

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal

**TAXA DE GESTAÇÃO E MORTALIDADE EMBRIONÁRIA EM RECEPTORAS
DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*, APÓS SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO
COM DIFERENTES PROTOCOLOS HORMONAIIS**

LEANDRO DE ARAUJO SILVA

Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2010

Leandro de Araujo Silva

**TAXA DE GESTAÇÃO E MORTALIDADE EMBRIONÁRIA EM RECEPTORAS
DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*, APÓS SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO
COM DIFERENTES PROTOCOLOS HORMONAIIS**

Dissertação apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito
parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência
Animal.

Área de Concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Álan Maia Borges

Co-orientador: Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2010**

S586t

Silva, Leandro de Araújo, 1977-

Taxa de gestação e mortalidade embrionária em receptoras de embriões produzidos *in vitro*, após sincronização do estro com diferentes protocolos hormonais / Leandro de Araújo Silva - 2010.
64 p. : il.

Orientador: Alan Maia Borges

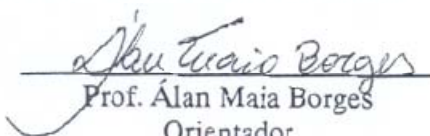
Co-orientador: Luiz Sérgio de Almeida Camargo

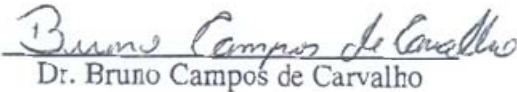
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. Novilha - Reprodução - Teses. 2. Novilha - Transferência de embriões - Teses. 3. Estro - Teses. 4. Prenhez - Teses. I. Borges, Alan Maia. II. Camargo, Luiz Sérgio de Almeida III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

Dissertação defendida e aprovada em 25 de fevereiro de 2010, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:


Prof. Alan Maia Borges
Orientador


Dr. Bruno Campos de Carvalho


Profa. Sandra Gesteira Coelho

AGRADECIMENTOS

A toda minha família pelo apoio e incentivo, sem a sua ajuda esse trabalho sequer seria iniciado.

À Escola de Veterinária da UFMG por possibilitar a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Alan Maia Borges, pelo apoio, dedicação e amizade.

Ao pesquisador Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, pela co-orientação.

À Profa. Sandra Gesteira Coelho, pelas sugestões que enriqueceram muito este trabalho.

Ao Dr. Nikolas Elias, do laboratório Cenatte-Biotech de Uberaba, pela disponibilização dos dados para realização deste trabalho.

A toda equipe do Cenatte embriões de Pedro Leopoldo, nas pessoas do Dr. Múcio Teixeira Alvim e Dr. Sérgio Bastos, pela compreensão e apoio para realização deste trabalho.

Ao pesquisador Dr. Bruno Campos de Carvalho, da Epamig, pelo total apoio na realização das análises estatísticas.

A todos os colegas da pós-graduação e estagiários do setor de reprodução pela ajuda e amizade.

Às funcionárias do Colegiado de Pós-graduação e do Departamento de Clínica e Cirurgia.

À Luciana pelo apoio e compreensão nos momentos de ausência.

SUMÁRIO

	LISTA DE TABELAS	8
	LISTA DE FIGURAS	8
	RESUMO	9
	ABSTRACT	10
1	Introdução	11
2	Revisão de Literatura	12
2.1	Importância e seleção da receptora	12
2.2	Manejo sanitário e nutricional das receptoras de embrião	13
2.3	Dinâmica folicular ovariana	14
2.4	Formação do corpo lúteo	16
2.5	Manifestação de estro	17
2.6	Sincronização de estros com prostaglandina F ₂ α	18
2.7	Sincronização do estro com protocolo a base de progesterona e estrógeno	20
2.8	Fatores que influenciam o índice de gestação em programas de transferência de embrião	23
3	Material e Métodos	26
3.1	Local de execução do experimento	26
3.2	Animais e manejo	27
3.3	Indução e sincronização de estros	27
3.4	Avaliação do corpo lúteo e transferência de embriões	28
3.5	Análises Estatísticas	29
4	Resultados e Discussão	30
4.1	Intervalo para manifestação do estro em receptoras de embrião de acordo com o tratamento hormonal	31
4.2	Taxas de aproveitamento de receptoras de embrião submetidas a diferentes protocolos hormonais para indução do estro	33
4.3	Influência do tratamento de sincronização, estágio de desenvolvimento embrionário, sincronia entre o embrião e o dia do estro da receptora e época do ano sobre os índices de gestação aos 30 e 60 dias e mortalidade embrionária entre 30 e 60 dias de gestação	36
4.4	Índice de gestação aos 30 e 60 dias após a transferência de embriões produzidos <i>in vitro</i> para as receptoras manifestando estro natural ou induzido com hormônios	38
4.5	Índice de gestação aos 30 e 60 dias após a transferência, segundo o estágio de desenvolvimento dos embriões produzidos <i>in vitro</i>	40
4.6	Índice de gestação aos 30 e 60 dias em receptoras inovuladas em diferentes dias após a manifestação do estro	42
4.7	Mortalidade embrionária segundo o tipo de sincronização de estros, estágio de desenvolvimento embrionário, sincronia entre a receptora e o embrião, e período do ano	44

4.8	Mortalidade embrionária entre 30 e 60 dias de gestação segundo o tipo de sincronização de estros, estágio de desenvolvimento embrionário, sincronia entre a receptora e o embrião, e período do ano	46
5	Conclusões	48
6	Referências Bibliográficas	48
7	Anexos	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição do estro em receptoras de embrião após a sincronização com PGF ₂ α ou protocolos hormonais a base de implantes de progesterona	30
Tabela 2	Taxa de aproveitamento para a transferência de embriões de receptoras que manifestaram estro natural ou após tratamentos hormonais com prostaglandina F ₂ α ou progesterona	33
Tabela 3	Análise de regressão logística sobre a influência das variáveis testadas sobre o índice de gestação e mortalidade embrionária	36
Tabela 4	Índices de gestação aos 30 e 60 dias em função do tipo de sincronização do estro, do estágio de desenvolvimento embrionário, do dia do estro da receptora e da época do ano em que a TE foi realizada	37
Tabela 5	Índices de mortalidade embrionária entre 30 e 60 dias em função do tipo de sincronização do estro, do estágio de desenvolvimento embrionário, do dia do estro da receptora e da época do ano em que a TE foi realizada	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Número de animais observados em estro, segundo os dias após a aplicação de prostaglandina F ₂ α ou retirada do implante de P4	31
Figura 2	Valores prováveis preditos para o índice de gestação aos 30 e 60 dias obtidos pela regressão logística considerando apenas o efeito do tratamento	38
Figura 3	Valores prováveis preditos para o índice de gestação aos 30 e 60 dias, obtidos pela regressão logística considerando apenas o efeito do estágio de desenvolvimento embrionário	41
Figura 4	Valores prováveis preditos para o índice de gestação aos 30 e 60 dias, obtidos pela regressão logística considerando apenas o efeito do dia da manifestação do estro	43
Figura 5	Valores prováveis preditos para o índice de gestação aos 30 e 60 dias, obtidos pela regressão logística considerando apenas o efeito da época do ano em que a TE foi realizada	45

RESUMO

Estudou-se a influência de diferentes métodos de sincronização sobre a taxa de aproveitamento, de gestação e mortalidade embrionária de receptoras transferidas com embriões produzidos *in vitro*. Foram avaliadas 3507 transferências, no período de dois anos (outubro de 2007 a junho de 2009), em receptoras que apresentaram estro natural ou sincronizado com PGF₂ α , ou implantes intravaginais de progesterona. Avaliou-se também os efeitos do estágio de desenvolvimento embrionário, a sincronia entre o estro da receptora e o embrião e o período do ano em que a transferência foi realizada. A taxa de aproveitamento para transferência diferiu entre os tratamentos utilizados ($p < 0,05$), sendo de 80,5% para o estro natural, 88,1% para a PGF₂ α , e 70,8% para o implante de progesterona. As taxas de gestação aos 60 dias foram 42,0%, 45,6% e 44,3%, respectivamente, não diferindo ($P > 0,05$) entre tratamentos. O estágio de desenvolvimento embrionário influenciou o índice de gestação ($P < 0,05$), sendo de 32,7%, 44,0% e 50,1% para blastocistos, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos, respectivamente. A sincronia entre embrião e o estro da receptora não influenciou o índice de gestação e os resultados foram 37,4%, 45,1%, 46,5%, 42,7%, 33,8% para receptoras que manifestaram estro seis, sete, oito, nove e dez dias antes da data da transferência, respectivamente. O período do ano teve influência sobre o índice de gestação, com percentuais de 42,0% e 44,6% para o período chuvoso e seco, respectivamente. A mortalidade embrionária média foi de 6,4% e não foi influenciada de forma independente pelas variáveis analisadas. Como a sincronia entre o embrião e o dia do estro da receptora não afetou o índice de gestação, a rotina nas centrais de transferência pode ser simplificada reduzindo o manejo dos animais e o tempo durante a inovulação dos embriões, o que possibilita melhores resultados. Para a análise dos dados foi utilizado o modelo de regressão logística.

Palavras chave: embriões produzidos *in vitro*; época do ano; receptoras; sincronização de estro.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the influence of different factors on selection of recipients, pregnancy rates and embryonic mortality following transfer of *in vitro* produced embryos. It was evaluated 3,507 embryo transfers for recipients displaying natural or synchronized estrus using PGF₂α or progesterone releasing intravaginal devices. Also, it was evaluated the stage of embryonic development, the synchronization between embryo stage and day of estrus of the recipient and the seasons of the year. The rate of selected recipients differed among treatments (p<0.05), 80.5%, 88.1% and 70.8% for natural, PGF₂α and progesterone induced estrus, respectively. The pregnancy rates at the day 60 after transfer did not differ (P>0.05) among treatments: 42.0%, 45.6% and 44.3%, respectively. The pregnancy rates differ (P<0.05) among embryonic development stage, 32.7% for blastocyst, 44.0% for expanded blastocyst and 50.1% for hatched blastocyst. The synchronization between embryo and recipient did not influence pregnancy rates (37.4%, 45.1%, 46.5%, 42.7%, 33.8% for recipients at days 6, 7, 8, 9 and 10 post-estrus, respectively). The season of the year influenced (P<0.05) pregnancy rates (42.0% for summer and 44.6% for winter time, respectively). The average of embryo loss was of 6.4% and did not differ between the analyzed variables.

Keywords: estrus synchronization; *in vitro* produced embryos; recipients; season of the year.

1. INTRODUÇÃO

Um dos principais desafios em relação à produção mundial de alimentos é atender a crescente demanda gerada pelo crescimento populacional. Nesse contexto, o uso de biotecnologias da reprodução animal tem papel fundamental não só no aspecto de multiplicação dos rebanhos, mas destaca-se como ferramenta para acelerar o melhoramento genético, promovendo rápida difusão de material genético superior.

Dentre as várias tecnologias disponíveis, a produção *in vitro* de embriões (PIV) tem avançado significativamente nos últimos 20 anos. O grande interesse nessa biotecnologia é explicado pelo fato de que enquanto na monta natural uma fêmea é capaz de produzir, aproximadamente, 13 bezerros durante sua vida produtiva e, na transferência de embriões (TE) tradicional (*in vivo*), em torno de 12 bezerros/ano, na PIV a doadora pode chegar a produzir 36 produtos/ano (Rumpf, 2007). A PIV vem sendo cada vez mais incorporada nos sistemas de produção, pois além da multiplicação animal, permite a utilização de bezerras pré-púberes, vacas no início de gestação, vacas com problemas de fertilidade adquiridos e vacas com idade avançada.

Os avanços obtidos na punção folicular guiada por ultrassom permitiram a obtenção de ovócitos de animais vivos, de alto valor genético, com boas características morfológicas e grande capacidade de desenvolvimento, sendo este o primeiro passo para o sucesso na PIV. Paralelamente, os estudos relacionados à maturação de ovócitos em

laboratório, como a adição de hormônios no meio de maturação, aumentaram o número de embriões obtidos a partir de ovócitos imaturos (Coelho et al., 2002). As características fisiológicas das raças zebuínas, como número de ondas de crescimento folicular, momento da divergência, tamanho dos folículos e perfil de recrutamento folicular, que determinam grande variação na resposta ao tratamento superovulatório, possibilitam maior número de folículos disponíveis para aspiração (Viana et al.; 2004). Todos esses fatores, associados às características de mercado, como destaque do Brasil no agronegócio da carne e o alto valor dos animais zebuínos de elite, fizeram com que a PIV superasse a TE convencional e levou o Brasil a se tornar o maior produtor mundial de embriões bovinos produzidos *in vitro*. No ano de 2006 foram comunicadas 266.594 transferências no Brasil sendo que 244.715 (91,81%) foram de embriões produzidos *in vitro* (Viana e Camargo, 2007). No ano de 2008, considerando apenas as raças zebuínas, foram transferidos 222.257 embriões, sendo 199.153 (89,60%) produzidos *in vitro* (ABCZ, 2009).

O aumento no número de embriões produzidos a partir da PIV tem gerado maior demanda por receptoras para realização de transferência a fresco, uma vez que os resultados obtidos com os protocolos atuais de criopreservação dos embriões produzidos *in vitro* apresentam grande variação nos índices de gestação. Assim, a disponibilidade de fêmeas receptoras aptas tem sido o principal limitante para a implantação da TE em larga escala. Outro fator relevante é que essa categoria animal representa o maior percentual dos custos de um programa

de TE, principalmente relacionado com seus custos de aquisição, alimentação, controle sanitário e sincronização de estros.

O fator limitante imposto pelas receptoras é agravado uma vez que esses animais, além de manifestarem o estro, devem estar em sincronia com a data de aspiração folicular da fêmea doadora e, também, que apresentem condições uterinas e ovarianas adequadas, apesar da avaliação subjetiva, para levar a gestação a termo. Portanto, para se obter resultados satisfatórios na TE e reduzir os gastos com as receptoras, deve-se buscar estratégias para promover o incremento na taxa de aproveitamento dessa categoria animal.

Dentre as ferramentas disponíveis para aumentar o número de receptoras disponíveis para TE, a sincronização do estro e da ovulação tem se mostrado a mais eficaz, sendo a aplicação de análogos de prostaglandina ($PGF_2\alpha$) e uso de protocolos hormonais com implantes de progesterona os métodos mais utilizados. A aplicação de $PGF_2\alpha$, por apresentar baixo custo, é amplamente utilizada, mas apresenta algumas limitações como a necessidade dos animais estarem em atividade ovariana cíclica, a presença de corpo lúteo em fase responsiva à droga, a variabilidade entre aplicação da droga e o início do estro, e falhas no manejo de detecção de estro. Por outro lado, os protocolos à base de progesterona (P4), utilizados para controlar o crescimento folicular e o momento da ovulação, apresentam alto custo, porém, permitem a utilização de animais em anestro, promovem maior sincronização entre a doadora e a receptora, além de

possibilitar a TE em tempo fixo, sem a observação de estro.

Considerando a importância e o custo das receptoras nos programas de TE, este trabalho teve como objetivos avaliar os principais métodos de sincronização de estros utilizados, comparando-os com o estro natural em relação à: manifestação de estro; intervalo e sincronia da resposta em relação ao dia da aplicação dos hormônios; taxa de aproveitamento das receptoras; índice de gestação aos 30 e 60 dias; e o índice de perda embrionária. Também foi avaliada a sincronia entre o grau de desenvolvimento embrionário e o dia do estro da receptora, para cada tipo de sincronização, e sua influência no índice de gestação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância e seleção da receptora

O primeiro e, talvez, o mais importante passo para a obtenção de melhores índices de gestação na TE é a seleção de receptoras de embrião, saudáveis e que não apresente problemas reprodutivos. O animal deve apresentar boa condição geral, sem lesões nos cascos e no úbere, e trato reprodutivo com desenvolvimento e morfologia normais. A manutenção e a aquisição de receptoras representam grande parte dos custos e influencia diretamente o número de produtos gerados em programas de TE (Beltrame et al., 2007).

A escolha do genótipo da receptora deve ser baseada na disponibilidade de mercado, nos custos de aquisição, adaptação ao ambiente local com relação

à oferta de alimento, sua resistência às doenças, além da eficiência reprodutiva. Além disso, deve-se ressaltar sua habilidade em produzir leite suficiente para alimentar a cria e, também, seu valor de mercado quando do desmame do bezerro. (Guimarães et al., 2002). Nesse sentido, as fêmeas mestiças obtidas pelo cruzamento da raça Holandês com animais zebuínos (Nelore, Gir e Guzerá) são as mais indicadas, pois possuem características morfológicas e fisiológicas adequadas ao ambiente tropical, boa pigmentação da pele e capacidade termorreguladora, desenvolvimento muscular adequado, boa conversão alimentar e eficiência reprodutiva (Facó et al., 2005).

Devido ao alto valor dos produtos, na maioria dos casos, as receptoras são manejadas de forma intensiva após o parto e, portanto, os animais de temperamento calmo devem ser preferidos, sempre que possível. Outro fator que deve ser observado é o estabelecimento de parâmetros mínimos para o diâmetro pélvico durante a seleção das novilhas, pois, como os produtos oriundos da PIV têm peso ao nascer acima da média, e a incompatibilidade feto-pélvica é a principal causa de distocias, a ocorrência desse problema tem sido frequentemente encontrado nos rebanhos de receptoras, determinando perdas econômicas consideráveis, tais como morte de novilhas e de seus produtos. Para a avaliação da área pélvica dos animais, as medidas internas mais utilizadas são: biilíaco superior, biilíaco inferior e sacropubiana. Para novilhas mestiças esses parâmetros são: 12,90 cm, 11,86 cm e 16,05 cm respectivamente (Barreto et al., 2004).

A categoria animal é um fator de grande impacto para a eficiência reprodutiva nos processos de TE. Com relação à categoria animal, deve-se buscar a utilização de novilhas ao invés de vacas, uma vez que esses animais têm menor probabilidade de serem submetidos às modificações hormonais e metabólicas do pós-parto e da lactação, tal como ocorre com vacas, principalmente as primíparas.

As novilhas são menos propensas a apresentarem problemas reprodutivos, e o útero virgem apresenta melhor ambiente para o desenvolvimento embrionário. O tamanho do útero das novilhas, por ser menor que o das vacas, facilita a manipulação no momento da inovulação reduzindo lesões do endométrio e, conseqüentemente, a liberação precoce de $PGF_2\alpha$ (Broadbent et al., 1991). Por outro lado, Hasler (2001) sugere que a diferença encontrada nos índices de gestação entre vacas e novilhas ocorre somente em animais com genética para alta produção de leite, fato esse que seria o responsável por menores índices nas vacas, uma vez que para raças de corte não existe diferença quando se compara vacas com novilhas, ou ainda melhores índices de gestação são obtidos quando se utiliza vacas (66%) em relação às novilhas (43%) (Looney et al.; 2006).

