

**Bruna Rios Coelho Alves**

**PRODUÇÃO *IN VIVO* E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES F1 EM  
REBANHOS LEITEIROS, UTILIZANDO-SE CRUZAMENTO RECÍPROCO  
ENTRE AS RAÇAS HOLANDÊS E GIR, EM DUAS ÉPOCAS DO ANO**

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

**Área de concentração: Reprodução Animal.**

**Orientador: Prof. Alan Maia Borges**

**Co-orientador: Dr. José Reinaldo Mendes Ruas**

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária- UFMG  
2008**

A474p

Alves, Bruna Rios Coelho, 1983-

Produção in vivo e transferência de embriões F1 em rebanhos leiteiros, utilizando-se cruzamento recíproco entre as raças Holandês e Gir, em duas épocas do ano / Bruna Rios Coelho Alves – 2008

110 p. : il.

Orientador: Alan Mais Borges

Co-orientador: José Reinaldo Mendes Ruas

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

Inclui bibliografia

1. Bovino de leite – Reprodução – Teses.
  2. Transferência de embriões – Teses.
  3. Criopreservação – Teses.
  4. Embriões – Teses.
- I. Borges, Alan Maia. II. Ruas, José Reinaldo Mendes. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.  
IV. Título

Dissertação defendida em 17 de março de 2008 e aprovada pela banca examinadora constituída por:

---

Prof. Álan Maia Borges  
(DCCV - Universidade Federal de Minas Gerais)

---

Prof. Helton Mattana Saturnino  
(DZO - Universidade Federal de Minas Gerais)

---

Profa. Sandra Gesteira Coelho  
(DZO - Universidade Federal de Minas Gerais)

---

Prof. Ciro Alexandre Alves Torres  
(DZO - Universidade Federal de Viçosa)

---

Dr. João Henrique Moreira Viana  
(Pesquisador Embrapa – CNPGL)



**À minha família, por determinar minha formação pessoal, e apoiar meu crescimento profissional.**

**Pai e Mãe: a contribuição de vocês foi fundamental para que esse trabalho se concretizasse.**



*Para o Universo  
até mesmo as coisas mais difíceis  
acontecem espontaneamente.  
A maior conquista  
é composta de inúmeras partes minúsculas.  
O mestre compreende que,  
no Universo e na vida,  
grandes feitos podem ser facilmente realizados  
começando por ações pequenas.*

Lao Zi, Dao De Jing, nº 63

*DEUS,  
Dai-nos a força de ajudar o progresso  
a fim de subirmos até Vos.  
Dai-nos a caridade pura.  
Dai-nos a fé e a razão.  
Dai-nos a simplicidade, que fará de nossas almas  
um espelho onde se refletirá a Vossa Santa e Misericordiosa imagem.*

Trecho da oração de Cáritas



---

## AGRADECIMENTOS

---

Ao meu caro orientador, Prof. Alan Maia Borges, pelo exemplo profissional e pessoal, pela confiança depositada, por sua grande dedicação e intensa participação na execução deste projeto.

Ao Dr. José Reinaldo Mendes Ruas pelo companheirismo, por sua grande disposição para ajudar-nos e pelos ensinamentos e conselhos valiosos.

À Escola de Veterinária da UFMG, por tornar possível a realização deste trabalho.

À FAPEMIG, pelo financiamento do projeto (CAG 1153/05).

À Capes, pela concessão de bolsa de estudo.

À Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG, pela parceria, receptividade e por ter viabilizado a realização do projeto.

À Embrapa Gado de Leite, nos nomes de Dr. Pedro Arcuri e Dr. Wanderlei Ferreira de Sá, pela concessão de liberação para a realização dos experimentos.

Aos sempre companheiros Guilherme Pugliesi, Gustavo Menezes, Mariana Resende, Samuel Silva e Thiago Amaral pela ajuda imprescindível para a execução deste projeto.

Aos funcionários da Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa, especialmente aos Srs. Ailton Silva e Renato Salim, e da Fazenda Experimental de Felixlândia, especialmente aos Srs. Arismar Menezes e Geraldo Chagas, pelo grande auxílio na execução dos experimentos.

Ao Sr. José Cláudio, demais proprietários e aos funcionários da Fazenda Capoeira Grande (Araçá – MG), pela disponibilidade dos animais e pela receptividade incondicional.

Aos meus queridos colegas de pós-graduação Bruno Carvalho, Fabiana Varago e Jorge Martins, pela amizade e fundamental ajuda.

À Nutricell, pela doação parcial dos meios para a coleta dos embriões.

Aos Professores da Escola de Veterinária da UFMG que contribuíram para a minha formação profissional, em especial ao Prof. José Monteiro da Silva Filho.

Às funcionárias do Colegiado de Pós-Graduação (Nilda, Eloísa, Débora) e do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias (Lourdes, Rosângela e Eliane) pela prontidão em nos atender.

Ao Dr. João Henrique Moreira Viana, pelo incentivo e pronta disponibilidade para responder aos meus questionamentos infundáveis.

Aos colegas Dr. Fernando César Ferraz Lopez, Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo, e Dr. Rui da Silva Verneque pela paciência e contribuição.

Aos Professores Ciro Alexandre Alves Torres, Helton Mattana Saturnino e Sandra Gesteira Coelho, pela participação na banca examinadora e sugestões valiosas.

Às minhas amigas Adriana Santana, Juliana Cordeiro, Letícia Mendonça, Luciana Faria, Mariana Magalhães, Raissa Rossi, pelo carinho e companheirismo.

Ao meu querido Sanzio, e sua família, pelo carinho, paciência e incentivo.

A todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a execução deste trabalho.

---

## SUMÁRIO

---

	LISTA DE TABELAS .....	12
	LISTA DE GRÁFICOS .....	13
	LISTA DE FIGURAS .....	13
	LISTA DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	14
	LISTA DE ABREVEATURAS .....	17
	RESUMO .....	19
	ABSTRACT .....	20
<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	21
<b>2</b>	<b>Revisão de literatura</b> .....	23
2.1	O cruzamento F1 Holandês x Zebu .....	23
2.2	Produção <i>in vivo</i> de embriões.....	24
2.2.1	O processo de superovulação.....	25
2.2.2	Fatores que afetam o processo de superovulação.....	26
2.2.3	Influência da época do ano na produção de embriões.....	29
2.2.3.1	Efeitos de estresse calórico sobre a reprodução e produção de embriões em fêmeas bovinas .....	29
2.2.3.2	Efeitos da sazonalidade sobre a reprodução e produção de embriões em animais zebuínos.....	33
2.3	Criopreservação de embriões .....	34
2.4	Transferência de embriões em rebanhos leiteiros .....	35
2.4.1	Fatores relacionados ao estabelecimento da gestação em receptoras de embrião .....	35
2.4.1.1	Maturidade reprodutiva de receptoras péri-púberes .....	36
2.4.1.2	Restabelecimento da ciclicidade e do ambiente uterino após o parto .....	38
2.4.2	Uso de progestógeno e estradiol para a indução e sincronização do estro em receptoras de embrião .....	41
<b>3</b>	<b>Material e Métodos</b> .....	42
3.1	Experimentos 1 e 2: Produção e criopreservação de embriões .....	42
3.2	Experimento 3: Sincronização do estro das receptoras e transferência dos embriões .....	46
3.1.4	Experimento 4: Cultivo <i>in vitro</i> dos embriões F1 Holandês x Gir.....	51
<b>4</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	52
4.1	Experimento 1: Produção de embriões a partir de doadoras da raça Holandês.....	52
4.2	Experimento 2:Produção de embriões a partir de doadoras da raça Gir .	57
4.3	Experimento 3: Transferência de embriões F1 .....	63
4.3.1	Utilização de novilhas como receptoras .....	63
4.3.2	Utilização de vacas no período pós-parto como receptoras .....	67
4.4	Experimento 4: Cultivo <i>in vitro</i> de embriões F1 .....	71
<b>5</b>	<b>Conclusões</b> .....	74
<b>6</b>	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	75
<b>7</b>	<b>Anexos</b> .....	94

---

**LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1	Distribuição das fêmeas utilizadas, conforme categoria e época da sincronização.....	46
Tabela 2	Médias $\pm$ desvios-padrão da idade e peso vivo das novilhas submetidas à sincronização de estro .....	47
Tabela 3	Características das vacas F1 utilizadas como receptoras de embrião, distribuídas de acordo com a época de sincronização .....	47
Tabela 4	Distribuição dos embriões transferidos de acordo com o grupo de produção, época de inovulação e categoria da receptora .....	50
Tabela 5	Distribuição dos embriões cultivados <i>in vitro</i> , segundo o grupo de produção e sua qualidade .....	51
Tabela 6	Parâmetros climáticos durante os períodos experimentais de inverno e verão, na Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa (FEPHB) .....	52
Tabela 7	Estruturas recuperadas a partir da superovulação de doadoras da raça Holandês, no inverno e verão, classificadas segundo seu estágio de desenvolvimento .....	54
Tabela 8	Estruturas recuperadas a partir da superovulação de doadoras da raça Holandês nas épocas de inverno e verão .....	55
Tabela 9	Parâmetros climáticos durante os períodos experimentais de inverno e verão, na Fazenda Experimental de Felixlândia (FEFX) .....	57
Tabela 10	Estruturas recuperadas a partir da superovulação de doadoras da raça Gir, durante o inverno e o verão, classificadas segundo seu estágio de desenvolvimento .....	59
Tabela 11	Estruturas recuperadas a partir da superovulação de doadoras da raça Gir nas épocas de inverno e verão .....	60
Tabela 12	Área do corpo lúteo no dia da inovulação, nas novilhas receptoras de embrião .....	65
Tabela 13	Taxa de gestação aos 30 e 60 dias em novilhas receptoras de embrião .....	65
Tabela 14	Taxas de gestação relativas aos diferentes grupos de embriões transferidos em novilhas .....	66
Tabela 15	Número total de estruturas coletadas após a superovulação das doadoras dos embriões transferidos .....	66
Tabela 16	Taxas de gestação aos 30 e 60 dias, em vacas receptoras de embrião no período pós-parto .....	68
Tabela 17	Taxas de gestação aos 30 e 60 dias, em vacas e novilhas receptoras de embrião .....	70
Tabela 18	Taxas de gestação relativas aos diferentes grupos de embriões transferidos em vacas .....	70
Tabela 19	Embriões F1 cultivados <i>in vitro</i> .....	72
Tabela 20	Análise bromatológica dos alimentos fornecidos na Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa (Igarapé - MG) .....	108

Tabela 21	Composição do Concentrado A fornecido na Fazenda Experimental de Felixlândia (Felixlândia, MG) .....	108
Tabela 22	Composição do Concentrado B (mistura nitromineral) fornecido na Fazenda Experimental de Felixlândia (Felixlândia, MG) .....	108
Tabela 23	Análise bromatológica do concentrado total (80% de concentrado A mais 20% do concentrado B) oferecido aos animais na Fazenda Experimental de Felixlândia (Felixlândia, MG) .....	108

---

### LISTA DE GRÁFICOS

---

Gráfico 1	Frequência respiratória média das doadoras da raça Holandês, no inverno e verão .....	53
Gráfico 2	Temperatura retal média das doadoras da raça Holandês, no inverno e verão .....	53
Gráfico 3	Frequência respiratória média das doadoras da raça Gir, no inverno e verão .....	58
Gráfico 4	Temperatura retal média das doadoras da raça Gir, no inverno e verão .....	58
Gráfico 5	Taxas de viabilidade e eclosão de embriões F1 Holandês x Gir cultivados <i>in vitro</i> .....	72

---

### LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1	Mórula Grau 1 .....	109
Figura 2	Mórula compacta Grau 1.....	109
Figura 3	Mórula compacta Grau 2 .....	109
Figura 4	Mórula compacta Grau 3 .....	109
Figura 5	Blastocisto inicial Grau 1 .....	109
Figura 6	Blastocisto inicial Grau 2 .....	109
Figura 7	Blastocisto Grau 1 .....	109
Figura 8	Blastocisto eclodido Grau 1 .....	109
Figura 9	Estrutura degenerada .....	109
Figura 10	Estrutura não fecundada .....	109
Figura 11	Índice de Temperatura e Umidade (ITU) para bovinos.....	110

---

**LISTA DE ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

---

Análise 1	Idade das doadoras da raça Holandês no início do tratamento .....	94
Análise 2	Peso das doadoras da raça Holandês no início do tratamento .....	94
Análise 3	Escore da condição corporal das doadoras da raça Holandês no início do tratamento .....	94
Análise 4	Idade das doadoras da raça Gir no início do tratamento .....	94
Análise 5	Peso das doadoras da raça Gir no início do tratamento .....	94
Análise 6	Escore da condição corporal das doadoras da raça Gir no início do tratamento .....	94
Análise 7	Idade das novilhas mestiças, no início do protocolo de sincronização do estro .....	95
Análise 8	Peso vivo das novilhas mestiças, no início do protocolo de sincronização do estro .....	95
Análise 9	Peso ao parto das vacas F1 utilizadas como receptoras .....	95
Análise 10	Escore da condição corporal ao parto das vacas F1 utilizadas como receptoras .....	95
Análise 11	Idade das vacas F1 utilizadas como receptoras .....	95
Análise 12	Dias pós-parto no início do protocolo hormonal das vacas F1 utilizadas como receptoras .....	95
Análise 13	Produção de leite na última pesagem das vacas F1 utilizadas como receptoras .....	95
Análise 14	Diâmetro do folículo dominante das vacas F1 utilizadas como receptoras .....	96
Análise 15	Temperatura máxima na FEPHB .....	96
Análise 16	Temperatura mínima na FEPHB .....	96
Análise 17	Temperatura ambiente às 6h na FEPHB .....	96
Análise 18	Umidade relativa do ar às 6h na FEPHB .....	96
Análise 19	Índice de Temperatura e Umidade às 6h na FEPHB .....	96
Análise 20	Temperatura ambiente às 12h na FEPHB .....	97
Análise 21	Umidade relativa do ar às 12h na FEPHB .....	97
Análise 22	Índice de Temperatura e Umidade às 12h na FEPHB .....	97
Análise 23	Temperatura ambiente às 18h na FEPHB .....	97
Análise 24	Umidade relativa do ar às 18h na FEPHB .....	97
Análise 25	Índice de Temperatura e Umidade às 18h na FEPHB .....	97
Análise 26	Frequência respiratória das doadoras da raça Holandês às 6h .....	98
Análise 27	Frequência respiratória das doadoras da raça Holandês às 12h .....	98
Análise 28	Frequência respiratória das doadoras da raça Holandês às 18h .....	98
Análise 29	Temperatura retal das doadoras da raça Holandês às 6h .....	98
Análise 30	Temperatura retal das doadoras da raça Holandês às 12h .....	98
Análise 31	Temperatura retal das doadoras da raça Holandês às 18h .....	99

