. Finalmente, danos de fratura na zona pelúcida ou no citoplasma ocorrem entre -50 e -150°C (RALL & MEYER, 1989). Durante o aquecimento, os mesmos tipos de injúria podem ocorrer, obviamente, na ordem inversa (VAJTA & NAGY, 2006).

A extensão da crioinjúria depende do tamanho e tipo celular, da permeabilidade das membranas ao crioprotetor e da qualidade e sensibilidade do embrião à criopreservação. E, todos esses fatores, podem ainda variar de acordo com a espécie, estágio de desenvolvimento embrionário e a origem (embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*). Entretanto, os embriões têm a capacidade de reparar os danos causados pela criopreservação total ou parcialmente e, continuar seu desenvolvimento, levando a gestação a termo.

Dessa forma, o propósito da criopreservação de embriões é minimizar a crioinjúria e auxiliar na regeneração celular (VAJTA & KUWAYAMA, 2006).

Todas as estratégias utilizadas para minimizar as crioinjúrias baseiam-se em dois fatores fundamentais: o uso de crioprotetores e curvas ótimas de resfriamento e reaquecimento (VAJTA & KUWAYAMA, 2006). Dentre as metodologias que incluem a técnica de criopreservação de embriões, duas merecem destaque especial: a congelação tradicional lenta e a vitrificação (DATTENA *et al.*, 2000; VAJTA & KUWAYAMA, 2006).

2.3.1. Congelação lenta versus vitrificação

As técnicas tradicionais de congelação foram introduzidas primeiramente e, podem ser interpretadas como um delicado balanço entre vários fatores que podem causar danos tóxicos, osmóticos, fraturas celulares e formação de cristais intra e extracelular (VAJTA & KUWAYAMA, 2006).

Na congelação tradicional lenta, os embriões permanecem em soluções que contêm substâncias crioprotetoras numa concentração de aproximadamente 1 a 2 mol/L, para então, serem envazados em mini palhetas de 0,25 mL. As palhetas são lacradas e colocadas em uma máquina de congelação estabilizada a -6°C . O resfriamento ocorre rapidamente até a temperatura de -6°C , quando a indução à cristalização (*seeding*) é realizada. Os passos subsequentes são totalmente controlados pela máquina e as taxas de resfriamento variam entre 0,3 e $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até que temperatura atinja -32°C , quando as palhetas são submergidas diretamente no nitrogênio líquido e armazenadas em botijões criogênicos (VAJTA & NAGY, 2006).

O mecanismo de ação dos crioprotetores não está totalmente elucidado, entretanto, sabe-se que o seu papel é reduzir o ponto de solidificação das soluções durante a congelação, aumentando a taxa de sobrevivência das células. Essa característica é benéfica por promover um maior tempo para a desidratação celular, diminuindo a formação de cristais de gelo intracelular. Uma segunda função do crioprotetor parece ser a sua interação com a membrana celular, exercendo uma ação estabilizadora durante as mudanças de estado físico e, talvez até mais importante, durante a descongelação (MAZUR, 1970).

Na técnica de congelação lenta, os danos tóxicos e osmóticos parecem não ser tão graves, já que são utilizadas baixas concentrações das soluções crioprotetoras (VAJTA & NAGY, 2006). No entanto, essa concentração é insuficiente para prevenir a formação de cristais de gelo intracelular, prejudicando a recuperação e sobrevivência das células embrionárias (LEIBO *et al.*, 1993; DATTENA *et al.*, 2000; LAZAR *et al.*, 2000; PAPADOPOULOS *et al.*, 2002; LOPATAROVA *et al.*, 2002, 2006). A baixa velocidade de resfriamento, associada à indução da cristalização, resulta na cristalização de parte da solução que contém o embrião, consequentemente, ocorre um aumento da concentração de íons, macromoléculas e outros componentes, incluindo os crioprotetores, permitindo a desidratação das células embrionárias. Essa desidratação deve atingir um ponto de equilíbrio, para não causar danos osmóticos relevantes e deformação celular (MAZUR, 1984). O aumento da concentração final do crioprotetor, neste caso, ocorre em baixas temperaturas, nas quais o efeito tóxico é minimizado (VAJTA & NAGY, 2006).

Por outro lado, a vitrificação é um método de criopreservação através do qual ocorre a solidificação da solução que contém o embrião (estado vítreo), sem a formação de cristais de gelo intracelular, uma vez que a passagem pela zona crítica de resfriamento ocorre de maneira muito rápida. Este nome refere-se à aparência macroscópica dessa solução, que se mostra clara e transparente. Para tanto, são necessárias elevadas taxas de resfriamento e aumento da concentração dos crioprotetores (VAJTA *et al.*, 1998; VAJTA *et al.*, 2000).

Os crioprotetores utilizados nas técnicas de vitrificação são os mesmos utilizados na técnica de congelação lenta, entretanto, a escolha baseia-se naquele com menor toxicidade e maior permeabilidade à membrana dos embriões. Dessa forma, o etilenoglicol tornou-se o crioprotetor mais utilizado nos protocolos de vitrificação, sendo comum combinação de dois ou até três tipos de crioprotetores, com a finalidade de diminuir a toxicidade individual específica (VAJTA *et al.*, 2000; VAJTA & NAGY, 2006).

Há cerca de 15 anos, a técnica de vitrificação de embriões em palhetas de 0,25 mL submergidas diretamente em nitrogênio líquido, alcançava taxas de resfriamento de aproximadamente 2500 °C/min e a concentração de

crioprotetores requerida era de 5 a 7 M (PALASZ & MAPLETOFT, 1996). No entanto, com o aumento da taxa de resfriamento, a concentração dos crioprotetores pode ser reduzida e vice-versa, tornando a vitrificação uma alternativa competitiva à congelação tradicional lenta (VAJTA & KUWAYAMA, 2006).

A maneira mais eficiente em aumentar a taxa de resfriamento é a utilização do menor volume possível da solução crioprotetora que contém o embrião e estabelecer o contato direto dessa solução com o nitrogênio líquido (VAJTA & NAGY, 2006).

Por esta razão, a idéia de se utilizar palhetas de 0,25 mL com diâmetro reduzido, as “open pulled straws” (OPS), trouxe um grande avanço à técnica de vitrificação. Neste método a velocidade de resfriamento atinge cerca de 15.000-30.000°C/min, o que permite redução de 30% da concentração dos crioprotetores (VAJTA *et al.*, 1998; VAJTA *et al.*, 2000; MASSIP, 2001).

Os embriões são armazenados na OPS pelo fenômeno da capilaridade, já que o seu diâmetro é aproximadamente metade do diâmetro da palheta de 0,25 mL e o volume da solução que contém o(s) embrião(ões) é da ordem de 1 a 2 µL. Ademais, esta técnica é simples, rápida e não requer um equipamento caro (VAJTA *et al.*, 1998).

Outra técnica bastante inovadora, o “*Cryotop*”, é uma versão avançada das técnicas que abordam a utilização de um “volume mínimo” de crioprotetor, oferecendo inúmeros benefícios relacionados ao aumento das taxas de resfriamento e aquecimento. No caso do *Cryotop*, as taxas de resfriamento e aquecimento (desvitrificação) podem atingir patamares superiores a 40.000°C/min, contribuindo efetivamente com uma melhor sobrevivência embrionária pós vitrificação (KUWAYAMA *et al.*, 2007).

O benefício da redução no volume do crioprotetor tanto no capilar (OPS) quanto na haste de vitrificação (*Cryotop*) é a indução de uma congelação mais acelerada, que inibe a formação de cristais intracelulares e lesões na zona pelúcida (LEIBO *et al.*, 1993; DATTENA *et al.*, 2000; LAZAR *et al.*, 2000; PAPADOPOULOS *et al.*, 2002; LOPATAROVA *et al.*, 2002, 2006; KUWAYAMA *et al.*, 2007). Além disso, a técnica de *Cryotop* utiliza um volume ainda menor

de crioprotetor ($< 0,1 \mu\text{L}$) quando comparado ao método da OPS ($2 \mu\text{L}$) (MORATÓ *et al.*, 2008).

Não há uma definição específica sobre a quantidade de volume de crioprotetor utilizado para que o método de vitrificação seja definido como uma técnica de “volume mínimo”. No entanto, de acordo com o significado deste termo, pode-se defini-lo como um volume inferior a $1 \mu\text{L}$, sendo que técnicas que utilizam de 1 a $5 \mu\text{L}$ não são classificadas como técnicas de “volume mínimo” (KUWAYAMA *et al.*, 2007).

A despeito do avanço das inúmeras técnicas de vitrificação existentes, sua aplicação continua restrita a laboratórios experimentais, ou é pouco utilizada nas rotinas comerciais de criopreservação de embriões bovinos, principalmente, pela dificuldade da realização da transferência direta dos embriões. A desvitrificação requer passos importantes de rehidratação e retirada da solução crioprotetora, que devem ser realizados com o auxílio de um estereomicroscópio, para que, então, os embriões sejam reenvazados e transferidos à receptoras (VAJTA & KUWAYAMA, 2006). Um estudo recente comparou a congelação convencional (CC) com um novo método de vitrificação com transferência direta dos embriões (TD) e, os resultados de 16 transferências mostraram que as taxas de concepção dos embriões dos grupos CC e TD foram de 38% (3/8) e 50% (4/8), respectivamente (PRYOR *et al.*, 2010). Este último estudo mostrou grandes passos da evolução da técnica de vitrificação, que busca tornar-se uma técnica mais eficiente e competitiva no mercado. Contudo, esses resultados preliminares devem ser analisados com cautela, visto que o número de transferências realizadas foi muito restrito e não permitiu uma comparação estatística entre os grupos.

Outro ponto relevante é o potencial de transmissão de doenças através da estocagem em nitrogênio líquido. Especialmente, para as técnicas que preconizam o contato direto da solução que contém o embrião com o mesmo. No entanto, alternativas vêm sendo implementadas a fim de minimizar este problema, através no uso de nitrogênio esterilizado ou técnicas em que o embrião não permanece em contato direto com o nitrogênio líquido (VAJTA & NAGY, 2006).

2.3.2. Particularidades da criopreservação de embriões taurinos e zebuínos

Com relação à criopreservação de embriões taurinos e zebuínos, pode-se dizer que esta é largamente utilizada na transferência comercial de embriões provenientes de vacas taurinas devido às taxas de sobrevivência dos embriões congelados/descongelados serem próximas às dos embriões transferidos a fresco. Hasler *et al.* (2001), num estudo retrospectivo, reuniram dados de transferência de embriões taurinos, frescos e criopreservados pelo método tradicional lento, utilizando o glicerol como crioprotetor. Verificaram que não houve diferença nas taxas de concepção de embriões congelados em relação aos transferidos frescos (Tabela 1).

TABELA 1. Taxa de concepção de embriões transferidos a fresco *versus* congelados em glicerol em dois estudos, de 1987 a 1995. Adaptado de Hasler *et al.* (2001).

	Embriões Frescos		Embriões Congelados	
	Transferências (n)	Taxa de Concepção (%)	Transferências (n)	Taxa de Concepção (%)
Estudo 1				
1987	2512	68,6	1174	61,3
1988	2716	67,3	1290	58,5
1991	1960	70,1	1479	57,5
1992	1835	67,2	1354	56,7
Estudo 2 (Doadoras)				
Leite	7457	68,5	4038	58,8
Corte	1566	67,3	1259	57,2
P > 0,05				

O estudo acima descrito é uma metanálise e os dados de transferência de embriões frescos e congelados não são contemporâneos, o que dificulta uma comparação direta entre esses dois grupos experimentais. Em contrapartida, a

compilação desses resultados, nos fornece um elevado número de transferências realizadas, o que, indubitavelmente, é um dado relevante à sobrevivência de embriões taurinos criopreservados.

Ainda com relação à comparação das duas técnicas de criopreservação, Loparatova *et al.* (2002) demonstraram maior taxa de sobrevivência, avaliada pelo cultivo *in vitro* por 72 horas, de embriões em estágio avançado criopreservados pela vitrificação em OPS quando comparados com o método convencional. Os mesmos autores, também, avaliaram a taxa de concepção após a transferência de embriões taurinos produzidos *in vivo*, que foram criopreservados pela vitrificação em OPS (VAJTA *et al.*, 1998) ou pelo método convencional de congelamento. Obtiveram taxas de concepção similares na transferência de mórulas, blastocistos iniciais e blastocistos expandidos criopreservados pelo método convencional ou vitrificados em OPS. No entanto o número de unidades experimentais utilizado nesse experimento não permitiu uma avaliação estatística precisa (LOPARATOVA *et al.*, 2006; Tabela 2).

TABELA 2. Taxas de concepção de embriões taurinos congelados e vitrificados em diferentes estágios do desenvolvimento embrionário. Adaptado de Loparatova *et al.* (2006).

Estágio de desenvolvimento	Método de criopreservação	Embriões transferidos (n)	Taxa de concepção (%)
Mórula	Vitrificação	22	54,5
	Convencional	25	56,0
Blastocisto inicial	Vitrificação	30	53,3
	Convencional	31	58,1
Blastocisto expandido	Vitrificação	26	57,7
	Convencional	29	48,3

P > 0,05

Outro estudo também não encontrou diferença entre as taxas de concepção de 873 embriões frescos ou congelados/descongelados, provenientes de vacas holandesas lactantes e não lactantes (45,8 vs. 43,1%; P > 0,05; respectivamente; Revisado por VASCONCELOS *et al.*, 2006).

Entretanto, congelação convencional de embriões zebuínos parece ser problemática, não apresentando resultados similares àquela com embriões taurinos (ZANENGA *et al.*, 1993). Sartori *et al.* (2008) realizaram um estudo com embriões zebuínos produzidos *in vivo* e verificaram que a sobrevivência de embriões congelados/descongelados pelo método tradicional foi menor do que dos embriões frescos, quando estes foram cultivados *in vitro* por 72 horas, simultaneamente.

2.3.3. Diferenças morfo-estruturais de embriões frescos e criopreservados

Visintin *et al.* (2002) verificaram que embriões produzidos *in vivo* frescos apresentavam formato discoidal delimitado pela zona pelúcida. As mórulas compactas apresentavam textura homogênea e a disposição dos blastômeros foi similar tanto na raça Nelore como na HPB. Nos blastocistos, a camada trofoblástica, circundando a blastocèle e a massa celular interna (botão embrionário), apresentava aspecto irregular, sendo que a comunicação intercelular é realizada pelos desmossomos e junções intercomunicantes. Este arranjo e disposição dos blastômeros nesta fase de desenvolvimento também foi observado por outros autores independentemente da sub-espécie analisada (IWASAKI *et al.*, 1990; FARIN *et al.*, 1995; ABE *et al.*, 1999; CROSIER *et al.*, 2000; FAIR *et al.*, 2001).

Nas mórulas, foram encontradas cavidades de dimensões variadas entre as células periféricas, algumas dispostas mais internamente, sugerindo um processo de acúmulo de líquido após a fase de compactação para a formação posterior da blastocèle. A formação da blastocèle é fundamental para que haja a diferenciação dos blastômeros nas células trofoblásticas e nas células que irão compor o botão embrionário (VISINTIN *et al.*, 2002).

Nos blastocistos, a membrana plasmática das células trofoblásticas que fazia contato com o espaço perivitelínico, apresentava inúmeras microvilosidades responsáveis pela captação de moléculas e íons, sendo comum encontrar debris celulares neste espaço (VISINTIN *et al.*, 2002).

Células que se encontram em processos degenerativos ou apoptose não apresentam arranjo anormal e são similares às observadas na camada

trofoblástica e massa celular interna (VISINTIN *et al.*, 2002). Outros autores obtiveram os mesmos achados em embriões de bovinos (ESPER & BARBOSA, 1991), de camundongos (BRISON & SCHULTZ, 1997) e de equinos (ALVARENGA, 1995). Esse fato traduz a capacidade de regulação do número de blastômeros, que é baseado na capacidade do embrião de remover células que exibem potencial redução durante desenvolvimento embrionário (VISINTIN *et al.*, 2002).

No que se refere ao arranjo das organelas citoplasmáticas, algumas diferenças são notadas em relação ao acúmulo de gotas de lipídeos, fagossomos e mitocôndrias. As gotas de lipídeos são mais numerosas em embriões provenientes da raça HPB (VISINTIN *et al.*, 2002). Embriões provenientes da raça Nelore apresentam maior número de fagossomos com ou sem a fusão dos lisossomos e mitocôndrias. Estas diferenças também foram encontradas por Esper & Barbosa (1991).

Apesar dessas diferenças marcantes, os embriões submetidos aos processos de criopreservação apresentam sinais evidentes de degeneração e morte celular quando comparados com embriões frescos, principalmente na raça Nelore (VISINTIN *et al.*, 2002). Ocorreu um aumento do espaço perivitelínico e algumas deformidades em relação ao tamanho original dos blastocistos, que pode ser explicado pela reexpansão incompleta durante a re-hidratação celular, após a remoção do crioprotetor. Alvarenga (1995) observou alterações semelhantes em embriões eqüinos, que incluem um rearranjo anormal das moléculas de lipídeos e proteínas das membranas, provocando alterações na permeabilidade plasmática e metabolismo celular. Debris celulares foram observados no espaço perivitelínico e na blastocele, sugerindo a ocorrência de lise celular após o processo de criopreservação (VISINTIN *et al.*, 2002).

A manutenção da morfologia das células embrionárias pós-descongelamento, tanto na raça Nelore como HPB, foi superior quando se utilizou a congelamento lenta em comparação à vitrificação. No entanto, os embriões taurinos mostraram-se mais resistentes ao processo de vitrificação do que embriões zebuínos (VISINTIN *et al.*, 2002).

Outros achados relevantes pós descongelação nos dois grupos genéticos referem-se à uma redução significativa das microvilosidades das células trofoblásticas, aumento de vesiculações citoplasmáticas e vacuolizações mitocondriais (VISINTIN *et al.*, 2002).

2.3.4. Estágio de desenvolvimento embrionário

A sobrevivência de embriões de ruminantes após a criopreservação e inovulação em receptoras sincronizadas é maior nos embriões em estágio de desenvolvimento avançado (COCERO *et al.*, 1996; MASSIP *et al.*, 2001). O período crítico no desenvolvimento embrionário em bovinos ocorre em embriões nos estágios de 8 a 16 células, no qual estes passam a adquirir o controle do seu desenvolvimento, através da ativação do genoma embrionário (GARCIA-GARCIA *et al.*, 2006).