2.2 Manejo sanitário e nutricional das receptoras de embrião

A maioria dos problemas de saúde vai apresentar alguma interferência nos processos reprodutivos, porém, os animais que são mantidos em plano nutricional adequado, bom ambiente físico e manejados com baixo grau de

estresse, têm menor probabilidade de sofrerem os efeitos de doenças. As receptoras que apresentarem sinais de alterações ou patologias não devem ser utilizadas, mas, como no rebanho a maior parte dos animais apresenta a forma subclínica das doenças, a utilização de programas eficientes de prevenção tem demonstrado resultados satisfatórios (Jones e Lamb, 2008).

Todos os tratamentos devem ser realizados antes das receptoras entrarem no programa de sincronização do estro, pois, após a TE, as novilhas não devem ser submetidas a qualquer tipo de manejo ou aplicação de medicamentos até completarem 60 dias de gestação, devido ao alto risco de morte embrionária nessa fase (Dobson et al., 2001). Os animais devem passar por controle de ecto e endoparasitas, conforme o calendário sanitário adotado na propriedade. O controle de brucelose e tuberculose deve ser realizado de acordo com o Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (Manual Técnico do PNCEBT, 2001).

No Brasil, a leptospirose, rinotraqueíte infecciosa (IBR) e a diarreia viral bovina (BVD) têm distribuição endêmica nos rebanhos e provocam mortalidade embrionária, mumificação fetal, abortos, infecção fetal e nascimento de bezerros fracos (Flores et al., 2005). Para o controle da leptospirose é realizado tratamento de todas as fêmeas com 50 mg/kg de estreptomicina, em dose única, e vacinação semestral (Mineiro et al., 2007). O controle da IBR e BVD é realizado com vacinação anual, sendo que no caso de primo vacinação

recomenda-se a utilização de duas doses intervaladas de 21 dias (Lima et al., 2004).

A nutrição é o ponto fundamental no manejo de receptoras e reflete diretamente seu desempenho reprodutivo. A ingestão insuficiente de energia, proteínas, vitaminas, minerais e água estão associadas com baixos índices reprodutivos. Este fato ocorre devido à prioridade metabólica na utilização dos nutrientes, sendo que somente quando as exigências de metabolismo basal, atividade física, crescimento e reservas de energia são atendidas é que se inicia a atividade ovariana e estabelecimento de nova gestação (Short et al., 1990).

Um dos métodos mais eficientes para monitorar o padrão nutricional do rebanho é a avaliação do escore de condição corporal (ECC). Essa avaliação é facilmente executada por pessoas treinadas e apresenta alta correlação com índices reprodutivos. Os animais são classificados em escalas de um a nove (1-9) ou um a cinco (1-5), de acordo com a relação de tecidos gordurosos e não gordurosos na carcaça. Para novilhas mestiças utilizadas como receptoras, assim como para gado de corte, o ideal é manter os animais com ECC superior a cinco durante o início da puberdade até o momento do parto, pois o tamanho do bezerro, sua viabilidade e a produção de leite da receptora dependem de sua condição corporal no final de gestação e ao parto (Lalman et al., 1997)

2.3 Dinâmica folicular ovariana

A dinâmica folicular em bovinos é caracterizada por sucessivas ondas de

crescimento e regressão foliculares durante o ciclo estral, sendo encontrado, normalmente, de uma a quatro ondas (Ginther et al., 1996), com predominância de duas (Borges et al., 2003) ou três por ciclo estral (Viana et al., 2000) de zebuínos. O número de ondas esta relacionado com a duração da fase luteínica do ciclo estral. No início de cada onda de crescimento, um grupo de pequenos folículos (dois a quatro milímetros de diâmetro), previamente estimulado pelo hormônio folículo estimulante (FSH), é recrutado e inicia o desenvolvimento durante, aproximadamente, três dias (Lucy et al., 1992).

Após o recrutamento os folículos apresentam diâmetro de seis a nove milímetros e, neste momento, ocorre o processo de seleção, onde apenas um folículo do grupo recrutado será selecionado e continuará seu desenvolvimento, enquanto os demais sofrerão processo de regressão ou atresia. O folículo selecionado atinge diâmetro superior a 10mm e estabelece a fase de dominância (Beg e Ginther, 2006). O mecanismo através do qual o folículo torna-se dominante não está totalmente esclarecido, porém o surgimento de receptores de hormônio luteinizante (LH) nas células da granulosa participa ativamente deste processo (Burantini Jr., 2007). O folículo dominante suprime ativamente o crescimento dos folículos subordinados através da secreção de estradiol e inibina, que vão reduzir a concentração plasmática de FSH. O surgimento de receptores de LH nas células da granulosa possibilita ao folículo dominante continuar o seu desenvolvimento em baixas

concentrações de FSH, uma vez que o LH atua promovendo o crescimento final e a maturação do folículo dominante. (Fortune, 1994).

O folículo dominante permanece ativo por aproximadamente sete dias e, após esse período, pode regredir ou ovular (Lucy et al., 1992). A concentração sanguínea de progesterona determinará o destino do folículo dominante, ou seja, ovulação ou regressão. Concentrações circulantes de progesterona elevadas, devido à presença de CL ativo, impedem o aumento na frequência dos pulsos de LH, necessário para maturação final e ovulação (Fortune, 1994). Caso a regressão luteal ocorra durante as fases de recrutamento ou de dominância, o aumento na frequência dos pulsos de LH irá permitir que ocorra a maturação final do folículo, aumentando sua capacidade esteroideogênica e promovendo o pico de LH e, conseqüentemente, a ovulação, pois o estrógeno em altas concentrações promove retro alimentação positiva nos neurônios superiores que vão por sua vez estimular a liberação de GnRH, que por sua vez estimula a liberação de LH (Ginther et al., 1997).

A dinâmica folicular em animais de raças taurinas e zebuínas foi amplamente pesquisada, porém são poucos os trabalhos publicados com animais mestiços (Borges et al., 2001). Uma vez que os rebanhos de receptoras de embrião são compostos basicamente por novilhas mestiças, e pelo fato de que o padrão de crescimento folicular pode influenciar a resposta à sincronização de estro e ovulação, o melhor conhecimento da fisiologia desses animais é fundamental para obter melhores

resultados de protocolos hormonais utilizados para a sincronização do estro.

Existem diferenças na dinâmica folicular entre animais taurinos e zebuínos. Enquanto os primeiros apresentam predomínio de duas ondas (Sirois e Fortune, 1988), fêmeas zebuínas têm preferencialmente três ondas por ciclo estral (Viana et al., 2000). Outra diferença está relacionada ao diâmetro máximo dos folículos dominantes e do CL formado após ovulação (Baruselli et al., 2007).

Devido essas diferenças, Borges et al. (2001) realizaram estudo para caracterizar o padrão de crescimento folicular de animais mestiços. Foi realizado o acompanhamento diário por ultrassonografia, durante um ou dois ciclos estrais consecutivos, de 26 novilhas mestiças Holandês-Zebu com boa condição corporal. Os resultados mostraram predomínio de três ondas de crescimento e diâmetro máximo do folículo dominante foi de $12,2 \pm 3,6$ milímetros, que é próximo ao encontrado para novilhas da raça Nelore. Alves et al. (2002) encontraram resultados semelhantes, porém, com predomínio de duas ondas por ciclo. Portanto, a dinâmica folicular em animais mestiços é semelhante à encontrada para as raças taurinas e zebuínas, possivelmente com valores intermediários para as estruturas ovarianas, ou seja, folículo dominante com diâmetro máximo de aproximadamente 12 milímetros.

Após a ovulação, os diferentes tipos celulares do folículo dominante irão compor o CL, definido como uma

glândula endócrina transitória cuja principal função é a produção e liberação de progesterona (Smith, 1986).

2.4 Formação do corpo lúteo

Existe efeito significativo entre a área transversal do CL e o dia do ciclo estral. Geralmente o CL é encontrado por volta do dia dois ou três após a ovulação com o tamanho inicial em torno de $1,0 \text{ cm}^2$. A massa do tecido luteal é identificada ultrassonograficamente antes que a concentração plasmática de progesterona supere $1,0 \text{ ng/ml}$. Os maiores valores para a área do CL ocorrem entre os dias sete e 16 do ciclo estral, período em que a área do tecido luteal atinge aproximadamente $4,0 \text{ cm}^2$. A partir desse período tem início a regressão da área luteal que atinge valores próximos de $2,0 \text{ cm}^2$ no dia 22 do ciclo estral (Viana et al., 1999).

Existe correlação entre a área do CL e a concentração plasmática de progesterona, sendo que a maior concentração de progesterona ocorre após o CL atingir seu tamanho máximo. Isto ocorre porque o aumento na produção de progesterona é devido à maturação funcional do CL e não pelo aumento do tecido luteal (Viana et al., 1999). Borges et al. (2003b), trabalhando com vacas das raças Gir e Nelore, verificaram que cerca de 57% dos animais avaliados apresentavam cavidade no CL, enquanto Viana et al. (1999) encontraram cerca de 37% de cavidade em CL's de vacas Gir, porém nos dois trabalhos não foram encontrados qualquer influência da cavidade na produção de progesterona.

2.5 Manifestação de estro

A ação do estrógeno (E_2) sobre o hipotálamo, na ausência da ação da P4, é a responsável pelo comportamento de estro em bovinos (Asdell et al., 1945). O efeito do estradiol na indução do estro é do tipo “tudo ou nada”, ou seja, uma vez atingida à concentração necessária, aumentos deste hormônio na corrente sanguínea não implicam em maior expressão de comportamento estral (Allrich, 1994). Durante o ciclo estral de bovinos o início do estro precede a ovulação em torno de 24 á 30 horas. A duração do estro é de aproximadamente 12 a 16 horas e, conseqüentemente, a ovulação ocorre 12 horas após o término do estro (Hurnik e King, 1987).

Nem sempre o comportamento de estro e a ovulação ocorrem de forma simultânea. Nas novilhas, em determinadas situações, o comportamento de estro não é seguido por ovulação e formação de tecido luteal. Rutter e Randel (1986) sugerem que este fato pode estar relacionado à pré-sensibilização da P4 sobre o hipotálamo, possibilitando melhor resposta ao estradiol e, conseqüentemente, à liberação do LH. Novilhas que apresentaram o primeiro estro seguido de ovulação mostraram elevações na concentração plasmática de P4 antes da primeira ovulação, devido à luteinização de folículos ovarianos. Outra possibilidade é a ocorrência do estro silencioso, onde a ovulação ocorre, mas não é acompanhada por comportamento estral. Essa situação é mais comum no período pós-parto, quando vacas são utilizadas como receptoras, e pode ser devido às altas concentrações de E_2 , durante a gestação, que deixam o hipotálamo refratário a ação desse

hormônio. Esse quadro é revertido pela progesterona liberada pelo CL formado após a primeira ovulação pós-parto (Allrich, 1994).

Existem vários sinais que são utilizados para determinar se um animal está em estro ou não, porém, dentre estes, o principal é a novilha ficar imóvel quando montada por um macho ou outras fêmeas do rebanho, comportamento denominado como aceitação de monta (Foote, 1975). Outros sinais, chamados de secundários, são utilizados para facilitar a observação e confirmar a ocorrência do estro. Esses sinais são importantes, pois, em algumas situações, não é possível observar a novilha aceitando a monta. Os principais sinais secundários são os seguintes: descarga de muco límpido pela vagina, montar outros animais, sinais de intranqüilidade, vulva edemaciada e de coloração avermelhada, alterações do pelo ou da pele na base da cauda e garupa e sinais de sangue na cauda ou na vulva (Diskin e Sreenan, 2000).

Alguns fatores podem influenciar negativamente a expressão do estro, dificultando sua observação e levando a baixos índices reprodutivos. A falta de espaço físico provoca redução na manifestação do estro por impedir adequada interação entre os animais (Hurnik e King, 1987). A estrutura e o tipo de piso também podem influenciar a observação de estro, onde solos com muita lama ou piso sem aderência inibem a atividade de monta. Além disso, esse tipo de solo aumenta a probabilidade de ocorrência de problemas de casco e lesões dos membros, reduzindo ainda mais a atividade sexual em novilhas (Britt et al., 1986).

Com o objetivo de determinar a influência da estação do ano e da sincronização sobre a manifestação de estro, Pires et al. (2003) conduziram experimento com 35 vacas da raça Gir. Foi observada maior manifestação de estro (número de animais em estro) durante o inverno do que no verão, mas com maior atividade sexual (sinais de estro) no verão. A duração do estro não diferiu entre as estações, sendo $12,33 \pm 0,74$ horas no verão e $11,82 \pm 0,74$ horas no inverno. Quando se comparou o estro natural com o sincronizado com aplicação de $PGF_{2\alpha}$, os autores encontraram duração do proestro inferior nos animais sincronizados. A atividade sexual, por sua vez, foi maior nos animais sincronizados. Provavelmente, o maior número de vacas exibindo comportamento sexual simultâneo, após a sincronização, estimulou a manifestação do estro provocando proestro mais curto.

2.6 Sincronização de estros com prostaglandina $F_{2\alpha}$

A $PGF_{2\alpha}$ causa à luteólise e encurta o ciclo estral e, por isso, tem sido amplamente utilizada na sincronização do estro de receptoras de embrião. Entretanto, os resultados obtidos com esse tratamento apresentam algumas desvantagens, quando comparados aos protocolos hormonais utilizando outras associações hormonais. Entre os principais problemas relacionados com a sincronização com $PGF_{2\alpha}$ estão a necessidade das novilhas apresentarem CL responsivo à droga e a variação no tempo entre o tratamento e a manifestação do estro. Esses fatores acabam limitando o número de animais disponíveis para a TE uma vez que é

necessária sincronia adequada entre a manifestação de estro da receptora e o dia da aspiração folicular guiada por ultrassom da vaca doadora de ovócitos (Odde, 1990; Bó et al., 2004).

O tecido luteal não tem capacidade de responder a ação da $PGF_{2\alpha}$ durante toda a fase luteínica. O efeito luteolítico dessa substância é observado somente entre os dias seis e 16 do ciclo estral, e isto se deve, possivelmente, com a aquisição de receptores para a $PGF_{2\alpha}$ durante o desenvolvimento e maturação das células do CL (Hansel e Blair, 1996). Mesmo durante o período em que o CL está responsivo ao tratamento, a resposta apresenta variações. Os tratamentos realizados no início dessa fase (entre os dias seis e nove) apresentam menor índice de luteólise quando comparados aos realizados entre os dias 11 e 16 (Odde, 1990) e, portanto, o CL apresenta maior sensibilidade aos efeitos da $PGF_{2\alpha}$ conforme o ciclo estral vai se aproximando do fim da fase luteínica (Beal, 1996). Tanabe e Hann (1984) avaliaram a resposta a aplicação de $PGF_{2\alpha}$ nos dias sete, nove e 15 do ciclo estral e encontraram aumento progressivo 86%, 90% e 98% na manifestação de estro, após o tratamento hormonal, sendo que a resposta final foi de 91,3%.

O principal fator que determina o intervalo da aplicação da $PGF_{2\alpha}$ à manifestação do estro é o estágio de desenvolvimento do folículo dominante no momento da aplicação do hormônio, e não o tempo necessário para a luteólise. Se o tratamento for realizado com o folículo dominante na fase final de crescimento, ou início da fase estática, a ovulação ocorre em torno de

48 horas. Por outro lado, se a sincronização for realizada com o folículo dominante no meio ou no final da fase estática, ou seja, no início da fase de regressão, a ovulação vai ocorrer em, aproximadamente, 96 horas. Essa variabilidade no intervalo para o início das respostas ocorre pois quando o tratamento é realizado antes do folículo dominante iniciar o processo de regressão, este mesmo folículo dominante vai completar seu desenvolvimento e, então, ovular. Porém, caso o folículo dominante esteja em regressão, será necessário que o folículo dominante da próxima onda folicular se desenvolva até o estágio pré-ovulatório, para que a novilha possa manifestar o estro (Kastelic e Ginther, 1991).

Vasconcelos et al. (1999) realizaram experimento para avaliar a sincronização com protocolos a base de GnRH e PGF₂ α em função do dia do ciclo estral em que o tratamento é iniciado e do tamanho do folículo dominante. As vacas que iniciaram o tratamento na primeira metade do ciclo estral (entre os dias um e 12) apresentaram maiores taxas de sincronização (91%) em relação às vacas que foram tratadas entre os dias 12 a 21 do ciclo estral, que apresentaram taxa de sincronização de 80%. O diâmetro do folículo diferiu de forma significativa em função da fase do ciclo estral em que o tratamento foi realizado. Animais tratados no início (entre os dias um e quatro) e no final (entre os dias 17 e 21) apresentaram folículo maiores (19,2 a 20,2mm) em relação aos animais tratados no meio do ciclo estral (entre os dias quatro e 17) que foi de 16,8 a 18,0mm.

Vários trabalhos foram realizados com o objetivo de avaliar a resposta à sincronização de estro utilizando PGF₂ α , em diferentes fases do ciclo estral. Borges et al. (2003) encontraram resposta de 92% para vacas da raça Gir e 100% para vacas da raça Nelore, após aplicação de análogo de prostaglandina nos dias 10, 11 e 12 do ciclo estral. Os intervalos da aplicação da droga à identificação dos estros foram, em média, de 88,7 horas (Nelore) e 91,6 horas (Gir), não sendo observada diferença com relação aos dias do tratamento.

Alves et al. (2003), trabalhando com vacas das raças Gir e Guzerá com duas aplicações de prostaglandina em intervalos de 11 dias, verificaram manifestação de estro após $73,47 \pm 3,45$ e $64,08 \pm 2,41$ horas após a aplicação de prostaglandina em vacas das raças Gir e Guzerá, respectivamente. Neste estudo, 95,1% dos animais manifestaram estro em até 72 horas, sendo que a maior porcentagem (35,8%) apresentou estro entre 48 e 60 horas após o tratamento.

Viana et al. (1999b) compararam as luteólise natural e induzida com cloprostenol sódico em vacas da raça Gir, e os autores encontraram diferenças na regressão do CL. Para os animais com luteólise induzida, ocorreu redução significativa na área do CL cerca de 24 horas após a aplicação de PGF₂ α , e para os animais com luteólise natural esse período foi de 48 horas. A queda na concentração de P4 ocorreu dentro de 24 horas para os dois grupos, mostrando que a regressão funcional precede a regressão morfológica.

O estudo de Tanabe e Hann (1984) avaliou a dispersão dos estros para três dias de tratamento (sete, nove e 15 do ciclo estral) com $\text{PGF}_2\alpha$. Os autores verificaram que os animais tratados no início do ciclo estral apresentaram menor dispersão na manifestação do estro (24 a 72 horas), quando comparado com aqueles tratados no meio e final do ciclo (32 a 104 horas).

Os resultados com a sincronização utilizando $\text{PGF}_2\alpha$ em receptoras de embrião apresentam variações que estão relacionadas com a qualidade da observação do estro. Geralmente para um lote de receptoras tratadas com este hormônio, aproximadamente 50% dos animais serão aproveitados para TE e, considerando índice de gestação de 50%, apenas 25% dos animais tratados ficaram gestantes no final do processo (Baruselli et al., 2005).