Análise 32	Intervalo entre a retirada do CIDR e o estro das doadoras da raça Holandês .....	99
Análise 33	Estruturas totais, e de graus 1, 2 e 3 obtidas a partir das doadoras da raça Holandês .....	99
Análise 34	Estruturas viáveis, congeláveis, não fecundadas, fecundadas e degeneradas obtidas a partir das doadoras da raça Holandês .....	99
Análise 35	Temperatura máxima na FEFX .....	99
Análise 36	Temperatura mínima na FEFX .....	99
Análise 37	Temperatura ambiente às 6h30min na FEFX .....	100
Análise 38	Umidade relativa do ar às 6h30min na FEFX .....	100
Análise 39	Índice de Temperatura e Umidade às 6h30min na FEFX .....	100
Análise 40	Temperatura ambiente às 12h na FEFX .....	100
Análise 41	Umidade relativa do ar às 12h na FEFX .....	100
Análise 42	Índice de Temperatura e Umidade às 12h na FEFX .....	100
Análise 43	Temperatura ambiente às 17h30min na FEFX .....	101
Análise 44	Umidade relativa do ar às 17h30min na FEFX .....	101
Análise 45	Índice de Temperatura e Umidade às 17h30min na FEFX .....	101
Análise 46	Frequência respiratória das doadoras da raça Gir às 6h .....	101
Análise 47	Frequência respiratória das doadoras da raça Gir às 18h .....	101
Análise 48	Temperatura retal das doadoras da raça Gir às 6h .....	102
Análise 49	Temperatura retal das doadoras da raça Gir às 18h .....	102
Análise 50	Intervalo entre a retirada do CIDR e o estro das doadoras da raça Gir .....	102
Análise 51	Taxa de recuperação de estruturas após a superovulação de doadoras da raça Gir .....	102
Análise 52	Estruturas totais, e de graus 1, 2 e 3 obtidas a partir das doadoras da raça Gir .....	102
Análise 53	Estruturas viáveis, congeláveis, não fecundadas, fecundadas e degeneradas obtidas a partir das doadoras da raça Gir .....	102
Análise 54	Intervalo entre a retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona e o estro das novilhas mestiças sincronizadas .....	103
Análise 55	Taxa de sincronização de novilhas dos grupos VA x IA .....	103
Análise 56	Taxa de sincronização de novilhas dos grupos IA x IB .....	103
Análise 57	Taxa de sincronização de novilhas dos grupos A x B .....	103
Análise 58	Área do corpo lúteo das novilhas receptoras de embrião, em relação aos grupos de sincronização .....	103
Análise 59	Taxa de gestação aos 30 dias de novilhas dos grupos VA x IA .....	104
Análise 60	Taxa de gestação aos 30 dias de novilhas dos grupos IA x IB .....	104
Análise 61	Taxa de gestação aos 30 dias de novilhas dos grupos A x B .....	104
Análise 62	Taxa de gestação aos 60 dias de novilhas dos grupos VA x IA .....	104
Análise 63	Taxa de gestação aos 60 dias de novilhas dos grupos IA x IB .....	104
Análise 64	Taxa de gestação aos 60 dias de novilhas dos grupos A x B .....	104

Análise 65	Área do corpo lúteo das novilhas receptoras de embrião, gestantes ou não-gestantes .....	105
Análise 66	Taxas de gestação dos embriões dos grupos HI e HV, transferidos em novilhas .....	105
Análise 67	Taxas de gestação dos embriões dos grupos HI e GV, transferidos em novilhas .....	105
Análise 68	Taxas de gestação dos embriões dos grupos HV e GV, transferidos em novilhas .....	105
Análise 69	Taxas de sincronização da vacas no pós parto .....	105
Análise 70	Intervalo entre a retirada do dispositivo intra-vaginal liberador de progesterona e o estro das vacas F1 utilizadas como receptoras .....	105
Análise 71	Taxa de gestação de aos 30 dias em vacas .....	106
Análise 72	Taxa de gestação de aos 60 dias em vacas .....	106
Análise 73	Diâmetro do folículo dominante das vacas F1 utilizadas como receptoras, que responderam ou não à sincronização .....	106
Análise 74	Área do corpo lúteo no dia da inovulação das vacas F1 utilizadas como receptoras, gestantes ou não gestantes .....	106
Análise 75	Área do corpo lúteo no dia da inovulação das vacas F1 utilizadas como receptoras, gestantes ou não gestantes .....	106
Análise 76	Taxa de gestação aos 30 dias, de vacas e novilhas .....	106
Análise 77	Taxa de gestação aos 60 dias, de vacas e novilhas .....	107
Análise 78	Taxas de gestação dos embriões dos grupos HI e HV, transferidos em vacas .....	107
Análise 79	Taxas de gestação dos embriões dos grupos HI e GV, transferidos em vacas .....	107
Análise 80	Taxas de gestação dos embriões dos grupos HV e GV, transferidos em vacas .....	107
Análise 81	Taxa de viabilidade dos embriões cultivados <i>in vitro</i> .....	107
Análise 82	Taxa de eclosão dos embriões cultivados <i>in vitro</i> .....	107

---

## LISTA DE ABREVEATURAS

---

Bec – Blastocisto eclodido  
BEN – Balanço energético negativo  
Bi – Blastocisto inicial  
Bl – Blastocisto  
BS – Temperatura de bulbo seco  
BU – Temperatura de bulbo úmido  
Bx – Blastocisto expandido  
cm - centímetros  
Deg – Degenerado  
DMPBS – Dulbecco's Modified Phosphated Buffered Saline  
DNA – Ácido desoxirribonucleico  
ECC – Escore de condição corporal  
ETR – Escore de trato reprodutivo  
FIV – Fecundação *in vitro*  
FR – Frequência respiratória  
FSH – Hormônio Folículo Estimulante  
GH – Hormônio do crescimento  
GI – Doadoras da raça Gir, superovuladas no inverno  
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotropina  
GV – Doadoras da raça Gir, superovuladas no verão  
HI – Doadoras da raça Holandês, superovuladas no inverno  
HSP – Proteína do Choque Térmico  
HV – Doadoras da raça Holandês, superovuladas no verão  
HZ –Holandês-Zebu  
IA –Novilhas sincronizadas no inverno, com protocolo A  
IB - Novilhas sincronizadas no inverno, com protocolo B  
IFN- $\tau$  - Interferon-tau

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante à insulina – tipo 1  
IM – Intramuscular  
ITU – Índice de Temperatura e Umidade  
LH – Hormônio Luteinizante  
Mc - Mórula compacta  
mL - mililitros  
mm - milímetros  
MM1 – Meio de manutenção 1  
Mo – Mórula  
Mpm – movimentos por minuto  
NF – Não fecundado  
PGF<sub>2α</sub> - Prostaglandina F<sub>2α</sub>  
SFB – Soro fetal bovino  
SNK- Student-Newman-Keuls  
TE – Transferência de embriões  
TR – Temperatura retal  
UI – Unidades Internacionais  
UR – Umidade relativa do ar  
VA –Novilhas sincronizadas no verão, com protocolo A  
ZP – Zona pelúcida

## RESUMO

Estudou-se a produção de embriões F1 Holandês x Gir e o potencial de utilização de receptoras mestiças no verão e inverno. Foram superovuladas fêmeas Holandês (7 em cada época) e da raça Gir (7 no verão e 5 no inverno). Embriões foram criopreservados para posterior cultivo *in vitro* ou inovulação. Utilizou-se 49 novilhas cíclicas ou acíclicas e 54 vacas F1 acíclicas, entre 21 e 65 dias pós-parto, sincronizadas com associações de progesterona e estradiol, sendo transferidos 87 embriões (grau 1). Ainda, embriões de graus 1 e 2 (n=72) foram cultivados *in vitro* por 72h. Recuperou-se média de estruturas totais, viáveis e congeláveis de, respectivamente, 20,1, 14,6 e 13,3 no inverno e de 8,6; 7,1 e 6,6 no verão ( $p>0,05$ ) em doadoras Holandês, e de 2,4; 1,6 e 1,4 no inverno e de 7,7 6,9 e 4,7 no verão ( $p>0,05$ ), em doadoras Gir. A taxa de sincronização diferiu entre novilhas cíclicas (93,9%) ou acíclicas (62,5%), independente da época. Das vacas, 81,8% no verão e 93,75% no inverno ( $p>0,05$ ) responderam ao protocolo, sendo o diâmetro do FD no início do protocolo maior nas que responderam (13,1 mm), em relação ao das que não responderam (10,6 mm). As taxas de gestação aos 30 e 60 dias foram 41,0% e 33,3% em novilhas e 14,6% e 12,5% em vacas, diferindo entre categorias, mas não entre épocas. No cultivo, observou-se 46,3% e 16,1% de viabilidade e 26,8 e 3,2% de eclosão, para os embriões grau 1 e 2, respectivamente ( $p<0,05$ ). A época do ano não afetou a produção de embriões de doadoras Holandês e Gir e a taxa de sincronização e gestação de receptoras, sendo a resposta ao protocolo afetada pela presença de CL (em novilhas) ou pelo diâmetro do FD (em vacas) no início.

Palavras chave: zebu, embrião, F1, época do ano.

## ABSTRACT

It was evaluated embryo production from reciprocal matting of Holstein and Gyr breeds, and the use of crossbreed recipients, in summer or winter. Holstein (7 in each season), and Gyr females (7 in summer and 5 in winter) were superovulated. Embryos (grade 1 and 2), were frozen for further *in vitro* culture or in ovulation. The recipients (49 cyclic or noncyclic heifers and 54 noncyclic F1 cows - 21 to 65 days post partum- were synchronized with protocols associating progesterone and estradiol. Eighty-seven F1 embryos (grade 1) were transferred and 72 (grades 1 and 2) were cultured *in vitro* for 72h. Total ova/embryo recovered, viable and freezable embryos means were, respectively, 20.1, 14.6 and 13.3 in winter and 8.6, 7.1 and 6.6 in summer ( $p>0,05$ ) for Holstein and 2.4, 1.6 e 1.4 in winter and 7.7, 6.8 and 4.7 in summer, for Gyr donors. Synchronization rates were different between cyclic (93.9%) or noncyclic (62.5%) heifers (no season effect) and, for cows, 81.8% in summer and 93.75% in winter ( $p>0.05$ ). The DF size in the beginning of protocol was higher in that cows that had ovulated (13.1 mm x 10.6 mm;  $p<0.05$ ). Pregnancy rates (days 30 and 60, respectively) were 41.0% and 33.3% for heifers and 14.6% and 12.5% for cows ( $p<0.05$ , comparing cows and heifers) not being affected by season. *In vitro* culture showed 46.3% and 16.1% viability, and 26.8 and 3.2% hatching rates, for grades 1 and 2, respectively ( $p<0.05$ ). Season did not affect embryo production from Holstein and Gyr donors and the synchronization and pregnancy rates. Synchronization was affected by the CL presence (in heifers) or the DF diameter (in cows) during the beginning of protocol.

Key-words: zebu, embryo, F1, season

## 1. Introdução

O Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite, com 25,4 bilhões de litros produzidos no ano de 2006, sendo Minas Gerais o principal estado em produção, concentrando 27,9% do total. A quantidade de leite produzida no país vem apresentando crescimento tanto horizontal, como vertical, com aumento, nos últimos dez anos, de 37,18% na produção e de 6,89% na produtividade. Esta última correspondeu, em 2006, a 1.213 litros por vaca ordenhada (IBGE, 2006).

Atualmente, existe forte tendência para o aumento da participação de países em desenvolvimento para atender à crescente demanda do mercado mundial de lácteos. Tal fato baseia-se na existência, nesses locais, de condições climáticas favoráveis para a atividade, permitindo a manutenção dos animais em pastejo na maior parte do ano, diminuindo os custos de alimentação, mão-de-obra e de capital empregado (Zoccal e Gomes, 2007). Dessa forma, considerando-se os valores atuais da produtividade brasileira, e ainda, a área de pastagem do país, que corresponde a cerca de 240 milhões de hectares, entende-se que são amplas as perspectivas quanto ao crescimento da produção leiteira no país (horizontal e vertical), possibilitando-se assim, significativa participação brasileira no comércio mundial de leite e derivados. É nesse contexto que se afirma que o caminho do crescimento da pecuária leiteira no país deverá ser sustentado em sistemas de produção que privilegiem pastagens de boa qualidade e animais que se mostrem economicamente

eficientes, nesse tipo de regime (Marcatti Neto et al., 2004).

A maior parte das regiões produtoras de leite no Brasil é caracterizada pela existência de duas estações climáticas bem definidas: a chuvosa (águas), e a seca. Na primeira, a temperatura, umidade e luminosidade mostram-se favoráveis ao crescimento das espécies forrageiras tropicais e, na segunda, esses fatores são quase sempre adversos. Como consequência, ocorre marcada estacionalidade na produção de forrageira (Aroeira e Paciullo, 2004). Por outro lado, as altas temperaturas e umidade verificadas em certas épocas do ano podem ocasionar queda no desempenho produtivo e reprodutivo de bovinos com maior sensibilidade ao calor, como é o caso dos taurinos. Dessa forma, as características climáticas do país relacionam-se à variabilidade na composição de rebanho leiteiro brasileiro, constituído por 6% de raças especializadas (taurinas) e 74% de vacas mestiças Holandês x Zebu (HZ), de composição genética variável, e o restante, de animais sem qualquer especialização para a produção de leite (Vilela, 2003).

Trabalhos da literatura mostram que o cruzamento F1 (ou seja, a primeira geração de cruzamento entre duas raças puras), a partir de animais da raça Holandês, com animais zebuínos, quando comparados a outros tipos de cruzamentos, resulta na produção de animais que apresentaram melhor desempenho produtivo e econômico, tanto em sistemas com alto e baixo nível de manejo, especialmente nestes últimos (Madalena et al., 1990 a,b; Lemos et al., 1996). No entanto, os sistemas de

produção brasileiros ainda buscam um mecanismo eficaz para suprir a reposição de fêmeas mestiças F1 (Marcatti Neto et al., 2004), sendo este o maior desafio para a utilização mais abrangente deste genótipo.