Carvalho *et al.* (1996) avaliaram a taxa de sobrevivência de diferentes estágios de desenvolvimento de embriões zebuínos produzidos *in vitro* e mostraram que, a idade destes embriões afeta o sucesso da congelação, sendo que blastocistos expandidos (Bx) apresentaram maiores taxas de eclosão pós descongelação que blastocistos iniciais (Bi) e blastocistos (BI). Da mesma forma, Varago *et al.* (2006) observaram maior sobrevivência embrionária no cultivo pós desvitrificação de Bx quando comparados a BI produzidos *in vitro* (21,8% vs. 4,7%; n = 64/grupo; respectivamente), apesar de terem relatado que todos os embriões perderam de 1 a 2 pontos na classificação durante desenvolvimento pós desvitrificação. Porém, nestes experimentos, por se tratarem de embriões produzidos *in vitro*, não foram incluídas as mórulas, já que se acredita que sua sobrevivência à criopreservação é ainda menor.

Garcia-Garcia *et al.* (2006) estudando a sobrevivência de embriões ovinos congelados, concluíram que a habilidade dos embriões para desenvolvimento *in vitro* pós descongelação é afetada pelo estágio de desenvolvimento, já que encontraram maior taxa de sobrevivência para blastocistos quando comparados a mórulas (83,7%; n = 43 vs. 46,3%; n = 43; $P \leq 0,005$; respectivamente). Adicionalmente, não houve diferença entre desenvolvimento

in vitro de blastocistos frescos e congelados (92,5%; n = 27 vs. 83,7%; n = 43; $P > 0,05$; respectivamente).

Corroborando esses resultados, outro estudo com embriões produzidos *in vivo* de fêmeas zebuínas avaliou o desenvolvimento *in vitro* de mórulas e blastocistos após serem congelados pelo método tradicional lento. Após 48 horas de cultivo, a taxa de eclosão foi menor nos embriões criopreservados em relação aos frescos (8,3 e 21,5 vs. 56,5 e 77,8 %; mórulas e blastocistos criopreservados vs. mórulas e blastocistos frescos; $P \leq 0,05$; respectivamente). No entanto, com 72 horas, as taxas de eclosão foram similares entre blastocistos criopreservados (75,9%), mórulas frescas (78,3%) e blastocistos frescos (88,9%), porém as mórulas criopreservadas apresentaram taxa de eclosão menor (41,7%; $P \leq 0,05$). Estes resultados sugerem que as mórulas de origem zebuína são menos resistentes à criopreservação do que os blastocistos e os embriões criopreservados apresentam um desenvolvimento menor quando comparados aos frescos (SARTORI *et al.*, 2008)

Abe *et al.* (1999) observaram através da técnica de microscopia eletrônica que blastocistos produzidos *in vivo* possuem menor número de gotas de lipídeos do que mórulas e sugerem que esta característica seja responsável pela menor criotolerância das mórulas. Vajta *et al.* (2000) demonstraram que a viabilidade de embriões ovinos e bovinos vitrificados no estágio de blastocisto expandido é maior que no estágio de mórula devido a sua maior tolerância ao resfriamento depois da formação da blastocela. Além disso, a permeabilidade ao crioprotetor pode variar de acordo com o estágio de desenvolvimento, sendo outro fator para explicar a diferente sensibilidade à congelação de mórula e blastocisto (COCERO *et al.*, 1996; PEDRO *et al.*, 2005).

No entanto, quando Campos-Chillon *et al.* (2006) avaliaram a criotolerância de mórulas (n = 25) e blastocistos (n = 20) produzidos *in vivo* através do cultivo *in vitro* pós desvitrificação, observaram que mórulas e blastocistos tiveram taxas de reexpansão e eclosão similares (100% vs. 95% de taxa de reexpansão; 96% vs. 95% de taxa de eclosão; respectivamente). Os autores acreditam que isso pode ser devido à alta competência de desenvolvimento de mórulas produzidas *in vivo* quando comparada às produzidas *in vitro*. Da mesma forma, Khurana & Niemann (2000) não

observaram diferença na criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos *in vitro*. Corroborando esses resultados, Sartori e Wiltbank (comunicação pessoal) compararam a taxa de concepção em 150 vacas holandesas lactantes nas quais foram transferidos embriões congelados e não observaram diferença entre mórulas e blastocistos (Tabela 3).

TABELA 3. Taxa de concepção de mórulas e blastocistos, provenientes de fêmeas da raça HPB, após serem submetidos à congelação tradicional lenta e transferidos em vacas HPB lactantes.

	Taxa de concepção (30 dias), %	Taxa de concepção (60 dias), %
Mórulas (n = 71)	36,7	31,4
Blastocistos (n = 78)	42,3	29,0
P > 0,05		

Aumentando ainda mais a controvérsia entre os resultados de sobrevivência à congelação lenta entre mórulas e blastocistos, trabalhando com doadoras da raça Bonsmara, Peres *et al.* (2006) observaram maiores taxas de concepção em receptoras inovuladas com mórulas descongeladas (n = 142) quando comparadas a Bi (n = 207) e BI (n = 157) descongelados (65,5 vs. 55,5 vs. 45,2%; $P \leq 0,05$; respectivamente). Da mesma forma, Rodrigues *et al.* (2007), em um estudo retrospectivo com doadoras de embrião da raça HPB, constataram que as taxas de concepção de embriões frescos foram maiores do que congelados (43,8; n = 2.634 vs. 39,5%; n = 2.237; $P \leq 0,001$; respectivamente) e, com relação ao estágio de desenvolvimento embrionário, verificaram que a diferença na taxa de concepção entre embriões frescos e congelados aumentou conforme o embrião se desenvolveu (Tabela 4).

TABELA 4. Taxa de concepção aos 25 dias de embriões frescos e congelados oriundos de doadoras da raça HPB. Adaptado de Rodrigues *et al.*, 2007.

	Frescos; % (n)	Congelados, % (n)	Redução da taxa de concepção; %	P
Mórulas	44,0 (1.880)	41,3 (1.664)	2,7	0,05
Blastocistos iniciais	41,8 (773)	33,3 (204)	8,5	0,07
Blastocistos	45,8 (340)	35,5 (270)	10,3	0,01
Blastocistos expandidos	42,3 (85)	26,7 (56)	15,6	0,10

3. OBJETIVO

Objetivou-se comparar a vitrificação à congelação lenta de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* em fêmeas taurinas e zebuínas, por meio de taxas de concepção em receptoras inovuladas, aos 30 e 60 dias.

4. HIPÓTESES

- 1) A viabilidade dos embriões frescos é melhor do que os criopreservados.
- 2) Quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário, as mórulas taurinas e os blastocistos zebuínos são mais criotolerantes.
- 3) A técnica de vitrificação é melhor do que a congelação lenta.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. EXPERIMENTO 1: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* em fêmeas da raça Sindi

Local

A avaliação da criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* em fêmeas zebuínas (raça Sindi), foi realizada na Fazenda São José, em Ituiutaba, Minas Gerais, nos meses de novembro de 2008 a abril de 2009.

Animais

Vinte e quatro fêmeas da raça Sindi, nulíparas e primíparas, lactantes e não-lactantes, com ECC médio entre 3,0 e 3,5 (escala de 1 a 5; HOUGHTON et al., 1990) foram superovuladas com um protocolo comparativo substituindo as duas últimas doses de FSH por 300 UI de eCG em metade dos animais, num delineamento do tipo *cross-over*, com intervalo de 35 a 42 dias entre as superovulações (SOVs – ANEXO I).

Alimentação

As fêmeas foram mantidas em sistema de pastejo com *Brachiaria decumbens*, mineralização adequada e água à vontade.

Sincronização da ovulação, superestimulação ovariana e superovulação das doadoras Sindi

Todas as fêmeas tiveram a emergência da onda folicular sincronizada, com aplicação intramuscular (i.m.) de 2 mg de benzoato de estradiol (BE - Gonadiol[®], Intervet/Schering-Plough, Brasil) e inserção de um dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona (DIB[®], Intervet International GmbH, Alemanha), caracterizando o dia 0 (D₀) do protocolo (Figura 3). Quatro dias após (D₄), iniciaram-se as i.m. de FSH em doses decrescentes com intervalo de 12 horas entre as aplicações, totalizando 100 mg de FSH suíno (Folltropin-V[®], Bioniche Animal Health Canadá Inc, Belleville, Canadá) para as fêmeas nulíparas e primíparas (Grupo FSH). No momento da quinta e sexta aplicações de FSH (D₆), foram realizadas injeções i.m. de 0,150 mg de PGF_{2α} (Preloban[®], Intervet/Schering-Plough, Brasil).

No D₇, foram aplicados i.m. em metade dos animais, 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG - Folligon[®], Intervet International B.V., Holanda) divididas em duas doses com intervalo de 12 horas, em substituição à sétima e oitava aplicações de FSH (Grupo eCG).

Simultaneamente à oitava aplicação de FSH ou eCG, o dispositivo intravaginal de progesterona foi retirado. Dezoito horas após a última aplicação de FSH ou eCG, ovulação foi induzida com 0,2 mg i.m. de GnRH (Gonadorrelina - Fertagyl[®], Intervet/Schering-Plough, Brasil) e as inseminações artificiais (IA) foram feitas 6 e 18 h após a aplicação de GnRH (D9). Para todas as IA utilizou-se sêmen congelado de um mesmo touro da raça Sindi, testado e aprovado previamente em testes pós descongelação. Sete dias após a aplicação de GnRH, embriões foram colhidos, avaliados e classificados de acordo com estágio de desenvolvimento embrionário (Mo = mórula, Bi = blastocisto inicial, BL = blastocisto e Bx = blastocisto expandido) e grau de qualidade (1 = excelente, 2 = bom, 3 = razoável, 4 = pobre e 5 = degenerado), de maneira similar à Ahmad *et al.* (1995) e Sartori *et al.* (2002). Para a análise estatística, os embriões classificados como Bi, BL e Bx foram agrupados numa única categoria, chamada de BL (Blastocistos).

Após a colheita dos embriões, cada doadora recebeu duas injeções i.m. de 0,150 mg de PGF_{2α}, com intervalo de 24 horas entre as aplicações.

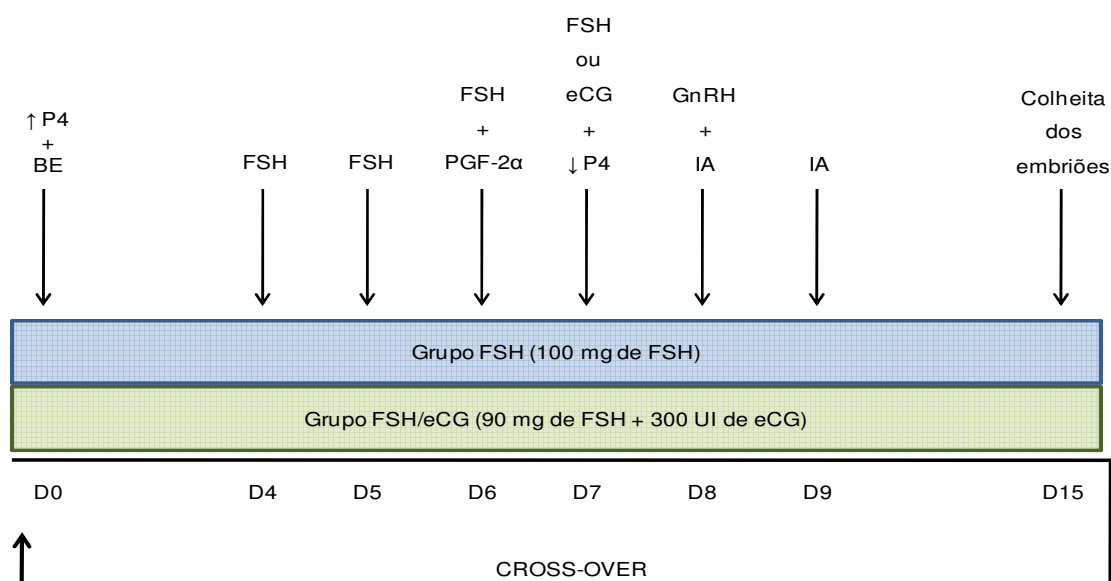


FIGURA 3. Esquema ilustrativo do protocolo de superestimulação ovariana e SOV das fêmeas da raça Sindi.

Foram realizadas 28 superovulações adicionais com a finalidade de aumentar o número de transferências de embriões para a próxima etapa do experimento. Para tanto, fêmeas nulíparas e primíparas e múltiparas foram superovuladas de acordo com o protocolo acima descrito para o grupo FSH. No entanto, as fêmeas múltiparas receberam a dose total 150 mg de FSH-P.

Colheita dos embriões

Para a realização das colheitas de embriões, as fêmeas foram contidas em tronco individual e após anestesia peridural com 60 mg de cloridrato lidocaína a 2% (Pearson Anestésico L[®], Eurofarma Laboratórios Ltda., Campo Belo, São Paulo, Brasil) a região perineal foi devidamente higienizada. A técnica de colheita utilizada foi a não cirúrgica, através da lavagem uterina com 1 L de Dulbecco Buffered Saline (DPBS) por animal. Para tanto, o balonete do catéter de Foley foi posicionado e inflado no corpo uterino justaposto ao óstio cranial da cérvix (CASTRO NETO *et al.*, 2004). Após a lavagem uterina, o útero foi preenchido com DPBS e o catéter mantido no local com sua abertura lacrada por uma presilha de filtro de colheita. Em seguida, as fêmeas foram liberadas e retornaram ao tronco 20 a 30 minutos depois, para a recolheita através da realização de um segundo lavado com um volume adicional de 500 mL de DPBS. O lavado uterino foi recolhido em filtro de 75 µm com a devida identificação do animal e transportado ao laboratório, onde os embriões foram rastreados e avaliados sob um estereomicroscópio (Nikon – SMZ-45, Japão). Todos os embriões foram classificados de acordo com o grau de qualidade e desenvolvimento, segundo as normas da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões – SBTE, descritas no Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e equina, Embrapa (2008) e mantidos em meio de manutenção (TQC Holding Plus, Bioniche, Pullman, WA) até momento da criopreservação ou inovulação nas receptoras, no caso dos embriões transferidos a fresco.

Criopreservação dos embriões

Os embriões classificados em graus de qualidade 1 e 2 foram alocados de forma balanceada em seis grupos experimentais: mórula fresca, mórula

vitrificada, mórula congelada, blastocisto fresco, blastocisto vitrificado e blastocisto congelado.

Congelação lenta

Os embriões criopreservados pelo método da congelação lenta foram lavados e mantidos numa solução de etilenoglicol (EG - Solução de tampão fosfato salino com BSA 0,4% suplementado com etilenoglicol 1,5 Molar, Nutricell, Campinas, Brasil) por 5 minutos, no mínimo, não excedendo o tempo máximo de 10 minutos. Em seguida, foram envazados, individualmente, em mini palhetas de 0,25 mL, previamente identificadas com o número da doadora, o estágio de desenvolvimento embrionário, o grau de qualidade e o nome do touro.

Logo após o envase, as palhetas foram acondicionadas em uma máquina de congelação TK 3000 (TK - Tecnologia em Congelação, Uberaba, MG, Brasil), que já encontrava-se estabilizada à temperatura de -6°C . Antes de iniciar a curva de congelação, as palhetas permaneceram por 10 minutos estabilizando à -6°C , sendo que após 2 minutos do período de estabilização, foi induzida a cristalização (*seeding*).

Após o período de estabilização, a taxa padrão de resfriamento instituída foi de $0,5^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ até atingir a temperatura de -32°C . Em seguida, as palhetas foram submergidas em nitrogênio líquido (N_2) e armazenadas em botijões criogênicos até o momento da descongelação para a transferência em receptoras sincronizadas.

Vitrificação

Os embriões criopreservados pelo método de vitrificação foram mantidos em solução de manutenção até o início do procedimento.

Os embriões foram vitrificados em hastes de polipropileno de 0,7 mm de espessura (Vitri-Ingá[®], Ingamed – Produtos Médicos Hospitalares, Perobal, Paraná, Brasil) através do método de vitrificação conhecido como “*Cryotop*”. Para tanto, foram utilizadas soluções comerciais de vitrificação (VI-1 e VI-2, Vitri-Ingá[®], Ingamed – Produtos Médicos Hospitalares, Perobal, Paraná, Brasil).

Primeiramente, as hastes de vitrificação foram identificadas com o número da doadora, o estágio de desenvolvimento embrionário, o grau de qualidade e o nome do touro. Em seguida, foi colocado N_2 nos dois compartimentos do equipamento de vitrificação (Vitri-Equip[®], Ingamed – Produtos Médicos Hospitalares, Perobal, Paraná, Brasil - Figura 4) e os protetores das hastes foram colocados horizontalmente no vapor de N_2 (compartimento 1), alguns minutos antes de iniciar o procedimento e, então, foram mergulhadas verticalmente (compartimento 2), de modo a ficarem totalmente submersas.

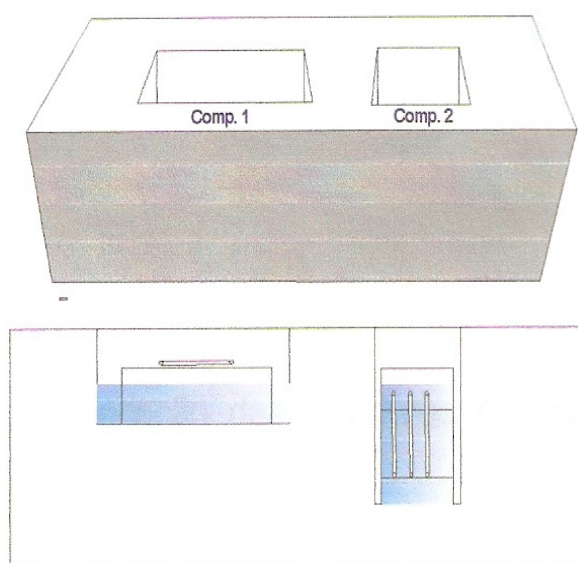


FIGURA 4. Figuras representativas dos compartimentos para vitrificação de embriões em hastes.

Em uma placa de petri de 100 mm de diâmetro foram distribuídas gotas de aproximadamente 50 μ L das soluções de manutenção (SM), solução de equilíbrio VI-1 (7,5% Etilenoglicol e 7,5% DMSO) e solução de equilíbrio VI-2 (15% Etilenoglicol, 15% DMSO e sacarose 0,5M), de acordo com a disposição representada na Figura 5.