Em um experimento utilizando 854 receptoras mestiças sincronizadas com aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$ de seis a oito dias após detecção do estro, Bó et al. (2004) obtiveram os seguintes resultados: 384 (45%) manifestaram estro, e destas, 226 foram consideradas aptas para TE, ou seja, aproveitamento de 59%. O índice de gestação foi de 39,4% em relação às receptoras inovuladas, e 10,4% em relação às receptoras tratadas.

2.7 Sincronização do estro com protocolos à base de progesterona e estrógeno

Os conhecimentos recentes sobre a função ovariana, obtidos através da ultrassonografia, permitiram o desenvolvimento de protocolos hormonais para controlar, com maior

precisão, o crescimento folicular e o momento da ovulação. A manipulação hormonal do ciclo estral permite a utilização de receptoras que não estão aptas para serem sincronizadas com $\text{PGF}_2\alpha$, ou por não estarem com atividade ovariana cíclica ou, então, por não se encontrarem no período responsivo à droga (Jones e Lamb, 2008).

Os protocolos possibilitam menor dispersão na manifestação do estro, o que reflete em melhor sincronização entre a doadora e a receptora de embriões. Esses aspectos viabilizaram a sincronização de número maior de receptoras e facilitaram a implantação de programas de TE em larga escala. Os protocolos de transferência de embrião em tempo fixo (TETF), que consistem em tratamentos hormonais para sincronizar o momento da ovulação, surgiram com o objetivo de eliminar a necessidade de observação de cio nas receptoras, que é apontado como o principal entrave ao amplo uso da TE nos rebanhos mestiços criados a campo (Baruselli et al., 2004).

A manipulação do ciclo estral bovino consiste em tratamentos hormonais aplicados em sequência pré-definida visando controlar o recrutamento, a seleção e, principalmente, a ovulação (Bó et al., 2006).

Vários são os medicamentos e protocolos disponíveis no mercado e, de modo geral, os tratamentos compreendem a inserção de implante intravaginal de P4 juntamente com a administração intramuscular de uma fonte de estrógeno (benzoato, valerato ou cipionato de estradiol). O implante é mantido por

aproximadamente oito dias e, no momento da sua retirada, é realizada a aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$ em associação com dose reduzida de cipionato de estradiol. Melhores resultados podem ser obtidos com a utilização de indutores de ovulação injetados no momento da retirada do implante, dentre os quais estão o hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) e a gonadotropina coriônica equina (eCG) (Bó et al., 2002).

O entendimento das bases fisiológicas e farmacológicas dos tratamentos hormonais é importante para a correta definição dos períodos de tratamento, das drogas utilizadas, bem como das variações nas datas de aplicação e resposta esperada aos diferentes protocolos (Bineli et al., 2006). Vários tratamentos podem ser usados para o controle do recrutamento folicular. A aplicação de GnRH, LH ou eCG podem induzir a ovulação do FD e, conseqüentemente, o surgimento de nova onda de crescimento, mas a sua eficiência depende do dia do ciclo estral em que o tratamento é realizado (Martinez et al., 1999). O E2 leva à inibição na secreção de FSH que, por sua vez, determina a regressão dos folículos com posterior liberação de FSH e surgimento de nova onda. Isto ocorre independente da fase em que o E2 é aplicado. A P4 em concentrações elevadas inibe a liberação de LH impedindo a ovulação e o folículo dominante entra em atresia no final da onda de crescimento (Martinez et al., 2005).

O principal objetivo dos protocolos hormonais é controlar o momento da ovulação. Para que isso ocorra é

necessário que um folículo dominante, com capacidade ovulatória, seja exposto ao pico de LH (Ginther et al., 1997). A colocação de um implante intravaginal de liberação programada de P4, associado ao controle do recrutamento, faz com que os folículos se desenvolvam, mas a ovulação não ocorre devido ao efeito inibitório da P4 sobre a liberação de LH (Lammoglia et al., 1998). A remoção do implante permite que o E2 produzido pelo FD leve ao pico de LH aumentando a taxa de ovulação. Para aumentar o desenvolvimento do folículo dominante e conseqüentemente a ovulação pode-se utilizar hormônios que estimulem a liberação de LH e, dos mais utilizados, a eCG. O tratamento com eCG, no momento da retirada do implante de progesterona, tem mostrado maiores taxas de concepção quando comparado aos animais não tratados. Especula-se que esse aumento se deve ao estímulo gonadotrófico que aumenta a taxa de crescimento e ovulação do folículo dominante, bem como o efeito luteotrófico do eCG (Baruselli et al., 2004).

O controle da seleção folicular é usado para promover a superestimulação em doadoras de embrião. Recentemente, tem se buscado aumentar o número de folículos selecionados em receptoras de embrião, com o objetivo de causar múltiplas ovulações e, conseqüentemente, aumentar a concentração plasmática de P4. Esse efeito pode ser obtido com uso de eCG antes da fase de dominância folicular, ou seja, por volta do dia cinco do ciclo estral (Binelli et al., 2001). Porém, altas concentrações de P4 têm reduzido os índices de gestação em receptoras de embrião uma vez que, segundo Nogueira

et al. (2004), pode induzir a liberação prematura de $\text{PGF}_2\alpha$ pelo endométrio, levando a perdas embrionárias.

Trabalhos têm sido realizados para adequar o melhor protocolo para receptoras de embrião. O objetivo dos pesquisadores é obter os melhores índices de gestação e simplificar o manejo nas centrais de receptoras. Nesse sentido, Nasser et al. (2004) realizaram estudo comparando dois protocolos para receptoras de embrião. Foram utilizadas novilhas mestiças (Nelore x Angus) entre 22 e 30 meses de idade e peso vivo médio de 315 Kg. Nos dois tratamentos foram colocados os implantes de P4 associados com E2 no início do protocolo, porém, a aplicação da eCG e da $\text{PGF}_2\alpha$ ocorreu nos dias cinco ou oito, mesmo dia da remoção do implante. Os resultados não mostraram diferenças para o número de animais selecionados para TE (inovuladas/tratadas), de 89,4% e 84,7%, bem como para o índice de gestação (prenha/inovuladas), de 52,6% e 48%. Portanto, a aplicação no dia oito foi vantajosa pelo fato das receptoras serem manejadas apenas duas vezes. Neste mesmo estudo, um grupo de 154 receptoras foi selecionado para determinação da concentração plasmática de P4. O tratamento no dia cinco resultou em maior concentração de P4 ($2,4 \pm 0,3$ ng/ml), mas não houve efeito da P4 em nenhum dos parâmetros avaliados.

Lonney et al. (2006) avaliaram vários aspectos relacionados à sincronização de receptoras de embrião. Primeiramente compararam a aplicação de $\text{PGF}_2\alpha$ com o protocolo hormonal a base de P4 e E₂. O tempo médio entre a sincronização e a manifestação do estro foi de 3,6 e 2,1

dias para o primeiro e segundo tratamentos, respectivamente. O aproveitamento para TE e o índice de gestação diferiram de forma significativa ($p < 0,01$) entre os tratamentos com resultados de 93% de aproveitamento e com 63% de gestação para a $\text{PGF}_2\alpha$, enquanto que para o protocolo com progesterona obteve-se 83% de aproveitamento e 53% de gestação. Os autores também avaliaram a influência do período de permanência do implante (por cinco, seis, sete e oito dias) sobre o índice de gestação, sendo verificados índices de 41%, 48%, 55% e 53% respectivamente, sendo a média de 46,8% e apesar das diferenças numéricas observadas não houve diferença estatística entre os diferentes períodos de permanência do implante.

Como é comum em centrais de receptoras de embrião, os animais que não se tornam gestantes, após a primeira TE, são submetidos a novos protocolos hormonais, até a confirmação da prenhez ou seu descarte do sistema. No estudo de Lonney et al. (2006) foram avaliadas receptoras até a terceira TE, sendo observada redução na fertilidade da primeira para a segunda, e da segunda para a terceira TE. Os resultados foram 65% na primeira TE, 53% na segunda e 41% na terceira transferência de embriões.

O estudo de Bényei et al. (2006) comparou dois métodos de sincronização de estros (protocolo hormonal baseado em implantes de P4 e aplicação de E₂ e agente luteolítico na retirada do implante, e sincronização apenas com $\text{PGF}_2\alpha$) e dois tipos de implante (intravaginal e auricular), com o estro natural de receptoras de embrião. Foram

avaliadas 1466 TE, sendo 193 com estro natural, 575 com uma única aplicação de PGF_{2α}, 334 com duas aplicações de PGF_{2α}, 226 com implante auricular e 138 com implante vaginal. Os índices de gestação foram de 40,9%, 41%, 34,7%, 45,1% e 50%, respectivamente. Não houve diferença quando se comparou o estro natural com o sincronizado (PGF_{2α} e protocolo), porém, os implantes de P4 (auricular e intravaginal) obtiveram resultados superiores à PGF_{2α}, mas não diferiram entre si.

2.8 Fatores que influenciam o índice de gestação em programas de transferência de embriões

O índice de gestação, após transferência de embriões, depende de fatores relacionados ao embrião, à receptora, à técnica utilizada, ou das suas interações (Spell et al., 2001). A receptora é um dos fatores mais importantes que vão determinar o sucesso ou não dos programas de TE e, portanto, a correta seleção desse animal é um passo determinante para se obter melhores índices de gestação (McMillan e Donnison, 1999).

McMillan (1998) desenvolveu um modelo estatístico para avaliar a contribuição do embrião e da receptora na taxa de sobrevivência embrionária até os 60 dias de gestação. A maior fonte de variação no índice de gestação foi devido às alterações na habilidade da receptora em levar a gestação a termo, e não pela capacidade de sobrevivência do embrião. Este modelo dividiu as receptoras em duas categorias, segundo a fertilidade: receptoras superiores e inferiores. Os mecanismos que diferenciam uma receptora considerada

superior ou inferior ainda não são totalmente conhecidos. Problemas no reconhecimento materno da gestação têm sido apontados como o principal responsável para as falhas reprodutivas, uma vez que existe grande diferença nos índices de gestação entre os grupos de receptoras consideradas superiores e inferiores, e que a maior parte dessa diferença é observada por volta de 16 ou 17 dias de gestação. A maioria das receptoras que não se tornaram gestantes retornaram ao estro dentro do período normal do ciclo estral.

Segundo McMillan (1998), no mesmo estudo anterior, não foi encontradas diferenças entre as receptoras superiores e inferiores com relação às principais características funcionais ovarianas, ou seja, comprimento do ciclo estral, população folicular, dia de surgimento e diâmetro do primeiro ou segundo folículos dominantes diâmetro do CL e concentração plasmática de P4. O ambiente uterino parece à principal fonte de variação nos índices de gestação entre os dois grupos estudados. Maior número de embriões apresentava-se alongados no útero de novilhas consideradas superiores (67%), quando comparados com os das inferiores (14%), por volta de 14 dias de gestação. Este atraso no crescimento embrionário foi mais significativo por volta do dia 17. A concentração de interferon tau (IFN-τ) também foi significativamente maior em novilhas com maiores índices de gestação (Staggs et al., 1998). Outras proteínas consideradas importantes para o reconhecimento materno da gestação também foram encontradas em maiores quantidades no útero de novilhas que se tornaram gestantes em relação as não gestantes (Roberts, 1989). Portanto, o

ambiente uterino proporciona melhores condições para a implantação e o crescimento embrionário inicial, favorecendo, dessa forma, o reconhecimento materno da gestação e levando a melhores índices de gestação. Assim, os critérios para seleção de receptoras, atualmente utilizadas, tais como a qualidade do CL, apresenta pouca relação com a capacidade de sobrevivência embrionária após a transferência de embriões.

Spell et al. (2001) realizaram estudo para comparar as características luteais (área, volume, presença ou não de cavidade, e concentração plasmática de P4) com os índices de gestação de receptoras de embrião. As receptoras foram avaliadas por palpação retal e exame por ultrassonografia, classificando os CL como excelentes (diâmetro >10mm e consistência firme ou moderada) e fracos (diâmetro < 10mm e consistência macia). Os embriões foram transferidos de seis a oito dias após a manifestação do estro. O diâmetro e a área do CL diferiram para receptoras transferidas no dia seis e no dia oito após o estro, sendo os valores maiores para essas características ocorreram no segundo grupo. Houve diferença e correlação positiva para área e volume do CL com concentração plasmática de P4. Não houve diferença com relação à área, volume, concentração plasmática de P4 e os índices de gestação. O índice de gestação também não foi influenciada pela presença de cavidade luteal. Não houve diferença no índice de gestação e na concentração de P4 para os CL classificados como excelentes ou fracos.

Outro fator relacionado à receptora e que apresenta grande influência nos

resultados dos programas de TE é o ECC. A nutrição interfere diretamente em todos os aspectos reprodutivos não só em novilhas receptoras de embrião, mas em todas as categorias de fêmeas bovinas. A ingestão de proteína e energia são os principais limitantes que vão influenciar o ECC e conseqüentemente os índices de gestação (Looney et al., 2006).

Mapletoft et al. (1986) analisaram a influência do ECC no dia TE e verificaram que receptoras com ECC (escala de um a cinco) de três e dois tiveram índices de gestação significativamente maiores, 55% e 53% respectivamente, quando comparados com novilhas de ECC um, que apresentaram índice de gestação de 44%.

Os embriões produzidos *in vitro* apresentam algumas características que determinam baixos índices de gestação. Maior quantidade de lipídeos intracelulares, alterações na densidade mitocondrial e a incompleta compactação da massa celular interna são os principais fatores que comprometem a fertilidade desses embriões (Farin et al., 2004). Em vários estudos baseados em necropsia de receptoras entre 22 e 124 dias de gestação, Peterson e Lee (2003) verificaram grande ocorrência (25%) de malformação do alantóide, que levaram a alterações dos placentomas e morte fetal por volta de 60 dias de gestação. Esses dados confirmam os achados de McMillan e Donnison (1999), indicando que a partir de 60 dias de gestação o embrião, e não a receptora, é o maior responsável pela morte fetal. Esse padrão de mortalidade embrionária, que ocorre acima de 35 dias de gestação, não

é visto quando os embriões produzidos *in vitro* foram cultivados em tubas uterinas de ovelhas, antes da transferência para receptoras. Isto demonstra que alguns fatores associados com as condições da produção *in vitro* são responsáveis pelas alterações no desenvolvimento do alantóide (Lonergan et al., 2003).

O estágio de desenvolvimento e a qualidade dos embriões têm grande influência nos índices de gestação, após a TE para os embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*. O estágio de mórula inicial apresenta resultados inferiores quando comparado aos estádios mais avançados, assim como embriões classificados como excelentes/bons determinam maiores índices de gestação em relação aos embriões de baixa qualidade (Looney et al., 2006).

Em estudo com 5070 TE's de embriões produzidos *in vitro*, realizadas em período de cinco anos, Hasler (1998) comparou idade dos embriões (Dias 7, 8 e 9), estágio de desenvolvimento (mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e qualidade (excelentes ou grau I, e bons ou grau II) com os índices de gestação. Com relação à idade dos embriões, comparando entre os embriões grau I, os resultados encontrados foram: 56%, 48% e 41% de gestação para os embriões de dias 7, 8 e 9, respectivamente, mostrando diferença entre os embriões do dia 7 em relação aos demais. Quando se comparou os embriões grau II, os resultados foram 41% para os embriões D7, e 30% para embriões D8, mostrando diferença entre esses dois dias.

O mesmo autor comparou o estágio de desenvolvimento com a idade e qualidade dos embriões. Para embriões grau I e D7, os resultados para cada grau de desenvolvimento (mórula, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) foram de 45%, 53%, 56%, 63% e 57%, respectivamente; e para os embriões D8 e grau I foram de 39%, 49%, 47% e 45% para blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido, respectivamente. Não foram transferidas mórulas de dia 8. Ao analisar apenas o grau de desenvolvimento embrionário, houve diferença entre as qualidades GI e GII para embriões de dia 7 (56% e 41%) e dia 8 (48% e 30%), respectivamente. Dentro de uma mesma idade e mesma qualidade (D7GI, D7GII, D8GI e D8GII), não foram encontradas diferenças entre os estádios de desenvolvimento embrionários.

A técnica de TE dos embriões também é outro fator que pode influenciar os índices de gestação. A experiência do operador é importante, pois determina não somente o local de deposição do embrião no corno uterino selecionado, mas, também, o grau de lesão do endométrio uterino (Looney et al., 2006).

Fernandes (1999) desenvolveu experimento para classificar os diferentes graus de dificuldade nas inovulações não cirúrgicas e seu impacto nos índices de gestação. As TE's foram classificadas com boa (duração de até três minutos, transposição da cérvix muito fácil, e deposição do embrião no terço cranial do corno uterino), regular (duração de três a seis minutos,

transposição moderadamente difícil e deposição no terço médio) e ruim (mais de seis minutos de duração, transposição difícil e deposição no terço caudal). Os índices de gestação encontrados foram 58,5%, 45,5% e 31% para as inovulações classificadas como boas, regulares e ruins respectivamente, sendo o resultado geral de 47,3%. Houve diferença significativa do primeiro para os demais grupos, sendo que não existiu diferença entre as inovulações regulares e ruins. O autor sugere que o maior número de lesões no endométrio e a dificuldade ou mesmo impossibilidade de deposição do embrião no local apropriado são os fatores responsáveis pelos menores índices de gestação para as TE's classificadas como regulares e ruins.

A sincronia entre o estro da receptora e a doadora influencia os índices de gestação para os embriões produzidos *in vivo* (Jones e Lamb, 2008). No estudo de Hasler (1998) foram avaliadas 4598 TE's de sete dias de idade produzidos *in vitro*. Os resultados foram de 57,6% para receptoras que manifestaram estro 12 a 24 horas antes da fecundação, 55% para receptoras em estro no dia da fecundação, e 50,3% para as que manifestaram estro de 12 a 24 horas após a sincronização. Houve diferença entre os dois primeiros com o último grupo estudado.

Peixoto et al. (2007) realizaram experimento para avaliar quais os fatores influenciam os índices de gestação após a transferência de embriões produzidos *in vivo*. Foram avaliadas 5627 transferências de embriões coletados de doadoras zebuínas e inovulados em

receptoras mestiças. As variáveis testadas foram ano em que a TE foi realizada, estação do ano, raça do embrião (Gir, Nelore e Guzerá), estágio de desenvolvimento embrionário (mórula até blastocisto eclodido), qualidade do embrião (grau I, II e III) e sincronia entre a doadora e a receptora. As análises dos dados foram realizadas pelo método de regressão logística e mostraram influência da estação do ano, estágio de desenvolvimento e qualidade do embrião e sincronia entre doadora e receptoras, sendo que os melhores resultados foram obtidos com as TE's realizadas no outono, com embriões grau I, em estágio de mórula ou blastocisto inicial e quando o estro da receptora ocorreu um dia antes do estro da doadora.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de execução do experimento

O experimento foi realizado na fazenda Nossa Senhora da Abadia (NSA), município de Patrocínio, região do Alto Paranaíba, MG. A propriedade atua como central de receptoras, em parceria com o laboratório Cenatte-Biotech® de Uberaba. Os dados foram coletados com referência nas TE's realizadas no período de outubro de 2007 a junho de 2009. A propriedade possui área de 900 hectares (ha), distribuídos em 500 ha de pastagem, sendo que destes 350 são formados por *Brachiaria brizantha* e 150 ha formados por *Brachiaria humidicola*, e 400 ha de área de cultura de milho. A lotação média no período experimental foi de 850 animais.