Uma estratégia para sobrepor esta dificuldade é a reposição contínua do rebanho com novilhas F1, por exemplo, utilizando-se o modelo organizacional proposto pela Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – EPAMIG (Marcatti Neto et al., 2000). Entretanto, alguns entraves desse sistema incluem o controle sanitário, o custo com transportes e a menor produtividade das raças zebuína puras (Madalena et al., 1990b), além da oferta atual de fêmeas bovinas F1 que está muito aquém de suprir essa demanda. Segundo Silvestre et al. (1996), os preços desses animais são bem superiores aos recebidos por outros genótipos, alcançando 200% a 250% do preço da arroba do boi gordo.

Sendo assim, a utilização de biotécnicas como a produção de embriões *in vivo* (tradicionalmente conhecida como transferência de embriões ou TE) ou *in vitro* (conhecida como fecundação *in vitro* ou FIV), é alternativa a ser considerada para a produção desses animais, desde que estas se mostrem economicamente viáveis (Ruas et al., 2004). Contudo, a obtenção de taxas de gestação insatisfatórias após a transferência de embriões criopreservados, produzidos *in vitro*, continua sendo um obstáculo importante para a expansão da FIV em raças leiteiras. Por esse motivo, a TE continua sendo uma opção mais viável para suprir essa demanda.

Existem poucos estudos sobre a produção de embriões mestiços F1, tanto a partir da base materna Holandês quanto da zebuína, nas condições de produção típicas brasileiras. Assim, haveria uma época mais apropriada para a superovulação visando a obtenção de maior número de embriões em qualidade e congelabilidade, utilizando-se cada uma das raças? Se houver, os sistemas poderiam dispor de um pequeno grupo de doadoras, maximizando a produção dos embriões nas épocas mais apropriadas. Dessa forma, optar-se-ia pela criopreservação e transferência dos mesmos, segundo a disponibilidade de receptoras do rebanho.

Além disso, deve-se levar em consideração que, dos custos da TE, a manutenção de um rebanho de receptoras é o mais oneroso ao sistema de produção (Looney et al., 2006). Por isso, a utilização das próprias matrizes leiteiras como receptoras poderia ser uma estratégia viável para os programas de TE que visam a reposição de vacas F1 HZ. Contudo, ao se contabilizar a eficiência reprodutiva deste tipo de animal, cujo período de serviço médio é curto (111,3 dias) a ponto de proporcionar intervalo de partos de 400 dias (Borges et al., 2007) deve-se atentar para que, da mesma forma, as vacas leiteiras receptoras não permaneçam, por muito tempo, aguardando para serem inovuladas. Neste raciocínio, o aproveitamento do primeiro estro natural ou induzido no pós-parto recente poderia ser um mecanismo de se reduzir o custo com manutenção das receptoras.

Adicionalmente, alguns sistemas de criação de animais mestiços utilizam cruzamentos terminais objetivando a

produção de bezerros de corte como uma forma de agregar valor à receita da propriedade (Marcatti Neto et al., 2000). Dessa forma, as fêmeas também poderiam ser recriadas e servirem como receptoras de embrião.

Uma vez que a TE é uma biotécnica potencialmente utilizável para a formação e manutenção de rebanhos leiteiros F1 HZ, torna-se necessário o conhecimento das características inerentes à produção, criopreservação e transferência desses embriões em condições típicas de produção brasileiras. Sendo assim os objetivos do presente trabalho foram estudar:

- as características da produção *in vivo* de embriões F1 Holandês x Gir, a partir do cruzamento recíproco entre as duas raças, no verão e inverno;
- o potencial de utilização de novilhas Holandês x Zebu, cíclicas ou acíclicas, como receptoras de embrião F1, no verão e inverno;
- o potencial de utilização de vacas F1 Holandês x Zebu no período pós-parto, como receptoras de embrião F1, no verão e inverno.

## 2. Revisão de literatura

### 2.1 O cruzamento F1 Holandês x Zebu

A utilização de cruzamentos *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* baseia-se na premissa da complementaridade entre as duas subespécies, que se dá pela reunião, nos produtos, das características de longevidade, resistência a parasitos, maior tolerância às variações de clima e seus efeitos, bem evidenciados nas raças

zebuínas, e da precocidade e maior eficiência produtiva e reprodutiva observadas nas raças taurinas (Pereira, 1998; Barbosa, 2004).

Alguns autores mostraram que o lucro por dia de vida útil obtido a partir da criação de animais F1 foi superior àquele obtido quando outros cruzamentos entre zebuínos e taurinos foram utilizados (Madalena et al., 1990a,b; Lemos et al., 1996). Um estudo recente revelou rentabilidade variando de 20,2 a 37,6% utilizando sistema de produção de leite com rebanho F1 produzindo cerca de 2.400 kg de leite/vaca em lactação, em clima tropical típico (Moraes et al., 2004).

Explicações para esses resultados baseiam-se no fato de que animais F1 apresentam nível máximo de heterose. Por heterose entende-se o fenômeno genético quantitativamente definido como a superioridade das progênes resultantes do acasalamento entre animais de raças diferentes, em relação à média dos pais, para uma determinada característica (Pereira, 1998). Segundo Madalena (2004), exceto para algumas poucas exceções, as características de importância econômica apresentam heterose que se acumula no agregado que compõe o lucro, amplificando grandemente a vantagem do F1 sobre os outros cruzamentos. Além disso, animais F1 apresentam tolerância ao calor e resistência aos parasitos semelhante às do zebu puro (Madalena et al., 1990b), de forma que quando estes estresses estão presentes, como na maioria dos sistemas de produção brasileiros, esta adaptação contribui para o aumento da produção e redução do custo (Madalena, 2004).

A produção de fêmeas F1 para a exploração leiteira normalmente é feita a partir de matrizes zebuínas acasaladas com touros da raça Holandês, sendo que as raças zebuínas mais utilizadas são a Gir, Guzerá e Indubrasil (Ruas et al., 2005a).

A utilização da raça Holandês nos cruzamentos explica-se pelo fato desses animais possuírem maior potencial para a produção de leite. Programas de melhoramento genético dessa raça são realizados há muito tempo, em todo mundo, e mais recentemente no Brasil, refletindo-se na grande disponibilidade de sêmen de touros de alto mérito genético no mercado (ASBIA, 2006).

A raça Gir Leiteiro é predominantemente utilizada para o cruzamento F1 no estado de Minas Gerais (Madalena et al., 1997) e isto é compreensível devido à história e a tradição da raça, vinculadas ao processo de seleção para a produção de leite, que vem ocorrendo há anos (Ruas et al., 2005a). A importância dessa raça na pecuária nacional é evidenciada pela sua participação em 51,75% da comercialização do sêmen nacional das raças leiteiras (ASBIA, 2006). Com o programa de melhoramento genético da raça, iniciado em 1985, hoje existem disponíveis no mercado sêmen de touros provados, o que estimula a utilização destes para a produção de F1.

A utilização do cruzamento no qual a raça materna é Holandês e a paterna é zebu pode vir a ser uma alternativa já que é baixa a disponibilidade das matrizes das raças zebuínas consideradas leiteiras para a produção de F1 e, portanto, não sendo capaz de suprir a demanda dos rebanhos. Infere-se que a

qualidade do F1 seja a mesma, com o mesmo potencial genético para a produção de leite (Verneque et al., 2007). Sendo assim, a escolha das raças materna e paterna para a produção de F1 deve basear-se em fatores como a disponibilidade de animais, além das características relacionadas ao desempenho reprodutivo das duas subespécies.

## 2.2. Produção *in vivo* de embriões

Atualmente, a produção de embriões é uma ferramenta altamente demandada pelo setor produtivo e indispensável aos programas de melhoramento animal. O Brasil é líder na produção mundial de embriões bovinos, atingindo 266.594 transferências comunicadas em 2006. As raças leiteiras participam com 8,19% da produção, sendo a técnica de TE utilizada para a produção de cerca de 40% dos embriões dessa categoria, que totalizaram, naquele ano, 6.037 embriões provenientes de raças zebuínas e 2.615 provenientes de raças taurinas (Viana e Camargo, 2007).

A produção *in vivo* de embriões é uma técnica que visa a produção do maior número possível de embriões a partir de uma doadora, que resultem em gestações e produtos nascidos. As principais etapas do processo incluem a seleção das doadoras, o tratamento hormonal para estimular a superovulação, a sincronização do ciclo estral das doadoras e das receptoras, e os procedimentos necessários para recuperar, manipular, criopreservar e transferir (inovular) os embriões produzidos (Viana et al., 2002).

### 2.2.1 O processo de superovulação

A espécie bovina é considerada monovulatória, e apresenta crescimento folicular num padrão de ondas. A emergência de uma onda folicular é caracterizada pelo crescimento ordenado de folículos a partir de 1,0 mm de diâmetro (Adams et al., 2008), em resposta ao estímulo de Hormônio Folículo Estimulante (FSH). No entanto, a maioria dos aparelhos de ultrassom consegue detectar esse crescimento a partir de diâmetros de 3,0 a 4,0 mm. Por cerca de dois dias a partir da detecção, a taxa de crescimento é similar entre os folículos da onda, quando então, um folículo é selecionado a continuar a crescer, se tornando dominante, e os remanescentes (subordinados) entram em atresia. O processo de atresia se desencadeia pela supressão da liberação de FSH por hormônios produzidos pelo folículo dominante (por exemplo, estradiol e inibina). Ao mesmo tempo, o folículo dominante continua a crescer devido à capacidade adquirida de sobreviver com menor estímulo de FSH, se tornando mais responsivo e dependente do Hormônio Luteinizante (LH). Sob a influência da progesterona, os folículos dominantes de sucessivas ondas entram em atresia, permitindo assim, a emergência de uma nova onda. Exceção se faz ao folículo dominante presente no momento da luteólise, pois se tornará o folículo ovulatório (Adams, 1994). Ovulações duplas ou triplas ocorrem ocasionalmente em bovinos (Sartori et al., 2004).

A maioria dos ciclos estrais, em taurinos, compreende duas ou três ondas foliculares. A emergência da primeira onda ocorre no dia da ovulação (dia 0) e

da segunda onda ocorre entre os dias nove e dez nos ciclos de duas ondas e nos dias oito e nove, nos ciclos de três ondas. Neste último, a terceira onda emerge no dia 15 ou 16 (Adams, 1994).

Concentrações plasmáticas de FSH normalmente flutuam durante o ciclo estral, alcançando valor máximo quando o folículo dominante, em desenvolvimento, possui 4 mm de diâmetro, e passando por redução progressiva até atingir concentrações basais, no momento da divergência folicular (Mihm et al., 1997).

Múltiplas ovulações em bovinos são induzidas pelo tratamento com gonadotropinas exógenas que possuem atividade tipo FSH. Essas substâncias estimulam o crescimento de folículos pré-antrais normais, que se tornariam subordinados, durante o processo natural de divergência folicular (Monniaux et al., 1983).

Apesar da TE ser empregada comercialmente desde a década de 70, os resultados alcançados por essa técnica ainda permanecem semelhantes aos daquela época (Hasler, 2003). A variabilidade de resposta à superovulação é um dos maiores problemas encontrados na implantação de um programa de TE em bovinos (Mapletoft et al., 2002). A resposta das doadoras taurinas e zebuínas à superovulação apresenta grande variabilidade, tanto na taxa de ovulação, quanto na produção de embriões viáveis (Monniaux et al, 1983; Armstrong 1993; Peixoto et al., 2002). A ausência de resposta ao tratamento superovulatório ocorre em aproximadamente 20 a 30% dos animais

(Hahn, 1992), enquanto que outros 20 a 30% respondem apenas modestamente e com baixas taxas de fecundação (menos de seis embriões viáveis por coleta), e 30% das doadoras apresentam número de embriões viáveis superior a sete (Rodrigues, 2001).

A análise de dados de 5.387 superovulações a partir de 2.941 doadoras da raça Holandês, distribuídas em rebanhos brasileiros, mostrou que a média de embriões transferíveis produzidos por superovulação foi de  $5,9 \pm 4,82$ , sendo que a maioria dos tratamentos superovulatórios resultou em apenas um embrião transferível (Tonhati et al., 1999).

Para animais da raça Gir, a literatura mostra médias de 2,3 a 4,1 embriões viáveis obtidos por coleta (Coelho, 1988; Lopes, 2003; Márquez et al., 2005; Prado, 2006; Peixoto et al., 2006; Viana et al., 2007).

### *2.2.2 Fatores que afetam o processo de superovulação*

Segundo Armstrong (1993), os fatores que determinam a resposta ao tratamento de superovulação podem ser divididos em: fatores que influenciam a resposta ovulatória das doadoras, fatores relacionados ao programa e manejo animal, e fatores que afetam a fecundação e a viabilidade embrionária.

A resposta das doadoras ao estímulo superovulatório se relaciona com a capacidade dos folículos ovarianos se desenvolverem, em resposta à aplicação de gonadotropinas exógenas, e ovularem. Monniaux et al. (1983) atribuem ao padrão individual como

sendo o principal componente da grande variação da resposta aos protocolos de superovulação. Segundo os autores, o potencial para o crescimento dos folículos, com posterior ovulação ou luteinização em resposta ao tratamento superestimulatório, é altamente correlacionado com o número de folículos de duas ou mais camadas de células da granulosa, presente nos ovários antes do tratamento, sendo esta quantidade altamente variável (53 a 755) entre os animais estudados. Sendo assim, segundo esses autores, indivíduos que possuem menos de 200 folículos normais em crescimento nos ovários irão sempre apresentar resposta ruim devido ao fato de que a sensibilidade desses animais teria, provavelmente, origem genética. Trabalhos mais recentes mostraram que o número de folículos maiores que 3,0mm de diâmetro, presentes nos ovários, apresenta alta repetibilidade em animais, tanto de corte como de leite (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007).

Todavia, se os animais apresentarem potencial para o crescimento dos folículos, o destino desses poderá ser a luteinização ou a ovulação. Segundo Monniaux et al. (1983), o número de folículos luteinizados se correlaciona com o número de folículos atrésicos, maiores que 0,5 mm presentes nos ovários; e o número de ovulações se correlaciona com o número de folículos normais maiores que 1,7 mm de diâmetro, e, também, com a taxa de crescimento desses folículos.