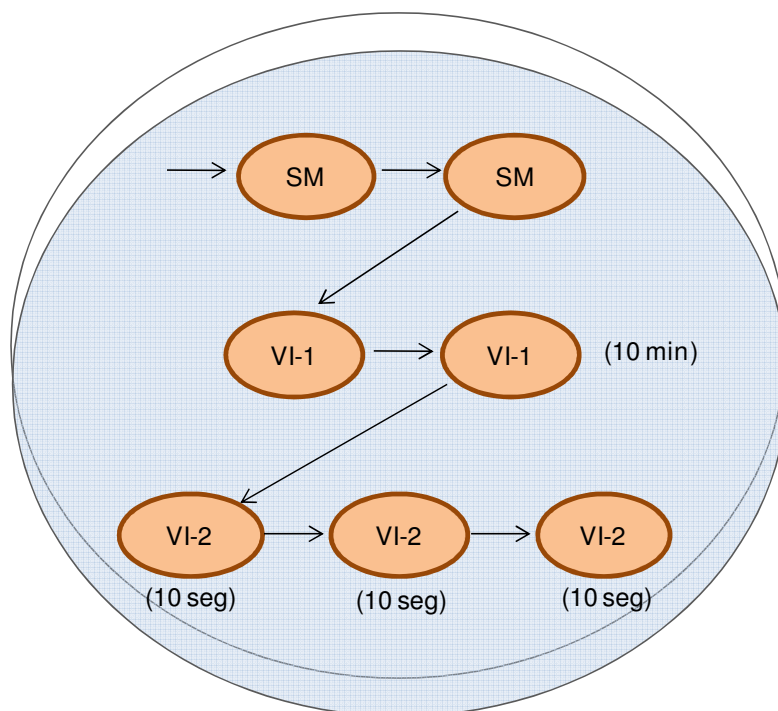


FIGURA 5. Esquema ilustrativo da disposição das gotas das soluções de manutenção (SM), solução de vitrificação – 1 (VI-1) e solução de vitrificação – 2 (VI-2) e das etapas da vitrificação em hastes – “Cryotop”.

Após a lavagem dos embriões na SM, os mesmos foram transferidos para a solução de equilíbrio VI-1, permanecendo 10 minutos nesta solução. Em seguida, os embriões foram transferidos para a solução de equilíbrio VI-2, colocados nas hastes de vitrificação (uma ou duas estruturas por haste - Figura 6) e, imediatamente, submergidos no N_2 , totalizando um tempo máximo de 1 minuto para esse procedimento.

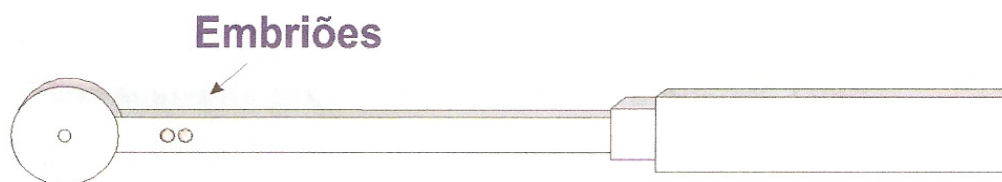


FIGURA 6. Figura representativa de haste de polipropileno para vitrificação dos embriões.

Finalmente, as hastes foram introduzidas no protetor que se encontrava mergulhado no N_2 e armazenadas em botijões criogênicos até o momento da desvitrificação para transferência em receptoras sincronizadas (Figura 7).

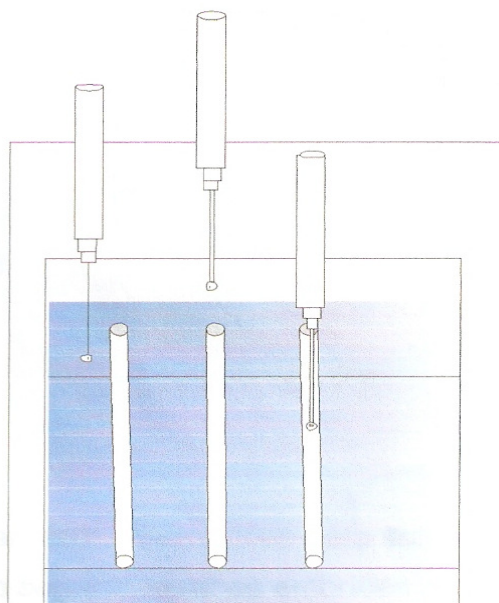


FIGURA 7. Figura ilustrativa do procedimento final de vitrificação de embriões em hastes.

Sincronização das receptoras de embriões

As receptoras de embriões utilizadas no Experimento 1 foram da raça Nelore. Essas fêmeas foram submetidas à avaliação ginecológica, com o auxílio de imagens ultrassonográficas e, somente aquelas que estavam ciclando, ou seja, aquelas que apresentavam CL em pelo menos um dos ovários e não apresentavam acúmulo de líquido no lúmen uterino foram submetidas ao protocolo de sincronização.

Foi utilizado o seguinte protocolo de sincronização da ovulação nas receptoras: No D₀ foram aplicadas injeções i.m. de 2 mg de benzoato de estradiol (BE,Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil) e 0,075 mg de PGF_{2α} (Sincrocio[®], Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil) juntamente com a inserção do dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona (Sincrogest[®], Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil). E, no D₈, o dispositivo intravaginal foi retirado e foram aplicadas injeções i.m. de 0,075 mg de PGF_{2α}, 300 UI de eCG (Folligon[®]) e 0,6 mg de cipionato de estradiol (ECP, Ouro Fino, Cravinhos, SP, Brasil), como agente indutor da ovulação. Os embriões foram transferidos nos dias 16, 17 e 18 do protocolo.

Descongelamento, desvitrificação e inovulação dos embriões

Após a contenção da receptora em tronco individual, foi realizada anestesia peridural com 60 mg de cloridrato de lidocaína a 2% (Pearson Anestésico L[®], Eurofarma Laboratórios Ltda., Campo Belo, São Paulo, Brasil) e através de avaliação ultrassonográfica, foi identificada a presença, a localização, bem como a mensuração do CL. Todos os embriões foram inovulados através da técnica transcervical não cirúrgica, com a deposição do embrião no terço cranial do útero, ipsilateral ao ovário que continha o CL. Esse procedimento foi realizado de forma balanceada para os seis grupos experimentais.

Primeiramente, foram transferidos os embriões frescos (não criopreservados), sendo que o período entre a colheita e a inovulação dos mesmos não excedeu 6 horas.

Em seguida, os embriões congelados foram transferidos, sendo descongelados somente após a avaliação ultrassonográfica da receptora. Para a descongelamento, cada palheta foi retirada do N₂, mantida em temperatura ambiente por 5 segundos e submersa em água aquecida a 30°C por 20 segundos. Após a descongelamento, as palhetas foram introduzidas no inovulador e a bainha de inovulação foi protegida por uma camisinha sanitária, rompida somente na entrada da cérvix. O processo de desvitrificação exigiu maior período de tempo para ser realizado. Portanto os embriões vitrificados foram transferidos de maneira intercalada aos embriões congelados, pois uma vez desvitrificados, os embriões devem ser transferidos imediatamente. Esse procedimento foi adotado de modo a otimizar o intervalo de tempo entre as inovulações dos embriões.

Para a desvitrificação dos embriões, a solução de desvitrificação - 1 (DV-1, sacarose 1M) foi mantida a 37°C, com o auxílio de uma placa aquecedora. Em uma placa de petri de 100 mm de diâmetro, foram distribuídas gotas de aproximadamente 200 µL da solução de aquecimento DV-1 (Figura 8).

As hastes foram retiradas do botijão criogênico e mantidas em uma pequena caixa de isopor com N₂. Ainda sob o N₂, o protetor foi removido da haste e, em seguida, a extremidade foi mergulhada na solução DV-1 pré-

aquecida a 37°C. Os embriões foram transferidos, imediatamente, para a segunda gota, aguardando um período de 1 minuto.

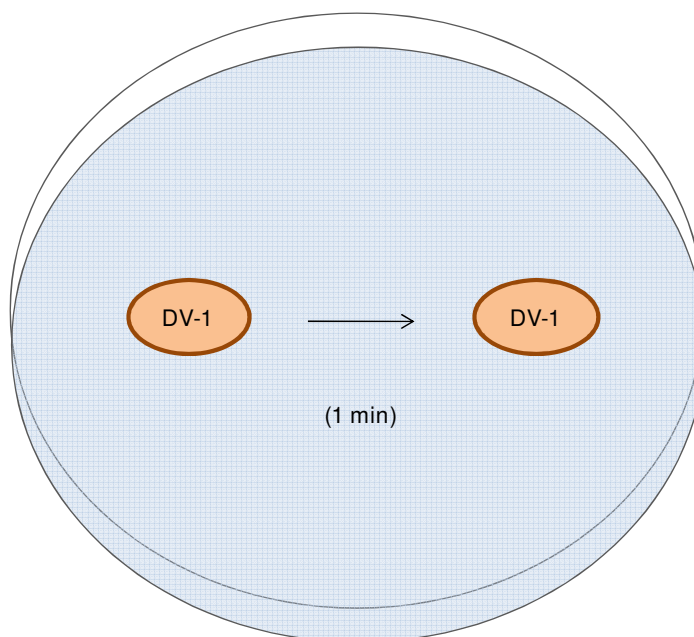


FIGURA 8. Esquema ilustrativo do primeiro passo da desvitrificação dos embriões.

Em outra placa de petri de 100 mm, foram distribuídas a solução diluente DV-2 (Sacarose 0,5M) e solução tampão DV-3 em gotas de aproximadamente 200 µL, mantidas à temperatura ambiente.

Após a permanência de 1 minuto na solução DV-1, os embriões foram transferidos para a solução DV-2 e mantidos nesta solução por 3 minutos, sendo, em seguida, lavados na solução DV-3 por mais 5 minutos em cada gota (Figura 9). Após esse procedimento, os embriões foram transferidos para o meio de manutenção, envazados em palhetas de 0,25 mL e transferidos para receptoras como acima descrito.

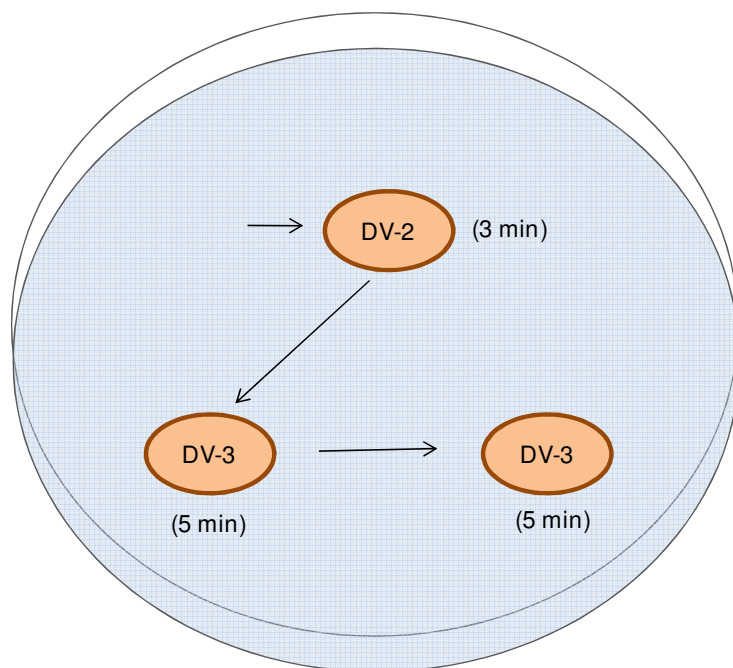


FIGURA 9. Esquema ilustrativo do segundo e terceiro passos da desvitrificação dos embriões.

5.2. EXPERIMENTO 2: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* em fêmeas da raça Nelore

Local

O experimento 2 foi proposto como forma de tornar os resultados obtidos com embriões zebuínos mais consistentes, já que foram observadas algumas variáveis inerentes, principalmente, à realização da técnica de vitrificação que podem ter afetado negativamente as taxas de concepção das receptoras.

Para tanto, o experimento 2, foi desenvolvido na Fazenda Figueira, pertencente à Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz - FEALQ, no distrito de Paiquerê, Londrina, PR, nos meses de novembro de 2009 a março de 2010.

Animais

Trinta e uma fêmeas da raça Nelore não lactantes, com ECC médio entre 3,5 e 4,0 (escala de 1 a 5; HOUGHTON et al., 1990) foram superovuladas com um protocolo comparativo substituindo as duas últimas doses de FSH por 400 UI de eCG, 4 mg de LH ou 2 mg de LH, aplicados de manhã e a tarde, num delineamento do tipo *crossover*, com intervalo de 35 dias entre as

superovulações. As avaliações referentes aos protocolos superovulatórios fizeram parte da dissertação de mestrado da aluna Ana Carolina dos Santos Oliveira, sob orientação do Prof. Dr. Ciro Moraes Barros e, portanto, não serão discutidas no presente trabalho. Contudo, os tratamentos acima foram incluídos na análise estatística das taxas de concepção dos embriões frescos, vitrificados e congelados.

Alimentação

As fêmeas foram mantidas em sistema de pastejo com *Brachiaria decumbens*, mineralização adequada e água à vontade.

Sincronização da ovulação, superestimulação ovariana e superovulação das doadoras Nelore

Todas as fêmeas tiveram a emergência da onda folicular sincronizada, com aplicação i.m. de 2 mg de BE(Gonadiol[®]) e inserção de um dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona (Primer[®], Tecnopec, Brasil), caracterizando o dia 0 (D₀) do protocolo (Figura 10). Cinco dias após (D₅), iniciaram-se as injeções i.m. de FSH em doses decrescentes com intervalo de 12 horas entre as aplicações, totalizando 133 mg de FSH suíno (Folltropin-V[®]). No momento da quinta e sexta aplicações de FSH (D₇), foram realizadas injeções i.m. de 0,150 mg de PGF_{2α} (Prolise[®], Tecnopec, Brasil).

No D₈, os animais foram alocados em quatro grupos:

- **Grupo FSH (Controle):** os animais foram tratados com 133 mg de FSH;
- **Grupo eGG:** os animais receberam 400 UI de eCG (Folligon[®]) divididas em duas doses com intervalo de 12 horas, em substituição à sétima e oitava aplicações de FSH.
- **Grupo LH2:** os animais receberam 2 mg de LH (Lutropin[®], Bioniche Animal Health Canadá Inc, Belleville, Canadá) divididas em duas doses com intervalo de 12 horas, em substituição à sétima e oitava aplicações de FSH.
- **Grupo LH4:** os animais receberam 4 mg de LH (Lutropin[®]) divididas em duas doses com intervalo de 12 horas, em substituição à sétima e oitava aplicações de FSH.

Simultaneamente à última aplicação de FSH, eCG ou LH, o dispositivo intravaginal de progesterona foi retirado. Doze horas após a retirada do implante, ovulação foi induzida com 12,5 mg de LH (Lutropin®, D₉) e as IA foram feitas 12 e 24 h após a aplicação de LH. Para todas as IA utilizou-se sêmen congelado de oito touros da raça Nelore, testado e aprovado previamente em testes pós-descongelamento. Sete dias após indução da ovulação, embriões foram colhidos, avaliados e, imediatamente alocados em seis grupos: mórula fresca, mórula vitrificada, mórula congelada, blastocisto fresco, blastocisto vitrificado e blastocisto congelado.

Após a colheita dos embriões, cada doadora recebeu duas injeções i.m. de 0,150 mg de PGF_{2α}, com intervalo de 24 horas entre as aplicações.

A colheita e criopreservação embrionária foram realizadas de maneira semelhante a dos embriões da raça Sindi, e a transferência dos embriões frescos, congelados e vitrificados, também, foi contemporânea.

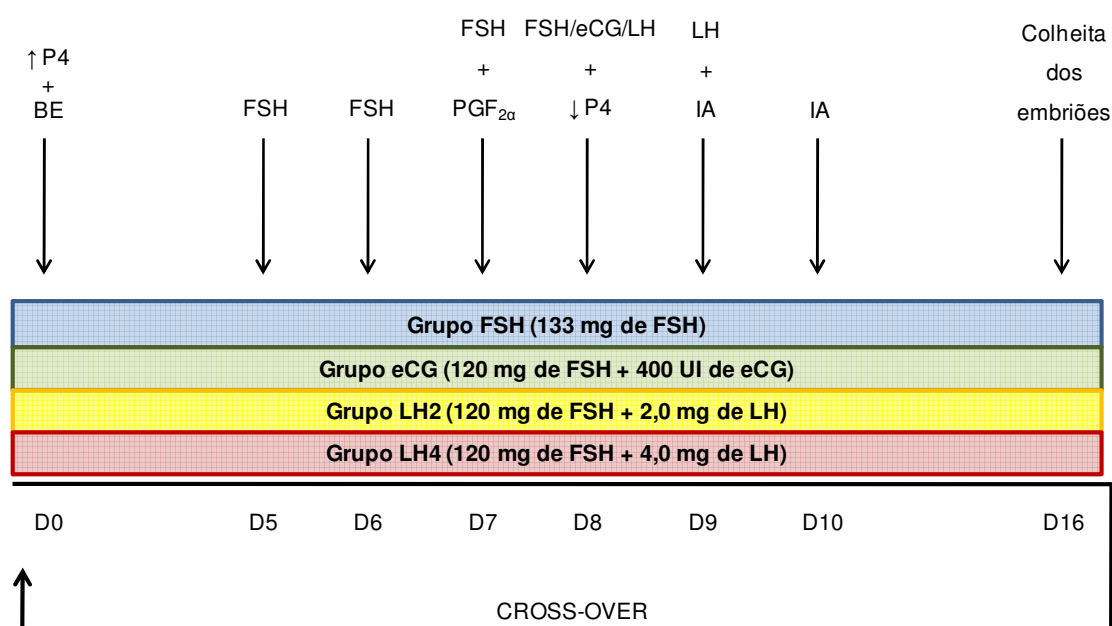


FIGURA 10. Esquema ilustrativo do protocolo de superestimulação ovariana e SOV das fêmeas da raça Nelore.

Sincronização das receptoras de embriões

Foram utilizadas 470 receptoras da raça Nelore e mestiças. Todas as receptoras foram submetidas à avaliação ginecológica, com o auxílio de

imagens ultrassonográficas. Das 470 receptoras selecionadas e submetidas ao protocolo de sincronização, 430 apresentavam CL ao exame ultrassonográfico.

Foi utilizado o seguinte protocolo de sincronização da ovulação nas receptoras: No D₀ foi aplicado 2 mg de BE (Estrogin[®], i.m., Farmavet, São Paulo, Brasil) e 0,075 mg de PGF_{2α} (Veteglan[®], Calier, Barcelona, Espanha) juntamente com a inserção do dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona (DIB[®]). No D₈, o dispositivo intravaginal foi retirado e foram aplicadas injeções i.m. de 0,075 mg de PGF_{2α} (Veteglan[®]), 300 UI de eCG (Folligon[®]) e 0,6 mg de cipionato de estradiol (ECP[®], Pfizer, São Paulo Brasil), como agente indutor da ovulação.

Os embriões foram transferidos nos dias 16, 17 e 18 do protocolo. Sete dias após a transferência, foram aplicados 400 UI de eCG (Novormon[®], Intervet/Schering-Plough, Brasil) em metade dos animais, com o objetivo de avaliar a influência da eCG pós inovulação, nas taxas de concepção aos 30 e 60 dias (Figura 11 – ANEXO II).