3.2 Animais e manejo

Foram utilizadas 2158 novilhas mestiças, de diferentes composições genéticas do cruzamento entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*. As receptoras foram selecionadas para o programa de TE com, aproximadamente, 330kg de peso vivo, estrutura corporal adequada para minimizar a ocorrência de distocias. A avaliação da área pélvica foi realizada de através da palpação retal, de forma subjetiva. Com o peso médio de 330kg é esperado que novilhas mestiças já apresentem atividade ovariana cíclica, porém devido à variação genética e as condições de recria desses animais, algumas ainda não manifestaram estro. Foram avaliados também o temperamento, aprumos e caracterização fenotípica. As novilhas foram submetidas a programa sanitário que incluiu exame de brucelose e tuberculose; vermifugação; aplicação de estreptomicina; vacinação contra raiva, clostridioses, leptospirose, BVD e IBR.

As receptoras foram mantidas com ECC maior ou igual a cinco (escala de um a nove), e manejadas em pastagens durante o período chuvoso, além de suplemento mineral (Núcleo Boi Verde Reprodução®, Tortuga) misturado na proporção de 1:1 com cloreto de sódio. No período seco as novilhas foram mantidas em área de palhada de milho e suplementadas com sal proteinado (35% de PB, 28% de NNP, 24 g de Ca e 12 g de P) por kg de produto.

3.3 Indução e sincronização de estros

A indução e sincronização do estro foram programadas com base na data da aspiração folicular da vaca doadora, para

que o dia do estro da receptora ocorresse no mesmo dia da aspiração, ou seja; oito dias antes da data provável da TE. Foram considerados como utilizáveis aqueles estros manifestados de seis (D6) até dez (D10) dias antes da data provável da TE, sendo preferencialmente utilizados os dias sete (D7), principalmente oito (D8) e nove (D9).

Para sincronização do estro foram utilizados dois métodos: aplicação de análogos de PGF₂ α e protocolo a base de implante intravaginal de P4 associado a estrógeno E2 e eCG. Estros naturais foram utilizados quando sincronizados com a data da aspiração folicular das doadoras. Os animais que receberam embrião e retornaram ao estro nos dias utilizáveis (D6 a D10) foram considerados como em estro natural.

As receptoras foram distribuídas em três tratamentos, com base no tipo de estro, natural ou sincronizado:

- Tratamento 1 – Estro natural;
- Tratamento 2 – Aplicação de 0,530mg de cloprostenol sódico (Ciosin®, Intervet – Schering-Plough) por via intramuscular;
- Tratamento 3 – No dia 0 (início do tratamento) foi inserido implante intravaginal de progesterona (CIDR®, Pfizer) associado à aplicação de 2,0mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Farmavet), por via intramuscular. O implante foi mantido por oito dias e, na retirada, aplicou-se 0,530mg de cloprostenol sódico (Ciosin®, Intervet – Schering-Plough) + 400UI de gonadotropina coriônica eqüina (Folligon®, Intervet – Schering-Plough) + 1,0mg de cipionato de estradiol (ECP®, Pfizer), todos por via intramuscular.

No momento da sincronização do estro avaliou-se o histórico da receptora, principalmente a data do último estro, para definição do tipo de protocolo a ser utilizado. Quando o último estro compreendia a fase responsiva do CL à $\text{PGF}_2\alpha$ (sete a 15 dias), esse método foi utilizado com a aplicação realizada três dias antes da data programada para a aspiração folicular da doadora, no período da tarde.

Para as receptoras em anestro foi utilizado protocolo hormonal à base de P4 e E_2 (Tratamento 3). A retirada do implante de P4 foi realizada dois dias antes da data da aspiração folicular da doadora, no período da tarde.

Para os animais em anestro, foram realizadas avaliações para determinar o tônus uterino e a atividade ovariana com o objetivo de verificar se estavam aptos ou não para serem submetidos ao protocolo hormonal de indução de estro. O tônus uterino foi classificado de um a cinco, sendo um flácido e cinco o útero tônico ou túrgido, semelhante ao estro. A atividade ovariana foi classificada de um a três, sendo um o ovário pequeno e sem atividade, dois para ovários de tamanho normal, mas sem folículos palpáveis (menores que 0,8mm), e três o ovário com folículos perceptíveis a palpação retal (maiores que 0,8mm). Foram considerados como aptos para o protocolo, aqueles animais com classificação uterina de três ou mais e ovário classificado como três.

O intervalo da aplicação da $\text{PGF}_2\alpha$ ou da retirada do implante de P4 ao estro foi avaliado e os animais classificados numa escala de um a seis, sendo que esse

número corresponde ao intervalo (dias) da sincronização ao estro.

A observação de estro foi realizada diariamente em dois períodos de aproximadamente 30 a 60 minutos cada, sendo o primeiro às 7:30 h e o segundo às 16:30 h. Foram utilizados rufiões, preparados por aderência peniana, para auxiliar a detecção do estro. Para observação mais criteriosa, as novilhas são reunidas em áreas próximas aos cochos de sal e durante o período de observação, os animais são movimentados periodicamente para aumentar a possibilidade de interação de demonstração de estro.

3.4 Avaliação do corpo lúteo e transferência de embriões

Todas as receptoras que manifestaram estro, após indução hormonal ou estro natural, foram avaliadas um dia antes da data provável da TE por palpação retal e/ou ultrassonografia para confirmar a presença de CL e, também, para classificá-lo quanto à localização e estrutura (tipo de implantação no ovário e tamanho estimado). Essa avaliação foi realizada nas receptoras que tivessem manifestando estro há cinco dias ou mais. Todas as receptoras sincronizadas com P4 foram avaliadas, independente de manifestarem ou não o estro.

A localização dos CL's foi registrada como sendo do ovário direito ou esquerdo (D ou E) para transferência no corno uterino ipsilateral ao CL. Com relação à estrutura, o CL foi classificado em incluso ou protuso, dependendo do tipo de implantação no ovário. Para os CL's classificados com protuso foi realizado avaliação do tamanho e

classificação das estruturas em um, dois ou três, sendo um o menor e três o maior. Os efeitos da localização, estrutura e tamanho foram considerados no modelo, mas como não apresentaram significância foram retirados da análise.

Os embriões foram produzidos *in vitro* pelo laboratório Cenatte-Biotech® e transferidos por via transcervical. As receptoras consideradas aptas na avaliação, ou seja, que apresentaram estrutura luteal, foram submetidas à anestesia epidural com anestésico local (lidocaína) e os embriões transferidos na porção cranial do corno uterino ipsilateral ao CL.

Foram transferidos embriões grau um (Grau I) e grau dois (Grau II), e destes, os seguintes estádios de desenvolvimento: Mórula (Mo), Blastocisto inicial (BI), Blastocisto (BL), Blastocisto expandido (Bx), Blastocisto eclodindo (BH) e Blastocisto eclodido (BE). Embriões clonados, produzidos por transferência nuclear também foram transferidos. Para a análise dos dados devido ao pequeno número de alguns grupos foram considerados apenas os embriões classificados com excelentes (Grau I) e os seguintes estádios de desenvolvimento: BL, BX e os BE e BH foram agrupados e considerados com eclodidos. No momento da TE, sempre que possível, foi realizada a sincronia entre o estádio de desenvolvimento do embrião com o dia do estro da receptora.

Devido às diferenças de manejo alimentar entre os períodos chuvoso e seco, observadas durante o período experimental, bem como os possíveis impactos gerados pelo estresse calórico provocado pelas altas temperaturas

durante a primavera e verão, foram realizadas comparações entre esses dois períodos, chuvoso e seco, para verificar sua influência nos índices de gestação e mortalidade embrionária. A influência do ano da transferência também foi avaliada no modelo inicial, mas não apresentou significância.

Foi realizado o diagnóstico precoce de gestação (DG), entre 28 e 30 dias após a TE, através de exame por ultrassonografia, em todas as receptoras que não retornaram ao estro até esta data. Novo exame com ultrassom foi realizado para confirmação do diagnóstico de gestação e sexagem fetal com aproximadamente 53 dias após a transferência de embriões.

As receptoras transferidas que retornaram ao estro antes da sexagem receberam novo embrião quando o estro foi sincrônico com o dia da aspiração das doadoras, independente se gestantes no diagnóstico precoce. As receptoras que retornaram ao estro, após a sexagem fetal, foram descartadas do programa de transferência de embriões.

3.5 Análises estatísticas

Para a análise do aproveitamento foram avaliadas 4744 sincronizações. Para as análises do tipo de sincronização, estádios de desenvolvimento embrionário, dia do estro e período do ano foram consideradas 3507 transferências. A comparação das médias da dispersão do intervalo entre o tratamento de sincronização e a manifestação do estro foi realizada através do teste de Fisher. Para a análise estatística do aproveitamento de receptoras em função dos diferentes

tratamentos de sincronização foi utilizado o teste de qui-quadrado. Para avaliar os índices de gestação aos 30 e 60 dias, e de perdas gestacionais entre 30 e 60 dias, foi utilizado modelo de regressão logística, utilizando o procedimento CATMOD do SAS, com a opção PROB (Statistical Analysis System Institute, Cary, NC, USA), que utiliza o método de máxima verossimilhança para verificar a significância dos efeitos testados. O modelo testado foi inicialmente completo, ou seja, foram consideradas todas as variáveis observadas como implantação e tamanho do CL, ano da TE, ordem de transferência e todas as suas interações. Posteriormente o modelo foi ajustado e as variáveis não significativas foram retiradas. O modelo foi ajustado considerando-se os efeitos fixos de tratamento de sincronização,

estádio de desenvolvimento embrionário, dia do estro da receptora, interação estágio de desenvolvimento embrionário versus sincronia entre o embrião e dia do estro da receptora e época do ano. Não foi realizada a análise da interação tripla entre a mortalidade embrionária, estágio de desenvolvimento e dia do estro da receptora. Outras interações foram consideradas no resíduo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Intervalo para manifestação do estro em receptoras de embrião de acordo com o tratamento hormonal.

A dispersão da resposta para os diferentes tratamentos utilizados para a sincronização do estro está contida na tabela 1 e figura 1.

Tabela 1: Distribuição do estro em receptoras de embrião após a sincronização com PGF₂α ou protocolos hormonais a base de implantes de progesterona

Dia da resposta	Prostaglandina F ₂ α (PGF ₂ α)		Implante de Progesterona	
	%	N	%	N
Dia 0	0,4	7/1731	14,9	71/474
Dia 1	1,9	33/1731	22,3	106/474
Dia 2	17,1	297/1731	58,2	276/474
Dia 3	46,9	812/1731	4,4	21/474
Dia 4	23,8	412/1731	0,0	0/474
Dia 5	9,5	166/1731	0,0	0/474
Dia 6	0,2	4/1731	0,0	0/474

No presente estudo foi verificado que os animais tratados com PGF₂α manifestaram estros distribuídos em vários dias (Figura 1), com dispersão da resposta em até seis dias após o tratamento, com a maior concentração

dos estros entre os dias dois e quatro após a sincronização. O intervalo médio, em dias, foi de 3,21 para a PGF₂α e 1,52 para o implante de P4, e esses valores diferem entre si (p<0,05) pelo teste exato de Fisher.

O intervalo do tratamento hormonal à manifestação do estro, bem como a dispersão da resposta tem grande importância para a programação das atividades nas centrais de receptoras de embrião. Com base nessas informações são definidas as datas para aplicação dos tratamentos, em função da data da aspiração folicular ovariana da doadora

de ovócitos. Portanto, o conhecimento do perfil da resposta de cada tratamento pode aumentar o número de receptoras aptas para serem utilizadas nos programas de TE, por permitir que a maior frequência de manifestação de estros, de determinado tratamento hormonal, ocorra com melhor sincronia possível com a data da provável TE.

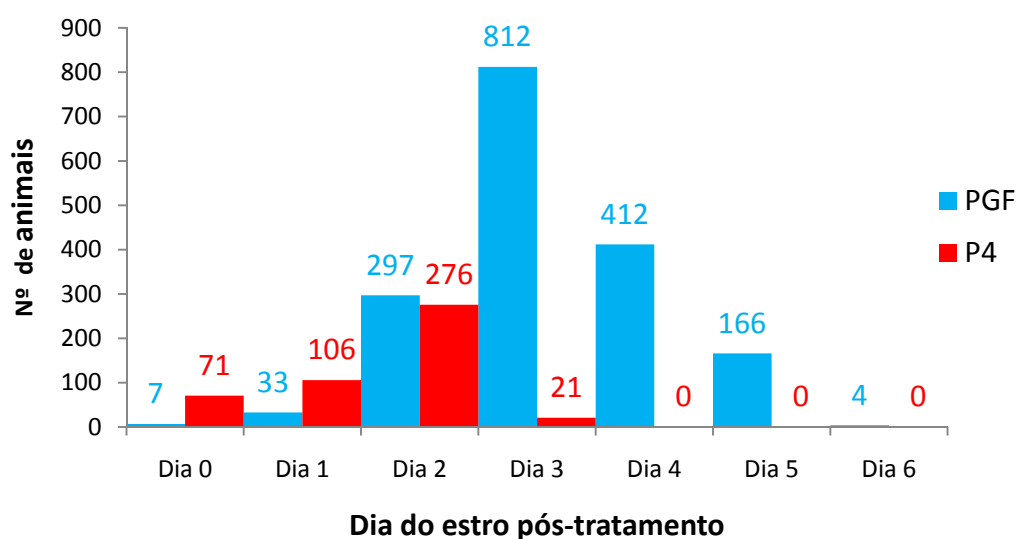


Figura 1. Número de animais observados em estro, segundo os dias após a aplicação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ou retirada do implante de P4.

O fator que determina a resposta após a aplicação de $PGF_{2\alpha}$ é a presença de CL com capacidade de responder a droga, ou seja, com receptores para $PGF_{2\alpha}$ no momento do tratamento, o ocorre entre os dias seis e 16 do ciclo estral (Henricks et al.; 1974). Segundo Tanabe e Hann (1984), animais tratados no início deste período, ou seja, por volta do dia sete do ciclo estral, apresentam menor resposta quando comparados com os tratamentos realizados entre os dias 11 e 16. Os resultados encontrados neste

experimento, com relação ao intervalo do tratamento à resposta, que foi de 3,21 dias, estão de acordo com os encontrados por Henricks et al. (1974), Tanabe e Hann (1984), Alves et al. (2003), Borges et al. (2003) que foram respectivamente 3,07 dias, 3,00 dias, 2,85 dias e 3,75 dias.

Para os animais que responderam ao tratamento, a dispersão da resposta vai ser determinada pelo o estágio de desenvolvimento do folículo dominante

no momento do tratamento. Isto ocorre pois se o folículo presente já iniciou o processo de regressão, no momento do tratamento, será necessário que o folículo da próxima onda se desenvolva até o estágio pré-ovulatório, para que a resposta possa ocorrer (Kastelic e Ginther, 1991). O fato de todas as novilhas tratadas estarem dentro do período responsivo promoveu concentração da resposta em 72 horas após o tratamento, mas, mesmo dentro dessa fase, ocorrem diferenças no estágio de desenvolvimento folicular e, por este motivo, a dispersão da resposta é maior do que a encontrada quando se utiliza o protocolo hormonal com P4, E₂ e eCG (Viana et al., 1999b; Alves et al., 2003).

Para os animais tratados com implante intravaginal de P4 (Figura 1) verificou-se sincronização mais eficiente dos estros, ou seja, concentração da resposta nos dois primeiros dias, com aproximadamente 90% dos animais manifestando estro dois dias após a remoção do implante. Apesar de todos os animais submetidos ao tratamento com P4 serem avaliados para TE, independente de manifestarem estro ou não, a observação criteriosa do estro é importante, pois possibilita melhor sincronia entre o dia do estro e o grau de desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro*. Nos trabalhos realizados com sincronização de estros à base de implantes de P4, normalmente não se observa a manifestação de estro, mas se considera sua ocorrência 48 horas após a remoção do implante (Bó et al., 2002; Nasser et al., 2004), conforme observado neste experimento.

A dispersão da resposta observada entre os tratamentos deve-se aos diferentes mecanismos de ação das drogas utilizadas. Apesar do tratamento com PGF₂ α , neste experimento, ser realizado apenas em novilhas que estão no período responsivo à droga, o intervalo da resposta é influenciado pelo estágio de desenvolvimento do folículo dominante no momento de sua aplicação (Kastelic e Ginther, 1991). No caso dos protocolos à base de implantes de P4, esse efeito não é observado. O implante de P4 impede a maturação final e a ovulação do folículo dominante, se este estiver presente no momento da colocação do implante, uma vez que reduz a liberação de LH necessário ao desenvolvimento folicular, enquanto o E₂ promove atresia dos folículos existentes e, conseqüentemente, o surgimento de nova onda de crescimento. Com a queda na concentração de P4, que ocorre após a retirada do implante, e com a elevação da concentração do E₂ promovida pelo crescimento do folículo dominante, ocorre a liberação de LH que promove a sincronização de ovulação (Bineli et al., 2006).

Outro fator que influencia a resposta ao protocolo e o grau de sincronização é a dose de E₂ utilizada após a remoção do implante de P4 (Macmillan e Burke, 1996). Em um estudo visando avaliar a influência da dose de E₂ na retirada do implante de P4, Lammoglia et al. (1998) verificaram que doses acima de 0,38 mg de E₂ determinam maior número de novilhas manifestando estro, melhor sincronização, e maiores concentração plasmática de E₂ e LH, quando comparado a animais não tratados ou tratados com doses inferiores de E₂ no

momento da retirada do implante de P4. A dose utilizada no presente trabalho foi de 1,0 mg, e esse fator pode ter contribuído para a grande taxa de sincronização, com 95% dos animais manifestando estro em até 48 horas após e remoção do implante.

A aplicação de indutores de ovulação (eCG) no momento da remoção do implante possibilita a resposta com dispersão ainda menor. O uso de eCG no momento da retirada do implante de P4, ou seja, após a dominância folicular, não é eficiente para promover múltiplas ovulações (Duffy et al., 2004), mas o seu uso estimula o crescimento final e controla, com maior precisão, o momento da ovulação do folículo dominante previamente selecionado durante o tratamento com P4 (Binelli et al., 2006). A ação do eCG pode estar relacionada com a alta taxa de

sincronização obtida no presente estudo. A dose utilizada neste estudo foi de 400 UI, e segundo Bó et al. (2004) essa dose é eficiente para promover maior crescimento do folículo dominante, ovulação e índice de gestação (41,7% sem eCG e 57,6% com eCG) quando comparado a animais submetidos a protocolos sem a utilização de eCG.

4.2 Taxas de aproveitamento de receptoras de embrião submetidas a diferentes protocolos hormonais para indução do estro

As receptoras que manifestaram estro natural ou induzido por $\text{PGF}_{2\alpha}$, e todas as que receberam implante de P4 foram avaliadas e aquelas que apresentavam CL foram consideradas aptas para TE. Os resultados de aproveitamento por tratamento estão contidos na tabela 2.