A literatura reporta fatores como idade (Lerner et al., 1986), o estado nutricional (Hendriks e Rone, 1986), e saúde da doadora (Hasler et al., 1983), influenciando a resposta superovulatória.

Provavelmente, esses fatores podem estar associados com a qualidade dos folículos presentes nos ovários no momento da superovulação, podendo, assim, determinar o destino dos mesmos.

Os fatores relacionados ao programa superovulatório incluem, principalmente, aqueles envolvidos com protocolo hormonal utilizado. Dentre esses, estão o tipo, a partida, a dose, a relação LH/FSH no produto utilizado, o dia do ciclo estral no início e a duração do tratamento (Elsden et al., 1978; Newcomb et al., 1979; Garcia et al., 1982; Adams, 1994; Kanitz et al., 2002).

Os extratos hipofisários de suínos (contendo diferentes concentrações de FSH e LH) são as preparações mais comumente utilizadas nos processos atuais de superovulação. Apesar da foliculogênese depender desses dois hormônios, as altas concentrações de LH nas preparações induzem a ovulação prematura ou a luteinização de folículos, ocasionando baixa resposta superovulatória (Visintin et al., 1999). Segundo Kanitz et al. (2002), o LH exógeno não é necessário para a indução da superovulação, mas é tolerado até certa quantidade, sem efeitos negativos na resposta.

A meia vida do FSH, na vaca, foi estimada em 5 horas ou menos e, portanto, é recomendável que seja aplicado duas vezes por dia, para a obtenção de sucesso na indução da superovulação (Monniaux et al., 1983). Além disso, esquema de doses decrescentes por quatro dias se torna mais adequado (Massey e Oden, 1984).

Já é bem estabelecido que o início do tratamento gonadotrópico no momento da emergência folicular, quando há ausência do folículo dominante, irá coincidir com a presença de maior número de folículos capazes de responder ao tratamento, resultando na melhor resposta à superovulação (Nasser et al., 1993; Adams, 1994). Segundo Moor et al. (1984), folículos de tamanho médio, não atrésicos, são mais abundantes nos dias 0 a 5 e 9 a 13 do ciclo estral e, o início do tratamento neste período resulta nas melhores respostas superovulatórias. Trabalhos da literatura mostram correlação de 0,4 a 0,5 entre o número de folículos de médios (3 a 6 mm), observados nos ovários antes do início do tratamento superovulatório, com a resposta de doadoras taurinas (Kanitz et al., 2002) ou zebuínas (Viana et al., 2007).

Tratamentos tradicionais de superovulação são iniciados por volta dos dias 8 a 12 do ciclo estral, buscando coincidirem com o início da segunda onda de crescimento folicular. Porém, esses protocolos exigem observação do “cio base” para se determinar o dia do início do tratamento, podendo ainda, não coincidirem exatamente com o início da onda devido à variação do número de ondas foliculares entre os animais (Bó et al., 2002). Segundo esses últimos autores, a maneira mais factível para sincronizar o momento do início do tratamento de superovulação com a emergência da onda folicular é a manipulação da emergência da onda. Isso pode ser feito via métodos mecânicos (como a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom) ou por tratamentos hormonais. A aspiração do folículo dominante ou de folículos

maiores que 5mm de diâmetro resulta no surgimento de uma onda de FSH no dia seguinte, seguida pela emergência de uma nova onda dois dias após a aspiração (Bergfeld et al., 1994; Baracaldo et al., 2000).

O uso do estradiol combinado à progesterona ou progestógenos é bastante eficiente para a sincronização da emergência da onda folicular e, por isso, esse tratamento tem sido amplamente utilizado nos esquemas de superovulação (Bó et al., 2002). Segundo a revisão desses autores, concentrações séricas de progesterona semelhantes às do diestro acarretam redução da frequência de pulsos de LH, causando supressão do crescimento do folículo dominante e, conseqüentemente, sua regressão, seguida pela emergência de uma nova onda folicular. Adicionalmente, o estradiol suprime o crescimento dos folículos antrais via redução na produção de FSH. Assim, quando esse hormônio é metabolizado, ocorre emergência de uma nova onda de crescimento folicular, em média 3 a 4 dias após o tratamento. O dia da emergência da onda folicular, após o tratamento, não difere entre animais taurinos, zebuínos ou mestiços (Carvalho, 2004).

Raças zebuínas apresentam algumas particularidades em relação ao ciclo estral que podem estar envolvidas nas diferentes respostas superovulatórias dessa subespécie, em comparação aos taurinos. Essas diferenças se relacionam à dinâmica folicular ovariana incluindo o número de ondas foliculares (podendo chegar a quatro ou cinco) ao menor tamanho máximo do folículo dominante, quando comparadas às raças européias

(Viana et al., 2000, Borges, 2001), e ao corpo lúteo de menor tamanho e menor concentração plasmática de progesterona observados em *Bos taurus indicus* (Randel, 1984; Segerson et al., 1984).

Adicionalmente, zebuínos são mais sensíveis às gonadotropinas em relação aos taurinos, e quando essas duas subespécies são desafiadas com a mesma dose de FSH, os primeiros produzem maior número de estruturas coletadas, porém com menor número de embriões transferíveis por coleta (Massey e Oden, 1984). Por isso, menores doses de gonadotropinas, do que as normalmente utilizadas para superovulação de animais *Bos taurus taurus*, parecem ser mais eficientes em animais *Bos taurus indicus* (Visintin et al., 1999; Barros e Nogueira, 2001).

Foi observado que novilhas *Bos taurus indicus* apresentam maior número de folículos recrutados no meio da onda de crescimento folicular (em relação a novilhas taurinas), sugerindo potencial de maior resposta ao tratamento superestimulatório (Carvalho, 2004). Segundo Baruselli et al. (2007), o aumento no número dos folículos presentes nos ovários pode estar relacionado ao sistema Fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1 (IGF-1), pois foi observado que fêmeas da raça Brahman apresentam maiores concentrações plasmáticas desse fator e menores concentrações de FSH (Alvarez et al., 2000). Sabe-se que o IGF-1 está relacionado à maior responsividade dos folículos ao FSH (Armstrong et al., 2001), e as quantidades de FSH são inversamente relacionadas à resposta ovariana à superovulação (Ireland et al., 2007).

### **2.2.3. *Influência da época do ano na produção de embriões***

Os principais efeitos da época do ano na produção e desenvolvimento de embriões relacionam-se tanto aos parâmetros climáticos, como temperatura e umidade do ar, quanto à disponibilidade de alimentos, em sistemas onde os animais são manejados a pasto. O aumento da temperatura e umidade ambientes, observado durante as épocas mais quentes do ano, pode exercer influência negativa sobre a qualidade embrionária de fêmeas bovinas, principalmente naquelas de raças taurinas, que são mais susceptíveis ao estresse calórico. Por outro lado, alguns trabalhos observaram que animais zebuínos podem apresentar variação na produção e qualidade embrionária em determinadas épocas do ano em decorrência de fatores que podem estar relacionados ou não, à disponibilidade de alimentos, luminosidade, fotoperíodo, etc.

#### **2.2.3.1. *Efeitos de estresse calórico sobre a reprodução e produção de embriões em fêmeas bovinas***

O estresse calórico ocorre quando a taxa de ganho ou produção de calor de um animal excede a de perda, fazendo com que o mesmo apresente um quadro de hipertermia (Dhiman e Zaman, 2001). Alterações na temperatura retal (TR) e frequência respiratória (FR) são os dois parâmetros mais utilizados como medida de conforto animal e adaptabilidade a ambientes adversos (Hemsworth et al., 1995). A temperatura retal normal de bovinos adultos pode variar de 38°C a 39°C, e a frequência respiratória entre 24

e 36 movimentos respiratórios por minuto (Stöber, 1993).

A zona de termoneutralidade é aquela que permite que o animal mantenha sua homeotermia pelos processos de produção e perda de calor, tais como a radiação, convecção, condução e evaporação. Para bovinos leiteiros essa zona situa-se entre 5°C e 25°C (Yousef, 1985) podendo alcançar limite superior de até 27°C (Fuquay, 1981). O limite de umidade relativa do ar ideal para animais domésticos varia de 60% a 70% (Müller, 1989). A partir desse limiar, ocorrem alterações no metabolismo do animal, na tentativa de manter a temperatura corporal constante.

Um dos mecanismos mais importantes para o controle da temperatura é a perda de calor pelos métodos evaporativos (sudação ou evaporação pelo trato respiratório superior). De acordo com Shearer e Beede (1990), quando a temperatura ambiente excede 21°C, os métodos evaporativos se tornam o principal mecanismo para perda de calor. Assim, o Índice de Temperatura e Umidade (ITU) é um parâmetro mais adequado para se indicar a ocorrência de estresse calórico nos animais, uma vez que, além da temperatura, esse índice também leva em consideração a umidade relativa do ar. Esse último parâmetro se relacionada inversamente à capacidade do animal em dissipar calor por métodos evaporativos. Armstrong (1994) classificou o estresse térmico em taurinos de acordo com a variação de ITU: em ameno ou brando (72 a 78), moderado (79 a 88) e severo (89 a 98). Sendo assim, ITU abaixo de 72 caracterizaria um ambiente sem estresse por calor.

Zebuínos regulam melhor a temperatura corporal em resposta ao estresse calórico quando comparados a taurinos (Finch, 1986). Durante períodos contínuos de alta umidade e temperatura, as alterações na ingestão de alimentos, temperatura corporal, frequência respiratória e gasometria sangüínea são menos evidentes em zebuínos, comparados a taurinos (Beatty et al., 2006). Tal fato se deve, em parte, à aquisição de adaptações evolutivas pela subespécie *Bos taurus indicus* (Hansen, 2004). Segundo a revisão desse autor, essas características são relacionadas com menor produção de calor de animais zebuínos (devido a sua menor taxa de metabolismo) e, também, pela maior eficiência na dissipação do calor, por exemplo, devido à maior facilidade de vasodilatação periférica e pela presença de glândulas sudoríparas maiores e com maior número de camadas de células epiteliais.

Segundo Hafez (1973), o intervalo de termoneutralidade para animais da raça Brahman corresponde às temperaturas de 10°C e 27°C, e de acordo com Shearer e Beede (1990) o processo de sudação se inicia a partir de temperatura ambiente de 32°C para taurinos, e de 35°C para zebuínos.

Do ponto de vista bioclimático, mesmo em animais mestiços HZ, que são considerados tolerantes ao calor, altas temperatura e umidade podem ocasionar alterações comportamentais e fisiológicas (Pires et al., 1999). Azevedo et al. (2005) estimaram valores críticos superiores de ITU iguais a 80, 77 e 75 (quando foram consideradas alterações nas TR), ou iguais a 79, 77 e 76 (quando foram consideradas alterações nas FR),

para os animais dos grupos genéticos 1/2, 3/4 e 7/8 HZ, respectivamente. Torres Jr. (2007) não observou estresse calórico em vacas não lactantes da raça Gir, submetidas a ambientes de ITU variando entre 62,2 a 87,4.

Os efeitos das condições climáticas na eficiência reprodutiva de bovinos refletem-se na taxa de gestação, que sofrem redução nas épocas mais quentes do ano, tanto em condições subtropicais (Badinga et al., 1985), quanto tropicais (Pires et al., 2002), devido ao efeito negativo da alta temperatura ambiente sob diversos processos relacionados à reprodução. O estresse calórico reduz a atividade de monta e duração do estro (Thatcher e Collier, 1986), aumenta a incidência de anestro e ovulações silenciosas (Gwazdauskas et al., 1981), e acarreta: inibição da dominância folicular (Badinga et al., 1993; Wolfenson et al., 1995; Wilson et al., 1998), redução da produção de estradiol e androstenediona pelas células foliculares (Wolfenson et al., 1997; Roth et al., 2001; Bridges et al., 2005), redução nas concentrações plasmáticas de LH (Wise, 1988) e alteração no fluxo sanguíneo no útero (Wolfenson et al. 2000). A redução na qualidade dos oócitos e no desenvolvimento embrionário, causada pelo estresse calórico, ocorre tanto como consequência dessas alterações reportadas acima, bem como devido ao efeito direto das altas temperaturas sobre essas estruturas.

O estresse calórico pode reduzir a taxa de fecundação e competência do oócito em se desenvolver até o estágio de blastocisto, tanto *in vitro* ou *in vivo* (Wolfenson et al., 2000; Zeron et al.,

2001; Al Katanani et al., 2002; Sartori et al., 2002). A elevação de 0,5°C na temperatura retal foi suficiente para causar esse comprometimento (Gwazdauskas et al. 1973; Al-Katanani et al., 2002).

Oócitos submetidos a condições adversas podem ser prejudicados desde o início do desenvolvimento do folículo (Britt, 1992). Todavia, as consequências são mais pronunciadas quando o aumento de temperatura ocorre próximo do momento do estro, sugerindo que o processo de maturação é bastante susceptível ao estresse calórico (Edwards e Hansen, 1996). Novilhas da raça Holandês superovuladas e submetidas a estresse calórico durante as fases finais de maturação do oócito (entre o momento do estro e a inseminação), produziram menor número de embriões viáveis e maior número de embriões com desenvolvimento atrasado (Putney et al., 1988), em comparação a novilhas não submetidas ao estresse. Da mesma forma, observou-se redução na taxa de gestação de vacas da raça Holandês que apresentaram maiores temperaturas retais nos dias -1 ou +1, em relação ao dia da inseminação (Pegorer et al., 2006). O choque térmico ocorrendo durante a maturação do oócito reduz sua síntese protéica (Edwards e Hansen, 1996) e induz efeitos apoptóticos (Roth e Hansen, 2004; Roth e Hansen, 2005), translocação prematura dos grânulos corticais (Payton et al., 2004), desorganização dos microtúbulos e do citoesqueleto e o não-alinhamento dos cromossomos na placa metafisária (Roth e Hansen, 2005).