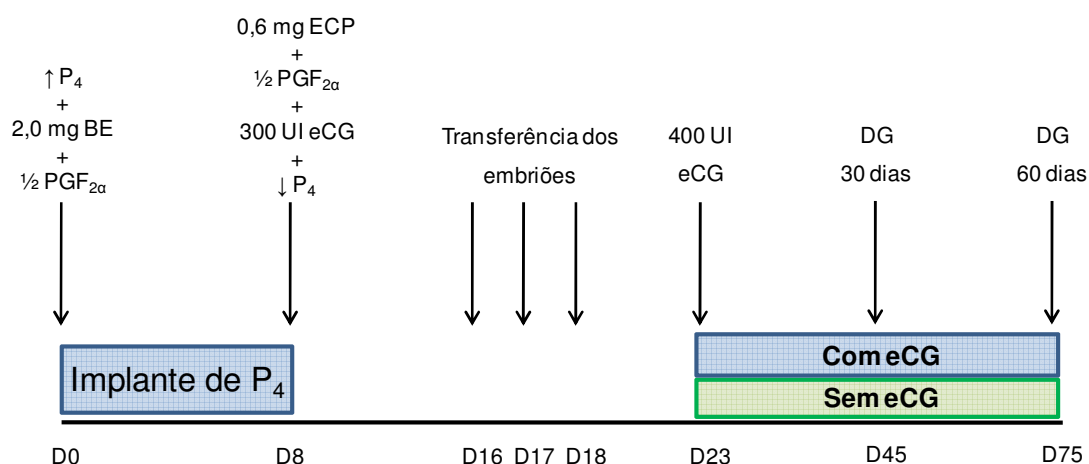


FIGURA 11. Protocolo das receptoras de embriões da raça Nelore, com e sem a aplicação de eCG, 7 dias após a inovulação.

5.3. EXPERIMENTO 3: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* em fêmeas da raça Holandês Preto e Branco

Local

A avaliação da criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* em fêmeas taurinas foi realizada nas Fazendas Sant'Anna e Iracema, no município de Lins, SP e Fazenda Campestre, no município de São Pedro, SP.

Animais

Trinta e cinco vacas lactantes e 32 novilhas da raça HPB foram superovuladas com 500 e 300 UI de FSH, respectivamente, totalizando 67 superovulações.

Alimentação

As vacas foram mantidas em sistema de confinamento total (*free stall*) com dieta a base de concentrado, feno e silagem de milho de acordo com a produção leiteira, e as novilhas foram mantidas em pasto de *Brachiaria brizantha*, suplementadas com sal mineral e água à vontade.

Sincronização da ovulação, superestimulação ovariana e superovulação das doadoras

O protocolo de superestimulação e SOV para a raça HPB apresentou algumas particularidades em relação ao utilizado na raças Sindi e Nelore.

As vacas em lactação tiveram a emergência da onda folicular sincronizada, com aplicação de 3 mg de BE (Gonadiol[®]) e inserção de um dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona (DIB[®]), caracterizando o dia 0 (D₀) do protocolo (Figura 12). Para as novilhas, a sincronização da emergência da onda folicular foi realizada com aplicação 2 mg de BE e inserção do DIB[®], 12 h mais tarde, em relação ao início do protocolo das vacas (Figura 13).

Quatro dias após (D₄), iniciaram-se as injeções i.m. de FSH suíno (Pluset[®], Calier, Barcelona, Espanha) em doses decrescentes com intervalo de 12 horas entre as aplicações, totalizando 500 UI de FSH para as vacas lactantes e 300 UI para as novilhas. No momento da quinta e sexta aplicações de FSH (D₆), foram realizadas injeções i.m. de 0,150 mg de PGF_{2α} (Veteglan[®], Calier, Barcelona, Espanha).

O dispositivo intravaginal de progesterona foi retirado simultaneamente à última aplicação de FSH. Vinte e quatro horas após a última aplicação de FSH, a ovulação foi induzida com 0,25 mg de GnRH (Gonadorelina - Fertagyl[®]) nas vacas lactantes. Nas novilhas, a indução da ovulação foi realizada 12 horas após a última aplicação de FSH. Finalmente, as IA foram feitas 12 e 24 horas

após a aplicação de GnRH (D₉). Para todas as IA utilizou-se sêmen congelado de diversos touros da raça HPB, testados e aprovados previamente em testes pós descongelação. Oito dias após a aplicação do GnRH, os embriões foram colhidos, avaliados e, imediatamente alocados em seis grupos: mórula fresca, mórula vitrificada_(H), mórula congelada, blastocisto fresco, blastocisto vitrificado e blastocisto congelado.

A colheita e criopreservação embrionária foram realizadas de maneira semelhante a dos embriões da raça Sindí e Nelore, assim como a transferência dos embriões frescos, congelados e vitrificados.

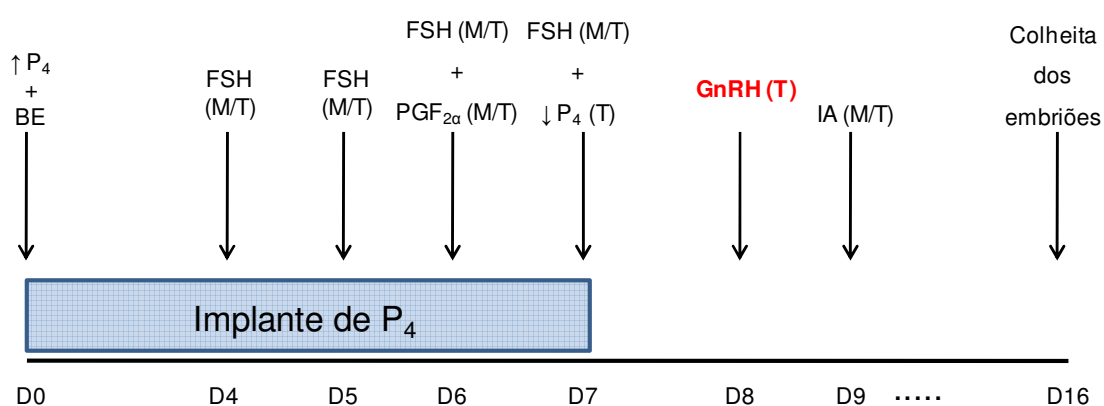


FIGURA 12. Esquema ilustrativo do protocolo de superestimulação ovariana e superovulação das vacas da raça HPB.

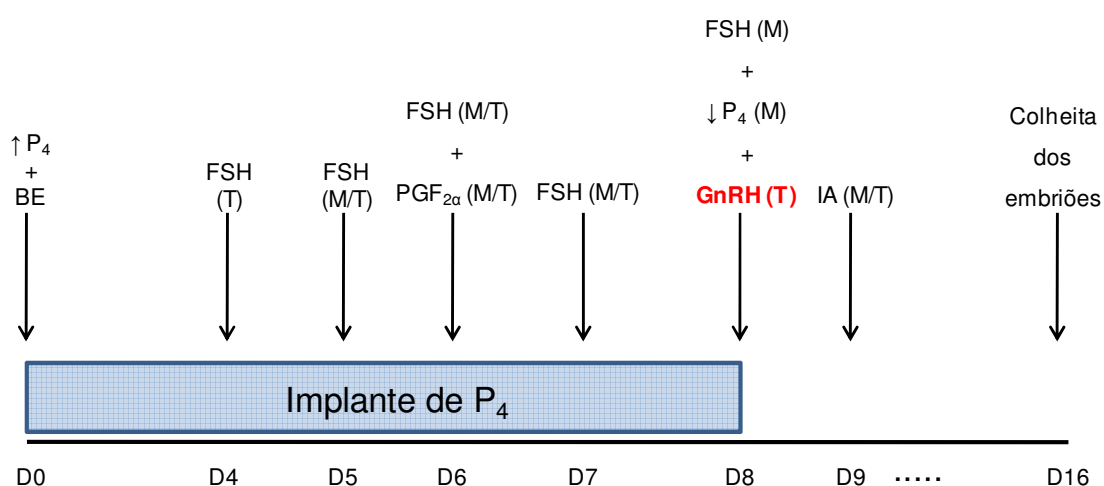


FIGURA 13. Esquema ilustrativo do protocolo de superestimulação ovariana e superovulação das novilhas da raça HPB.

Sincronização das receptoras de embriões

As receptoras de embriões utilizadas no Experimento 3 pertenciam a três diferentes categorias animais: vacas HPB em lactação, novilhas nulíparas HPB e vacas não lactantes da raça Nelore. A sincronização das receptoras foi realizada de acordo com protocolo usual de cada propriedade ou aproveitamento do estro natural desses animais.

Os embriões foram transferidos 6, 7 ou 8 dias após a detecção do estro ou aplicação do agente indutor da ovulação.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as avaliações estatísticas utilizou-se o procedimento GLIMMIX (Análise de Variância) do programa SAS na função REPEATED, sob a metodologia dos modelos lineares generalizados, considerando para as variáveis de proporção uma distribuição binomial, com função de ligação logit, de acordo com Nelder & Wedderburn (1972).

As variáveis de proporção como, taxas de concepção aos 30 e 60 dias, foram inseridas em um modelo matemático, que incluiu os efeitos de período, doadora, tratamento (embriões frescos, vitrificados e congelados), tempo (30 e 60 dias), estágio de desenvolvimento embrionário, grau de qualidade embrionária e interação tratamento*estágio.

Particularmente, no Experimento 1, devido à semelhança do conjunto de dados aos 30 e 60 dias em função da baixa perda embrionária/fetal nesse período, não foi possível aplicar o modelo estatístico com análise das medidas repetidas.

No Experimento 2, incluiu-se os efeitos do touro, tratamento superestimulatório das doadoras (FSH, eCG, LH2 e LH4) e o protocolo de sincronização das receptoras.

No Experimento 3, incluíram-se os efeitos do touro, categoria da doadora (vaca em lactação, vaca seca ou novilha) e categoria das receptoras (vaca em lactação, novilha ou vaca de corte). A fazenda e os diferentes técnicos que realizaram as transferências dos embriões foram incluídos como covariáveis no Experimento 3.

As interações que não apresentaram diferença significativa foram retiradas do modelo estatístico ($P < 0,10$) ou não puderam ser estudadas devido a estrutura dos dados.

As comparações estatísticas foram realizadas sobre as médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos e estão apresentadas na forma de médias $\pm$ erros-padrão (EP) com as distribuições nas escalas originais, pois estas podem ser facilmente interpretadas.

7. RESULTADOS

7.1. Experimento 1: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* em fêmeas da raça Sindi

Houve diferença entre as taxas de concepção dos embriões transferidos a fresco em relação aos embriões que foram criopreservados previamente à transferência, aos 30 dias após ovulação ($P \leq 0,05$). Entretanto, não houve diferença entre as taxas de concepção dos embriões que foram congelados ou vitrificados neste mesmo período (Tabela 5).

TABELA 5. Taxa de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) dos embriões produzidos *in vivo* em doadoras da raça Sindi, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados, aos 30 dias após ovulação.

Embriões (n)	Taxa de concepção (%), aos 30 dias após ovulação
Frescos (79)	$54,8 \pm 7,4^a$
Vitrificados (73)	$17,8 \pm 7,3^b$
Congelados (79)	$19,5 \pm 6,6^b$

^{a,b}Médias diferem na mesma coluna ($P \leq 0,05$)

Não foi possível detectar diferença entre as taxas de concepção dos 30 aos 60 dias e a mortalidade embrionária/fetal nesse período foi de 5,0% (2/42) para os embriões transferidos a fresco, 0% (0/20) para os embriões transferidos após congelação convencional e 7,6% (1/13) para os embriões transferidos após vitrificação.

Com relação ao estágio de desenvolvimento embrionário, não houve diferença entre taxas de concepção de mórulas e blastocistos aos 30 dias ($27,8 \pm 5,6$ e $28,2 \pm 8,3$, respectivamente; $P > 0,90$) e aos 60 dias ($27,1 \pm 5,1$ e $28,4 \pm 7,9$, respectivamente; $P > 0,90$). Também não foi observada interação entre tratamentos e estágio de desenvolvimento embrionário ($P > 0,10$).

Finalmente, não houve efeito do grau de qualidade embrionária (grau 1 ou 2) sobre as taxas de concepção dos embriões provenientes de doadoras da raça Sindi (Tabela 6). Também não se observou interação entre estágio de

desenvolvimento embrionário e tratamento ou grau de qualidade embrionária ($P > 0,10$).

TABELA 6. Efeito do grau de qualidade embrionária nas taxas de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) de embriões produzidos *in vivo* em doadoras da raça Sindi, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados.

Qualidade embrionária (n)	Taxa de concepção (%), aos 30 dias	Taxa de concepção (%), aos 60 dias
Grau 1 (151)	32,3 $\pm$ 4,6	31,0 $\pm$ 4,3
Grau 2 (80)	25,0 $\pm$ 8,5	24,7 $\pm$ 4,1

$P > 0,10$ na mesma coluna.

7.2. Experimento 2: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* em fêmeas da raça Nelore

Houve diferença entre as taxas de concepção aos 30 e 60 dias entre os grupos experimentais ($P < 0,0003$). A taxa de concepção média entre 30 e 60 dias foi maior nos embriões frescos do que nos embriões congelados. Entretanto, a taxa de concepção média dos embriões vitrificados nesse período não diferiu entre embriões frescos e congelados (Tabela 7).

TABELA 7. Taxa de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) dos embriões produzidos *in vivo* em doadoras da raça Nelore, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados, aos 30 e 60 dias após ovulação.

Embriões (n)	Taxa de concepção (%), aos 30 dias	Taxa de concepção (%), aos 60 dias	Taxa de concepção média (%), dos 30 aos 60 dias
Frescos (95)	44,7 $\pm$ 5,9	37,7 $\pm$ 5,7	41,1 $\pm$ 5,6 ^a
Vitrificados (100)	36,6 $\pm$ 5,5	31,6 $\pm$ 5,3	34,0 $\pm$ 5,2 ^{ab}
Congelados (102)	29,8 $\pm$ 5,5	21,6 $\pm$ 4,8	25,5 $\pm$ 5,0 ^b

^{a,b}Médias diferem na mesma coluna ($P \leq 0,05$)

A mortalidade embrionária/fetal dos 30 aos 60 dias de gestação foi de 17,3% (8/46) para os embriões transferidos a fresco, 16,1% (5/31) para os embriões transferidos após vitrificação e 24,1% (7/29) para os embriões transferidos após congelamento convencional ($P > 0,10$).

Com relação ao estágio de desenvolvimento embrionário, não houve diferença entre taxas de concepção de mórulas e blastocistos aos 30 e aos 60 dias após ovulação. Entretanto, a taxa de concepção média dos 30 aos 60 dias de mórulas foi maior do que blastocistos ($39,0 \pm 4,6$ e $28,5 \pm 4,5$, respectivamente; $P \leq 0,02$) Não foi observada interação entre tratamentos e estágio de desenvolvimento embrionário ($P > 0,10$).

Não houve efeito do grau de qualidade embrionária (grau 1 ou 2) sobre as taxas de concepção média dos 30 aos 60 dias de embriões provenientes de doadoras da raça Nelore (Tabela 8).

TABELA 8. Efeito do grau de qualidade embrionária nas taxas de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) de embriões produzidos *in vivo* em doadoras da raça Nelore, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados.

Qualidade embrionária (n)	Taxa de concepção média (%) dos 30 aos 60 dias
Grau 1 (159)	$34,0 \pm 4,8$
Grau 2 (138)	$32,5 \pm 4,9$

$P > 0,10$ na mesma coluna.

Os tratamentos superovulatórios das doadoras também foram incluídos na análise estatística e não houve diferença entre as taxas de concepção média dos 30 aos 60 dias quando os embriões foram alocados nos quatro tratamentos (Tabela 9).

TABELA 9. Taxa de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) de embriões produzidos *in vivo* por diferentes tratamentos superovulatórios em doadoras da raça Nelore, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados.

Doadoras (n)	Taxa de concepção média (%), dos 30 aos 60 dias
Grupo FSH (70)	34,9 $\pm$ 6,3
Grupo eCG (97)	38,2 $\pm$ 5,7
Grupo LH2 (65)	33,1 $\pm$ 6,5
Grupo LH4 (65)	27,2 $\pm$ 5,7

P > 0,10 na mesma coluna.

7.3. Experimento 3: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* em fêmeas da raça Holandês Preto e Branco

Foram realizadas 67 superovulações de vacas e novilhas da raça HPB. Não houve diferença entre o número total de estruturas colhidas, embriões viáveis (grau 1, 2 e 3), congeláveis (grau 1 e 2) e embriões degenerados entre vacas em lactação e novilhas. Porém, as vacas lactantes apresentaram maior número de estruturas não fecundadas do que as novilhas. (Tabela 10).

TABELA 10. Produção embrionária (média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) das vacas e novilhas HPB utilizadas no Experimento 3.

	Novilhas (n = 32)	Vacas em lactação (n = 35)	P
Embriões totais, n	5,8 $\pm$ 1,0	7,2 $\pm$ 1,0	0,36
Embriões viáveis (1, 2 e 3), n	3,7 $\pm$ 0,8	2,4 $\pm$ 0,5	0,18
Embriões congeláveis (1 e 2), n	3,0 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 0,5	0,37
Degenerados, n	1,5 $\pm$ 0,4	1,5 $\pm$ 0,3	0,98
Não fecundados, n	0,6 $\pm$ 0,2	3,3 $\pm$ 0,9	0,01

Não houve diferença entre as taxas de concepção média dos 30 aos 60 dias após ovulação de embriões transferidos a fresco em relação aos embriões que foram criopreservados previamente à transferência (P > 0,10; Tabela 11).

TABELA 11. Taxa de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP), aos 30 e 60 dias dos embriões produzidos *in vivo* em doadoras da raça Holandês Preto e Branco, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados.

Embriões (n)	Taxa de concepção (%), aos 30 dias	Taxa de concepção (%), aos 60 dias	Taxa de concepção média (%), dos 30 aos 60 dias
Frescos (58)	38,3 $\pm$ 6,1	36,6 $\pm$ 5,9	37,4 $\pm$ 5,6
Vitrificados (50)	26,4 $\pm$ 5,8	25,8 $\pm$ 6,7	26,1 $\pm$ 5,4
Congelados (62)	28,7 $\pm$ 5,1	29,2 $\pm$ 5,0	29,0 $\pm$ 4,7

P > 0,10 na mesma coluna.

A mortalidade embrionária/fetal dos 30 aos 60 dias foi de 7,4% (2/27) para os embriões transferidos a fresco, 7,1% (1/14) para os embriões transferidos após vitrificação e 20,0% (3/15) para os embriões transferidos após congelação convencional (P > 0,10).