Tabela 2. Taxa de aproveitamento para a transferência de embriões de receptoras que manifestaram estro natural ou após tratamentos hormonais com prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ou progesterona

Tratamento	Aproveitamento	
	%	N
Estro natural	80,51 ^b	2004/2489
$\text{PGF}_{2\alpha}$	86,13 ^a	1534/1781
Implante de progesterona	70,88 ^c	336/474

^{a, b, c} Valores seguidos por letras distintas diferem ($P < 0,05$) entre si pelo Teste do Qui-quadrado.

Conforme observado na tabela 2, os maiores índices de aproveitamento foram verificados para os animais sincronizados com $\text{PGF}_{2\alpha}$ (86,13%) seguidos por aqueles manifestando estro natural (80,51%) e sincronizados com implante de P4 (70,88%). Isto pode estar relacionado ao fato de que os animais que manifestaram estro natural e os

sincronizados com $\text{PGF}_{2\alpha}$ apresentavam atividade ovariana e ciclicidade regular. As novilhas com estro natural são, em parte, aqueles animais transferidos que estão retornando o estro dentro do período esperado, ou seja, de 18 a 24 dias. As novilhas sincronizadas com $\text{PGF}_{2\alpha}$ manifestaram o estro anterior dentro de seis a 16 dias. Nesses animais,

o hipotálamo apresenta maior capacidade de resposta à ação do E₂ devido à ação prévia da P4 (Rutter e Randel, 1986). Como o E₂ é responsável pelo comportamento de estro, a detecção desses animais pode ter sido facilitada. O E₂ também possui ação direta na maturação final e ovulação do folículo dominante e, com isso, esses animais podem ter ovulado folículos maiores e, conseqüentemente, vão originar CL maiores, contribuindo para o melhor aproveitamento dessas novilhas (Baruselli et al., 2007).

A menor taxa de aproveitamento das novilhas que apresentaram estro natural em relação às sincronizadas com PGF₂α pode estar relacionada à regulação hormonal que ocorre nesses animais durante a pré-puberdade. Algumas novilhas que apresentaram estro natural poderiam ser animais pré-puberes incorporadas no programa de TE e, por isso, aguardando a sincronização do estro. Esses animais podem manifestar alguns sinais de estro ou até mesmo comportamentos característicos, mas a ovulação não ocorre devido a falhas na liberação de LH pela hipófise. Isto ocorre em cerca de 50% das novilhas pré-puberes e está relacionado com a falta da pré-sensibilização da P4 sobre o hipotálamo. Quando essa pré-sensibilização não ocorre, a resposta ao estímulo de E₂ é reduzida e, portanto, não ocorre o pico de LH para promover a ovulação (Nelsen et al., 1985; Rutter e Randel, 1986). Essas novilhas tem o estro detectado mas, como esse comportamento não é seguido de ovulação e formação de CL, durante a avaliação pré-ovulação, essas novilhas são descartadas, uma vez que não

apresentam CL, reduzindo assim a taxa de aproveitamento desse grupo de animais.

Outro fator que pode influenciar o aproveitamento dos animais sincronizados com PGF₂α é a eficiência na observação e detecção do estro. Como a aplicação do hormônio é realizada somente com base no histórico das novilhas, a correta identificação dos animais em estro é importante, pois vai determinar a resposta ao tratamento, a dispersão da resposta e, conseqüentemente, o aproveitamento para TE. Quando a sincronização é eficiente ocorre maior concentração de estros em determinado período, o que pode aumentar a taxa de detecção, pois animais em proestro e estro tendem a manifestar maior atividade sexual na presença de maior número de animais no grupo sexualmente ativo (Orihuela et al., 1983; Diskin e Sreenan, 2000). Esse aspecto pode ter contribuído para aumentar a eficiência da detecção de estro e o aproveitamento no presente estudo.

O aproveitamento de animais sincronizados com PGF₂α neste estudo foi superior ao relatado por Bó et al. (2004), que encontraram valores de 59%, mas foi semelhante ao encontrado por Spell et al. (2001) que obteve 91% de aproveitamento. A diferença encontrada em relação ao primeiro estudo pode estar relacionada à eficiência na detecção dos estros. Segundo Bó et al. (2004) para os animais que são sincronizados com duas aplicações de PGF₂α com intervalos de 11 a 14 dias, sem avaliação do histórico de estro dos animais, a resposta é em torno de 80% de manifestação de estro e aproveitamento de 50% para TE.

A manifestação/detecção do estro não tem influência no aproveitamento dos animais que receberam implante de P4, pois todas as novilhas tratadas foram avaliadas, independentemente da manifestação de estro. Portanto, o desenvolvimento uterino e atividade ovariana são os principais responsáveis pela capacidade de resposta dos animais ao protocolo (Bruke et al., 2001; Amaral, 2009). O fato de todas as novilhas que receberam implante estarem em anestro favoreceu a menor taxa de aproveitamento, quando comparado aos demais tratamentos neste estudo. Lammoglia et al. (1998) verificaram que a ciclicidade influencia a resposta ao tratamento hormonal com P4 e E₂. Esses autores encontraram manifestação de estro de 76% para novilhas ciclando e 64% para novilhas em anestro. Algumas novilhas podem não ovular por apresentarem folículos pequenos devido à baixa concentração do E₂ (Looney et al., 2006) e, por esse motivo, acabam sendo consideradas como não aptas para a TE, contribuindo para reduzir a taxa de aproveitamento dos animais submetidos ao tratamento com implante de P4, pois o único motivo de descarte para TE é a ausência de CL.

Outro fator que pode ter contribuído para a menor taxa de aproveitamento dos animais tratados com o implante de P4 é o fato de alguns animais vão apresentar manifestação de estro por ação do E₂ aplicado na remoção do implante, mas sem apresentarem ovulação. Isto ocorre devido à ação de E₂ exógeno sobre o hipotálamo. Rhodes et al. (2003) encontraram que aproximadamente 79% dos animais detectados em estro ovularam após o tratamento com E₂. Os autores acreditam que essa falha na

ovulação está relacionada com a maturidade do folículo dominante, indicando que seria necessário algum período entre o final do tratamento com P4 e a aplicação de E₂ para que o folículo adquira capacidade ovulatória. O número de animais que falham em ovular é maior quando a aplicação do E₂ é feita no momento da retirada do implante, quando comparados com animais que receberam o E₂ 18 horas após a remoção do mesmo (Rhodes et al., 2003).

Bó et al. (2006) relataram 70,5% de aproveitamento para receptoras mestiças com ciclicidade regular, sincronizadas com implantes de P4. A avaliação prévia do trato reprodutivo realizada para selecionar as receptoras aptas para receberem implante pode ter contribuído para o maior aproveitamento encontrado neste estudo. Já, Nasser et al. (2004) e Bó et al. (2002) encontraram taxas de 83% e 84%, respectivamente. O menor aproveitamento encontrado no presente estudo pode estar relacionado à condição fisiológica das novilhas tratadas, uma vez que nos estudos acima referidos os animais não eram pré-pubescentes, e conseqüentemente apresentam melhores respostas (Lammoglia et al.; 1998).

O baixo aproveitamento não implica em desvantagem para os protocolos hormonais em relação aos demais tratamentos. Apesar do custo elevado dos tratamentos com progesterona, quando comparados com a PGF₂α, esses tratamentos permitem a utilização de animais em anestro que não seriam aproveitados até apresentarem estro natural. Com isso, é possível aumentar consideravelmente o número de embriões transferidos na central e reduzir

o custo com a manutenção de animais ociosos na propriedade. O uso dos protocolos hormonais reduz não somente o período de permanência das receptoras nas centrais, mas reduz, também, o número de receptoras necessárias (Beltrame et al., 2007).

4.3 Influência do tratamento de sincronização, estágio de desenvolvimento embrionário, dia do estro da receptora, sincronia entre o embrião e o dia do estro da receptora e época do ano sobre os índices de gestação aos 30 e 60 dias e mortalidade embrionária entre 30 e 60 dias de gestação

O resultado da análise da regressão logística para as variáveis testadas no modelo e sua respectiva influência nos índices de gestação (30 e 60 dias) e mortalidade embrionária é mostrado na tabela 3.

Entre as variáveis testadas no modelo, o tipo de tratamento de sincronização (estro natural, PGF₂α e P4), o dia do estro da receptora (D6, D7, D8, D9 e D10) e a sincronia entre o dia do estro da receptora e o embrião não influenciaram o índice de

gestação aos 30 e 60 dias. Os fatores que se mostraram significativos foram o estágio de desenvolvimento embrionário e a época do ano em que a TE foi realizada, sendo que o desenvolvimento embrionário afeta a gestação aos 30 e aos 60 dias, enquanto a época do ano influencia somente o índice de gestação aos 30 dias. A mortalidade embrionária entre os 30 e 60 dias não foi influenciada por nenhuma das variáveis testadas, sendo que não foi realizada análise da influência da sincronia entre o embrião e o dia do estro sobre a mortalidade embrionária.

Os índices de gestação aos 30 e 60 dias de acordo com o tratamento de sincronização de estro, estágio de desenvolvimento embrionário, dia do estro da receptora, bem como época da TE estão contidos nas tabelas 4 e os resultados são discutidos separadamente nos tópicos seguintes.

As taxa de mortalidade embrionária entre 30 e 60 dias de gestação em função do tipo de sincronização, estágio de desenvolvimento embrionário, dia do estro da receptora e época do ano são mostrados na tabela 5. A taxa média de mortalidade embrionária foi de 6,46% e será discutida no tópico 4.8.

Tabela 3. Análise de regressão logística sobre a influência das variáveis testadas sobre o índice de gestação e mortalidade embrionária.

Variável	Diagnóstico de gestação aos 30 dias			Diagnóstico de gestação aos 60 dias			Mortalidade embrionária		
	GL	χ^2	P	GL	χ^2	P	GL	χ^2	P
Intercepto	1	2.89	0.0892	1	6.79	0.0092	1	145.96	<0.0001
Tratamento	2	3.08	0.2139	2	1.26	0.5323	2	2.64	0.2676
Embrião	2	11.17	0.0037	2	8.99	0.0112	2	1.00	0.6056
Dia	4	4.59	0.3321	4	3.53	0.4737	4	1.79	0.7743
Época	1	4.26	0.0390	1	2.21	0.1370	1	1.53	0.2165
Embrião x dia	8	1.85	0.9852	8	3.03	0.9326	-	-	-
Razão de Max. Verossimilhança	53	81.07	0.0078	53	80.00	0.0081	56	51.47	0.6469

Tabela 4. Índices de gestação aos 30 e 60 dias em função do tipo de sincronização do estro, do estágio de desenvolvimento embrionário, do dia do estro da receptora e da época do ano em que a TE foi realizada.

Variável		Diagnóstico de gestação aos 30 dias			Diagnóstico de gestação aos 60 dias		
		%	N	P	%	N	P
Tipo de sincronização do estro	Estro natural	44,5	798/1793	0.1224	42,0	754/1793	0.3019
	PGF ₂ α	49,3	688/1394	0.5821	45,6	637/1394	0.7999
	Implante de P4	47,8	153/320	-	44,3	142/320	-
Estádio embrionário	Blastocisto	34,4 ^b	101/293	0.0017	32,7 ^b	96/293	0.0048
	Blastocisto expandido	47,0 ^a	1369/2907	0.8873	44,0 ^a	1281/2907	0.9217
	Blastocisto eclodido	55,0 ^a	169/307	-	50,1 ^a	156/307	-
Dia do estro da receptora	Dia 6	39,7	136/342	0.8923	37,4	128/342	0.8573
	Dia 7	47,6	370/776	0.1366	45,1	350/776	0.2100
	Dia 8	49,8	720/1445	0.1860	46,5	673/1445	0.2397
	Dia 9	46,5	323/694	0.7053	42,7	297/694	0.7449
	Dia 10	36,0	90/250	-	33,8	85/250	-
Período do ano	Seco	47,9 ^a	1070/2231	0.0390	44,6	996/2231	0.1370
	Chuvoso	44,5 ^b	569/1276	-	42,0	537/1276	-

^{a, b, c} Valores seguidos por letras distintas diferem ($P < 0,05$) entre si pelo método de máxima verossimilhança teste de regressão logística.

Tabela 5. Índices de mortalidade embrionária entre 30 e 60 dias em função do tipo de sincronização do estro, do estágio de desenvolvimento embrionário, do dia do estro da receptora e da época do ano em que a TE foi realizada.

Variável		Mortalidade embrionária		
		%	N	P
Tipo de sincronização do estro	Estro natural	5,5	44/798	0.1773
	PGF ₂ α	7,4	51/688	0.4746
	Implante de P4	7,1	11/153	-
Estádio embrionário	Blastocisto	4,9	5/101	0.4256
	Blastocisto expandido	6,4	88/1369	0.9964
	Blastocisto eclodido	7,7	13/169	-
Dia do estro da receptora	Dia 6	5,9	8/136	0.8809
	Dia 7	5,4	20/370	0.5364
	Dia 8	6,4	45/704	0.8434
	Dia 9	8,1	26/323	0.2618
	Dia 10	5,6	5/90	-
Período do ano	Seco	6,9	74/1070	0.2165
	Chuvoso	5,6	32/569	-

4.4 Índices de gestação aos 30 e 60 dias após a transferência de embriões produzidos *in vitro* para as receptoras manifestando estro natural ou induzido com hormônios

O método utilizado para a sincronização do estro das receptoras, quando comparado com animais manifestando estro natural, não influenciou os índices de gestação aos 30 e 60 dias após a transferência de embriões produzidos *in vitro*, conforme mostrado na tabela 4. O índice de gestação médio no presente estudo foi de 46,73% aos 30 dias e 43,71% aos 60 dias de gestação, estão de acordo com os relatados na literatura, que estão entre 40 e 50%, para gestações

obtidas com embriões produzidos *in vitro* (Hasler, 1998; McMillan, 1998; Farin et al., 1999; Faber et al., 2003; Peterson e Lee, 2003; Nasser et al., 2004).

A figura 2 mostra os valores prováveis para o índice de gestação considerando apenas o efeito do tratamento, sem a influência das outras variáveis. A diferença numérica está relacionada a outros fatores como estágio de desenvolvimento embrionário e época do ano em que a transferência foi realizada, pois, apesar dos valores observados no gráfico (figura 2), não existe diferença estatística ($P > 0,05$) segundo o modelo de regressão logística.

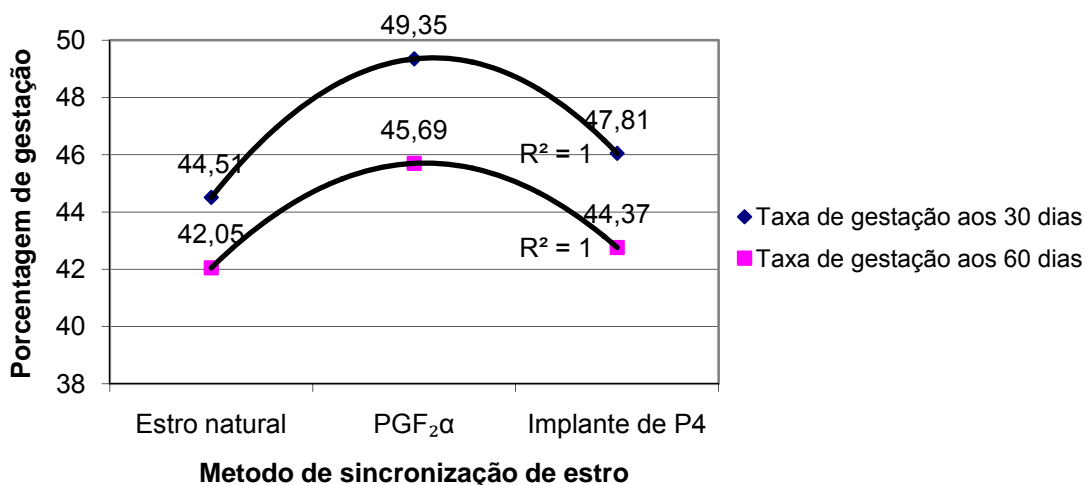


Figura 2. Valores prováveis preditos para o índice de gestação aos 30 e 60 dias, obtidos pela regressão logística considerando apenas o efeito do tratamento

O grupo de animais utilizado como receptoras no presente estudo apresentava-se homogêneo com relação à categoria animal, manejo sanitário, nutricional e escore da condição corporal. Esta característica de igualdade entre os animais ajudou a reduzir as possíveis diferenças no índice de gestação dos animais submetidos à

sincronização de estros, uma vez que esses fatores podem interferir com a capacidade de resposta e com o índice de gestação para cada tratamento, sendo que o escore de condição corporal é um dos principais fatores que influenciam o índice de gestação para os diferentes tratamentos de sincronização utilizados (Looney et al., 2006).

Sabe-se que o fato dos animais estarem ciclando ou em anestro influencia diretamente o índice de gestação após a indução do estro com protocolos a base de P4 e E₂ (Rhodes et al., 2003). O grupo de animais sincronizados com implante intravaginal de progesterona foi formado basicamente por novilhas pré-uberres ou em anestro, enquanto as novilhas dos demais tratamentos apresentavam atividade ovariana cíclica normal. A diferença que existe com relação à ciclicidade dos animais, e que poderia influenciar negativamente o índice de gestação para o grupo de animais sincronizados com implante de P4, não foi verificada no presente estudo. Este resultado pode estar relacionado com a avaliação prévia dos animais que é rotineiramente realizada antes da transferência de embriões. Todos os animais foram submetidos à avaliação ginecológica por palpação transretal e/ou ultrassonografia para confirmar a presença de corpo lúteo e avaliar sua qualidade morfológica e ecogenicidade. Desta forma, foram selecionados para serem submetidos à transferência somente aqueles animais que apresentavam regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário e atividade ovariana adequada para responder ao protocolo hormonal com ovulação e formação de CL, tornando essas novilhas aptas na avaliação para TE. Portanto, os animais com deficiências na regulação hormonal e conseqüentemente baixa atividade ovariana (foliculos pequenos e ausência de ovulação) e que não responderam à sincronização foram excluídos da transferência no momento da avaliação. Como esses animais excluídos são os responsáveis pelos baixos índices de gestação dos

protocolos, não houve influência deste grupo no presente estudo.

A seleção prévia dos animais, e que está associada à menor taxa de aproveitamento das novilhas submetidas à sincronização de estro com implantes intravaginais de progesterona (Tabela 2), pode ter contribuído para minimizar a influência da sincronização no índice de gestação ao final do estudo.