Os efeitos deletérios da hipertermia também são bastante pronunciados quando ocorrem durante as primeiras clivagens do embrião (Putney et al., 1989; Ealy et al., 1993; Eberhardt et al., 2005). Até sete dias de gestação os embriões são bastante sensíveis ao estresse calórico (Hansen e Ealy, 1991) e se tornam mais resistentes à medida que se desenvolvem (Edwards e Hansen, 1997). Por isso, alguns estudos mostram que vacas sob estresse calórico podem apresentar maior taxa de gestação quando recebem embriões de sete dias, produzidos *in vitro* ou *in vivo* (a partir de animais que não sofreram estresse calórico), do que quando são inseminadas (Putney et al., 1989; Ambrose et al., 1999; Vasconcelos et al., 2006).

Em relação à duração e intensidade do estresse calórico, estudos *in vitro* demonstram que o desenvolvimento embrionário pode ser prejudicado tanto por condições de estresse severo e de curta duração, quanto nos menos intensos e prolongados. A taxa de desenvolvimento em blastocisto foi reduzida em embriões de uma ou duas células, cultivados a 41°C por 9 ou 12 horas, quando comparado com aqueles cultivados a 38,5°C e/ou 40°C (Rivera e Hansen 2001; Jousan e Hansen, 2004; Rivera et al., 2004b). Por outro lado, embriões expostos a flutuações de temperatura similares às que ocorrem com a TR de vacas sob estresse calórico, sofreram redução do seu desenvolvimento após oito dias de incubação (Rivera e Hansen, 2001).

Os efeitos deletérios do choque térmico na qualidade e viabilidade embrionária são relacionados a alterações das

mitocôndrias (Rivera et al., 2003), mudanças no citoesqueleto celular (Rivera et al., 2004a) e aumento no número de células apoptóticas (Paula-Lopes e Hansen, 2002).

A termotolerância de oócitos e embriões pode ser regulada por uma variedade de fatores endógenos e exógenos, incluindo expressões de genes dependentes do estágio de desenvolvimento, a produção de proteínas do choque térmico (HSP), a proteção proporcionada pelos sistemas de defesa antioxidantes e, possivelmente, modificações genéticas dos animais (Ju, 2005). A HSP 70 desempenha importante papel na resistência das células ao aumento da temperatura, estabilizando a estrutura protéica, reparando as proteínas desnaturadas, estabilizando o citoesqueleto, preservando a função normal dos ribossomos e impedindo a apoptose (Hansen, 2002).

Em relação às modificações genéticas, existem fortes indícios de que *Bos taurus indicus* possuem genes relacionados à resistência ao calor, baseados na maior resistência ao choque térmico de embriões e linfócitos de animais dessa subespécie, em comparação a taurinos (Paula-Lopez et al., 2003; Hernandez-Céron et al., 2004). Essa maior resistência de embriões zebuínos ao choque térmico proporciona seu maior potencial de desenvolvimento durante as épocas mais quentes do ano, em comparação aos taurinos. Rocha et al. (1998) observaram que doadoras *Bos taurus taurus* produzem maior porcentagem de oócitos normais, fecundados, mórulas e blastocistos durante a estação amena do que na não amena, mas nenhuma diferença foi

detectada em oócitos de doadoras da raça Brahman. Outro trabalho realizado entre o final da primavera e início do outono no Brasil (Camargo et al., 2007) mostrou que oócitos imaturos obtidos a partir de vacas da raça Gir apresentam maior capacidade de se desenvolver em blastocistos após maturação e fecundação *in vitro*, em comparação aos oócitos obtidos a partir de vacas da raça Holandês. Além disso, esses primeiros produziram menor quantidade de HSP 70.1, associando-se com sua adaptação ao clima tropical. A menor produção de blastocistos a partir de oócitos de vacas da raça Holandês ocorreu devido à baixa taxa de fecundação e também pela reduzida capacidade dos embriões se desenvolverem.

Dessa forma, a utilização de cruzamentos entre taurinos e zebuínos pode conferir aos embriões maior termotolerância, em comparação a embriões taurinos puros. Segundo Block et al. (2002), embriões produzidos pela fecundação de oócitos da raça Brahman com espermatozóides da raça Angus são mais termotolerantes do que aqueles produzidos a partir da inseminação de oócitos da raça Holandês com espermatozóide da raça Angus. No entanto, essa diferença não foi observada quando se comparou a utilização de espermatozóides das raças Brahman ou Angus para inseminação de oócitos da raça Holandês. Os autores reportaram que esse fato pode ser um indicativo que a termotolerância de embriões pode depender mais de fatores produzidos nos oócitos, do que nos espermatozóides.

Em contrapartida, Eberhardt et al. (2005) mostraram que não só o oócito, mas também os espermatozóides de *Bos*

*taurus indicus* contribuem para a resistência dos embriões em estágio de pré-implantação. Assim, oócitos de vacas da raça Holandês foram mais resistentes ao choque térmico (em 12 e 96 horas pós-inseminação) quando fecundados com espermatozóides de touros da raça Nelore, do que com espermatozóides de touros da raça Angus.

### **2.2.3.2. Efeitos da sazonalidade sobre a reprodução e produção de embriões em animais zebuínos**

Segundo Randel (1984), animais zebuínos são mais sensíveis aos efeitos sazonais, possuindo menor fertilidade em épocas de dias mais curtos, em condições de temperatura ambiental mais baixa e quando há menor disponibilidade de forragens, como nos casos de sistemas de criação em pastejo.

Trabalhos da literatura reportam que zebuínos apresentam menor produção de oócitos ou embriões viáveis durante os meses de inverno. Tribulo et al. (1991) verificaram maior número de estruturas totais e fecundadas obtidas em coletas realizadas no verão (9,6 e 7,0; respectivamente), quando comparadas com aquelas do inverno (1,6 e 0,8, respectivamente), para doadoras da raça Brahman mantidas a pasto, usando preparações de FSH contendo 16% de LH. Vacas da raça Nelore produziram maior proporção de oócitos viáveis na época de verão/primavera, quando comparado com a época de outono/inverno (Rubin et al., 2005). Além disso, a superovulação de 40 vacas da raça Gir, no verão e inverno, resultou em médias de 3,5 e 2,7 embriões viáveis, respectivamente (Márquez et al., 2005).

Esses últimos autores observaram que os embriões coletados no verão apresentam menor número de células apoptóticas antes e após a criopreservação, em comparação aos embriões coletados no inverno.

Bastidas e Randel (1987), estudando 1841 coletas de embrião em doadoras da raça Brahman, no estado do Texas (Estados Unidos da América), observaram menor número de embriões viáveis coletados no inverno (2,9) em comparação às outras estações (3,4 a 4,2). Os autores também reportaram que os embriões coletados no inverno produziram menores taxas de gestação. Segundo esses autores, os animais foram mantidos sob as mesmas condições nutricionais durante o ano e, portanto, outros fatores como a luminosidade, temperatura e diferenças genéticas podem influenciar a função reprodutiva dos bovinos.

Em contrapartida, em um estudo realizado no Brasil com doadoras da raça Nelore submetidas a bom manejo nutricional, não foi observado efeito da época do ano na coleta de embriões viáveis (média de 11,0 e 9,8 para verão e inverno, respectivamente), nem na taxa de gestação de embriões transferidos para vacas (65,19%) e novilhas (55,97%), respectivamente (Souza et al., 2007). Adicionalmente, Lopes (2003) também não observou diferença na produção de estruturas totais e viáveis a partir da superovulação de vacas da raça Gir entre as épocas de inverno e verão, no estado do Rio de Janeiro. No entanto, os animais desse experimento foram submetidos a manejos nutricionais semelhantes, e além disso, não foi observada grande variação na

temperatura ambiente, entre as duas épocas estudadas, que foram de 23,1°C (15°C a 32°C) e 22,7°C (10,1°C a 32,1°C) para verão e inverno, respectivamente.

### **2.3. Criopreservação de embriões**

A criopreservação tem como finalidade ampliar as aplicações potenciais da tecnologia da TE. O armazenamento de embriões em nitrogênio líquido por tempo indeterminado permite a preservação do excedente produzido, o transporte de embriões para diferentes locais, a escolha da melhor época para realizar a transferência e, além disso, elimina a necessidade de sincronizar o ciclo estral de doadoras e receptoras, viabilizando assim, a utilização do estro natural dessas últimas.

Os protocolos de criopreservação objetivam proteger os embriões contra a formação de cristais de gelo intracelulares durante o congelamento, e a recristalização durante o reaquecimento. Para prevenir a formação de gelo intracelular, a água é substituída por crioprotetores permeáveis, e os embriões são desidratados em taxas relativamente lentas (Palasz e Mapletoft, 1996). Após o congelamento/descongelamento, os agentes crioprotetores devem ser removidos do embrião antes da transferência, permitindo que ocorra, assim, a re-hidratação do mesmo, que deve acontecer numa taxa que impeça a excessiva expansão das células e seu consequente rompimento (Voelkel e Hu, 1992).

A criopreservação pode causar danos que resultam em fragmentação do DNA

e/ou transcrição de genes relacionados ao processo de apoptose, reduzindo a capacidade de desenvolvimento de embriões congelados (Park et al., 2006). Assim, Márquez - Alvarado et al. (2004) observaram maior número de células apoptóticas em embriões F1 (Holandês x Gir) criopreservados, em relação aos não criopreservados.

O etilenoglicol tem sido efetivamente empregado como crioprotetor para embriões bovinos, apresentando vantagens como sua alta permeabilidade e a possibilidade da realização da transferência direta dos embriões congelados, sem necessitar da etapa adicional de re-hidratação, tal qual ocorre com o glicerol e, por isso, tem sido bastante aplicável nas condições de campo (Voelkel e Hu, 1992; Dochi et al., 1998).

Segundo Hasler (2001), ocorre queda de aproximadamente 10 a 13 pontos percentuais na taxa de gestação após transferência de embriões criopreservados, em relação aos transferidos a fresco. O mesmo autor avaliou a transferência de mais de 21.000 embriões, de três bases de dados diferentes, e reportou taxas de gestação variando de 68,3% a 77,1% para embriões transferidos a fresco, e de 56,1% a 68,7% para embriões criopreservados. Outros estudos mostraram taxas de gestação de 51% e 53,8% para embriões transferidos a fresco (Callesen et al., 1998; Martinez et al., 2002) e de 39%, 44,7% 35,6%, 45,4% e 41% para embriões criopreservados (Callesen et al., 1998; Dochi et al., 1998; Sá et al., 2001; Martinez et al., 2002; Béynei et al., 2006, respectivamente).

Para embriões zebuínos transferidos a fresco, foram reportadas taxas de gestação de 52% (Coelho, 1988) e de 63,7% (Peixoto et al., 2007). Segundo esses últimos autores, a taxa de gestação não diferiu entre as raças dos embriões (Gir, Guzerá ou Nelore). A taxa de gestação a partir de transferência de embriões criopreservados da raça Nelore foi de 49,2% (Souza et al., 2007).

Zanenga (1993) reportou que a taxa de gestação de embriões criopreservados em glicerol varia de 43,3 a 56,1%, no caso de zebuínos, enquanto que os embriões taurinos produzem 67,8% de gestação. Segundo o autor, os embriões zebuínos apresentam variações na qualidade após descongelamento e, conseqüentemente, no percentual de gestação. Já os taurinos, segundo o autor, se comportam de maneira bastante homogênea quando a criopreservação é realizada dentro das especificações propostas.

Segundo Visintin et al. (2002) embriões zebuínos apresentam maior susceptibilidade aos danos causados pelo processo de criopreservação. Em estudo com microscopia eletrônica, os autores observaram que embriões da raça Nelore apresentam menores concentrações de gotículas lipídicas, além de maiores quantidades de vesículas endossômicas e mitocôndrias comparados aos da raça Holandês, quando avaliados a fresco. Além disso, também foi observado que após o processo de criopreservação, os embriões zebuínos apresentaram maior quantidade de células mortas, lisadas e edemaciadas em comparação aos embriões taurinos.

## **2.4. *Transferência de embriões em rebanhos leiteiros***

Um importante fator a ser considerado na implantação de programas de TE, para formação e manutenção de rebanhos, é a disponibilidade de receptoras, que representam a maior parte do custo desses programas (Looney et al., 2006). Sendo assim, a escolha desses animais deve se basear na melhor relação custo/benefício, que é altamente dependente da eficiência desses em responderem aos protocolos de sincronização, de se tornarem gestantes e levarem a gestação a termo.

### **2.4.1. *Fatores relacionados ao estabelecimento da gestação em receptoras de embrião***

A sobrevivência embrionária inicial depende do balanço entre sinais luteolíticos advindos do útero e a produção de fatores antiluteolíticos, como o Interferon- $\tau$  (IFN- $\tau$ ) pelo embrião, sendo a progesterona o principal hormônio envolvido neste processo (Mann e Laming, 2001). Por volta do dia oito a nove do ciclo estral, o embrião eclode da zona pelúcida e inicia seu alongamento em torno do 13<sup>o</sup> dia, próximo ao momento do reconhecimento materno da gestação. Esse processo é acompanhado por aumento significativo no seu metabolismo e na secreção de IFN- $\tau$  (Thatcher et al., 1995). Sendo assim, o período crítico de perda embrionária precoce em bovinos está entre o dia oito e 13 após a fecundação (Morris et al., 2001)

Quantidades adequadas de progesterona são necessárias para a modulação da secreção endometrial, e

consequentemente da condição uterina para receber o embrião (McEvoy et al., 1995). Concentrações sub-ótimas desse hormônio podem acarretar perdas gestacionais (Mann Lamming, 2001), normalmente desencadeadas pela involução luteal precoce, sendo que a maior proporção das perdas, por esse motivo, acontece entre os dias quatro a sete de gestação (Inskip, 1995).

Trabalhos da literatura reportam que qualidade do embrião afeta a taxa de gestação, sendo essa superior para embriões de grau 1 ou excelentes (Lindner e Wright, 1983; Hasler, 2001; Peixoto et al., 2007). Estudos também apontam que a taxa de gestação de embriões a fresco ou congelados não é afetada pelo estágio de desenvolvimento do embrião (Hasler, 2001; Bényei et al., 2006), nem pela assincronia de estros entre doadora e receptora, quando esta é de mais ou menos 24 horas (Callesen et al., 1998; Hasler, 2001; Bényei et al., 2006). Já Peixoto et al. (2007) relatam que maior sucesso foi obtido quando os embriões transferidos foram de blastocistos iniciais ou mórulas, e a receptora apresentou estro um dia antes da doadora.