Com relação ao estágio de desenvolvimento embrionário, não houve diferença entre taxas de concepção de mórulas e blastocistos aos 30 e aos 60 dias após ovulação. Entretanto, a taxa de concepção média dos 30 aos 60 dias de mórulas foi maior do que de blastocistos (36,0 $\pm$ 5,1 e 25,8 $\pm$ 4,0, respectivamente; P $\leq$ 0,05). Não houve interação entre tratamentos e estágio de desenvolvimento embrionário (P > 0,10).

Não houve efeito do grau de qualidade embrionária (grau 1 ou 2) sobre as taxas de concepção média dos 30 aos 60 dias de embriões provenientes de doadoras da raça Nelore (P > 0,10 - Tabela 12).

TABELA 12. Efeito do grau de qualidade embrionária nas taxas de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) de embriões produzidos *in vivo* em doadoras da raça Holandês Preto e Branco, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados.

Qualidade embrionária (n)	Taxa de concepção média (%), dos 30 aos 60 dias
Grau 1 (131)	31,7 $\pm$ 3,9
Grau 2 (39)	29,6 $\pm$ 5,4

P > 0,10 na mesma coluna.

Finalmente, a taxa de concepção média dos 30 aos 60 dias das receptoras de corte e novilhas HPB foram maiores do que das vacas em lactação (Tabela 13).

TABELA 13. Efeito da categoria animal das receptoras nas taxas de concepção (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) aos 30 e 60 dias de embriões produzidos *in vivo* em doadoras da raça Holandês Preto e Branco (HPB), transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados.

Categoria da receptora (n)	Taxa de concepção média (%), dos 30 aos 60 dias
Vaca de corte não lactante (39)	32,3 $\pm$ 6,8 ^a
Novilha HPB (61)	45,1 $\pm$ 5,9 ^a
Vaca HPB lactante (70)	18,0 $\pm$ 4,2 ^b

^{a,b}Médias diferem na mesma coluna (P $\leq$ 0,05)

8. DISCUSSÃO

8.1. Experimento 1 e 2: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* em fêmeas da raça Sindi e Nelore

Na raça Sindi, os embriões transferidos a fresco apresentaram maiores taxas de concepção aos 30 dias do que os embriões que foram criopreservados previamente à transferência, independentemente da técnica de criopreservação utilizada. Entretanto, na raça Nelore, a taxa de concepção média dos 30 aos 60 dias de embriões frescos foi superior à dos embriões congelados, mas semelhante aos vitrificados. De forma geral, é esperado que a concepção obtida com embriões criopreservados seja menor do que a obtida com embriões transferidos a fresco, especialmente em raças zebuínas (ZANENGA *et al.*, 1993).

O processo de criopreservação leva à ocorrência de crioinjúrias que diminuem a viabilidade embrionária após transferência. Visintin *et al.* (2002) observaram que embriões submetidos a processos de criopreservação apresentaram sinais evidentes de degeneração e morte celular quando comparados aos embriões frescos, principalmente na raça Nelore (*Bos indicus*).

Sartori *et al.* (2008), também, observaram que embriões produzidos *in vivo* de doadoras da raça Nelore e, posteriormente, congelados apresentaram menores taxas de eclosão 48 e 72 horas após a descongelação quando comparados aos embriões frescos.

No entanto, não foi observada diferença entre a vitrificação e a congelação lenta nas duas raças estudadas. Guardieiro *et al.* (2010) em um estudo com embriões de doadoras Nelore suplementadas com gordura protegida, também, não encontraram diferença entre as taxas de eclosão dos embriões vitrificados pelo método da OPS ou congelados pelo método tradicional. Mucci *et al.* (2010) em um estudo com embriões produzidos *in vivo* de ovelhas, também, não encontraram diferença entre as taxas de concepção de embriões submetidos à congelação lenta (47,8%; n = 23) e à vitrificação (43,5%; n = 23). Outro estudo recente, com fêmeas da raça Brahman, comparou a congelação convencional (CC) com um novo método de vitrificação com transferência direta dos embriões (TD) e, os resultados

preliminares de 16 transferências mostraram que as taxas de concepção dos embriões dos grupos CC e TD foram de 38% (3/8) e 50% (4/8), respectivamente (PRYOR *et al.*, 2010).

Aparentemente, em se tratando de embriões produzidos *in vivo*, a vitrificação não tem se mostrado superior à congelação clássica devido à alta competência e qualidade desses embriões. Todavia, pode tornar-se uma excelente ferramenta a ser utilizada para os embriões produzidos *in vitro*, reconhecidamente inferiores. Landim Junior *et al.* (2010) compararam as taxas de sobrevivência após vitrificação (OPS) e congelação lenta de embriões produzidos *in vitro*. Os embriões vitrificados apresentaram maiores taxas de re-expansão e eclosão (63,2%; n = 542) do que os embriões congelados pelo método lento (56,2%; n = 424).

Adicionalmente, a taxa de concepção obtida com embriões vitrificados da raça Sindi apresentou grande oscilação durante o experimento, variando de 10,0 a 37,0%, ao longo das três transferências, o que contribuiu para um resultado geral aquém do esperado. Esses resultados devem-se, provavelmente, ao processo de aprendizado e otimização da técnica.

A vitrificação é definida como uma técnica simples, rápida e que não requer equipamento caro pela maioria dos autores (VAJTA, 1998; 2000; VAJTA & NAGY, 2006), contudo as taxas de concepção foram aumentando à medida que a capacitação do técnico (aluna) foi sendo aprimorada. Por esta razão, foi proposto o segundo experimento, com embriões provenientes da raça Nelore. Neste estudo, as taxas de concepção dos embriões vitrificados permaneceram constantes ao longo das quatro transferências (38,5%; 31,5%; 30,5% e 30,0%), tornando tais resultados mais consistentes.

A mortalidade embrionária/fetal na raça Nelore, dos 30 aos 60 dias, foi de 18,8% (20/106) e na raça Sindi foi de apenas 4,0% (3/75). Rodrigues *et al.* (1995), observaram uma mortalidade embrionária/fetal de 5,5% (32/582) entre 28-32 e 55-65 dias de gestação, após a transferência de embriões produzidos *in vivo* em novilhas de corte. Corroborando estes resultados, Zanenga & Pedroso (1995) tiveram 4,4% (10/229) de perda embrionária precoce dos 23-30 aos 53-60 dias de gestação, em novilhas e vacas de corte. Em outro estudo mais recente, embriões produzidos *in vivo* de vacas Nelores apresentaram

45,6% (132/289) de concepção aos 30 dias e 41,52% (120/289) aos 60 dias. Neste estudo a mortalidade embrionária/fetal foi de 9,0% (PONTES *et al.*, 2009). Muitos fatores podem estar relacionados à mortalidade embrionária/fetal, dentre eles destacam-se defeitos intrínsecos do embrião, ambiente uterino inadequado, idade, raça, nutrição, estresse, doenças infecciosas entre outros (Sartori & Dode, 2008). Acredita-se que, especialmente na fazenda em que foi realizado o experimento 2, fatores extrínsecos podem ter contribuído para uma mortalidade embrionária/fetal superior à relatada nestas categorias animais, como por exemplo, manejo inadequado das receptoras, problemas sanitários ou estresse, já que a perda embrionária foi homogênea nos três grupos experimentais. Além disso, não houve interação entre as taxas de concepção de embriões frescos, vitrificados e congelados e as diferentes categorias de receptoras presentes neste estudo (vacas, novilhas e vacas lactantes).

Quanto ao estágio de desenvolvimento embrionário, não houve diferença nas taxas de concepção de mórulas e blastocistos, na raça Sindi. Entretanto, na raça Nelore, a taxa de concepção média dos 30 aos 60 dias de mórulas foi maior do que blastocistos. Ao relacionar-se a criotolerância de mórulas e blastocistos aos diferentes tratamentos, não houve interação com as taxas de concepção nessas duas raças estudadas. Esses resultados foram, de certa forma, inesperados, pois a maioria dos trabalhos da literatura que avaliou a criotolerância dos embriões zebuínos ao estágio de desenvolvimento dos mesmos, identificou uma maior resistência dos blastocistos. Segundo os trabalhos, embriões no estágio de blastocisto são mais resistentes às crioinjúrias devido a maior tolerância ao resfriamento, ao maior número e menor tamanho de células e menor quantidade de gotas lipídicas quando comparados às mórulas (ABE *et al.*, 1999; VAJTA *et al.*, 2000; VISINTIN *et al.*, 2002; SHIRAZI *et al.*, 2010). Entretanto, os trabalhos acima citados, não avaliaram efetivamente taxas de concepção de mórulas e blastocistos zebuínos. Dessa forma, pode-se especular que assim como vêm sendo observado nos estudos com raças taurinas (PERES *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2007), de fato, as mórulas zebuínas também sejam mais criotolerantes do que os blastocistos.

Quando as taxas de concepção dos embriões, nos dois estudos, foram correlacionadas ao grau de qualidade dos embriões, não houve diferença entre as taxas de concepção aos 30 e 60 dias de embriões grau 1 e 2. Embriões frescos com grau de qualidade embrionária 1 e 2 apresentam taxas de concepção semelhantes, que variam entre 45 e 60% (AHMAD *et al.*, 1995; SARTORI *et al.*, 2002). Por esta razão, os embriões grau 3 não estão incluídos nas análises dos resultados.

Finalmente, os quatro tratamentos superovulatórios das doadoras Nelores, apesar de não estarem diretamente relacionados com o presente estudo, foram incluídos como efeitos sobre as variáveis estudadas dentro do modelo estatístico, a fim de excluir qualquer interação com as principais variáveis de interesse. E, como era esperado não houve interação do mesmo com as taxas de concepção das receptoras, aos 30 e 60 dias.

8.2. Experimento 3: Criotolerância de mórulas e blastocistos produzidos *in vivo* em fêmeas da raça Holandês Preto e Branco

No presente estudo a média de produção de embriões viáveis foi de 2,4 e 3,7 para vacas holandesas em lactação e novilhas, respectivamente. Os dados de campo indicam que o número médio de embriões viáveis recuperados de vacas leiteiras superovuladas varia de três a cinco. Contrastando com animais de ovulação natural, há uma tendência para que as novilhas apresentem um menor número de embriões viáveis (cerca de 3,0) que para vacas em lactação (cerca de 5,0). No entanto, o reduzido número de embriões em novilhas parece estar relacionado a uma menor resposta superovulatória ao invés de uma redução na qualidade do embrião, que pode ser devido à menor dose de FSH utilizada nessa categoria animal (revisado por Sartori *et al.*, 2010). As vacas lactantes apresentaram maior número de estruturas não fecundadas do que as novilhas. Apesar da taxa de fecundação ser baixa em vacas superestimuladas durante o verão (revisado por Sartori *et al.*, 2010), acredita-se que no presente estudo o maior número de estruturas não fecundadas colhidas nas vacas lactantes seja em função de uma falha do protocolo superestimulatório ocorrida nas Fazendas Sant'Anna e Iracema, nas quais encontravam-se 26 das 35 vacas em lactação do Experimento 3.

No estudo com vacas e novilhas Holandesas, a taxa de concepção média dos 30 aos 60 dias não diferiu entre embriões frescos e criopreservados. Em diversos relatos, a sobrevivência dos embriões após criopreservação, provenientes de vacas taurinas foi semelhante à dos embriões transferidos a fresco (HASLER *et al.* 2001; LOPATAROVA *et al.*, 2006; revisado por VASCONCELOS *et al.*, 2006). Contudo, o número de transferências do experimento 3, tendo sido mais restrito do que nos experimentos 1 e 2, requer uma análise cautelosa, pois, contrariando os autores acima, Rodrigues *et al.* (2007) constataram que as taxas de concepção dos embriões frescos de doadoras holandesas foram maiores do que as dos congelados ($P \leq 0,001$).

Seguindo a mesma tendência dos experimentos 1 e 2, as duas técnicas de criopreservação apresentaram taxas de concepção semelhantes. Visintin *et al.* (2002) avaliaram a morfologia embrionária após os processos de vitrificação e congelação lenta e, apesar do número restrito de observações, o aspecto morfológico das células embrionárias foi mais bem preservado após o processo de congelação lenta. No entanto, o processo de vitrificação mostrou-se mais benéfico para os embriões provenientes de vacas Holandesas do que para os embriões de vacas Nelores. Um estudo mais recente comparou dois métodos de vitrificação (*OPS* e *Closed Pulled Straws* - CPS) e a congelação lenta em embriões produzidos *in vivo* de *Bos taurus* (*Chinese Yelloy Cattle*). Após os três processos de criopreservação, os embriões foram colocados em cultivo *in vitro* e a porcentagem de embriões viáveis foi comparada 24 e 72 horas após. Não houve diferença na porcentagem de embriões viáveis entre a OPS ($63,4 \pm 7,7\%$; $n = 68$) e a CPS ($63,4 \pm 8,6\%$; $n = 67$), entretanto, a congelação lenta apresentou uma menor porcentagem de embriões viáveis ($52,3 \pm 2,6\%$; $n = 63$) após 24 h de cultivo. As mesmas diferenças mantiveram-se após 72 horas de cultivo embrionário. Este estudo não apresentou dados referentes à criotolerância de mórulas e blastocistos (YU *et al.*, 2010).

A mortalidade embrionária média do experimento 3 foi de 10,7% (6/56) e, não foi possível detectar diferença entre os grupos. Sartori *et al.* (2006), compararam a IA à transferência de embriões produzidos *in vivo*, em vacas Holandesas lactantes. A mortalidade embrionária/fetal das vacas que receberam TE foi de 26,2% (22/84), dos 25-32 aos 60-66 dias. Outros dados

não publicados de Sartori & Wiltbank mostraram que a mortalidade embrionária/fetal de embriões congelados transferidos em vacas Holandesas lactantes foi de 35,5% (21/59), dos 30 aos 120 dias. Neste mesmo estudo, as mórulas congeladas apresentaram menor taxa de mortalidade embrionária/fetal (23,0%; n = 26) do que os blastocistos congelados (45,0%; n = 33; $P \leq 0,05$). Outro estudo que buscou avaliar fatores relacionados à mortalidade embrionária/fetal, dos 30 aos 60 dias, em vacas Holandesas lactantes e novilhas, encontrou uma porcentagem geral de perda embrionária de 18,3% em 640 animais, sendo destes 10,3% nas novilhas, 19,4% nas vacas de primeira lactação e 20,5% nas vacas de segunda ou mais lactações. Neste estudo, a estação do ano, o número de lactações e a produção leiteira se mostraram fatores de risco significativos para favorecer a mortalidade embrionária/fetal, dos 30 aos 60 dias. (MELÉNDEZ & DUCHENS, 2009)

Rodrigues *et al.* (2010) compilaram dados de 2096 transferências de embriões de vacas Holandesas de alta produção e repetidoras de serviço com a finalidade de avaliar a perda embrionária/fetal dos 30 a 60 dias. Curiosamente, a mortalidade embrionária/fetal foi maior nos embriões frescos (22,9%; n = 615) do que nos congelados (19,4%; n = 1481; $P = 0,005$). Surpreendentemente também, não houve diferença na mortalidade embrionária/fetal entre os diferentes estágios de desenvolvimento embrionário (mórulas, blastocistos iniciais, blastocistos e blastocistos expandidos) ou entre embriões com distintos graus de qualidade (1, 2 e 3).

Especula-se que a baixa taxa de mortalidade embrionária/fetal do presente estudo seja pela utilização de três categorias diferentes de receptoras (vacas Holandesas em lactação, novilhas Holandesas e vacas de corte). Dessa forma, foram transferidos 70 embriões nas vacas em lactação e 100 embriões nas novilhas Holandesas e vacas de corte diferentemente dos estudos anteriores em que a totalidade das receptoras pertencia à categoria de vacas Holandesas de alta produção leiteira.

Com relação ao estágio de desenvolvimento embrionário, a taxa de concepção média dos 30 aos 60 dias de mórulas foi maior do que de blastocistos e não houve interação entre o estágio e os tratamentos. Esse resultado corrobora a predileção por se congelar mórulas a blastocistos da

maioria dos profissionais que trabalha com TE de raças taurinas. Ademais, Rodrigues *et al.* (2007), verificaram que a transferência de mórulas congeladas foi responsável por uma menor redução da taxa de concepção entre os embriões frescos e congelados ($P \leq 0,05$). Peres *et al.* (2006), também, observaram maiores taxas de concepção em receptoras inovuladas com mórulas descongeladas quando comparadas a blastocistos iniciais e blastocistos descongelados da raça Bonsmara ($P \leq 0,05$).

Semelhantemente às raças Sindi e Nelore, não houve diferença entre as taxas de concepção média dos 30 aos 60 dias de embriões HPB com grau de qualidade embrionária 1 e 2, já que embriões considerados excelentes e bons, respectivamente, tendem a apresentar taxas de concepção similares (AHMAD *et al.*, 1995; SARTORI *et al.*, 2002).

Finalmente, com relação às categorias animais utilizadas como receptoras dos embriões frescos, vitrificados e congelados do experimento 3, as receptoras de corte e novilhas HPB apresentaram maiores taxas de concepção média dos 30 aos 60 dias do que vacas em lactação. Essa variável é de suma importância e permite especular que vacas em lactação podem apresentar menor fertilidade quando comparadas às novilhas ou receptoras de corte, especialmente quando submetidas à situações de estresse térmico. O experimento 3 foi realizado nos meses de setembro a dezembro de 2009, durante os quais a temperatura ambiente foi bastante elevada. No estudo de Demétrio (2007) a temperatura corporal aferida no dia 7 (dia da inovulação) afetou negativamente a taxa de concepção das vacas em lactação que receberam embrião ($P \leq 0,08$). Dessa forma, uma possível condição de estresse térmico das vacas lactantes utilizadas como receptoras de embrião no experimento 3, pode ter sido prejudicial à concepção desses animais quando comparadas às receptoras de corte ou novilhas HPB.

9. CONCLUSÕES

A criopreservação comprometeu a viabilidade de embriões produzidos *in vivo*, especialmente aqueles de origem zebuína, independente da técnica empregada, contudo, não inviabilizou sua utilização.

Não há indicação em se congelar ou vitrificar blastocistos zebuínos ao invés de mórulas e, de fato, as mórulas taurinas foram mais criotolerantes do que os blastocistos.

Com relação às técnicas de criopreservação estudadas, alguns fatores podem contribuir para a utilização de uma ou de outra:

- A vitrificação e desvitrificação de embriões exige a presença de um técnico capacitado, entretanto não há necessidade em se adquirir uma máquina de congelamento, que pode ser bastante oneroso;
- Por outro lado, a congelamento de embriões exige a aquisição de uma máquina de congelamento, contudo é uma técnica de realização mais simples e a possibilidade de transferência direta dos embriões é uma das suas grandes vantagens.