Os resultados encontrados neste estudo, ou seja, a não influência do método de sincronização no índice de gestação, são similares aos reportados por Bó et al. (2004); que encontraram índices de gestação de 32% para PGF₂ α e 37% para o implante de P4; e Barreiros et al. (2006) que não encontraram diferenças significativas nos índices de gestação entre novilhas sincronizadas com PGF₂ α ou implantes de P4. Já o estudo realizado por Bó et al. (2002) verificou diferença estatística ($p < 0,01$) nos índices de gestação para receptoras sincronizadas com PGF₂ α ou implantes de P4, sendo que os animais do primeiro grupo apresentaram melhores resultados, de 63% e 53%, respectivamente. Esses autores discorrem que esta diferença pode estar relacionada a outros fatores, tais como a influência do estágio de desenvolvimento embrionário, categoria da receptora, uma vez que nesse estudo foram utilizadas vacas e novilhas como receptoras; condição corporal da receptora e a ordem da transferência, uma vez que os índices de gestação diminuem conforme se aumenta a ordem da transferência.

Para os embriões produzidos *in vivo*, os resultados sobre a influência do método

da sincronização sobre o índice de gestação são semelhantes aos encontrados para embriões produzidos *in vitro*. Spell et al. (2001) não encontraram diferença no índice de gestação de receptoras sincronizadas com $\text{PGF}_2\alpha$ ou protocolos hormonais com implante de P4.

Bényei et al. (2006) não encontraram diferença no índice de gestação entre receptoras que apresentaram estro natural ou sincronizados com $\text{PGF}_2\alpha$ ou implantes de P4, mas, quando a comparação foi entre a $\text{PGF}_2\alpha$ e o implante de P4, este apresentou melhor resultado. Assim como para os embriões produzidos *in vitro*, a avaliação realizada antes da transferência reduz o impacto da sincronização no índice de gestação. Isto se deve ao fato de que todos os animais transferidos apresentam CL com capacidade de manter a gestação e, a partir dessa fase, outros fatores com o embrião, época do ano e qualidade da receptora determinam o índice de gestação (McMillan, 1998).

Siqueira et al. (2009) realizaram estudo com receptoras mestiças submetidas a protocolos de sincronização a base de implantes de P4 e avaliaram as principais características do CL, ou seja, tamanho, textura, presença de cavidade e concentração de P4 e concluíram que nenhuma das características avaliadas afetou de forma significativa o índice de gestação para embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*, e que somente o tipo do embrião afetou de forma significativa o índice de gestação, com resultados melhores para os embriões produzidos *in vivo* (58,8%) quando comparados com os produzidos *in vitro* (31,0%).

4.5 Índices de gestação aos 30 e 60 dias após a transferência, segundo o estágio de desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro*

O estágio de desenvolvimento embrionário influenciou o índice de gestação das receptoras aos 30 e 60 dias após a transferência. Os embriões mais desenvolvidos, ou seja, blastocisto expandido e blastocisto eclodido apresentaram melhores índices de gestação, quando comparados os blastocistos, que tem o estágio de desenvolvimento menos adiantado. Entre blastocisto expandido e eclodido não houve diferença significativa como demonstrado na tabela 4 e figura 3.

São poucos os dados da literatura em relação à influência do estágio de desenvolvimento embrionário sobre os índices de gestação para embriões produzidos *in vitro*. Hasler (1998) analisou transferências por um período de cinco anos e não encontrou influência do desenvolvimento embrionário no índice de gestação.

A qualidade e a maturação do ovócito são influenciadas por vários fatores, tais como tamanho do folículo e a fase do ciclo estral (Lonergan, 2008), além do efeito doadora (raça, idade, nutrição), que vão causar grande impacto na taxa de clivagem e consequentemente no desenvolvimento embrionário e na sua sobrevivência durante a gestação (Gilchrist, 2008). Outro fator que pode implicar na divergência dos resultados são os meios de cultivos utilizados, pois existe grande variação na composição e nos resultados obtidos por cada um (Lonergan, 2008). Modificações nas condições de cultivo, principalmente

pós-fecundação, podem ter impacto significativo na qualidade e viabilidade dos blastocistos produzidos. Contudo, melhorias no rendimento dos embriões

produzidos somente são obtidas com a melhoria da qualidade do ovócito submetido à maturação *in vitro* (Lonergan et al., 2006).

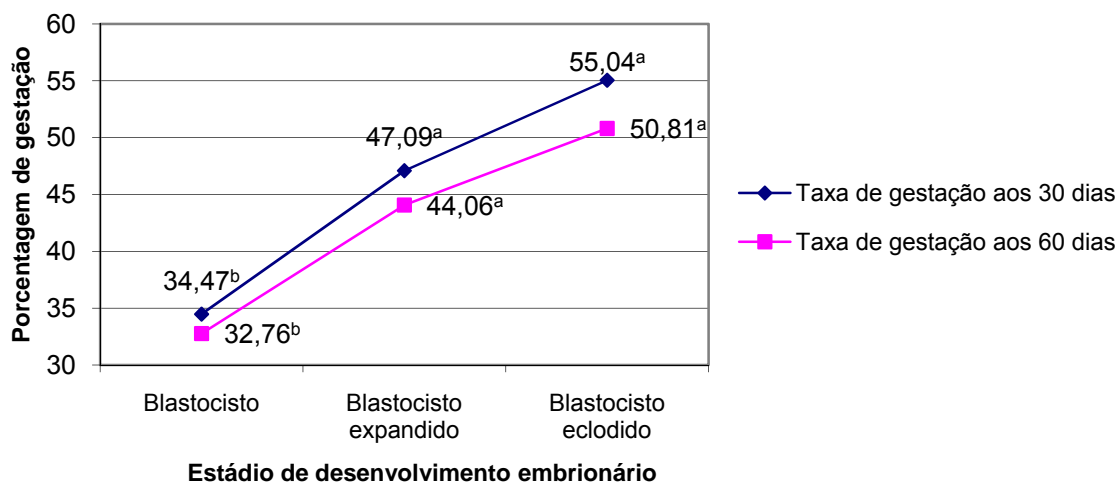


Figura 3. Valores prováveis preditos para o índice de gestação aos 30 e 60 dias, obtidos pela regressão logística considerando apenas o efeito do estágio de desenvolvimento embrionário.

Poucos são os estudos que comparam a influência do estágio de desenvolvimento embrionário nos índices de gestação para embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo* (Hasler, 1998; Faber et al., 2003; Looney et al., 2006). Todavia, a mesma divergência é encontrada na literatura para embriões produzidos *in vivo*. Nos trabalhos realizados por Schineider et al. (1980) e por Wright (1981), os autores observaram que as estruturas mais desenvolvidas, como blastocistos expandidos e eclodidos, resultam em maiores índices de gestação, quando comparadas com estruturas mais jovens, tais como mórulas e blastocistos iniciais. Por outro lado Hasler (2001) e Spell et al. (2001) não verificaram influência do estágio de desenvolvimento embrionário no índice de gestação, enquanto Peixoto

et al. (2007), trabalhando com embriões zebuínos produzidos *in vivo*, encontraram maiores índices de gestação para os embriões com menor estágio de desenvolvimento, ou seja mórulas e blastocistos iniciais.

Com relação à influência do estágio de desenvolvimento embrionário no índice de gestação encontrado para os embriões produzidos *in vivo*, outros fatores relacionados com a metodologia de cada estudo podem ter contribuído para a divergência dos resultados. Segundo Peixoto et al. (2007), a época do ano da transferência, qualidade do embrião e sincronia entre a doadora e a receptora vão influenciar o índice de gestação. Como esses fatores não foram padronizados nos estudos avaliados (Schineider et al., 1980; Wright, 1981;

Hasler, 2001; Spell et al., 2001; Peixoto et al., 2007), é possível que esses fatores, bem como suas interações, e não somente o estágio de desenvolvimento embrionário tenha interferido com os resultados encontrados por esses autores.

As diferenças entre os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* com relação a sua morfologia, fisiologia e metabolismo, associado à subjetividade das análises quanto à avaliação da qualidade embrionária, podem ser as responsáveis pelas diferenças encontradas entre os dois grupos com relação ao desenvolvimento embrionário e sua respectivo índice de gestação, pois para os embriões produzidos *in vitro* o estágio de desenvolvimento é um indicativo de qualidade, o que parece não ocorrer para os embriões produzidos *in vivo* (Farin et al., 2004).

Com relação aos resultados encontrados no presente estudo, o fato de todos os embriões serem transferidos no dia sete após a fecundação *in vitro* e, portanto, apresentarem a mesma idade, mostra que alguns embriões apresentam desenvolvimento mais acelerado que outros. Essa diferença pode indicar que esses embriões são metabolicamente mais ativos em relação aos demais, apresentando qualidade superior, o que pode resultar em maiores índices de gestação, tais como obtida por esse grupo (Looney et al., 2006).

Outro aspecto relacionado com a capacidade embrionária em estabelecer a gestação é resultante da sua habilidade de romper a zona pelúcida (ZP). A falha desses embriões em eclodir, após a fecundação *in vitro* e a TE, tem sido

reportada com um dos fatores responsáveis pelos baixos índices de gestação observada com este tipo de embrião (Vajta et al., 1997). O rompimento da ZP é realizado por meio da lise promovida por enzimas proteolíticas e pelo aumento da pressão hidrostática causada pela expansão da blastocèle (Flechon e Renard, 1978). A expansão do blastocisto é um sinal que esses embriões estão metabolicamente ativos, e esse fator pode estar relacionado com os maiores índices de gestação obtidos quando blastocistos expandidos e eclodidos são transferidos.

4.6 Índices de gestação aos 30 e 60 dias em receptoras inovuladas em diferentes dias após a manifestação do estro

Os índices de gestação em função da sincronia entre o dia do estro da receptora e o embrião estão apresentados na tabela 4 e figura 4. Apesar da diferença numérica observada para as transferências realizadas com sete, oito e nove dias após a manifestação do estro da receptora observados na figura 4, que leva em consideração apenas o efeito do dia do estro, o intervalo entre a manifestação do estro da receptora e a transferência não influenciou os índices de gestação segundo o método de máxima verossimilhança. A diferença numérica encontrada nos valores está relacionada aos outros fatores que se mostraram significativos na regressão logística. O efeito do estágio de desenvolvimento embrionário e o período do ano (seco ou chuvoso) em que a transferência foi realizada são os fatores que influenciam os índices de gestação segundo o modelo adotado.

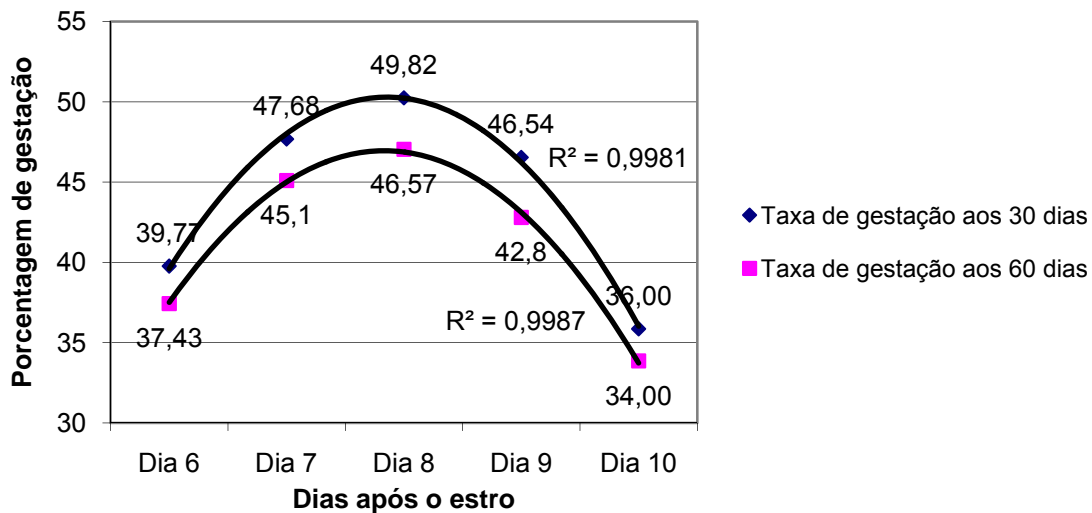


Figura 4. Valores prováveis preditos para o índice de gestação aos 30 e 60 dias, obtidos pela regressão logística considerando apenas o efeito do dia da manifestação do estro.

Poucos são os trabalhos de literatura que estudaram a relação da sincronia entre a idade do embrião e o dia da manifestação do estro de receptoras sobre o índice de gestação para embriões produzidos *in vitro* (Hasler, 1989; Hasler et al., 1995; Looney et al., 2006). Hasler (1989) não encontrou diferenças nos índices de gestação em função da sincronia para D8, D7, mas houve diferença significativa para as receptoras D6. Em outro estudo, Hasler et al. (1995) não encontraram diferença no índice de gestação para embriões produzidos *in vitro*, quando as receptoras utilizadas apresentaram estro 36 horas antes ou após da data da fertilização dos ovócitos. De maneira geral, conforme levantamento realizado por Looney et al. (2006), não existe diferença nos índices de gestação quando se utiliza receptoras que manifestaram estro 24 horas antes ou após a fecundação. Logo, mais estudos são necessários para avaliar a sincronia entre embrião e a receptora para embriões produzidos *in vitro*,

principalmente os estros manifestados dez dias antes da data provável da TE.

Para embriões produzidos *in vivo*, os resultados avaliando a sincronia entre a doadora e a receptora são semelhantes aos encontrados para os embriões produzidos *in vitro*. Spell et al. (2001) não encontraram diferenças no índice de gestação quando utilizaram receptoras que manifestaram estro de seis a nove dias antes da data da transferência. Hasler (2001) avaliou a sincronia entre a doadora e receptora e não encontrou influência no índice de gestação quando embriões, a fresco ou congelados, foram transferidos em receptoras D6, D7 e D8.

O estabelecimento da gestação em receptoras de embrião depende de complexa interação entre o embrião, ambiente uterino e o CL (Roberts et al., 1996). O principal fator que determina o reconhecimento materno é a produção de IFN- τ por parte do embrião sob o estímulo da progesterona, que promove

ainda alterações no ambiente uterino influenciando o crescimento e desenvolvimento do embrião (Staggs et al., 1998). A produção contínua por parte do CL, durante o período em que a transferência é realizada, pode contribuir para minimizar o efeito da sincronia entre a receptora e o embrião no índice de gestação.

Apesar dos índices de gestação não apresentarem diferença estatística em função do dia do estro no presente estudo, o dia de sua manifestação, bem como a distribuição da resposta aos protocolos hormonais devem ser bem avaliados e considerados para planejar as aplicações dos hormônios em função da data provável da TE. Isto é importante para as centrais de receptoras, pois quando se realiza a sincronização do estro com o objetivo de obter animais D8, a dispersão observada na resposta aos protocolos vai fazer com que a resposta se concentre nos dias sete, oito e nove, com alguns animais manifestando estro nos dias seis e 10. Com isso a grande maioria dos animais vai estar no intervalo considerado apto para a TE, ou seja, entre seis e 10 dias, sem apresentar variações no índice de gestação entre esses dias.

Outro aspecto prático muito importante para as centrais de receptoras obtidos a partir dos resultados desse estudo é o fato da sincronia entre o estágio de desenvolvimento embrionário e o dia do estro da receptora não apresentar significância ($p = 0,9852$) segundo o

modelo estatístico adotado. Na rotina das centrais, no momento da transferência é realizada a escolha do embrião que será transferido em cada receptora é realizada buscando-se obter melhor sincronia entre o estágio de desenvolvimento embrionário e o dia da manifestação do estro da receptora, ou seja, as estruturas mais jovens (blastocistos) são inovuladas, preferencialmente, nas receptoras D6 e depois D7, enquanto que os blastocistos eclodidos são destinados as receptoras com maior intervalo entre o estro e a TE. O resultado deste estudo facilita o manejo no momento da transferência, pois não seria necessário escolher o embrião para determinada receptora em função do estágio de desenvolvimento embrionário e o dia do estro. Dessa maneira a transferência na central seria otimizada em relação ao tempo de serviço e mão de obra, reduzindo as apartações dos lotes de receptoras e o estresse desses animais no momento da TE.

4.7 Índices de gestação aos 30 e 60 dias em receptoras inovuladas durante o período seco ou chuvoso

O período do ano em que a transferência de embriões foi realizada, seco ou chuvoso, afetou significativamente ($P < 0,05$) o índice aos 30 dias de gestação de acordo com o método de máxima verossimilhança. O índice aos 60 dias de gestação não sofreu influência da época do ano. Os índices de gestação obtidas no presente estudo estão apresentados da tabela 4 e figura 5.

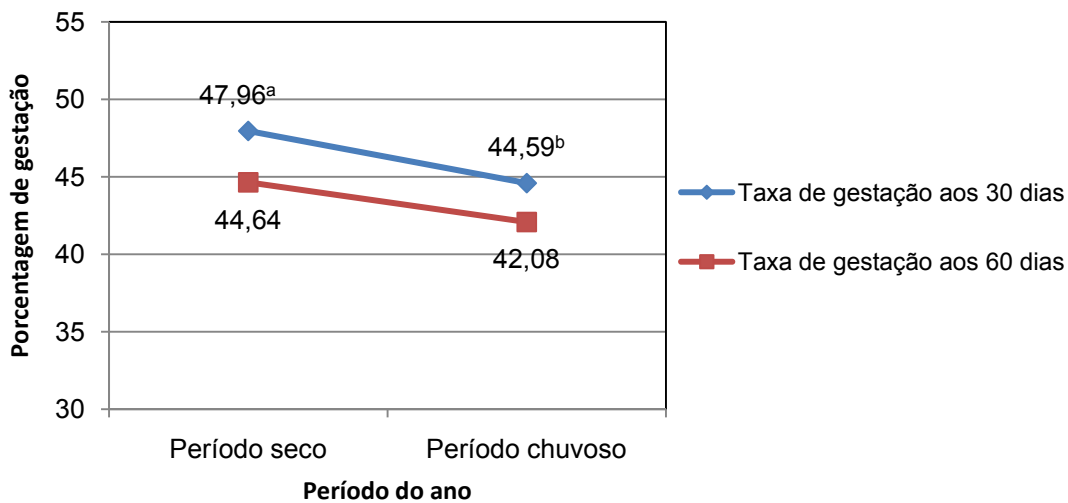


Figura 5. Valores prováveis preditos para o índice de gestação aos 30 e 60 dias, obtidos pela regressão logística considerando apenas o efeito da época do ano em que a TE foi realizada.

As receptoras que foram transferidas no período seco apresentaram maiores índices de gestação quando comparadas aquelas no período chuvoso. Essa influência da época do ano foi relatada por Hasler (1989), que encontrou redução nos índices de gestação durante os meses mais quentes do ano. Segundo Mapletoft et al. (1986) e Looney et al. (2006), menores índices de gestação são encontradas quando ocorrem deficiências, mesmo que pequenas, em um ou mais nutrientes na dieta de doadoras e receptoras de embrião.

As principais diferenças que ocorreram entre os períodos avaliados estiveram relacionadas com variações na temperatura e umidade relativa do ar, além da dieta das receptoras. A época das águas é caracterizada por altas temperaturas e, neste período, os animais mantidos exclusivamente a pasto. Ao contrário, no período da seca as temperaturas são mais baixas e é

realizada a suplementação com suplementos protéicos e energéticos.