Em relação à época do ano, estudos envolvendo a transferência de embriões realizados no Brasil, utilizando receptoras mestiças HZ, reportam maiores taxas de gestação no outono (66,2%) em comparação às outras estações (60,2%; 64,4% e 65,2% para verão, inverno e primavera, respectivamente), para embriões zebuínos transferidos a fresco (Peixoto et al., 2007), ou nos meses de setembro a abril (43%) comparadas aos meses de maio a agosto (38%), para embriões da

raça Holandês transferidos pós congelamento/ descongelamento (Bényei et al., 2006).

Considerando-se a categoria da receptora, Hasler (2001) reportou que vacas leiteiras apresentaram menores taxas de gestação quando comparadas às novilhas leiteiras ou vacas e novilhas de corte. Esse último autor reportou taxas de gestação variando de 38,5% a 47,1%, em vacas leiteiras recebendo embriões criopreservados. Dochi et al. (1998), trabalhando com transferência de embriões criopreservados em receptoras da raça Holandês, observaram maior taxa de gestação aos 60 dias em novilhas (44,86%) do que em vacas (39,41%). Porém, outros trabalhos não mostram essa diferença (Wright, 1981; Callesen et al., 1998; Bényei et al., 2006).

#### **2.4.1.1. *Maturidade reprodutiva de receptoras péri-púberes***

Uma das vantagens da utilização de novilhas como receptoras de embrião relaciona-se à alta fertilidade dessa categoria. Segundo Broadbent et al. (1991), novilhas apresentam menor probabilidade de estarem passando por estresse nutricional ou de apresentarem histórico de problemas de saúde, além de apresentarem, potencialmente, melhor condição uterina para a deposição do embrião. Contudo, esses animais devem apresentar maturidade suficiente de todo o eixo hipotálamo-hipófise-ovário-útero, que possa permitir o estabelecimento e manutenção da gestação, e assim a otimização do processo de transferência de embriões.

Na fêmea bovina, define-se puberdade como o primeiro ciclo estral seguido de

ovulação e formação de corpo lúteo de vida normal (Schillo et al., 1992; Kinder et al., 1995). A maturação do hipotálamo, durante o processo de puberdade, envolve redução do efeito “feed-back” negativo do estradiol, e aumento da frequência de pulsos de LH (cerca de 50 dias antes da puberdade).

Os folículos ovarianos em novilhas pré-púberes crescem e regridem em ondas, assim como ocorre em vacas no pós-parto, e o folículo dominante se torna maior com a aproximação da puberdade. Com o desenvolvimento dos folículos ovarianos, ocorre produção de estradiol suficiente para induzir comportamento de estro e onda pré-ovulatória de LH. Ao avançar do processo de puberdade ocorre ovulação ou luteinização de folículos, com formação de corpo lúteo ou folículos luteinizados de curta duração, resultando no aumento transitório de progesterona (Kinder et al., 1995).

O aumento da concentração circulante de estrógeno contribui para o crescimento uterino, especialmente nos momentos próximos à ocorrência da puberdade (Kinder et al., 1995), e o estímulo de progesterona que acontece anteriormente ao estro puberal é essencial para que o desenvolvimento uterino ocorra de forma adequada, permitindo o estabelecimento da gestação (Ruter e Randel, 1986; Kinder et al., 1995).

A maturidade reprodutiva de novilhas pode ser avaliada por meio da palpação transretal do útero e ovários. Rosenkrans e Hardin (2003) atribuíram pontuação, denominada escore de trato reprodutivo (ETR), variando de 1 a 5, para descrição da maturidade do trato genital de novilhas. Segundo esses autores, os

escores 1 e 2 correspondem a útero sem tônus e ovários sem estruturas palpáveis (ETR=1), ou com folículos menores que 8 mm de diâmetro (ETR=2). Esses escores indicam animal imaturo, com baixa fertilidade. O escore 3 corresponde a novilhas com leve tônus uterino e presença de folículos de 8 a 10 mm nos ovários. Os escores 4 e 5 indicam útero com tônus e folículos maiores que 10 mm (ETR=4) ou presença de corpo lúteo palpável (ETR=5) nos ovários. Esses três últimos escores indicam maturidade do sistema reprodutivo, associada à elevada fertilidade.

Idade e peso são fatores fortemente associados ao início da puberdade (Rutter e Randel, 1986), sendo que a idade à puberdade é inversamente relacionada ao plano nutricional (Schillo et al., 1992). Animais que ingerem maior quantidade de energia possuem folículos dominantes maiores, e atingem a puberdade mais cedo, e novilhas que ingerem quantidades limitadas de energia antes da puberdade podem sofrer supressão de liberação dos pulsos de LH (Kinder et al., 1995). Além disso, o acúmulo de gordura parece modular de certa forma o desencadeamento da puberdade (Schillo et al., 1992). O grau de adiposidade é relacionado às concentrações plasmáticas de leptina, que é um peptídeo sintetizado primariamente pelos adipócitos (Barb, 1999). A leptina atua no hipotálamo modulando os peptídeos orexiogênicos (por exemplo o neuro-peptídeo Y) que inibem a secreção de Hormônio Liberador de Gonadotropinas (GnRH). Além disso, atua também na hipófise, estimulando a síntese de LH (Smith et al., 2002). Presume-se que concentrações plasmáticas de leptina tenham que

atingir um limiar crítico para o desencadeamento da função reprodutiva (Barb, 1999). Dessa forma, foi observado que as concentrações desse hormônio elevam à medida que a puberdade se aproxima (Garcia et al., 2002).

A estação do ano também pode se relacionar com a idade à puberdade, inter-relacionando-se ou não com a nutrição. Segundo Schillo et al. (1992), novilhas nascidas na época do outono e que são expostas a condições de primavera, após seis meses de idade, têm a idade à puberdade reduzida em relação às que nascem na primavera. Kinder et al. (1994) reportaram que novilhas da raça Brahman apresentam baixa incidência de corpos lúteos durante o inverno, seguido por aumento da frequência de observações dessas estruturas na primavera.

#### **2.4.1.2. Restabelecimento da ciclicidade e do ambiente uterino após o parto**

A utilização das próprias vacas do rebanho leiteiro como receptoras de embrião pode ser uma alternativa para a reposição do rebanho, reduzindo-se assim os custos com aquisição ou recria e manutenção de fêmeas destinadas a esta finalidade. A transferência dos embriões no período pós-parto das receptoras baseia-se na tentativa de fazer com que o período de serviço seja o mais curto possível, e o sucesso desse procedimento dependerá da capacidade do sistema reprodutivo da vaca de se recuperar da gestação anterior e permitir o estabelecimento de uma nova gestação. Esse processo de recuperação envolve a completa involução uterina, bem como o retorno da atividade cíclica ovariana com

o restabelecimento do eixo hipotálamo-hipófise-ovário-útero (Lamming et al., 1981).

Durante a gestação, as concentrações de progesterona e, principalmente, de estradiol, exercem forte estímulo negativo ao hipotálamo, resultando na diminuição da liberação de GnRH, ocorrendo assim, inibição da síntese e, conseqüentemente, o esgotamento das reservas de LH na hipófise (Nett, 1987). Nesse período, as concentrações circulantes de FSH e LH estão baixas e as ondas ovarianas podem estar ausentes. Devido à luteólise e à remoção da unidade feto-placentária no parto, o “feed-back” negativo dos esteróides ao sistema nervoso central é removido. As concentrações de FSH são normalizadas nos primeiros 3 a 5 dias após o parto, enquanto que as de LH se regularizam em cerca de 10 a 20 dias (Butler e Smith, 1989; Yavas e Walton, 2000). O intervalo entre o parto e a primeira ovulação em vacas leiteiras pode variar entre 19 a 43 dias, sendo esse último valor mais comumente observado naquelas manejadas sob sistema de pastejo (Rhodes et al., 2003).

Um folículo dominante pode iniciar seu crescimento desde 10 a 14 dias após o parto (Rhodes et al., 2003). Segundo Diskin et al. (2003), existem três padrões distintos de desenvolvimento folicular nesse período: 1) ovulação de um folículo dominante com atividade esteroideogênica normal, oriundo da primeira onda de crescimento folicular; 2) desenvolvimento de várias ondas de crescimento folicular acompanhado de folículos anovulatórios até o momento da ocorrência da primeira ovulação; ou 3) desenvolvimento da primeira onda de

crescimento folicular com o folículo dominante tornando-se cístico.

A secreção de LH é o fator limitante para o retorno a ciclicidade e, durante o período pós-parto, essa secreção é caracterizada por baixa frequência de pulsos (Nett, 1987). A recuperação da alta frequência de secreção pulsátil de LH é necessária para estimular o desenvolvimento contínuo do folículo dominante, e a produção de estradiol suficiente para induzir a onda pré-ovulatória de LH (Jolly et al., 1995).

No período pós-parto, o aumento da demanda energética da vaca para a produção de leite pode exceder a quantidade de energia que é obtida na dieta, levando a mesma à condição de balanço energético negativo (BEN) com consequente perda de peso e redução da condição corporal (Lucy, 2001). A subnutrição (ou ingestão inadequada de nutrientes relativos à demanda) é o principal fator envolvido no desencadeamento do anestro pós-parto prolongado, especialmente em animais submetidos a regimes de pastagem (Nett, 1987; Jolly et al., 1995).

A condição energética é considerada o fator nutricional de maior influência na reprodução (O'Callaghan e Bolland, 1999) e a duração do período de BEN está inversamente relacionada ao desempenho reprodutivo de vacas no pós-parto. Sendo assim, trabalhos mostram que a restrição alimentar e o BEN estão associados à redução da frequência dos pulsos de LH (Butler e Smith, 1989; Schillo, 1992), à redução desenvolvimento folicular (Lucy et al., 1991), à redução do tamanho máximo atingido pelo folículo dominante (Diskin

et al., 1999); ao atraso na primeira ovulação (Butler e Smith, 1989; Lucy et al., 1991), à redução da qualidade do oócito (Snijders et al., 2000), à depressão da função luteal (Villa-Godoy et al., 1988) e à redução da probabilidade de concepção (Wiltbank et al., 1962; Buckley et al., 2003).

O BEN relaciona-se à alteração do metabolismo para uma situação catabólica, provocando elevação da secreção de hormônio do crescimento (GH) e diminuição da produção de IGF-1 e de insulina (Spicer et al., 1990). Essas modificações endócrinas afetam o crescimento folicular de maneira direta, influenciando a sensibilidade do ovário às gonadotropinas, ou indireta, diminuindo a frequência de pulsos de LH e, também, de suas concentrações (Beam e Butler, 1997; Gong, 2002; Webb, 2004).

A insulina, conjuntamente com glicose, pode estimular a liberação de GnRH pelo hipotálamo (Arias et al., 1992), estimular a proliferação e esteroidogênese das células foliculares (Wetteman e Bossis, 2000) e a produção IGF-1 pelo fígado (Webb et al., 2004). O IGF-1 estimula a proliferação e a mitogênese das células da granulosa, aumentando também o número de receptores de gonadotropinas e sua atividade. Com isso, a esteroidogênese das células foliculares (Gutierrez et al., 1997; Webb et al., 2006), bem como a produção de progesterona pelas células luteais (Scham e Berisha, 2004), são positivamente relacionadas às concentrações desse hormônio. É também provável que IGF-1 regule a função gonadotrófica da hipófise (Roberts et al., 1997). Além disso, IGF-1

e/ou insulina podem ser benéficos à maturação do oócito e ao desenvolvimento embrionário inicial (Gong, 2002).

A primeira ovulação após o parto é dependente da produção de estradiol pelo folículo dominante, suficiente para estimular o pico de LH pré-ovulatório (Day, 2005). À medida que o efeito do BEN é reduzido, os estoques de LH na hipófise vão sendo restabelecidos, e as concentrações plasmáticas e frequências dos pulsos de LH, bem como as concentrações plasmáticas de estradiol aumentam linearmente e, como consequência, a cada onda folicular, o diâmetro máximo alcançado pelo folículo dominante aumenta, até a ocorrência da ovulação (Jolly et al., 1995).

Sendo assim, redução do BEN, e o consequente aumento nas concentrações circulantes de IGF-1 (Roberts et al., 1997) e insulina (Gong, 2002) estão relacionados ao retorno da ciclicidade no pós-parto. Assim, é visto que vacas submetidas a dieta com baixo teor de energia apresentam maior número de ondas de crescimento folicular, antes da primeira ovulação, do que aquelas que receberam dietas com alto teor de energia (Stagg et al., 1995). Da mesma forma, maiores concentrações de IGF-1 foram observadas em vacas que ovularam durante a primeira onda folicular no pós-parto, em relação às que falharam em ovular (Beam e Butler, 1998).

O corpo lúteo oriundo da primeira ovulação geralmente sofre luteólise prematura, caracterizando um ciclo curto, com duração de aproximadamente

6 a 10 dias (Day et al., 1990). Esta estrutura formada apresenta menor tamanho e menor produção de progesterona (Short et al., 1990). Segundo Rhodes et al. (2003) a fase luteal curta é consequência de interações entre o útero, o corpo lúteo e possivelmente o folículo ovulatório, sendo a condição uterina o fator mais importante. Observou-se que durante o ciclo curto ocorre liberação prematura de  $PGF_{2\alpha}$  pelo útero (Cooper et al., 1991), por consequência de concentrações insuficientes de progesterona (Zollers et al., 1993) e estradiol (Mann e Lamming, 2000), durante o período que precede esta primeira ovulação.

Segundo Zollers et al. (1993), durante o ciclo estral normal, o estradiol da onda pré-ovulatória estimula a síntese de receptores para progesterona no endométrio. A progesterona inibe diretamente a síntese de receptores uterinos para oxitocina durante o início e o meio da fase luteal. O declínio nas concentrações de progesterona plasmática, no final dessa fase, permite a síntese de receptores para oxitocina no endométrio para que este último hormônio determine a liberação de  $PGF_{2\alpha}$ . A quantidade de receptores para progesterona no endométrio é maior e a de oxitocina menor no quinto dia do ciclo estral de duração normal em vacas. Ao contrário, em vacas que apresentam ciclo estral de curta duração, observou-se maiores quantidades de receptores para oxitocina e menores para progesterona no endométrio. Sendo assim, são observadas correlações positivas entre a ocorrência de ciclos estrais curtos e a baixa concentração de estrógeno plasmático no momento do

estro (Garcia-Winder et al., 1987; Zollers et al., 1993).