10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com relação à criotolerância dos embriões zebuínos, embriões transferidos a fresco apresentam maior taxa de concepção do que os criopreservados e, aparentemente, não há diferença nas taxas de concepção quando os embriões são congelados ou vitrificados previamente à transferência. Por outro lado, os embriões taurinos apresentam taxas de concepção semelhantes entre frescos e criopreservados, independente da técnica de criopreservação, apesar de existir uma grande controvérsia entre os dados presentes na literatura.

Mórulas parecem apresentar taxas de concepção superiores à blastocistos tanto em raças taurinas quanto zebuínas. Entretanto, particularmente na raça Sindi, mórulas e blastocistos apresentaram concepção semelhante. Por outro lado, não há nenhum estudo controlado que tenha comparado o comportamento de embriões taurinos e zebuínos em diferentes estágios de desenvolvimento e nas mesmas condições experimentais. Até por que, existe uma grande dificuldade em se atender às condições experimentais ótimas para que cada raça desempenhe seu pleno potencial de produção.

É importante destacar que em se tratando da criotolerância de mórulas e blastocistos, independente da raça ou grupo genético, a técnica de criopreservação instituída pode contribuir de maneira efetiva para o sucesso ou fracasso dos resultados. Logo, a escolha da técnica de vitrificação a ser estudada foi realizada com muita cautela. E, após vasta revisão da literatura, optou-se pelo método do *Cryotop*, por tratar-se de uma técnica bastante inovadora e consagrada em muitos laboratórios de reprodução humana assistida e com excelentes resultados. Por outro lado, a vitrificação, apesar de ser uma técnica simples e rápida, exige capacitação eficiente para que os resultados sejam satisfatórios. No presente estudo, a curva de aprendizado da técnica interferiu negativamente nas taxas de concepção do experimento 1. Esse fato tornou imprescindível a realização do experimento 2, a fim de obter resultados mais consistentes em zebuínos.

Ademais, com o transcorrer do estudo, a dificuldade inicial que parecia ser uma grande limitação inerente à técnica e a sua implementação numa rotina comercial, foi superada e a vitrificação tornou-se uma possibilidade

interessante, especialmente quando foram realizadas algumas alterações no protocolo original a fim de tornar o processo mais ágil e competitivo à transferência direta dos embriões congelados.

Em suma, apesar dos resultados da vitrificação não terem superado os da congelação clássica, essa pode ser uma grande alternativa para embriões produzidos *in vivo*, mas principalmente àqueles mais sensíveis produzidos *in vitro*, por promover menos crioinjúrias e danos às células embrionárias.

11. BIBLIOGRAFIA

- ABE, H.; OTOI, T.; TACHIKAWA, S.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Fine structure of bovine morulae and blastocysts *in vivo* and *in vitro*. *Anatomy Embryology*, v.199, p.519-527, 1999.
- ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology*, v.54, p.19–24, 1994.
- ALVARENGA, F.C.L. Avaliação dos efeitos da congelação e descongelação sobre a viabilidade e morfologia dos embriões eqüinos. Tese, Botucatu, Brasil, 1995.
- AHMAD, N.; SCHRICK, F.N.; BUTCHER, R.L.; INSKEEP, E.K. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biology of Reproduction*, v.52, p.1129–1135, 1995.
- AMAN, R.R.; PARKS, J.E. Effects of cooling and rewarming of the meiotic spindle and chromosomes of *in vitro* matured bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, v.50, p.103-110, 1994.
- BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; PINHEIRO, O.L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.19, p.9-22, 1995.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1483–96, 2001.
- BARROS, C. M.; BARCELOS, A. C. Z.; GOUVÊA, L. M.; MENEGHEL, M.; BARCELOS, D. S.; BARCELOS, L. N.; TRINCA, L. A. Improvement of a superstimulatory protocol in nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. *Reproduction Fertility and Development*, v.20, p.152, 2007 (abstract).
- BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BÓ, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v.65. p.77-88, 2006.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p.205-211, 2007.

- BECKERS, J.F.; REMY, B.; BARIL, G.; FIGUEIREDO, J.R.; BUREAU, F.; SULON J.; SAUMANDE, J. Anti-eCG antibodies are transmitted via the colostrum in goats. *Theriogenology*, v.43, p.165, 1995 (abstract).
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; NASSER, L.F.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology*, v.40, p.225–239, 1993.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.39, p.193-204, 1995.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; CHESTA, P.M.; MARTINS, C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, v.65, p.89-101, 2006.
- BRISON, D.R.; SCHULTZ, R.M. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biology of Reproduction*, v.56, p.1088-1096, 1997.
- BURATINI JR., J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BÓ, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, v.54 p.421-431, 2000.
- CAMPOS-CHILLON, L.F.; WALKER, D.J.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J.F.; SEIDEL Jr., G.E. *In vitro* assessment of a direct transfer vitrification procedure for bovine embryos. *Theriogenology*, v.65, p.1200-1214, 2006.
- CARVALHO, R.V.; DEL CAMPO, M.R.; PALASZ, A.T.; PLANTE, Y.; MAPLETOFT, R.J. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7. *Theriogenology*, v.45, p.489-498, 1996.
- CARVALHO, J.B.; CARVALHO, N.A.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, v.69, p.167-175, 2008.

- CASTRO NETO, A., SANCHES, B. V., BINELLI, M., SENEDA, M. M., PERRI, S.H., GARCIA, J. F. Improvement in embryo recovery using uterine double flushing. *Theriogenology*, v.63, p.1249-1255, 2005.
- COCERO, M.J.; LOPEZ SEBASTIAN, A.; BARRAGAN, M.L.; PICAZO, R.A. Differences on post-thawing survival between ovine morulae and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol or glycerol. *Cryobiology*, v.33, p.502-507, 1996.
- CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDRE, J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vitro* or *in vivo*. *Biology of Reproduction*, v.62, p.1459-1465, 2000.
- DATTENA, M.; PTAK, G.; LOI, P.; CAPPAL, P. Survival and viability of vitrified *in vitro* produced ovine blastocysts. *Theriogenology*, v.53, p.1511-1519, 2000.
- DEMETRIO, D.G.B.; SANTOS, R. M.; DEMETRIO, C. G. B.; VASCONCELOS, J. L. M. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. *Journal Dairy Science*, v.90, p. 5073-5082, 2007.
- ESPER, C.R.; BARBOSA, J.C. Estrutura comparativa de embriões bovinos. In: *VIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, Minas Gerais, Brasil, 1991.
- FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTEL, D.C.; HITTEL, P. Ultrastructure of bovine blastocysts following criopreservation: effect of method of blastocyst production. *Molecular Reproduction and Development*, v.58, p.186-195, 2001.
- FARIN, P.W.; BRITT, J.H.; SHAW, D.W.; SLENNING, B.D. Agreement among evaluators of bovine embryos produced *in vitro* or *in vivo*. *Theriogenology*, v.44, p.339-349, 1995.
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*). *Theriogenology*, v.47, p.1489-1505, 1997.
- GARCIA-GARCIA, R.M.; GONZALEZ-BULNES, A.; DOMINGUEZ, V.; VEIGA-LOPEZ, A.; COCERO, M.J. Survival of frozen-thawed sheep embryos cryopreserved at cleavage stages. *Cryobiology*, v.52, p.108-113, 2006.

- GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; MADURE, E.H.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M.; BARUSELLI, P.S. Estudo ultrasonográfico da divergência folicular em novilhas *Bos indicus*. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, p.210, 2005a (resumo).
- GIMENES, L.U.; CARVALHO, N.A.T.; SÁ FILHO, M.F.; SANTIAGO, L.L.; CARVALHO, J.B.P.; MAPLETOFT, R.J. *et al.* Capacidade ovulatória em novilhas *Bos indicus*. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, p.209, 2005b (resumo).
- GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.87, p.223-230, 1989.
- GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology and Reproduction*, v.55, p.1187-1194, 1996.
- GUARDIEIRO, M. M.; MACHADO, G. M.; BASTOS, M. R.; MOURÃO, G. B.; CARRIJO, L. H. D.; DODE, M. A. N.; SARTORI, R. Postcryopreservation viability of embryos from Nelore heifers supplemented with rumen-protected fat. *Reproduction, Fertility and Development*, v.22, n.1, p.205-206, 2010.
- HASLER, J. F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1401-1415, 2001.
- HOUGHTON, P.L.; LEMENAGER, R.P.; HENDRIX, K.S.; MOSS, G.E.; STEWART, T.S. Effects of body composition, pre- and postpartum energy intake and stage of production of energy utilization by beef cows. *Journal of Animal Science*, v.68, p.1447-1456, 1990.
- IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F.J.; IRELAND, L.H.; SMITH, G.W.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reproduction*, v.22, n.6, p.1687–1695, 2007.
- IWASAKI, S.; YOSHIBA, N.; USHIJIMA, H.; WATANABE, S.; NAKAHARA, T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.90, p.279-284, 1990.

- KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of cryopreservation on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. *Theriogenology*, v.54, p.313-326, 2000.
- KUWAYAMA, M. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology*, v.67, p.73-80, 2007.
- LANDIM JUNIOR, L.P.; YAMAZAKI, L.T.S.; WATANABE, O.; BENZI, E.C.D.; CORNEGLIAN, D.P.; ROMANO, M. *et al.*, Recovery rates of bovine IVP embryos cryopreserved by slow freezing and vitrification (OPS and SSV) methods. *Reproduction, Fertility and Development*, v.22, n.1, p.207, 2010.
- LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PYLES, E.S.C.S.; SILVA, A.O. Criopreservação de Oócitos e Embriões Bovinos, *II Simpósio sobre Produção In Vitro de Embriões Bovinos*, Campinas, São Paulo, 2007.
- LAZAR, L.; SPAK, J.; DAVID, V. The vitrification of *in vitro* fertilized cow blastocysts by the open pulled straw method. *Theriogenology*, v.53, p.571-578, 2000.
- LEIBO, S.P.; LOSKUTOFF, N.M. Criobiology of *in vitro*-derived bovine embryos. *Theriogenology*, v.39, p.81-94, 1993.
- LEIBO, S.P.; MARTINO, A.; KOBAYASHI, S.; Stage-dependent sensitivity of oocytes and embryos to low temperatures. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.45-53, 1996.
- LIMA, W.M.; VIEIRA, A.D.; THALLER NETO, A.; MEZZALIRA, A.; MATOS, R.C.; GREGORY, R.M. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. *Animal Reproduction Science*, v.100, p.364–370, 2007.
- LIU, J.; SIROIS, J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. *Biology of Reproduction*, v.58, p.1527-1532, 1998.
- LOPATAROVA, M.; CECHE, S.; HAVLICEK, V.; HOLY, L. Effect of vitrification in open pulled straws on survival of bovine embryos from superovulated cows. *Acta Veterinariae Brunensis*, v.71, p.93-99, 2002.

- LOPATAROVA, M.; CECH, S.; HOLY, L.; DOLEZEL, R. The effect of vitrification in open pulled straws on pregnancy rates after transfer of *in vivo* produced bovine embryos. *Veterinarni Medicina*, v.51, n.9, p.454-460, 2006.
- LOPEZ, H.; SATTER, L.D.; WILTBANK, M.C.; Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v.81, p.209-223, 2004.
- MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, v.42, p.601-611, 2002.
- MARTINS, C.M.; CASTRICINI, E.S.C.; REIS, E.L.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; *et al.* Produção embrionária de vacas holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.3, p.286, 2005 (resumo).
- MARTINS, C.M.; OLIVEIRA, L.G.; CREPALDI, G.A.; SALES, J.N.S.; BARUSELLI, P.S. Efeito de diferentes doses de eCG na resposta superovulatória de doadoras Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.1237, 2007 (resumo).
- MASSIP, A. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals. *Reproduction of Domestic Animals*, v.36, p.49-55, 2001.
- MAZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. *Science*, v.199, p.939-949, 1970.
- MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology*, v.247, p.125-142, 1984.
- MELÉNDEZ, P.; DUCHENS, M. Factores asociados a mortalidad embrionaria (30-60 ds) en vacas Holstein de Chile Central. In: *Anais do 8^{vo} Simpósio Internacional de Reproduccion Animal*, Córdoba, Argentina, 2009 (CD-ROM).
- MOLLO, M.R.; RUMPF, R.; MARTINS, A.C.; MATTOS, M.C.C.; LOPES JR., G.; CARRIJO, L.H.D.; SARTORI, R. Função ovariana em novilhas Nelore submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.1241, 2007 (resumo).
- MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T.; MOGAS, T. Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine

- oocytes: Effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology*, v.57, p.137-141, 2008.
- MUCCI, N.; HOZBOR, F.; KAISER, G.G.; SANCHEZ, E.; ALBERIO, R.H. Pregnancy rate after embryo transfer of *in vivo*-produced ovine embryos cryopreserved by slow freezing or vitrification. *Reproduction, Fertility and Development*, v.22, n.1, p.212, 2010.
- NASSER, L.; ADAMS, G.P.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, v.40, p.713–24, 1993.
- NELDER, J.; WEDDERBURN, R.W. Generalize linear models. *Journal Research Statistic Science*, v.135, p.370-384, 1972.
- NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, B.J.P.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A.; D'OCCHIO, M.J.; BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology*, v.57, p.1625–34, 2002.
- NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.509, 2003 (resumo).
- PALASZ, A.T.; MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. *Biotechnology Advances*, v.14, p.127-149, 1996.
- PAPADOPOULOS, S.; RIZOS, D.; DUFFY, P.; WADE, M.; QUINN, K.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. *Animal Reproduction Science*, v.74, p.35-44, 2002.
- PEDRO, P.B.; YOKOYAMA, E.; ZHU, S.E.; YOSHIDA, N.; VALDEZ JR, D.M.; TANAKA, M.; EDASHIGE, K.; KASAI, M. Permeability of mouse oocytes and embryos at various developmental stages to five cryoprotectants. *Journal of Reproduction and Development*, v.51, p.235-246, 2005.
- PERES, L.C.; PINCINATO, D.; TRIBULO, R.; CUTAIA, L.; BÓ, G.A. Fatores que afetam a taxa de prenhez em programas de transferência de embriões em tempo fixo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, p.518, 2006 (resumo).

- PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; VALLE, E.R.; ENCARNAÇÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 α or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v.49, p.667-81, 1998.
- PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v.71, p.690–697, 2009.
- PRYOR, J.H.; LOONEY, C.R.; WALKER, D.; SEIDEL Jr., G.E.; HASLER, J.F.; KRAEMER, D.C.; ROMO, S. Comparison between conventional direct transfer freezing and vitrification for the cryopreservation of *in vivo* embryos from Brahman cattle. *Reproduction Fertility and Development*, v.19, n.1, p.224-225, 2010.
- RALL, W.F.; MEYER, T.K. Zona fracture damage and its avoidance during the cryopreservation of mammalian embryos. *Theriogenology*, v.31, p.683-692, 1989.
- RHODES, F.M.; DE`ATH, G.; ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. *Animal Reproduction Science*, v.38, p.265-277, 1995.
- RODRIGUES, C.F.M. Ocorrência de mortalidade embrionária em programa de transferência de embriões. *ARS Veterinaria*, v.11, p.76-78, 1995.
- RODRIGUES, C.A.; MANCILHA, R.F.; REIS, E.L.; AYRES, H.; GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F., Efeito do número de implantes de norgestomet e do momento da administração do indutor de ovulação em vacas holandesas superovuladas. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, p.229, 2005 (resumo).
- RODRIGUES, C.A.; AYRES, H.; FERREIRA, R.M.; TEIXEIRA, A.A.; BARUSELLI, P.S. Taxa de concepção de embriões frescos e criopreservados transferidos em vacas holandesas de alta produção. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.1256, 2007 (resumo).
- RODRIGUES, C.A.; TEIXEIRA, A.A.; FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; RANIERI, A.L.; FREITAS, B.G.; BARUSELLI, P.S. Pregnancy loss (between 30 and 60

- days) in high-producing repeat breeder holstein cows submitted to embryo transfer. *Reproduction, Fertility and Development*, v.22, p. 248, 2010.
- ROY, F.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CRIBIU, E.P.; POBEL, T.; DELÉTANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F.; MAUREL, M.C. Hormonal immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: Association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. *Biology of Reproduction*, v.61, p.209-218, 1999.
- RUMPF, R.; BRANDÃO, D.O.; PEREIRA, D.C.; CORRÊA, G.A. *Workshop de vitrificação de embriões produzidos in vitro*, EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 2004.
- SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, v.63, p.2382-2394, 2005.
- SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.P.; GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1403-1409, 2001.
- SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.A.; GUENTHER, J.N.; PARRISH, J.J.; WILTBANK, M.C. 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.
- SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *Journal of Dairy Science*, v.87, p.905-920, 2004.
- SARTORI, R.; GÜMEN, 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, p.1311–1321, 2006.
- SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; GUARDIEIRO, M.M.; BASTOS, M.; RUMPF, R.; DODE, M.A.N. *In vitro* development of *in vivo* produced embryos frozen at morula or blastocyst stages. *Reproduction, Fertility and Development*, v.20, p.148-148, 2008 (abstract).

- SARTORI, R.; DODE, M.A.N. Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem. In: *Anais do 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*. p. 175-194, Londrina, Brasil, 2008.
- SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M.; BARROS, C.M.; BASTOS, M.R., MACHADO, G.M.; LEME, L.O.; RUMPF, R. Lack of improvement on embryo production by the replacement of the last two doses of pFSH by eCG in superstimulated Nelore heifers. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 21, p.245-246, 2009 (abstract).
- SARTORI, R.; BASTOS, M.R.; WILTBANK, M.C. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle *Reproduction, Fertility and Development*, v.22, p.151–158, 2010.
- SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicle during during the oestrous cycle in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.83, p.663-671, 1988.
- SEGERSON, E.C.; HANSEN, T.R.; LIBBY, D.W.; RANDEL, R.D.; GETZ, W.R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *Journal of Animal Science*, v.59, p.1026-1046, 1984.
- SHIRAZI, A.; SOLEIMANI, M.; KARIMI, M.; NAZARI, H.; AHMADI, E.; HEIDARI, B. Vitrification of *in vitro* produced ovine embryos at various developmental stages using two methods. *Cryobiology*, v.60, p.204–210, 2010.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction*, v.39, p.308-317, 1988.
- SOUZA, A.H.; SARTORI, R.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.; MONSON, R.; WILTBANK, M.C. Effect of semen source and dose of FSH on superovulatory response and embryo production in Holstein heifers. *Animal Reproduction*, v.4, p.70-76, 2007.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, J.P.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H., GREVE, T.; CALLESEN, H. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Molecular Reproduction*, v.51, p.53-58, 1998.
- VAJTA G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. *Animal Reproduction Science*, v.60, p.357-364, 2000.

- VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. *Theriogenology*, v.65, p.236-244, 2006.
- VAJTA, G.; NAGY, Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reproduction BioMed Online*, v.12, p.779-796, 2006.
- VARAGO, F.C.; SALIBA, W.P.; ALVIM, M.T.T.; VASCONCELOS, A.B.; OLIVEIRA, C.H.; STAHLBERG, R. LAGARES, M.A. Vitrification of in vitro produced Zebu embryos. *Animal Reproduction*, v.3, p.353-358, 2006.
- VASCONCELOS, J.L.M; DEMÉTRIO, D.G.B.; SANTOS, R.M.; JARDINA, D.T.G.; RODRIGUES, C.A.; CHIARI, J.R. Programa de transferência de embriões para vacas de leite em ambiente tropical. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, p.159-170, 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.
- VISINTIN, J.A.; MARTINS, J.F.P.; BEVILACQUA, E.M.; MELLO, M.R.B.; NICÁCIO, A.C.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Cryopreservation of *Bos taurus* vs. *Bos indicus* embryos: Are they really different? *Theriogenology*, v.57, p.345-359, 2002.
- WHITTINGHAM, D.G.; LEIBO, S.P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196°C and -269°C . *Science*, v.178, p.411-414, 1972.
- WILMUT, I.; ROWSON, L.E.A. Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *The Veterinary Record*, v.92, p.686-690, 1973.
- XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction*, v.53, p.951-957, 1995.
- YU, X.L.; DENG, W.; LIU, F.J.; LI, Y.H.; LI, X.X.; ZHANG, Y.L.; ZAN, L.S. Closed pulled straw vitrification of *in vitro*-produced and *in vivo*-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v.73, p.474-479, 2010.
- ZANENGA, C.A. Freezing on zebu embryos – Development and viability. In: *X Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*. Belo Horizonte, MG, Brasil, 1993.

ZANENGA, C.A.; PEDROSO, M.F. Early pregnancy check by ultrasound scanning in bovine embryo transfer. *ARS Veterinaria*, v.11, p.151, 1995 (abstract).

ZANENGA, C.A.; MARQUES, M.O.; SANTOS, I.C.C.; VALENTIN, R.; BARUSELLI, P.S. Comparação entre dois protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.626-627, 2003.

12. ANEXO I

Trabalho científico enviado à revista Animal Reproduction Science

IMPROVEMENT OF EMBRYO QUALITY BY THE REPLACEMENT OF THE LAST TWO DOSES OF PORCINE FOLLICLE-STIMULATING HORMONE BY EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN IN SINDHI DONORS

M. C. C. Mattos¹, M. R. Bastos¹, M. M. Guardieiro², J. O. Carvalho², M. M. Franco³, G.
B. Mourão², C. M. Barros⁴, R. Sartori^{2*}

¹Department of Animal Reproduction and Radiology, FMVZ, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil, 18618-970. ²Department of Animal Science, ESALQ, University of São Paulo (USP), Piracicaba, SP, Brazil, 13418-900. ³Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, Brasília, DF, Brazil, 70770-900. ⁴Department of Pharmacology, IBB, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, SP, Brazil, 18618-970.

mmary_ccm@yahoo.com.br, michelerbastos@hotmail.com,

moniqueguardieiro@yahoo.com.br, joseocneto@hotmail.com,

mfranco@cenargen.embrapa.br, gbmourao@esalq.usp.br, cmbarros@ibb.unesp.br

*Correspondence and reprint request: Av. Pádua Dias, 11 CP 9, 13418-900, Piracicaba, SP, Brazil; Phone/fax (55) 19-34294007, E-mail: robertosartori@usp.br

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the superovulatory (SOV) response of Sindhi (*Bos indicus*) donors submitted to a superstimulatory protocol replacing the last two doses of pFSH by eCG. Forty-eight SOV treatments were performed in a crossover design in 19 nulliparous and primiparous females that were randomly divided into two groups: FSH ($n = 24$), which consisted of eight pFSH injections, or FSH/eCG ($n = 24$), which consisted of six pFSH injections followed by two eCG injections. Each female underwent two or three SOV treatments that consisted of an i.m. injection of 2 mg estradiol benzoate and the insertion of an intravaginal progesterone-releasing device on Day 0. On Day 4, the superstimulatory treatments (100 mg pFSH) were initiated and given in decreasing doses twice a day over a 4-day period. In the FSH/eCG group, the last two doses of pFSH were replaced by two doses of eCG (150 IU eCG each). At the time of the fifth and sixth injections of FSH, 0.150 mg PGF_{2α} was injected i.m. The intravaginal progesterone-releasing device was removed at the time of the last FSH or eCG injection and ovulation was induced with 0.2 mg GnRH 12 h later. All females were artificially inseminated with frozen-thawed semen from the same bull 12 and 24 h after GnRH treatment. Seven days after the first AI, embryos/ova were recovered. Superstimulatory (number of follicles ≥ 6 mm at the time of the last FSH or eCG injection) and SOV (CL number) responses were determined by transrectal ultrasonography. Data were analyzed using generalized linear models and results were presented as least squares means $\pm$ standard error. The FSH/eCG group had higher superstimulatory (33.8 ± 3.9 v. 23.8 ± 2.6 follicles; $P \leq 0.03$) and SOV (16.8 ± 2.9 v. 10.8 ± 2.1 CL; $P \leq 0.10$)

responses. Although the number of total ova/embryos recovered was not different between groups (8.2 ± 1.8 v. 5.9 ± 1.4 for FSH/eCG and FSH groups, respectively; $P > 0.25$), the number (5.8 ± 1.3 v. 2.6 ± 0.7 ; $P \leq 0.02$) and percentage (75.6 ± 5.7 v. $53.2 \pm 9.7\%$; $P \leq 0.05$) of viable embryos was greater for the FSH/eCG females. Therefore, there was improvement in superstimulatory and SOV responses and embryo quality by replacing the last two doses of pFSH by eCG in Sindhi donors.

Keywords: superovulation; eCG; embryo; *Bos indicus*.

1. INTRODUCTION

Bos indicus cattle are the largest commercial herd in Brazil, due to its great adaptability to the tropical environment. The increasing demand of high genetic merit animals has directed the use of advanced biotechnologies, particularly those associated with animal reproduction. In this context, induction of multiple ovulation or superovulation (SOV) for embryo production and embryo transfer (ET) can be a tool to improve the number of offspring of high genetic merit Zebu cows and heifers.

For this reason, Barros and Nogueira (2001) developed a protocol, called P-36, in which an intravaginal progesterone-releasing device is maintained for a period of 36 h after application of $\text{PGF}_{2\alpha}$, and ovulation is induced with LH 12 h after device removal. With this protocol, ovulation occurs about 24 to 36 h after LH treatment and animals are inseminated at fixed time 12 to 24 h after the injection (Nogueira and Barros, 2003).

Finally, to improve the superestimulatory response, some studies have proposed changes in the protocol-based superstimulatory gonadotropins. Barros et al. (2007) tested the replacement of the last two treatments with porcine follicle stimulating hormone (pFSH) by equine chorionic gonadotropin (eCG) in Nellore cows and noted a greater SOV response in animals treated with eCG and pFSH compared to animals treated only with pFSH. However, another similar study with Nellore heifers did not corroborate these observations (Sartori et al., 2009).

Based on the controversial results, the aim of this study was to evaluate the superestimulatory and SOV responses and embryo production of Sindhi (*Bos indicus*) females superovulated with a protocol replacing the last two injections of pFSH by eCG.

2. MATERIAL AND METHODS

The study was conducted on a farm located in Ituiutaba, MG, Brazil, where 19 lactating and non-lactating Sindhi females, with body condition score between 3.0 and 3.5 (scale from 1 to 5, according to Houghton et al., 1990) were superovulated with two different protocols, in a crossover design, with a 35 to 42-days interval between SOV, totaling 48 treatments. In this study, animals were superovulated at least once and at most twice in each treatment.

All females were kept in *Brachiaria decumbens* pasture, receiving adequate amounts of mineral salt and with free access to water.

The emergence of follicular wave was synchronized with an i.m. treatment of 2 mg estradiol benzoate (EB, Gonadiol, Intervet Schering-Plough Animal Health, Brazil) and the insertion of an intravaginal progesterone-releasing device (DIB, Intervet Schering-Plough Animal Health, Brazil) on Day 0 of the SOV protocol (Figure 1). Four days later, the animals were superestimated with 100 mg pFSH (Folltropin-V, Bioniche Animal Health Canadá Inc) administered twice daily in decreasing doses over a 4-day period. At the time of the fifth and sixth injections of pFSH (Day 6), 0.150 mg PGF_{2α} (Preloban, Intervet Schering-Plough Animal Health, Brazil) was injected i.m.

At Day 7, two treatments of 150 IU eCG (Folligon, Intervet Schering-Plough Animal Health, Brazil) were administered in half of the animals 12 h apart, instead of the seventh and eighth injections of pFSH (FSH/eCG group).

The DIB device was removed at the time of the last pFSH or eCG injection and ovulation was induced with 0.2 mg GnRH (Fertagyl, Intervet Schering-Plough Animal Health, Brazil) 18 h later. All females were artificially inseminated with frozen-thawed semen from the same bull 6 and 18 h after GnRH treatment. Seven d after GnRH treatment, embryos/ova were recovered using the double uterine flushing technique described by Castro Neto et al. (2005). All embryos were classified for quality (1 = excellent, 2 = good, 3 = fair, 4 = poor and 5 = degenerate) according to Ahmad et al. (1995) and Sartori et al. (2002).

After embryo recovery, each donor received two i.m. injections of 0.150 mg PGF_{2α}, 24 h apart.

Ultrasound evaluation of the ovaries was performed using an Aloka SSD-500 (Aloka, Tokyo, Japan) equipped with a 7.5 MHz linear transducer at the time of the first pFSH and last pFSH or eCG injections, to evaluate follicle population at wave emergency and the superstimulatory responses, respectively. The SOV response was evaluated two days after GnRH treatment and on the day of embryo collection, by counting the number of non-ovulated follicles and CL, respectively.

Statistical Analyses

For statistical analyses, the GLIMMIX procedure (ANOVA) of SAS was used under generalized linear models methodology. For count variables, a Poisson distribution with logarithmic link function was used and for proportion variables, a binomial distribution with logit link function was employed.

The count variables, such as number of follicles ≥ 3 mm at wave emergence, number of follicles ≥ 6 mm at the end of superstimulation, number of non-ovulated follicles 48 h after GnRH treatment, number of CL, number of total ova/embryos collected, number of viable embryos, degenerate embryos and unfertilized ova, were inserted in a mathematical model that included the effects of period, donor, donor category (nulliparous or primiparous) and superstimulatory treatment (FSH or FSH/eCG). Follicle number at Day 4 was included as a random effect in all count variables analyzed.

All statistical comparisons were done through means adjusted by least squares means method and results are presented as least square means $\pm$

standard error (SE) with the distributions in the original scales, because these can be easily interpreted.

3. RESULTS

There was no difference between experimental groups regarding number of follicles at the beginning of the superstimulatory protocol (Table 1). For this variable, primiparous cows had higher follicle population than nulliparous heifers ($P \leq 0.08$, Table 2).

Number of follicles at Day 4 influenced the superstimulatory responses ($P \leq 0.0005$; Day 7), the number of non-ovulated follicles after GnRH ($P \leq 0.08$, Day 10), the number of CL ($P \leq 0.06$, Day 15) and the total number of ova/embryos ($P \leq 0.10$) and viable embryos ($P \leq 0.04$).

The FSH/eCG group had a higher superstimulatory response (Day 7) than the FSH group (Table 1) and, no interaction was observed between superstimulatory treatments and animal classes.

The number of non-ovulated follicles 48 h after GnRH injection did not differ between groups (Table 1). However, the SOV response and CL number at the day of embryo collection (Day 15) was higher in the FSH/eCG group (Table 1). There was no interaction between superstimulatory treatment and animals classes. However, nulliparous heifers had greater CL number than primiparous cows (Table 2).

The number of total ova/embryos recovered did not differ between groups (Table 1), and nulliparous heifers presented average number of total ova/embryos similar to primiparous cows (Table 2). The number and percentage of viable embryos, however, was greater in the FSH/eCG group (Table 1). Nulliparous heifers showed a lower percentage of viable embryos than primiparous cows (Table 2).

Finally, number of degenerate embryos and unfertilized ova did not differ between treatments (Table 1). However, nulliparous heifers showed a greater number of degenerate embryos and unfertilized ova than primiparous cows (Table 2).

4. DISCUSSION

Sindhi donors had an average of 57.5 follicles at the beginning of superstimulatory protocol. It is known that the number of follicles at the beginning of superstimulation with gonadotropins is an indicative of the animal response to the SOV protocol (Barros and Nogueira, 2001; Ireland et al., 2007). For this reason, many studies on synchronization of follicle wave emergence prior to SOV were performed (Baruselli et al., 2006). In fact, the follicle population at the beginning of the SOV, has directly influenced the superstimulatory and SOV responses and embryo production in both treatments.

The FSH/eCG group had a higher superstimulatory response, possibly because the pFSH dose at the last day of the superstimulatory treatment

consists of only 10% of the total pFSH administered to the animal. Thus, replacement of pFSH by eCG at this moment would have the function to enhance follicle growth by the LH activity of eCG after deviation. In this study, although ovulation rate was not different between groups, the SOV response was higher in the FSH/eCG females. Corroborating these results, Barros et al. (2007), observed a greater superstimulatory response in Nellore cows treated with eCG replacing the last two doses of pFSH. However, ovulation rate and SOV response did not differ between groups. On the other hand, Sartori et al. (2009) did not find differences between the superstimulatory and SOV responses, and ovulation rate in Nellore heifers treated only with pFSH or with the association of pFSH and eCG.

The total number of ova/embryos collected did not differ between groups, but the average number of viable embryos and the percentage of viable embryos were higher in FSH/eCG group, which allows us to speculate that eCG can improve embryo quality in Sindhi donors.

In the study with Nellore cows, the total number of ova/embryos was higher in animals treated with eCG, but the number of viable embryos did not differ between treatments (Barros et al., 2007). Moreover, in another study with Nellore heifers, there was no difference between groups for the total number of ova/embryos and viable embryos (Sartori et al., 2009).

Cifuentes et al. (2009) superovulated Angus, Brahman and Senepol donors in a crossover design study. The cows were randomly allocated into two groups: FSH group: each female received 200-240 mg total pFSH, according to breed; and, eCG group: each female received 200-240 mg total pFSH,

according to breed, associated with 400 IU total eCG along with the last two doses of pFSH. There was no breed effect or breed and treatment interaction ($P > 0.05$). The CL number did not differ between groups (13.7 ± 0.9 vs. 12.4 ± 1.0 , respectively; $P > 0.10$). However, donors that received eCG had a greater mean number of ova/embryos collected (12.1 ± 1.0 vs. 10.6 ± 1.2 ; $P \leq 0.02$), more fertilized oocytes (9.5 ± 1.0 vs. 5.0 ± 0.6 ; $P \leq 0.0001$) and more number of viable embryos (8.9 ± 1.0 vs. 4.6 ± 0.6 ; $P \leq 0.0001$) than the ones treated only with pFSH. In another study, Brangus cows and heifers were randomly allocated into three groups. In the FSH group, each female received 200-320 mg pFSH, according to animal class in a traditional SOV protocol. In the FSH/eCG Day 6 group, each female received the first four doses of pFSH and at Day 6 cows/heifers were treated with 400 IU eCG in a single dose. In the FSH/eCG Day 7 group, each female received the first six doses of pFSH and the last two doses of pFSH were replaced by two doses of 200 IU eCG. The FSH/eCG Day 7 group had higher SOV response than FSH/eCG Day 6 and FSH groups (18.8 ± 1.3 ; 14.1 ± 1.5 and 14.2 ± 1.1 CL, respectively; $P \leq 0.02$). The total number of ova/embryos did not differ among groups, but the number of viable embryos and Grade 1 embryos was higher in the FSH/eCG Day 7 group (10.7 ± 1.2 , 8.0 ± 1.2 and 6.4 ± 1.1 ; $P \leq 0.04$) and (8.8 ± 1.1 , 6.4 ± 1.1 and 4.9 ± 1.1 , $P \leq 0.03$), respectively (Reano et al., 2009).

Curiously, primiparous females had a higher number of follicles at the beginning of the superstimulatory protocol (Day 4). However, nulliparous heifers had a higher CL number (Day 15) than primiparous cows. It is possible to speculate that nulliparous heifers have had some delayed ovulations. This fact

may be explained by the greater number of degenerate embryos and unfertilized ova in nulliparous compared to primiparous females.

5. CONCLUSION

In the present study, eCG had beneficial effects related to the superstimulatory and superovulatory responses and quality of the embryos, as confirmed by the greater percentage of viable embryos, becoming a new alternative to improve embryo production in Sindhi and, potentially, other breeds of cattle

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the financial support from FAPESP, EMBRAPA, Intervet Schering-Plough Animal Health and Sindi do ACS of Brazil.

REFERENCES

- Ahmad, N., Schrick, F.N., Butcher, R.I., Inskeep, E.K., 1995. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol. Reprod.* 52, 1129-1135.
- Barros, C.M., Barcelos, A.C.Z., Gouvêa, L.M., Meneghel, M., Barcelos, D.S., Barcelos, L.N. Trinca, L.A., 2007. Improvement of a superstimulatory protocol in Nellore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. *Reprod. Fertil. Develop.* 20, 152 (abstract).

- Barros, C.M., Nogueira, M.F.G., 2001. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 56, 1483-1496.
- Baruselli, P.S., Sá Filho, M.F., Martins, C.M., Nasser, L.F., Nogueira, M.F.G., Barros, C.M., Bó, G.A., 2006. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 65, 77-88.
- Castro Neto, A., Sanches, B.V., Binelli, M., Seneda, M.M., Perri, S.H., Garcia, J.F., 2005. Improvement in embryo recovery using uterine double flushing. *Theriogenology*, 63, 1249-1255.
- Cifuentes, E., Quevedo, L., Hoyos, A., Carballo, D., Piccardi, M., Bó, G.A., 2009. Efecto de la aplicacion de eCG en vacas donates de embriones superovuladas con Folltropin-V. In: Anais do 8^{vo} Simpósio Internacional de Reproduccion Animal, Cd, Córdoba, Argentina.
- Houghton, P.L., Lemenager, R.P., Hendrix, K.S., Moss, G.E., Stewart, T.S., 1990. Effects of body composition, pre- and postpartum energy intake and stage of production of energy utilization by beef cows. *J. Anim. Sci.* 68, 1447-1456.
- Ireland, J.J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F.J., Ireland, L.H., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum. Reprod.* 22(6), 1687-1695.
- Nogueira, M.F.G., Barros, C.M., 2003. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. *Acta Sci. Vet.* 31, 509 (abstract).
- Reano, I., Carballo, D., Tribullo, A., Tribullo, P., Balla, E., Bó, G.A., 2009. Efecto de la adicion de eCG a los tratamientos superovulatorios con Folltropin-V

en la producción de embriones en donantes de embriones. In: Anais do 8^{vo} Simpósio Internacional de Reproducción Animal, Cd, Córdoba, Argentina.