A dieta pode ter contribuído para a diferença encontrada no índice de gestação, para os diferentes períodos do ano. Apesar da boa qualidade das pastagens no período chuvoso, a suplementação no período seco pode ter resultado em dieta mais equilibrada permitindo maiores índices de gestação. Esse quadro de baixo plano nutricional pode ocorrer principalmente no final do período chuvoso, quando as pastagens não apresentam qualidade suficiente e os animais ainda não estão sendo suplementados. O fato dos animais serem mantidos em áreas de cultura de milho durante o período seco pode contribuir para ocorrência desta situação, pois as novilhas são removidas dessas áreas em outubro para que a mesma possa ser preparada para a próxima safra, e nessa época as pastagens ainda não apresentam qualidade nutricional ideal. Isto ocorre porque a ingestão alimentar

insuficiente, seja por dietas de baixa qualidade ou quantidade em nutrientes, é a principal causa do baixo desempenho reprodutivo, reduzindo as taxas de sobrevivência embrionária. Isso ocorre, provavelmente, como consequência de alterações nos mecanismos neuroendócrinos, neurais e metabólicos (Ferreira, 1993; Hess et al., 2000).

Os hormônios protéicos são influenciados diretamente pela dieta e suas alterações levam às modificações na liberação de GnRH e LH e, também, atuam diretamente nas gônadas, controlando o crescimento folicular (Hess, 2000). O uso do protocolo hormonal pode levar receptoras com alguma deficiência nutricional e que não apresentariam estro, a ovularem devido à ação dos hormônios exógenos utilizados. Porém, como esses animais apresentam baixa atividade ovariana, o CL formado pode não ter qualidade suficiente para manter a gestação (Looney et al., 2006).

Apesar da possível influência da dieta, a temperatura pode ter tido maior impacto no índice de gestação em função do período do ano. Mesmo utilizando receptoras mestiças *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* que possuem maior resistência aos efeitos provocados pelo estresse calórico, esses animais estão sujeitos as alterações fisiológicas provocadas por altas temperaturas e umidade relativas do ar (Pires et al., 1999). As temperaturas no período experimental foram de aproximadamente 14°C nos meses de maio e junho até temperaturas por volta de 34°C durante os meses de outubro e novembro. A umidade relativa do ar foi, em média, de 30% no período seco e 94% durante o período das chuvas (Instituto Nacional de

meteorologia – INMET). Segundo Azevedo et al. (2005), essas temperaturas causam estresse calórico em novilhas mestiças, prejudicando os índices de gestação. Uma das principais ações deletérias do estresse calórico sobre os embriões está relacionada a alterações no ambiente uterino e que levam a interrupção da síntese protéica por parte do embrião, ocasionando sua morte (Hansen, 2002).

Apesar da sensibilidade dos embriões a temperaturas elevadas, e menores índices de gestação sob essas condições (Hansen, 2002), o principal efeito deletério da temperatura vai afetar o ovócito, reduzindo de forma substancial a sua qualidade quando as doadoras estão submetidas ao estresse calórico. Esse fato representa não somente menor taxa de clivagem dos embriões, mas, também, menor viabilidade dos embriões produzidos a partir desses ovócitos (Lonergan, 2008). Segundo Pegorer et al. (2007), o ovócito desempenha papel crucial para determinar a habilidade genética do embrião em resistir aos efeitos do estresse térmico, sendo que os embriões produzidos a partir de ovócitos de doadoras de raças européias são mais sensíveis a ação deletéria da temperatura quando comparados com as raças zebuínas.

4.8 Mortalidade embrionária entre 30 e 60 dias de gestação segundo o tipo de sincronização de estros, estágio de desenvolvimento embrionário, sincronia entre a receptora e o embrião, e período do ano

A mortalidade embrionária média encontrada neste estudo foi de 6,46% e as diferentes características avaliadas

(sincronização do estro, estágio de desenvolvimento embrionário, sincronia entre embrião e receptora e período do ano) não afetaram, de forma independente, a taxa de mortalidade embrionária ($P>0,05$), segundo o método de máxima verossimilhança, conforme apresentado na tabela 4.

A mortalidade embrionária após a monta natural, inseminação ou transferência de embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*, é a principal causa de falhas reprodutivas e resultando em menor número de produtos nascidos, reduzido progresso genético e consequentemente elevado prejuízo econômico para o setor pecuário (Dunne et al.; 2000).

São poucos os relatos na literatura com relação à taxa mortalidade embrionária para embriões produzidos *in vitro* entre 30 e 60 dias de gestação. Peterson e Lee (2003) encontraram que a cada 100 embriões transferidos, apenas 50 vão sobreviver até 24 dias de gestação e aproximadamente 40 embriões estarão vivos até 60 dias de gestação. Apesar das altas taxas de mortalidade embrionária reportadas nos primeiros dois meses de gestação, após esse período os índices encontrados são de aproximadamente 10% entre dois e sete meses (Hasler et al; 1998), mas os valores ainda são maiores do que os encontrados para embriões produzidos *in vivo* que foram, em média, de 5,0% para o mesmo período (King et al., 1985; Hasler et al., 1987).

Segundo Diskin e Sreenan (1980) e Dunne et al. (2000) após a inseminação artificial o índice de concepção de novilhas é próximo a 90% e a taxa de mortalidade embrionária está entre 22 e

32% e ocorre em sua grande maioria entre os dias 8 e 16 após a inseminação, sendo raras as perdas após esse período. A baixa taxa de mortalidade encontrada neste estudo (6,47%) com relação aos relatos da literatura pode estar relacionada ao período avaliado que foi entre 30 e 60 dias, pois segundo Peterson e Lee (2003) grande parte das perdas ocorrem antes dos 30 dias e, portanto esses animais já foram considerados não gestantes, não sendo contabilizados como mortalidade embrionária. Porém, os valores encontrados não foram correlacionados com o tipo de sincronização de estros, estágio de desenvolvimento embrionário transferido ou período do ano em que a transferência foi realizada, como no presente estudo.

As principais causas que determinam a mortalidade embrionária durante os 60 primeiros dias de gestação são os fatores relacionados com as receptoras, principalmente alterações no ambiente uterino (MacMillan, 1998) e, também, das características dos embriões produzidos *in vitro*, tais como alterações na formação do alantóide (Peterson e Lee, 2003).

Enquanto os embriões produzidos *in vivo* são mais dependentes dos fatores relacionados com o ambiente uterino da receptora e da resposta da receptora aos sinais emitidos pelo embrião (Hansen, 2002), os defeitos do embrião, malformação do alantóide e saco vitelínico, são os principais responsáveis pela mortalidade embrionária no caso dos embriões produzidos *in vitro*, próximo aos 35 dias de gestação (Peterson e Lee, 2003). Outro fator que determina a mortalidade embrionária são

as alterações provocadas no ambiente uterino devido ao estresse materno. O grau que o embrião será afetado pelo estresse vai depender não só da magnitude do fator estressante, mas, também, dos mecanismos adaptativos do embrião para responder ao estresse (Hansen, 2002).

A capacidade de resistência ao estresse e, conseqüentemente, a sobrevivência embrionária está relacionada a processos que envolvem sua compactação, formação do blastocisto, alongamento, secreção de IFN- τ e formação de tecidos placentários. Como essas funções estão comprometidas nos embriões produzidos *in vitro* (Peterson e Lee, 2003), acredita-se que a taxa de mortalidade esteja mais relacionada a fatores do embrião do que as variáveis estudadas no presente trabalho.

5. CONCLUSÕES

A utilização de implantes de progesterona em novilhas para sincronização do estro é mais eficiente para concentrar o estro de receptoras de embrião.

O uso de implantes de progesterona para a indução e sincronização do estro em novilhas pré-púberes, previamente selecionadas por tônus uterino e atividade ovariana, permite a utilização desses animais em programas de transferência de embriões.

Novilhas sincronizadas com implantes de progesterona apresentam índices de gestação semelhante aos demais tratamentos, apesar de não estarem em atividade ovariana cíclica regular.

Embriões produzidos *in vitro* com estágio de desenvolvimento mais adiantado resultam em maiores índices de gestação.

Embriões produzidos *in vitro* no dia sete pós-fecundação podem ser transferidos para receptoras com intervalos entre seis e nove dias após cio sem interferir na taxa de gestação.

A época do ano interfere no índice de gestação aos 30 dias de receptoras inovuladas com embriões produzidos *in vitro*.

O tipo de tratamento de sincronização do estro, o estágio de desenvolvimento embrionário, a sincronia entre o dia do estro da receptora e o embrião, e o período do ano não afetaram, individualmente, a taxa de mortalidade embrionária entre 30 e 60 dias após a transferência de embriões produzidos *in vitro*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLRICH, R. D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v. 77, p. 2738-2744, 1994.

ALVES, N. G.; COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D. *et al.* Atividade ovariana em fêmeas bovinas da raça Holandesa e mestiças Holandês-Zebu, durante dois ciclos estrais consecutivos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, p. 627-634, 2002.

ALVES, N. G.; PIRES, M. F. A.; SILVA FILHO, J. M.; *et al.* Intervalos do início e do final do estro à ovulação

em vacas da raças Gir e Guzerá após luteólise natural ou induzida por prostaglandina. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, p. 430-437, 2003.

AMARAL, T. F. Influência do diâmetro do folículo dominante sobre as taxas de ovulação e gestação de vacas da raça Gir em anestro pós-parto e submetidas a protocolo hormonal com progesterona associada a estradiol. 2009. 60p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ASDELL, S. A.; ALBA, J.; ROBERTS, J. S. *et al.* The levels of ovarian hormones required to induce heat and other reactions in the ovariectomized cow. *Journal of Animal Science*, v. 4, p. 277-284, 1945.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE ZEBU. Disponível em: <<http://www.abcz.org.br>>. Acesso em: 15 de novembro de 2009.

AZEVEDO, M.; PIRES, M. F. A.; SATURNINO, H. M. E. *et al.* Estimativa de níveis críticos superiores do índice de temperatura e umidade para vacas leiteras 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês-zebu em lactação. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, p. 200-208, 2005.

BARREIROS, T. R. R.; BLASCHI, W.; BORSATO, E. A. *et al.* Comparação de taxas de prenhes entre receptoras com corpos lúteos cavitário ou compacto após protocolo de sincronização com cloprostenol ou transferência de embrião em tempo fixo. *Ciências Agrárias*, v. 27, p. 657-664, 2006.

BARRETO, M. B. P.; SANTOS, R. M. B.; WISCHRAL, A. *et al.* Pelvimetria e pelvilogia em fêmeas bovinas da raça Girolanda em diferentes estágios reprodutivos. *Ciência Veterinária Tropical*, v. 7, p. 131-139, 2004.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 205-211, 2007.

BARUSELLI, P. S.; MARTINS, C. M.; SÁ FILHO, M. F. *et al.* Novos avanços no tratamento de doadoras e receptoras de embrião bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, p. 151-156, 2005.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O. *et al.* The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 479-486, 2004.

BEAL, W. E. Application of knowledge about corpus luteum function in control of estrus and ovulation in cattle. *Theriogenology*, v. 45, p. 1399-1411, 1996.

BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle and horses: role of intrafollicular factors. *Reproduction*, v. 132, p. 365-377, 2006.

BELTRAME, R. T.; BARIONI, L. G.; MAESTRI, B. D. *et al.* Economic optimization of the number of recipients in bovine transfer programs. *Scientia Agricola*, v. 64, p. 221-226, 2007.

- BÉNYEI, B.; KOMLÓSI, I.; PÉCSI, A. *et al.* The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. *Animal Reproduction Science*, v. 93, p. 268-297, 2006.
- BINELLI, M.; IBIAPINA, B. T.; BISINITTO, R. S. Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 1-7, 2006.
- BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R. *et al.* Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*, v. 56, p.1451-1463, 2001.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D. *et al.* The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v. 57, p. 53-72, 2002.
- BÓ, G. A.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; *et al.* Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32, p. 1-22, 2004.
- BÓ, G. A.; PICINATO, D. PERES, L. *et al.* Protocolos de transferência de embriões em tempo fixo para receptoras de embriões bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 17-23, 2006.
- BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M. *et al.* Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, p. 595-604, 2001.
- BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M. *et al.* Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, p. 85-92, 2003.
- BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M. *et al.* Desenvolvimento luteal e concentração plasmática de progesterona em vacas das raças Gir e Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, p. 276-283, 2003b.
- BRITT, J. H.; SCOTT, R. G.; ARMSTRONG, J. P. *et al.* Determinants of estrous behavior in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 69, p. 2195-2200, 1986.
- BROADBENT, P. J.; STEWARD, M.; DOLMAN, D. F. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology*, v. 35 p. 125-139, 1991.
- BURANTI Jr, J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 190-196, 2007.
- BURKE, C. R.; MUSSARD, M. L.; GRUM, D. E. *et al.* Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. *Animal Reproduction Science*, v. 66, p. 121-174, 2001.
- COELHO, L. A.; ESPER, S. R.; ALVAREZ, R. H. *et al.* Produção *in vitro* de embriões bovinos: Utilização de

- diferentes fontes de gonadotrofinas na maturação de oócitos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, p. 1117-1121, 2002.
- DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Expression and detection of oestrus in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, v. 40, p. 481-491, 2000.
- DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Fertilisation and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial. *Journal Reproduction Fertility*, v. 59, p. 463-468, 1980.
- DOBSON, H.; TEBBLE, J. E.; SMITH, R. F. *et al.* Is stress important? *Theriogenology*, v. 55, p. 65-73, 2001.
- DUFFY, P.; CROWE, M. A.; AUSTIN, E. J. *et al.* The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. *Theriogenology*, v. 61, p. 725-734, 2004.
- DUNNE, L. D.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Embryo and fetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Animal Reproduction Science*, v. 58, p. 39-44, 2000.
- FABER, D. C.; MOLINA, J. A.; OHLRICH, C. L. *et al.* Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology*, v. 59, p. 125-138, 2003.
- FACÓ, O.; LÔBO, R. N. B.; FILHO, R. M. *et al.* Idade ao primeiro parto e intervalo de partos de cinco grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, p. 1920-1926, 2005.
- FARIN, C. R.; FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A. Development of fetuses from *in vitro*-produced and cloned bovine embryos. *Journal of Animal Science*, v. 82, p. 53-62, 2004.
- FARIN, P.W.; SLENNING, B. D.; BRITT, J. H. Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced in vivo or *in vitro*. *Theriogenology*, v. 52, p. 659-670, 1999.
- FERNANDES, C. A. C. Inovulações não cirúrgicas e taxa de gestação de gestação de receptoras de embrião. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, p. 263-266, 1999.
- FERREIRA, A. M. Nutrição e atividade ovariana em bovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 28, p. 1077-1093, 1993.
- FLECHON, J.; RENARD, J. P. A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 53, p. 9-12, 1978.
- FLORES, E. F.; WEIBLEN, R.; VOGEL, F. S. F. *et al.* A infecção pelo vírus da Diarréia Viral Bovina (BVD) no Brasil – histórico, situação atual e perspectivas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 25, p. 125-134, 2005.
- FOOTE, R. H. Estrus detection and estrus detection aids. *Journal of Dairy Science*, v. 658, p. 248-256, 1975.
- FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals.

- Biology of Reproduction*, v. 50, p. 225-232, 1994.
- GILCHRIST, R. B. Interações oócitos-células do cumulus regulando a qualidade do oócito. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 36, p. 257-278, 2008.
- GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L. J. *et al.* Emergence and deviation of follicular waves in cattle. *Theriogenology*, v. 48, p. 75-87, 1997.
- GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M. *et al.* Selection of dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 1187-1194, 1996.
- GUIMARÃES, A. L.; ALVES, N. G.; COSTA, E. P. *et al.* Eficiências reprodutivas e produtivas em vacas das raças Gir, Holandês e Holandês x Zebu. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, p. 641-647, 2002.
- HANSEL, W., BLAIR, R. M. Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. *Theriogenology*, v. 45, p. 126-1294, 1996.
- HANSEN, P. J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective *Journal of Animal Science*, v. 80, p. 33-44, 2002.
- HASLER, J. F.; McCAULEY, A. D.; LATHROP, W. F. *et al.* Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology*, v. 27, p. 139-168, 1987.
- HASLER, F. J. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, v. 59, p. 1401-1415, 2001.
- HASLER, F. J. The current status of oocyte recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. *Journal of Animal Science*, v. 76, p. 52-74, 1998.
- HASLER, F. J.; HENDERSON, W. B.; HURTGEN, P. J. *et al.* Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calves results. *Theriogenology*, v. 43, p. 141-152, 1995.
- HENRICKS, D. M.; LON, J. T.; HILL, J. R. *et al.* The effect of prostaglandin f 2α during various stages of the oestrous cycle of beef heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 41, p. 113-120, 1974.
- HESS, B. W.; LAKE, S. L.; SCHOLLJEGERDES, E. J. *et al.* Nutritional controls of beef cow reproduction. *Journal of Animal Science*, v. 83, p. 90-106, 2000.
- HURNIK, J. F.; KING, G. F. Estrous behavior in confined beef cows. *Journal of Animal Science*, v. 65, p. 431-438, 1987.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. Disponível em: www.inmet.gov.br Acesso em 14 de fevereiro de 2010.
- JONES, A. L.; LAMB, G. C. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. *Theriogenology*, v. 69, p. 105-107, 2008.

- KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Animal Reproduction Science*, v. 26, p. 13-24, 1991.
- KING, K. K.; SEIDEL, G. E.; ELSDEN, R. P. Bovine embryo transfer pregnancies. I. Abortion rates and characteristics of calves. *Journal of Animal Science*, v. 61, p. 747-762, 1985.
- LALMAN, D. L.; KEISLER, D. H.; WILLIAMS, J. E. *et al.* Influence of postpartum weight and body condition change on duration of anestrus by undernourished suckled beef heifers. *Journal of Animal Science*, v. 75, p. 2003-2008, 1997.
- LAMMOGLIA, M. A.; SHORT, R. E.; BELLOWS, R. E. *et al.* Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in prepubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing inset and prostaglandin F2 α . *Journal of Animal Science*, v. 70, p. 1662-1670, 1998.
- LIMA, M.; FLORES, E. F.; WEIBLEN, R. *et al.* Caracterização de amostras do vírus da Diarréia Viral Bovina (BVD) tipos 1 e 2 para uso em vacinas. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, p. 35-41, 2004.
- LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCOARAN, D. *et al.* Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, v. 65, p. 137-152, 2006.
- LONERGAN, P. Produção *in vitro* de embriões bovinos – lidando com problemas. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 36, p. 349-360, 2008.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ, A. A. *et al.* Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. *Biology of Reproduction*, v. 69, p. 1424-1431, 2003.
- LOONEY, C. R.; NELSON, J. S.; SCHNEIDER, H. J. *et al.* Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology*, v. 65, p. 201-209, 2006.
- LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L. *et al.* Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal of Animal Science*, v. 70, p. 3615-3626, 1992.
- Manual Técnico do Programa Nacional de Controle e Erradicação da Brucelose e Tuberculose – PNCBT. Secretaria de Defesa Agropecuária – MAPA, Brasília, 47p. 2001.
- MAPLETOFT, R. J.; LINDSELL, C. E.; PAWTYSHYN, V. Effects of clenbuterol, body condition and non-surgical embryo transfer equipment on pregnancy rates in bovine recipients. *Theriogenology*, v. 25, p. 172, 1986.
- MARTÍNEZ, M.; BERGFELT, D.; ADAMS, G. *et al.* Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 57, p. 23-33, 1999.

- MARTÍNEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; BÓ, G. A. *et al.* Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 86, p. 37-52, 2005.
- MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 307-320, 1996.
- McMILLAN, W. H. Statistical models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer. *Theriogenology*, v. 50, p. 1053-1070, 1998.
- McMILLAN, W. H.; DONNISON, M. J. Understanding maternal contributions to fertility in contrasting pregnancy rates. *Animal Reproduction Science*, v. 57, p. 127-140, 1999.
- MINEIRO, A. L. B. B.; BEZERRA, E. E. A.; VASCONCELLOS, S. A. *et al.* Infecção por leptospira em bovinos e sua associação com transtornos reprodutivos e condições climáticas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 59, p. 1103-1109, 2007.
- NASSER, L. F.; REIS, E. L.; OLIVEIRA, A. M. *et al.* Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* × *Bos taurus* recipients. *Theriogenology*, v. 62, p. 1587-1584, 2004.
- NELSEN, T. C.; SHORT, R. E.; PHELPS, D. A. *et al.* Nonpuberal and mature cow influences growth and puberty in heifers. *Journal of Animal Science*, v. 61, p. 470-473, 1985.
- NOGUEIRA, M. F. G.; MELO, D. S.; CARVALHO, L. M. *et al.* Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF2a and eCG? *Theriogenology*, v. 61, p. 1283-1290, 2004.
- ODDE, KG. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *Journal of Animal Science*, v. 68, p. 817-830, 1990.
- ORIHUELA, A.; GALINA, C.; ESCOBAR, J. *et al.* Estrous behavior following prostaglandin F_{2α} injection in Zebu cattle under continuous observation. *Theriogenology*, v. 19, p. 795-809, 1983.
- PEGORER, M. F.; VASCONCELOS J. L. M.; TRINCA, L. A. *et al.* Influence of sire and sire breed (Gyr versus Holstein) on establishment of pregnancy and embryonic loss in lactating Holstein cows during summer heat stress. *Theriogenology*, v. 67, p. 692-697, 2007.
- PEIXOTO, M. G. C. D.; BERGMANN, J. A. G.; SYAMA, E. *et al.* Logistic regression analysis of pregnancy rate following transfer of *Bos indicus* embryos into *Bos indicus* × *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, v. 67, p. 287-292, 2007.
- PETERSON, A. J.; LEE, R. S. Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology*, v. 59, p. 687-697, 2003.

- PIRES, M. F. A.; ALVES, N. G.; FILHO, J. M. S. *et al.* Comportamento de vacas da raça Gir (*Bos taurus indicus*) em estro. *Arquivo Brasileiro de medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 55, p. 187-196, 2003.
- PIRES, M. F. A.; FERREIRA, A. M.; COELHO, S. G. Estresse calórico em bovinos de leite. *Caderno Tecnicos de Veterinária e Zootecnia*, v. 29, p. 23-37, 1999.
- ROBERTS, R. M. Conceptus interferons and maternal recognition of pregnancy. *Biology of Reproduction*, v. 40, p. 449-452, 1989.
- RHODES, F. M.; MCDUGALL, S.; BURKE, C. R. *et al.* Invited Review: Treatment of cows with an extended postpartum interval. *Journal of Dairy Science*, v. 86, p.1876-1894, 2003.
- RUMPF, R. Avanços metodológicos na produção *in vitro* de embriões. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, p. 229-233, 2007.
- RUTTER, L. M.; RANDEL, R. D. Nonpuberal estrus in beef heifers. *Journal of Animal Science*, v. 63, p. 1049-1053, 1986.
- SCHNEIDER JR, H. J.; CASTLEBERRY, R. S.; GRIFFIN, J. L. Commercial aspects of bovine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 13, p. 73-85, 1980.
- SHORT, R.E.; BELLOWS, R. A.; STAIGMILLER, R. B. *et al.* Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *Journal of Animal Science*, v. 68, p. 799-816, 1990.
- SIQUEIRA, L. G. B.; TORRES, C. A. A.; SOUZA, E. D. *et al.* Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology*, v. 72, p. 949-958, 2009.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction*, v. 39, p. 308-317, 1988.
- SMITH, M. F. Recent advances in corpus luteum physiology. *Journal of Dairy Science*, v. 69, p. 911-916, 1986.
- SPELL, A. R.; BEAL, W. E.; CORAH, L. R. *et al.* Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, v. 56, p. 287-297, 2001.
- STAGGS, K. L.; AUSTIN, K. J.; JOHNSON, G. A. *et al.* Complex induction of bovine uterine by interferon-tau. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 293-297, 1998.
- TANABE, T. Y.; HANN, R. C. Synchronized estrus and subsequent conception in dairy heifers treated with prostaglandin F2(alpha). Influence of Stage of cycle at treatment. *Journal of Animal Science*, v. 58, p. 805-811, 1984.
- VAJTA, G., HOLM, P, GREVE, T. *et al.* Survival and development of bovine blastocysts produced *in vitro* after assisted hatching, vitrification, and in-straw direct rehydration. *Journal of*

Reproduction and Fertility, v. 111, p. 65-70, 1997.

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

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.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M. *et al.* Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 84, p. 1-12, 2004.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F. *et al.* Características funcionais e morfológicas do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, p. 251-256, 1999.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F. *et al.* Regressão luteal e dinâmica folicular após luteólise natural ou induzida por cloprostenol em vacas da raça Gir. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 51, p. 257-262, 1999b.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F. *et al.* Follicular dynamics in Zebu cattle. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 35, p. 2501-2509, 2000.

WRIGHT, J. M. Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology*, v. 15, p. 43-56, 1981.

7. ANEXOS

EMBRIÃO - BL -1; BX - 2; BE E BH- 3;
 DIA: 6, 7, 8, 9 E 10
 ÉPOCA/NUTRIÇÃO - CHUVA -1; SECA/SUPLEMENTAÇÃO - 2

REGRESSÃO LOGÍSTICA - DG30

Análise de Maxima Verossimilhança

Variável	G.L.	Chi-quadrado	Probabilidade
Intercepto	1	2.89	0.0892
tratamento	2	3.08	0.2139
embrião	2	11.17	0.0037
dia	4	4.59	0.3321
epoca	1	4.26	0.0390
embrião * dia	8	1.85	0.9852
Razão de M. V.	53	81.07	0.0078

Análise de estimativa de máxima verossimilhança

Parametero	Estimativa	Erro	Qui-quadrado	Probabilidade
Intercepto	0.2255	0.1327	2.89	0.0892
tratamento	1 (T1XT3) 0.0894	0.0579	2.39	0.1224
	2 (T2XT3) -0.0323	0.0587	0.30	0.5821
embrião	1 (BL X BE) 0.6233	0.1984	9.87	0.0017
	2 (BX X BE) 0.0184	0.1301	0.02	0.8873
dia	6 (D6XD10) -0.0475	0.3512	0.02	0.8923
	7 (D7XD10) -0.2697	0.1812	2.22	0.1366
	8 (D8XD10) -0.1982	0.1499	1.75	0.1860
	9 (D9XD10) 0.0702	0.1857	0.14	0.7053
epoca	1 (1X2) -0.0762	0.0369	4.26	0.0390
embrião*dia	1 6 0.2234	0.4057	0.30	0.5819
	1 7 -0.1441	0.2539	0.32	0.5705
	1 8 -0.0399	0.2309	0.03	0.8628
	1 9 0.1381	0.3204	0.19	0.6665
	2 6 0.0708	0.3564	0.04	0.8425
	2 7 0.0858	0.1862	0.21	0.6451
	2 8 -0.0492	0.1540	0.10	0.7493
	2 9 -0.1429	0.1916	0.56	0.4557

Contraste de estimativas de máxima verossimilhança

Contraste	GL	Qui-quadrado	Probabilidade
trattamento (T1XT2)1	1	2.65	0.1038
embrimod (BLXBX) 1	1	5.09	0.0241
sincronia1	1	0.24	0.6248
sincronia2	1	0.12	0.7292
sincronia3	1	0.07	0.7968
sincronia4	1	0.13	0.7136
sincronia5	1	1.98	0.1594
sincronia6	1	1.77	0.1840
bld6 x bld7	1	0.54	0.4634
bld6 x bld8	1	0.30	0.5850
bld6 x bld9	1	0.02	0.8791
bld6 x bld10	1	0.17	0.6777
bld6 x bxd6	1	0.07	0.7936
bld6 x bxd7	1	0.29	0.5926
bld6 x bxd8	1	0.53	0.4686
bld6 x bxd9	1	0.17	0.6838
bld6 x bxd10	1	0.54	0.4631
bld6 x bed6	1	0.17	0.6786
bld6 x bed7	1	0.52	0.4708
bld6 x bed8	1	0.08	0.7712
bld6 x bed9	1	0.00	0.9972
bld7 x bld8	1	0.25	0.6204
bld7 x bld9	1	0.05	0.8253
bld7 x bld10	1	0.15	0.6998
bld7 x bed6	1	0.00	0.9763
bld7 x bed7	1	0.12	0.7239
bld7 x bed8	1	0.02	0.8995
embrião sinc20	1	0.02	0.8882
embrião sinc21	1	0.29	0.5911
embrião sinc22	1	0.37	0.5410
embrião sinc23	1	0.00	0.9742
embrião sinc24	1	0.07	0.7856
embrião sinc25	1	0.21	0.6459
embrião sinc26	1	0.45	0.5039
embrião sinc27	1	0.84	0.3600
embrião sinc28	1	0.20	0.6560

PROBABILIDADES OBSERVADAS E PREDITAS PELO MODELO CONTENDO APENAS O EFEITO DE TRATAMENTO

tratamento	dg30	-----Observado-----		-----Predito-----		Residuo
		Probabilidade	Erro	Probabilidade	Erro	
1	0	0.5549	0.0117	0.5549	0.0117	0
	1	0.4451	0.0117	0.4451	0.0117	0
2	0	0.5065	0.0134	0.5065	0.0134	0
	1	0.4935	0.0134	0.4935	0.0134	0
3	0	0.5395	0.0286	0.5395	0.0286	0
	1	0.4605	0.0286	0.4605	0.0286	0

PROBABILIDADES OBSERVADAS E PREDITAS PELO MODELO CONTENDO APENAS O EFEITO DE EMBRIÃO

Embrião	dg30	-----Observado-----		-----Predito-----		Residuo
		Probabilidade	Erro	Probabilidade	Erro	
ff						
1	0	0.6553	0.0278	0.6553	0.0278	16E-11
	1	0.3447	0.0278	0.3447	0.0278	-2E-10
2	0	0.5291	0.0093	0.5291	0.0093	0
	1	0.4709	0.0093	0.4709	0.0093	0
3	0	0.4495	0.0284	0.4495	0.0284	0
	1	0.5505	0.0284	0.5505	0.0284	0

PROBABILIDADES OBSERVADAS E PREDITAS PELO MODELO CONTENDO APENAS O EFEITO DE DIA

Dia	dg30	-----Observado-----		-----Predito-----		Residuo
		Probabilidade	Erro	Probabilidade	Erro	
ff						
6	0	0.6023	0.0265	0.6023	0.0265	0
	1	0.3977	0.0265	0.3977	0.0265	0
7	0	0.5232	0.0179	0.5232	0.0179	0
	1	0.4768	0.0179	0.4768	0.0179	0
8	0	0.4975	0.0134	0.4975	0.0134	0
	1	0.5025	0.0134	0.5025	0.0134	0
9	0	0.5346	0.0189	0.5346	0.0189	0
	1	0.4654	0.0189	0.4654	0.0189	0
10	0	0.6414	0.0303	0.6414	0.0303	0
	1	0.3586	0.0303	0.3586	0.0303	0

REGRESSÃO LOGÍSTICA DG60

Análise de Máxima Verossimilhança

Variável	G.L.	Chi-quadrado	Probabilidade
Intercepto	1	6.79	0.0092
tratamento	2	1.26	0.5323
embrião	2	8.99	0.0112
dia	4	3.53	0.4737
epoca	1	2.21	0.1370
embrião * dia	8	3.03	0.9326
Razão de M. V.	53	80.88	0.0081

Análise de estimativa de máxima verossimilhança

Parametero		Estimativa	Erro	Qui-quadrado	Probabilidade
Intercepto		0.3457	0.1327	6.79	0.0092
tratamento	1	0.0600	0.0581	1.07	0.3019
	2	-0.0149	0.0589	0.06	0.7999
Embrião	1	0.5606	0.1988	7.95	0.0048
	2	0.0128	0.1301	0.01	0.9217
dia	6	-0.0633	0.3520	0.03	0.8573
	7	-0.2240	0.1787	1.57	0.2100
	8	-0.1761	0.1498	1.38	0.2397
	9	0.0604	0.1856	0.11	0.7449
epoca	1	-0.0552	0.0371	2.21	0.1370
embrião*dia	1 6	0.3709	0.4089	0.82	0.3644
	1 7	-0.2526	0.2524	1.00	0.3170
	1 8	-0.00695	0.2317	0.00	0.9761
	1 9	0.0852	0.3206	0.07	0.7904
	2 6	0.0734	0.3573	0.04	0.8372
	2 7	0.0358	0.1839	0.04	0.8459
	2 8	-0.0639	0.1539	0.17	0.6780
	2 9	-0.0872	0.1916	0.21	0.6489

Contraste de estimativas de máxima verossimilhança

Contraste	GL	Qui-quadrado	Probabilidade
tratamento	1	1.00	0.3185
embrião	1	4.15	0.0417
sincronial	1	0.13	0.7231
sincronia2	1	0.07	0.7960
sincronia3	1	0.07	0.7874
sincronia4	1	0.06	0.8016
sincronia5	1	1.42	0.2329
sincronia6	1	1.37	0.2412
embrião sinc1	1	1.53	0.2158
embrião sinc2	1	0.60	0.4376
embrião sinc3	1	0.26	0.6128
embrião sinc4	1	0.63	0.4281
embrião sinc5	1	0.40	0.5246
embrião sinc6	1	0.72	0.3951
embrião sinc7	1	0.81	0.3667
embrião sinc8	1	0.94	0.3328
embrião sinc9	1	0.78	0.3772
embrião sinc10	1	0.40	0.5287
embrião sinc11	1	0.81	0.3668
embrião sinc12	1	0.34	0.5608
embrião sinc13	1	0.27	0.6032
embrião sinc14	1	0.07	0.7979
embrião sinc15	1	0.03	0.8729
embrião sinc16	1	0.02	0.8953
embrião sinc17	1	0.03	0.8564
embrião sinc18	1	0.08	0.7837
embrião sinc19	1	0.00	0.9823
embrião sinc20	1	0.02	0.8939
embrião sinc21	1	0.18	0.6691
embrião sinc22	1	0.14	0.7080
embrião sinc23	1	0.01	0.9350
embrião sinc24	1	0.10	0.7563
embrião sinc25	1	0.12	0.7305
embrião sinc26	1	0.25	0.6151
embrião sinc27	1	0.25	0.6184
embrião sinc28	1	0.01	0.9117

PROBABILIDADES OBSERVADAS E PREDITAS PELO MODELO CONTENDO APENAS O EFEITO DE TRATAMENTO

tratamento	dg60	-----Observado-----		-----Predito-----		Residuo
		Probabilidade	Erro	Probabilidade	Erro	
1	0	0.5795	0.0117	0.5795	0.0117	0
	1	0.4205	0.0117	0.4205	0.0117	0
2	0	0.543	0.0133	0.543	0.0133	0
	1	0.457	0.0133	0.457	0.0133	0
3	0	0.5724	0.0284	0.5724	0.0284	0
	1	0.4276	0.0284	0.4276	0.0284	0

Análise de estimativa de máxima verossimilhança

Parametro	Estimativa	Erro	Qui-quadrado	Probabilidade
Intercepto	2.7043	0.2238	145.96	<.0001
tratamento 1	0.2295	0.1701	1.82	0.1773
2	-0.1170	0.1636	0.51	0.4746
Embrião 1	0.2652	0.3329	0.63	0.4256
2	0.000880	0.1975	0.00	0.9964
dia 6	-0.0481	0.3212	0.02	0.8809
7	0.1429	0.2312	0.38	0.5364
8	0.0375	0.1898	0.04	0.8434
9	-0.2383	0.2123	1.26	0.2618
epoca 1	-0.1434	0.1161	1.53	0.2165

Contraste de estimativas de máxima verossimilhança

Contraste	GL	Qui-quadrado	Probabilidade
tratamento 1	1	2.49	0.1148
embrião 1	1	0.31	0.5807
sincronia1	1	0.19	0.6601
sincronia2	1	0.04	0.8338
sincronia3	1	0.20	0.6587
sincronia4	1	0.14	0.7096
sincronia5	1	1.43	0.2315
sincronia6	1	1.11	0.2913

PROBABILIDADES OBSERVADAS E PREDITAS PELO MODELO CONTENDO APENAS O EFEITO DE TRATAMENTO

tratamento	morteemb	-----Observado-----		-----Predito-----		Residuo
		Probabilidade	Erro	Probabilidade	Erro	
1	0	0.9449	0.0081	0.9449	0.0081	0
	1	0.0551	0.0081	0.0551	0.0081	0
2	0	0.9259	0.01	0.9259	0.01	0
	1	0.0741	0.01	0.0741	0.01	0
3	0	0.9286	0.0218	0.9286	0.0218	0
	1	0.0714	0.0218	0.0714	0.0218	0

PROBABILIDADES OBSERVADAS E PREDITAS PELO MODELO CONTENDO APENAS O EFEITO DE EMBRIO

embrião	morteemb	-----Observado-----		-----Predito-----		Residuo
		Probabilidade	Erro	Probabilidade	Erro	
ff						
1	0	0.9505	0.0216	0.9505	0.0216	0
	1	0.0495	0.0216	0.0495	0.0216	0
2	0	0.9357	0.0066	0.9357	0.0066	0
	1	0.0643	0.0066	0.0643	0.0066	0
3	0	0.9231	0.0205	0.9231	0.0205	0
	1	0.0769	0.0205	0.0769	0.0205	0

PROBABILIDADES OBSERVADAS E PREDITAS PELO MODELO CONTENDO APENAS O EFEITO DE DIA

dia	morteemb	-----Observado-----		-----Predito-----		Residuo
		Probabilidade	Erro	Probabilidade	Erro	
ff						
6	0	0.9412	0.0202	0.9412	0.0202	0
	1	0.0588	0.0202	0.0588	0.0202	0
7	0	0.9459	0.0118	0.9459	0.0118	0
	1	0.0541	0.0118	0.0541	0.0118	0
8	0	0.9361	0.0092	0.9361	0.0092	0
	1	0.0639	0.0092	0.0639	0.0092	0
9	0	0.9195	0.0151	0.9195	0.0151	0
	1	0.0805	0.0151	0.0805	0.0151	0
10	0	0.9444	0.0241	0.9444	0.0241	0
	1	0.0556	0.0241	0.0556	0.0241	0