Geralmente os intervalos ovulatórios tendem a aumentar com as ovulações subsequentes. Observaram-se 27,3 e 9,2% de ciclos curtos após a primeira e segunda ovulações pós-parto (Royal et al., 2000).

Durante a retomada espontânea dos ciclos estrais, o ciclo curto é importante para promover o estro na ovulação subsequente e assegurar que este estro esteja associado a um ciclo de duração normal (Day, 2005). Dessa forma, a concepção de vacas em lactação se correlaciona com o número de ciclos ovulatórios precedendo a inseminação (Butler e Smith, 1989). A maior fertilidade é alcançada após o terceiro ciclo estral (Thatcher e Wilcox, 1973). Tipicamente, a terceira ovulação ocorre após 50 dias pós-parto, num momento em que a involução uterina já está completa. Segundo a revisão de Ferguson (2005), a taxa de concepção esperada para o terceiro ciclo é de 65%. O mesmo autor mostra que a taxa de concepção após a inseminação de vacas no pós-parto, na primeira ou segunda ovulação, é de 36%.

#### ***2.4.2. Uso de progestógeno e estradiol para a indução e sincronização do estro em receptoras de embrião***

O uso de protocolos que associam a inserção de implantes liberadores de progestógenos e aplicação de estradiol para a sincronização do estro de receptoras tem sido relatado em diversos trabalhos (Bó et al., 2001; Bó et al., 2002). Esses protocolos baseiam-se na premissa de que a liberação de

progestógeno pelo implante, com esse hormônio alcançando concentrações séricas condizentes com a fase luteal do ciclo estral, leva à inibição da frequência dos pulsos de LH, e inibição da ovulação durante o período em que implante está inserido. Foi demonstrado que a administração do estradiol no início do protocolo relaciona-se a efeito luteolítico e também a sincronização da emergência de uma nova onda folicular devido ao efeito de supressão do FSH e também à potencialização do efeito da progesterona na supressão do LH (Burke et al, 1996). A indução de regressão do folículo dominante em decorrência da administração de estradiol é essencial para evitar a presença de folículo persistente, o que se relaciona a baixas taxas de gestação. Após a metabolização do estradiol, inicia-se o crescimento de uma nova onda folicular, cerca de 3,5 a 5 dias após a aplicação desse hormônio (Moreno et al., 2001). Na maioria dos protocolos de sincronização de estro, o dispositivo liberador de progesterona (ou progestógeno) permanece inserido por sete a nove dias. A retirada do dispositivo permite com que o LH armazenado seja liberado em pulsos, o que acarreta na ovulação do folículo dominante presente. A  $PGF_{2\alpha}$  normalmente é aplicada no final do protocolo objetivando a regressão de um eventual corpo lúteo presente. Além disso, alguns protocolos ainda incluem a aplicação de estradiol um dia após a retirada do implante, objetivando a indução do pico pre-ovulatório do LH. Trabalhos mostram que a taxa de gestação de receptoras submetidas a protocolos associando progestógeno e estradiol variou entre 41,7 e 62,7 (Bó et al., 2001).

Protocolos que envolvem a utilização de progesterona e estradiol também têm se mostrado eficientes para indução de ovulações em vacas, a partir de 30 dias pós-parto, e em novilhas, com taxas de ovulação variando de 71% a 90% (Barreiros et al., 2005; Sá Filho et al., 2005ab; Meneghetti et al., 2005; Carvalho et al., 2007; Ruas et al., 2007).

O bloqueio da liberação de LH hipofisário, em decorrência da utilização dos implantes de progestógenos acarreta no armazenamento de LH e, com a retirada do implante, ocorre liberação desse hormônio, em concentração e frequência que possa ocasionar o retorno dos ciclos ovarianos (Breuel et al., 1993). Segundo Rhodes et al. (2003) o tratamento de vacas em anestro com progestógenos pode resultar no desenvolvimento e a maturação dos folículos dominantes, devido ao aumento da secreção de LH e ao estímulo do desenvolvimento de receptores de LH e da secreção de estradiol. O uso de progestógeno esteve associado ao retorno mais rápido à atividade ovariana cíclica no pós-parto em animais que apresentavam baixo peso corporal (Ruas et al., 2005b).

Em novilhas, após o início do processo de maturação sexual, o tratamento com estrógeno pode induzir ondas pré-ovulatórias de LH, pois os estoques de gonadotropinas não são limitantes durante a maturação sexual (Kinder et al., 1995). Tratamento com progestógenos durante a peri-puberdade pode induzir estro e ovulação, porém, as taxas de concepção podem ser baixas, principalmente se as novilhas apresentarem baixa condição corporal (Short et al., 1976).

### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Experimentos 1 e 2: *Produção e criopreservação de embriões*

Nesses experimentos foram produzidos e congelados embriões F1 Holandês x Gir a partir da superovulação de fêmeas das raças Holandês (experimento 1) e Gir (experimento 2), nas épocas de verão e inverno.

O experimento 1 foi realizado na Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa (FEPHB), pertencente à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), situada no município de Igarapé, MG (20° 04' S e 44° 18' W Gr). As superovulações e coletas de embrião foram realizadas durante o inverno (26/07/2006 a 20/08/2006) e o verão (17/01/2007 a 04/02/2007).

Foram utilizadas como doadoras sete novilhas em cada época, com idade média de  $23,0 \pm 3,0$  meses e  $24,7 \pm 3,8$  meses, para inverno e verão, respectivamente; peso corporal médio de  $349,6 \pm 52,0$  Kg e  $362,1 \pm 36,6$  Kg para inverno e verão, respectivamente, e escore de condição corporal (ECC) variando de 3 a 4 (escala de 1 a 5, sendo 1 muito magra e 5 muito gorda - Ferreira, 1990), sendo todos os parâmetros acima semelhantes entre as duas épocas ( $p > 0,05$ ).

O experimento 2 foi realizado na Fazenda Experimental de Felixlândia (FEFX), pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), localizada em Felixlândia, MG (18° 45' S e 44° 52' W Gr). As superovulações e coletas de embrião

foram realizadas durante o inverno (27/06/2007 a 15/07/2007) e o verão (10/01/2007 a 28/01/2007).

Foram utilizadas como doadoras sete novilhas no verão; e duas novilhas e três vacas não lactantes no inverno, sendo uma de primeira e duas de segunda ordem de parto. As doadoras apresentaram idade média de  $40,4 \pm 9,1$  meses e  $28,9 \pm 7,1$  meses, para inverno e verão, respectivamente; peso corporal médio de  $369,2 \pm 42,2$  Kg e  $329,1 \pm 29,6$  Kg para inverno e verão, respectivamente, e ECC variando 3,25 a 4,5. Os valores de peso corporal e ECC foram semelhantes nas duas épocas ( $p > 0,05$ ), porém, a idade média das doadoras no inverno foi superior em relação à do verão. Isso se deve à inclusão de vacas não lactantes no grupo de doadoras, durante o inverno. Nesta época, não foi possível utilizar apenas novilhas, devido ao fato de que apenas dois animais desta categoria apresentaram condições ginecológicas que permitissem sua inclusão no grupo de animais selecionados. De qualquer forma, as vacas não lactantes ou novilhas selecionadas, no inverno, foram submetidas ao mesmo tipo de manejo nutricional.

A seleção das doadoras baseou-se na avaliação de seus históricos reprodutivos e no exame ginecológico realizado por meio de palpação transretal. Foram selecionados animais que apresentaram pelo menos dois ciclos estrais regulares prévios, escore de trato reprodutivo (ETR - Rosenkrans e Hardin, 2003) de 4 a 5 (doadoras da raça Holandês) ou de 3 a 5 (doadoras da raça Gir), além de ausência de qualquer alteração clínica ou reprodutiva.

Os animais foram submetidos aos manejos nutricionais descritos a seguir. Doadoras da raça Holandês foram mantidas em piquete de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.), onde receberam sal mineral à vontade e 2 kg de ração concentrada por animal em cocho coletivo coberto, além disso, durante o inverno, receberam também silagem de milho (*Zea mays*) *ad libitum*, e 2 kg de polpa cítrica, por animal. Doadoras da raça Gir permaneceram em piquetes de *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha* contendo cocho coletivo coberto para o fornecimento de mistura mineral que foi oferecida à vontade nas duas épocas. No inverno, as doadoras também receberam silagem de sorgo (*Sorghum bicolor*) *ad libitum* além de 1 kg de concentrado (A) e 250 g de mistura nitromineral (concentrado B) por dia em cocho coletivo. A suplementação se iniciou 23 dias antes do início do protocolo de superovulação. A análise bromatológica dos alimentos oferecidos no experimento 1 e a composição dos concentrados A e B (experimento 2) encontra-se no anexo 2.

Durante os períodos experimentais foram medidas a pluviosidade, e as temperaturas ambiente máxima e mínima diárias. Também foram medidas as temperaturas de bulbo seco e úmido em três momentos diários: (6h, 12h e 18 h no experimento 1; e 6h30min, 12h e 17h30min no experimento 2). Para tanto, foram utilizados pluviômetros presentes nas fazendas e termômetros de máximas e mínimas e de bulbo seco e úmido, localizados em local coberto próximo ao piquete onde se localizavam os animais. A umidade relativa do ar (UR) foi calculada a partir das temperaturas de bulbo seco e úmido, segundo Silva

(2000). O ITU foi calculado a partir dos dados obtidos utilizando-se a seguinte fórmula:  $ITU = 0,72 \times (BS + BU) + 40,6$ ; sendo BS a temperatura do bulbo seco e BU a temperatura do bulbo úmido (Pires et al., 1999).

A TR e a FR das doadoras da raça Holandês foram mensuradas três vezes ao dia (6h, 12h e 18h), desde o dia do início do protocolo de superovulação até a coleta de embriões. No grupo das doadoras Gir foram feitas as mensurações desses mesmos parâmetros clínicos, duas vezes ao dia (6h e 18h) durante o período da sincronização até a inseminação artificial. A TR foi mensurada utilizando-se termômetro clínico mantido em contato com a mucosa retal, durante três minutos. A FR foi avaliada contando-se os movimentos respiratórios observando-se a área do costado dos animais, por um período de 15 segundos, e os valores observados foram multiplicados por quatro para se obter o número de movimentos respiratórios por minuto (mpm). Para essas mensurações os animais foram conduzidos a uma instalação coberta, e contidos em canzís individuais (Holandês) ou em brete (Gir).

As doadoras foram superovuladas de acordo com os seguintes protocolos: inserção de dispositivo intravaginal contendo 1,9g progesterona (CIDR<sup>1</sup>), independente da fase do ciclo estral (dia 0) e administração de Benzoato de Estradiol<sup>2</sup> pela via intramuscular (2 mg no dia 1 do tratamento para doadoras da raça Holandês ou 1,5 mg no dia 0 do tratamento para doadoras da raça Gir). A

aplicação de FSH<sup>3</sup> (IM) iniciou-se no dia 5, sendo administradas 400 UI nas doadoras da raça Holandês, e 200 UI nas doadoras da raça Gir. A dose total foi dividida em oito doses decrescentes, nas seguintes proporções: 20%, 20%, 15%, 15%, 10%, 10%, 5% e 5%, administradas em intervalos de 12 horas. Junto à sétima dose foi administrado 0,5mg de Cloprostenol Sódico<sup>4</sup> (IM). O dispositivo intravaginal foi retirado no momento da aplicação da última dose de FSH. Nesse momento, as doadoras da raça Gir também receberam uma outra aplicação de Cloprostenol Sódico (0,175mg pela via submucosa no lábio vulvar).

Após a retirada do dispositivo, procedeu-se observação de estro três vezes ao dia nos horários das 6h, 12h e 18h, durante período de 60 minutos (experimento 1) ou 6h, 12h e 17h, por um período de 30 minutos (experimento 2), com auxílio de rufião. Os animais foram submetidos a três inseminações artificiais a cada de 12 horas, iniciando-se 7 a 12 horas após a detecção do estro. Para tanto, utilizou-se sêmen de touros da raça Gir (para doadoras da raça Holandês) ou da raça Holandês (para doadoras da raça Gir), de fertilidade comprovada.

As coletas dos embriões foram realizadas nos dias 6 ou 7 após a primeira inseminação. Previamente, as doadoras foram avaliadas por palpação transretal para a estimativa do número de corpos lúteos em cada ovário, naquelas em que foi possível quantificar. Fêmeas com ausência de corpo lúteo em ambos os ovários não foram submetidas à coleta

---

<sup>1</sup> Pfizer, Brasil.

<sup>2</sup> Estrogin – Farmavet - Brasil

---

<sup>3</sup> Pluset – Calier - Brasil

<sup>4</sup> Ciosin – Shering-Plough - Brasil

de embriões. Considerou-se que houve resposta à superovulação quando as doadoras apresentaram três ou mais corpos lúteos à palpação. O procedimento de coleta foi realizado com os animais contidos em tronco coberto, pelo método não-cirúrgico, em sistema fechado. Uma sonda de Foley<sup>1</sup> foi introduzida e fixada no corpo uterino para a lavagem simultânea dos cornos uterinos. Para cada doadora, foram utilizados de 500 a 1000 mL do meio Dulbecco Modificado (DMPBS<sup>2</sup>).

Após a coleta, procedeu-se a lavagem do filtro coletor de embriões<sup>3</sup> vertendo-se seu conteúdo em placa de Petri. As estruturas foram rasteadas com o auxílio de estereomicroscópio<sup>4</sup> (40x), e então transferidas para outra placa contendo meio DMPBS acrescido de 0,4% de albumina sérica bovina<sup>2</sup> (denominado meio de manutenção 1 - MM1) onde foram classificados (Lindner e Wright 1983) segundo o estágio de desenvolvimento (oócito, mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido) e a qualidade, como descrito a seguir (Anexo 3):

Excelente (Grau 1) – Embrião esférico, simétrico, com células de tamanho, cor e textura uniformes.

Bom (Grau 2) – Embrião com pequenas imperfeições, como alguns blastômeros extrusados, forma irregular e algumas vesículas.

Regular (Grau 3) – Embriões com imperfeições claras, mas não severas, como presença de blastômeros extrusados, vesiculação e algumas células degeneradas.

Ruim (degenerado) – Embriões apresentando imperfeições graves, vários blastômeros extrusados, células degeneradas, células de vários tamanhos, muitas vesículas grandes.

Zonas pelúcidas intactas encontradas foram classificadas como estruturas degeneradas.