Sartori, R., Sartor-Bergfelt, R., Mertens, S.A., Guenther, J.N., Parrish, J.J., Wiltbank, M.C., 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. J. Dairy Sci. 85, 2803-2812.

Sartori, R., Guardieiro, M.M., Barros, C.M., Bastos, M.R., Machado, G.M., Leme, L.O., Rumpf, R., 2009. Lack of improvement on embryo production by the replacement of the last two doses of pFSH by eCG in superstimulated Nelore heifers. Reprod. Fertil. Develop. 21, 245-246 (abstract).

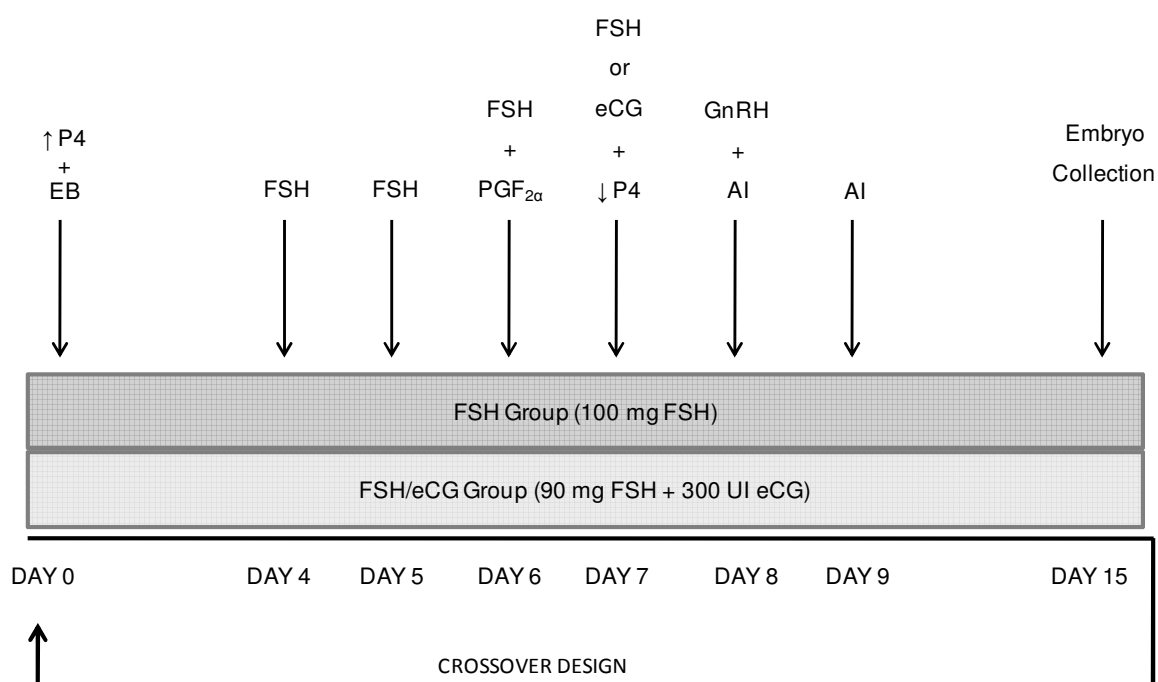


FIGURE 1. Schematic illustration of the superstimulation and superovulation protocol in Sindhi females.

TABLE 1. Results (least squares means $\pm$ SE) of the follicle population, superstimulatory and superovulatory responses and embryo production of Sindhi donors treated only with pFSH (FSH group) or with pFSH and eCG (FSH/eCG group).

	FSH (n = 24)	FSH/eCG (n = 24)	P
Number of follicles $\geq$ 3.0mm (Day 4)	57.9 $\pm$ 4.9	57.1 $\pm$ 4.9	0.84
Number of follicles $\geq$ 6.0mm (Day 7)	23.8 $\pm$ 2.6	33.8 $\pm$ 3.9	0.03
Number of non-ovulated follicles (Day 10)	8.3 $\pm$ 1.6	9.7 $\pm$ 2.0	0.44
Number of CL at embryo collection (Day 15)	10.8 $\pm$ 2.1	16.8 $\pm$ 2.9	0.10
Number of total ova/embryos collected	5.9 $\pm$ 1.4	8.2 $\pm$ 1.8	0.25
Number of transferable embryos (Grade 1, 2 and 3)	2.6 $\pm$ 0.7	5.8 $\pm$ 1.3	0.02
Number of degenerate embryos	1.6 $\pm$ 0.6	1.2 $\pm$ 0.5	0.56
Number of unfertilized ova	0.8 $\pm$ 0.3	0.6 $\pm$ 0.3	0.58
% of viable embryos	53.2 $\pm$ 9.7	75.6 $\pm$ 5.7	0.05
% of degenerate embryos	29.5 $\pm$ 6.7	14.8 $\pm$ 4.7	0.07

TABLE 2. Results (least squares means $\pm$ SE) of the follicle population, superstimulatory and superovulatory responses and embryo production of nulliparous and primiparous Sindhi donors.

	Nulliparous (n = 14)	Primiparous (n = 34)	P
Number of follicles $\geq$ 3.0mm (Day 4)	49.0 $\pm$ 6.4	64.0 $\pm$ 5.1	0.08
Number of follicles $\geq$ 6.0mm (Day 7)	29.2 $\pm$ 4.0	27.5 $\pm$ 2.7	0.73
Number of non-ovulated follicles (Day 10)	8.5 $\pm$ 2.4	9.5 $\pm$ 1.7	0.76
Number of CL at embryo collection (Day 15)	19.0 $\pm$ 3.5	9.4 $\pm$ 1.6	0.01
Number of total ova/embryos collected	9.0 $\pm$ 2.3	5.2 $\pm$ 1.2	0.12
Number of transferable embryos (Grade 1, 2 and 3)	4.3 $\pm$ 1.1	3.5 $\pm$ 0.6	0.50
Number of degenerate embryos	2.4 $\pm$ 1.1	0.8 $\pm$ 0.3	0.10
Number of unfertilized ova	1.2 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.2	0.08
% of viable embryos	52.3 $\pm$ 9.6	73.6 $\pm$ 6.8	0.07

Instruções para a submissão de artigos na revista **Animal Reproduction Science**.



Introduction

Types of Paper

1. Original Research Papers (Regular Papers)
2. Review Articles
3. Book Reviews

Original Research Papers should report the results of research that comprises one or a series of experiments. The paper should contribute to increasing our understanding of the biology and/or manipulation of reproduction in animals. The material should not have been previously published elsewhere, except in a preliminary form.

Review Articles should cover subjects falling within the scope of the journal which are of active current interest. They may be submitted or invited. Invited reviews will normally be solicited by the Review's Editor, but suggestions for appropriate review topics may be sent to:

K.L. Macmillan University of Melbourne Veterinary Clinical Centre 250 Princess Highway VIC 3030 Werribee, Australia k.macmillan@unimelb.edu.au

Book Reviews will be included in the journal on a range of relevant books which are not more than two years old. Book Reviews will be solicited by the Book Review Editor. Unsolicited reviews will not usually be accepted, but suggestions for appropriate books for review may be sent to the Book Review Editor: N. Prathalingam Newcastle Fertility Centre International Centre for LifeCentral Parkway Newcastle-Upon-Tyne, NE1 3BZ, United Kingdom

Contact details for submission

Authors should send queries concerning the submission process or journal procedures to AuthorSupport@elsevier.com. Authors can check the status of their manuscript within the review procedure using Elsevier Editorial System.

Page charges This journal has no page charges.



Before You Begin

Ethics in Publishing

For information on Ethics in Publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki)* for experiments involving humans <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>; *EC Directive 86/609/EEC for animal experiments*

http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article. Unnecessary cruelty in animal experimentation is not acceptable to the Editors of *Animal Reproduction Science*.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and

interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement. Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/languageediting> or our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/anirep/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.



Preparation

Article structure

Manuscripts should have numbered lines with wide margins and double spacing throughout, i.e. also for abstracts, footnotes and references. Every page of the manuscript, including the title page, references, tables, etc., should be numbered. However, in the text no reference should be made to page numbers; if necessary, one may refer to sections. Avoid excessive usage of italics to emphasize part of the text.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature*.

All biotica (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.

All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUB: Biochemical Nomenclature and Related Documents: <http://www.chem.qmw.ac.uk/iubmb/> for further information.

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as "graphics" or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

 <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

 **You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.**

☞ *Formats*

☞ Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please "save as" or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

☞ EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as "graphics".

☞ TIFF: color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

☞ TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

☞ TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

☞ DOC, XLS or PPT: If your electronic artwork is created in any of these Microsoft Office applications please supply "as is".

☞ **Please do not:**

☞ • Supply embedded graphics in your wordprocessor (spreadsheet,

☞ presentation) document;

☞ • Supply files that are optimised for screen use (like GIF, BMP, PICT,

☞ WPG); the resolution is too low;

☞ • Supply files that are too low in resolution;

☞ • Submit graphics that are disproportionately large for the content.

☞ ***Color artwork***

☞ Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see

☞ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

- ☞ Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

☞ **Tables**

- ☞ Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

☞ **Web references**

- ☞ As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

☞ **Reference style**

- ☞ *Text:* All citations in the text should refer to:

- ☞ 1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
- ☞ 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
- ☞ 3. *Three or more authors:* first author's name followed by "et al." and the year of publication.

- ☞ Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

- ☞ Examples: "as demonstrated (Allan, 1996a, 1996b, 1999; Allan and Jones, 1995). Kramer et al. (2000) have recently shown"

- ☞ *List:* References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters "a", "b", "c", etc., placed after the year of publication.

- ☞ *Examples:*

✎ Reference to a journal publication:

✎ Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2000. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

✎ Reference to a book:

✎ Strunk Jr., W., White, E.B., 1979. *The Elements of Style*, third ed. Macmillan, New York.

✎ Reference to a chapter in an edited book:

✎ Mettam, G.R., Adams, L.B., 1999. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

✎ **Video data**

✎ Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a maximum size of 30 MB and running time of 5 minutes. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: ✎ <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at ✎ <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

✎ **Supplementary data**

✎ Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary

files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

 It is hoped that this list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal's Editor for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

 One Author designated as corresponding Author:

 • E-mail address

 • Full postal address

 • Telephone and fax numbers

 All necessary files have been uploaded

 • Keywords

 • All figure captions

 • All tables (including title, description, footnotes)

 • Further considerations

 • Manuscript has been "spellchecked" and "grammar-checked"

 • References are in the correct format for this journal

 • All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

 • Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

 • Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print

- If only color on the Web is required, black and white versions of the figures are also supplied for printing purposes

- For any further information please visit our customer support site at <http://epsupport.elsevier.com>.



After Acceptance

Use of the Digital Object Identifier

- The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

doi:10.1016/j.physletb.2003.10.071

- When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, they are guaranteed never to change.

Proofs

- One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/acrrsystemreqs.html#70win>.
- If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan the pages and e-mail, or by post.

Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Therefore, it is important to ensure that all of your corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

-  The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

Author Inquiries

-  For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage. You can track accepted articles at  <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher.

13. ANEXO II

EFEITO DA APLICAÇÃO DA eCG APÓS A TETF EM RECEPTORAS NELORE OU CRUZADAS

Estudos recentes que utilizaram a aplicação de eCG após a IATF, em vacas leiteiras e de corte, observaram efeito positivo sobre as taxas de concepção. Bartolome (2009) mostraram aumento na taxa de concepção após IATF em vacas leiteiras com o uso de uma aplicação de 400 UI de eCG, 22 dias após inseminação em relação ao grupo controle (50,0% vs 33,3%, respectivamente). Similarmente, Diaz *et al.* (2009), num experimento com 212 vacas holandesas, aplicaram 400 UI de eCG, no dia 22, em parte dos animais que não haviam retornado em estro ($n = 183$) após IATF (Grupo eCG). O restante dos animais não recebeu nenhum tratamento e constituiu o grupo Controle. O Grupo eCG obteve maior porcentagem de prenhez (49,3%; $n = 69$), aos 30 dias, do que o grupo Controle (19,3%; $n = 114$; $P = 0,0001$). Em outro experimento, 127 vacas cruzadas (Zebu x Bonsmara) lactantes de segundo serviço, receberam 400 UI de eCG, 14 dias após a IATF e, 133 vacas com as mesmas características não receberam nenhum tratamento. A taxa de concepção, aos 30 dias, foi maior nos animais que receberam eCG (47,2%) do que nos animais controles (30,8%; $P = 0,02$; CUTAIA *et al.*, 2009).

Baseando-se nestes resultados, objetivou-se com o presente estudo avaliar a influência da eCG administrada 7 dias após a transferência de embriões em tempo fixo (TETF), por meio de taxas de concepção aos 30 e 60 dias.

Material e Métodos

Foram submetidas a um protocolo de sincronização de ovulação 470 receptoras da raça Nelore e cruzadas. Todas as receptoras foram submetidas à avaliação ginecológica, com o auxílio de imagens ultrassonográficas. Das 470 receptoras selecionadas e submetidas ao protocolo de sincronização, 430 apresentavam CL ao exame ultrassonográfico.

Foi utilizado o seguinte protocolo de sincronização da ovulação nas receptoras: No D_0 foi aplicado 2 mg de BE (Gonadiol) e 0,075 mg de $PGF_{2\alpha}$

(Preloban) juntamente com a inserção do dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona (DIB). No D₈, o dispositivo intravaginal foi retirado e foram aplicadas injeções i.m. de 0,075 mg de PGF_{2α} (Preloban), 300 UI de eCG (Novormon) e 0,6 mg de ECP, como agente indutor da ovulação.

Embriões frescos, vitrificados e congelados foram transferidos nos dias 16, 17 e 18 do protocolo nas 297 receptoras consideradas aptas a receberem embrião (corpo lúteo >16 mm). Sete dias após a transferência, foram aplicados 400 UI de eCG (Novormon) em 127 animais e 170 serviram como controle, não sendo tratadas nesse dia. O diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 e 60 dias após ovulação (Figura 1).

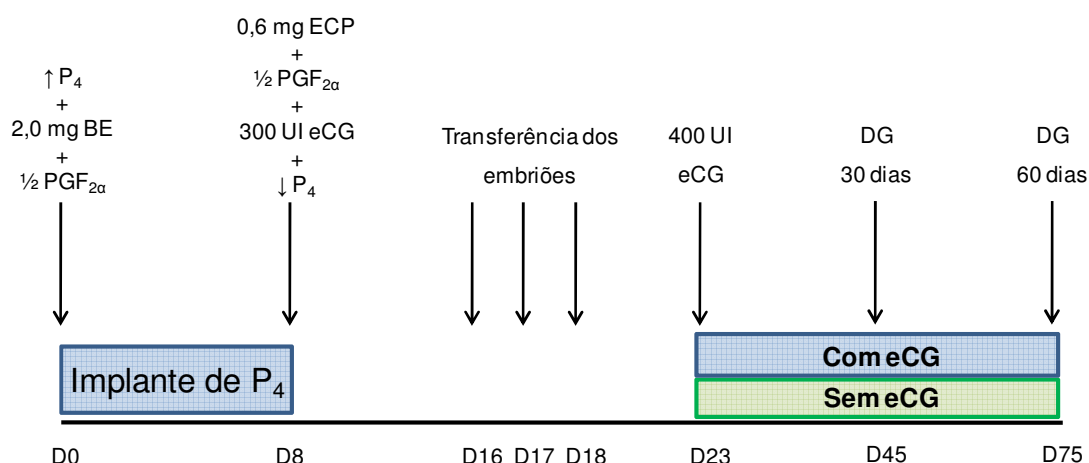


FIGURA 1. Protocolo das receptoras de embriões da raça Nelore, com e sem a aplicação de eCG, 7 dias após a ovulação.

Análise Estatística

Para a avaliação estatística utilizou-se o procedimento GLIMMIX (Análise de Variância) do programa SAS, sob a metodologia dos modelos lineares generalizados, considerando para variáveis de proporção uma distribuição binomial, com função de ligação logit, de acordo com Nelder & Wedderburn (1972).

As comparações estatísticas foram realizadas sobre as médias ajustadas pelo método dos quadrados mínimos com uma aproximação do teste qui-quadrado e estão apresentadas na forma de médias ± erros-padrão (EP) com

as distribuições nas escalas originais, pois estas podem ser facilmente interpretadas.

Resultados e Discussão

Não houve incremento das taxas de concepção aos 30 e 60 dias, nas receptoras que receberam 400 UI de eCG sete dias após a transferência dos embriões (Tabela 1).

TABELA 1. Taxa de concepção de receptoras (%; média dos quadrados mínimos $\pm$ EP) que receberam a aplicação de eCG (400 e 0 UI), sete dias após a transferência de embriões produzidos *in vivo* em doadoras da raça Nelore, transferidos a fresco ou após serem congelados ou vitrificados, aos 30 e 60 dias.

Receptoras (n)	Taxa de concepção (%), aos 30 dias	Taxa de concepção (%), aos 60 dias
Grupo com eCG (127)	35,9 $\pm$ 5,5	27,6 $\pm$ 4,9
Grupo sem eCG (170)	33,5 $\pm$ 4,4	26,7 $\pm$ 3,9

P > 0,10 na mesma coluna.

Os resultados do presente estudo não corroboraram estudos realizados com vacas leiteiras e de corte inseminadas (BARTOLOME, 2009; CUTAIA *et al.*, 2009; DIAZ *et al.*, 2009). No entanto, faz-se necessária a realização de novas pesquisas acerca da fisiologia e mecanismos envolvidos na atividade da eCG pós IA e, particularmente, pós TE para que novos experimentos sejam delineados baseados numa hipótese bem fundamentada.

Agradecimentos: À Intervet Schering-Plough Animal Health e à Syntex pelos hormônios.

Bibliografia

- BARTOLOME, J.A.; Mortalidad embrionaria y fetal temprana de origen no infeccioso en vacas lecheras. In: VIII SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCION ANIMAL- IRAC- 2009.
- CUTAIA, L.; RAMOS, M.; CHESTA, P.; BÓ, G.A. Efecto de la aplicación de eCG 14 días después de la IATF en vacas de carne con cría tratadas con dispositivos con progesterona. In: *Anais do 8^{vo} Simpósio Internacional de Reproduccion Animal*, Córdoba, Argentina, 2009 (CD-ROM).
- DIAZ, T.; SOUTON, M., CUTAIA, L. Efecto de la aplicación de eCG al día 22 pos IATF sobre las tasas de preñez en vacas de leche tratadas con dispositivos con progesterona. In: *Anais do 8^{vo} Simpósio Internacional de Reproduccion Animal*, Córdoba, Argentina, 2009 (CD-ROM).
- NELDER, J.; WEDDERBURN, R.W. Generalize linear models. *Journal Research Statistic Science*, v.135, p.370-384, 1972.