Após a classificação, embriões considerados excelentes (grau 1) ou bons (grau 2) foram selecionados para serem criopreservados sendo, em seguida, transferidos para outra placa contendo meio etilenoglicol a 1,5M<sup>2</sup> e imediatamente envasados em palhetas de 0,25mL. O envase procedeu-se de tal forma que houvesse três colunas de líquido intercaladas por ar na palheta, sendo a central correspondente ao embrião em meio etilenoglicol e as duas laterais contendo solução composta por 80% de MM-1 e 20% de soro fetal bovino<sup>2</sup>. Todos os meios utilizados foram previamente filtrados em filtros de 22 micra<sup>5</sup>. Imediatamente após o envase, procedeu-se o congelamento em equipamento CL 5500<sup>6</sup>, utilizando-se a curva pré-programada de número 6, iniciando-se com o resfriamento a 2° C/minuto, da temperatura ambiente até -6° C. Nesse momento procedeu-se a indução da cristalização realizada na extremidade da coluna central da palheta. Posteriormente, os embriões

---

<sup>1</sup> Rusch - Malásia

<sup>2</sup> Nutricell - Brasil

<sup>3</sup> Millipore - EUA

<sup>4</sup> Olympus S240 – Japão

---

<sup>5</sup> Millex - EUA

<sup>6</sup> Cryologic - Austrália

foram mantidos nesta temperatura por 15 minutos (estabilização) e, então, ocorreu redução da temperatura a 0,3° C/minuto até -32° C. Após esse procedimento, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido a -196°C, depositadas em raques e conservadas em botijão criogênico até o momento do descongelamento.

Os dados de temperatura máxima e mínima, temperatura ambiente, UR e ITU obtidos nos diferentes horários, bem como idade, peso vivo e o intervalo da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e o estro, foram comparados, dentro de cada grupo de doadoras (raças Holandês e Gir), sendo os dados submetidos à análise de variância, considerando-se o efeito fixo de tratamento (época do ano), sendo as médias comparadas pelo teste F. O ECC das doadoras foi comparado, entre as épocas pelo teste não paramétrico de Wilcoxon.

Para comparação da FR e TR das doadoras, entre as épocas estudadas, procedeu-se análise de variância, levando-se em consideração os efeitos de época, dia da mensuração e interação desses dois últimos, sendo as médias comparadas pelo teste F. Os dias que foram considerados para comparação foram: inserção do dispositivo intravaginal de progesterona, início das aplicações de FSH, retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, e do estro até o dia da coleta dos embriões (raça Holandês) e dias das aplicações de FSH e dia seguinte à observação do estro (raça Gir). Os resultados da coleta dos embriões (número de estruturas totais, viáveis, congeláveis, degeneradas e não fecundadas, e de embriões excelentes,

bons e regulares) foram analisados pelo teste de Wilcoxon. A taxa de recuperação de estruturas obtidas a partir das doadoras da raça Gir foi comparada, entre as épocas, utilizando-se o teste Qui-quadrado. As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAEG (Fundação Arthur Bernardes - UFV), versão 9.1.

### 3.2. Experimento 3: *Sincronização do estro das receptoras e transferência dos embriões*

O experimento foi conduzido na Fazenda Experimental de Felixlândia (FEFX), pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), localizada em Felixlândia, MG (18° 45' S e 44° 52' W Gr). Cento e três fêmeas, sendo vacas (primíparas ou multíparas) ou novilhas foram submetidas a protocolos de sincronização de estro, durante as épocas de inverno ou verão (Tabela 1).

**Tabela 1: Distribuição das fêmeas utilizadas, conforme categoria e época da sincronização.**

	Inverno	Verão	Total
Novilhas	24	25	49
Vacas	32	22	54
<i>Total</i>	56	47	103

As novilhas utilizadas (mestiças Holandês x Zebu), foram sete F1 Holandês x Gir e 42 de grau de sangue 1/4 Holandês e 3/4 Zebu, oriundas do cruzamento terminal das fêmeas leiteiras F1 com touros das raças Nelore ou Guzará. Os animais foram distribuídos em grupos conforme a época e o protocolo de sincronização utilizado, sendo que a idade e o peso vivo dos animais foi semelhante entre os grupos (Tabela 2).

**Tabela 2: Médias  $\pm$  desvios-padrão da idade e peso vivo das novilhas submetidas à sincronização de estro**

Grupo	n	Idade (meses)	Peso (kg)
VA	25	25,4 $\pm$ 4,5	370,5 $\pm$ 32,7
IA	8	27,1 $\pm$ 5,8	373,5 $\pm$ 27,1
IB	16	26,0 $\pm$ 1,9	354,4 $\pm$ 26,5
<i>Geral</i>	49	25,9 $\pm$ 4,0	365,7 $\pm$ 30,4

VA= novilhas sincronizadas no verão, com o protocolo A; IA=novilhas sincronizadas no inverno, com o protocolo A; IB= novilhas sincronizadas no inverno, com o protocolo B. Médias nas mesmas colunas não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

As vacas eram mestiças F1 Holandês x Zebu de base genética Gir (n=40), Guzerá (n=7) ou Indubrasiladas (n=7), de primeira à nona ordem de parição, com produção média 3.089,08 kg nas lactações encerradas. Todas se encontravam no período pós-parto, entre 21 a 65 dias de lactação. O peso vivo e ECC ao parto, idade à sincronização, o número de dias pós-parto, a produção de leite na pesagem anterior ao início da sincronização, e diâmetro do folículo dominante no dia do início do protocolo de sincronização estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3:Características das vacas F1 utilizadas como receptoras de embrião, distribuídas de acordo com a época de sincronização**

Época	n	Peso ao parto (kg)	ECC ao parto (1-5)	Idade (meses)	DPP (dias)	PL (kg)	Diâmetro FD (cm)
Verão	22	485,8 $\pm$ 58,4	3,8 $\pm$ 0,2	79,9 $\pm$ 18,7	42,4 $\pm$ 13,3	18,6 $\pm$ 2,9	1,3 $\pm$ 0,2
Inverno	32	508,3 $\pm$ 59,0	3,8 $\pm$ 0,2	87,0 $\pm$ 20,2	40,7 $\pm$ 11,4	17,6 $\pm$ 4,0	1,3 $\pm$ 0,2
<i>Geral</i>	54	499,2 $\pm$ 59,3	3,8 $\pm$ 0,2	84,1 $\pm$ 19,8	41,4 $\pm$ 12,1	18,0 $\pm$ 3,6	1,3 $\pm$ 0,2

DPP = dias pós-parto; PL = produção de leite; FD = folículo dominante. Valores nas colunas não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

Desde o dia do parto até o início do protocolo de sincronização, os animais foram mantidos com touros zebuínos de fertilidade comprovada, na proporção de aproximadamente 1:50. Animais selecionados para serem sincronizados foram alocados em outro lote, sem a presença do touro.

As receptoras foram mantidas em piquetes de *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens*, contendo bebedouros e cochos cobertos onde foi fornecida mistura mineral à vontade,

durante os dois períodos experimentais. No inverno as novilhas receberam 1 kg de concentrado (A) e 250 g de mistura nitromineral (concentrado B) por animal/dia, oferecidos em cochos coletivos; e as vacas foram suplementadas com silagem de sorgo (*Sorghum bicolor*) acrescida de 200 g/animal/dia de mistura nitromineral (concentrado B), também em cochos coletivos. Durante as duas épocas as vacas foram suplementadas individualmente com ração concentrada (concentrado A) no momento da

ordenha. A quantidade diária oferecida (dois terços durante a ordenha da manhã e um terço na ordenha da tarde) variou de acordo com a produção de leite e os dias em lactação, sendo que vacas até 30 dias pós-parto recebiam 1,0 kg de concentrado para cada 3,0 kg de leite produzido, e vacas entre 31 a 65 dias pós-parto recebiam 1,0 kg de concentrado para cada 2,5 kg de leite produzidos a partir de 5,0 kg de leite/dia.

Para a seleção das receptoras, procedeu-se a avaliação ginecológica por meio da palpação transretal e ultrassonografia<sup>1</sup>, utilizando-se transdutor linear de 7,5 MHz. Foram selecionadas as novilhas que apresentavam sistema genital sem alterações aparentes, e ETR entre 3 e 5 (Rosenkrans e Hardin, 2003). Todas as novilhas utilizadas no verão possuíam corpo lúteo (ETR=5) antes de serem submetidas ao protocolo de sincronização de estro, sendo, portanto, consideradas cíclicas. No inverno, devido ao fato de poucos animais dessa categoria estarem ciclando, foram selecionadas oito novilhas cíclicas e 16 novilhas acíclicas (ETR = 3 ou 4).

As novilhas cíclicas foram submetidas a protocolo de sincronização (protocolo A) com inserção de dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR<sup>2</sup>) e aplicação de 1,0 mg de Benzoato de Estradiol<sup>3</sup> (IM) no dia 0 (independente da fase do ciclo estral), com posterior aplicação de 0,175mg de Cloprostenol Sódico<sup>4</sup> na submucosa vulvar (dia 7) e retirada do dispositivo intravaginal no

dia 8. As novilhas acíclicas foram submetidas a outro protocolo de sincronização de estro (Protocolo B), com inserção de dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR<sup>2</sup>) e aplicação de 1,0 mg de Benzoato de Estradiol<sup>3</sup> (IM) no dia 0, e no dia da retirada do dispositivo (dia 8) administração de 1,0 mg de Cipionato de Estradiol<sup>5</sup> (IM).

As vacas selecionadas para sincronização apresentavam sistema genital sem alterações aparentes, ausência de líquido no lúmen uterino, ausência de corpo lúteo, além de folículo ovariano com, no mínimo, nove milímetros de diâmetro. Para a sincronização dessa categoria, utilizou-se o protocolo B.

A observação de estro foi realizada duas vezes ao dia (6h e 18h) por um período de 30 minutos, a partir da retirada do dispositivo. A resposta ao protocolo de sincronização foi considerada positiva quando os animais apresentaram estro após a retirada do dispositivo, além de corpo lúteo no dia da involução. Nesse dia, as possíveis receptoras foram examinadas por palpação transretal com o auxílio de aparelho de ultrassom<sup>1</sup>, utilizando-se um transdutor de 7,5 MHz, quando se avaliou a localização e a maior área do corte transversal do corpo lúteo.

Os embriões foram transferidos entre o sexto e o oitavo dia após a detecção do estro. Duas novilhas que responderam ao protocolo de sincronização não receberam embriões: uma que apresentou corpo lúteo aparentemente

---

<sup>1</sup> Honda Electronics CO. LTD.; HS 1500-V. - Japão

<sup>2</sup> Pfizer - Brasil

<sup>3</sup> Estrogin – Farmavet - Brasil

<sup>4</sup> Ciosin – Shering-Plough - Brasil

---

<sup>5</sup> ECP – Pfizer - Brasil

jovem (indicando uma possível ovulação tardia), e outra em que não foi possível transpor sua cérvix no momento da inovulação. Todas as vacas que responderam ao protocolo de sincronização foram inovuladas. Transferiu-se um único embrião F1 (Holandês x Gir) para cada receptora, totalizando-se 87 inovulações. Os embriões utilizados foram produzidos e congelados conforme descrito em 3.1. Todos apresentaram qualidade excelente (grau 1) antes da criopreservação, e encontravam-se nos estádios de mórula (Mo), mórula compacta (Mc) ou blastocisto inicial (Bi). Os embriões utilizados foram provenientes de três grupos, de acordo com a raça da doadora e a época de produção, sendo:

HI: Embriões produzidos no inverno, a partir de doadoras da raça Holandês, inseminadas com sêmen de touros da raça Gir (n=29);

HV: Embriões produzidos no verão, a partir de doadoras da raça Holandês, inseminadas com sêmen de touros da raça Gir (n=29);

GV: Embriões produzidos no verão, a partir de doadoras da raça Gir, inseminadas com sêmen de touros da raça Holandês (n=29).

Devido à baixa resposta à superovulação das doadoras da raça Gir no inverno, não foi possível a obtenção de número suficiente de embriões para formação do grupo GI (embriões produzidos no inverno, a partir de doadoras da raça Gir, inseminadas com sêmen de touros da raça Holandês), portanto esses embriões não foram transferidos. A Tabela 4 apresenta a distribuição dos embriões

transferidos, de acordo com o grupo de produção, época de inovulação e categoria da receptora.

As inovulações foram realizadas pelo método não-cirúrgico, por um único técnico. Para tanto, procedeu-se o descongelamento das palhetas em ar por 10 segundos e, subseqüentemente, em água aquecida a 30°C por 20 segundos. O embrião foi depositado no corno uterino ipsilateral ao ovário que continha o corpo lúteo. O diagnóstico de gestação foi realizado entre os dias 26 a 35 após a inovulação e, posteriormente, aos 60 dias de gestação, utilizando-se aparelho de ultrassom<sup>1</sup>, acoplado a um transdutor linear de 7,5 MHz.

Para análise dos dados relativos às novilhas receptoras de embrião, foram considerados os seguintes grupos: VA (novilhas sincronizadas no verão, com o protocolo A), IA (novilhas sincronizadas no inverno, com o protocolo A) e IB (novilhas sincronizadas no inverno, com o protocolo B). Os valores de idade, peso vivo e área de corpo lúteo no dia da inovulação e do intervalo da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e o estro observado, dos três grupos de novilhas, bem como da área de corpo lúteo das novilhas gestantes ou não-gestantes foram submetidos à análise de variância, segundo modelo linear geral considerando-se o efeito fixo de tratamento, e as médias comparadas pelo teste de Student-Newman-Keuls (SNK). As taxas de sincronização e gestação foram comparadas pelo teste Exato de Fisher.

---

<sup>1</sup> Honda Electronics CO. LTD.; HS 1500-V. - Japão

**Tabela 4: Distribuição dos embriões transferidos de acordo com o grupo de produção, época de inovulação e categoria da receptora**

Grupo	Época da inovulação	Categoria da receptora	Embriões transferidos	Subtotais	Embriões transferidos
HI	Inverno	Vaca	9	<i>Subtotal HI inverno</i>	15
		Novilha	6		
	Verão	Vaca	7	<i>Subtotal HI verão</i>	14
		Novilha	7		
<i>Subtotal HI</i>					29
HV	Inverno	Vaca	10	<i>Subtotal HV inverno</i>	15
		Novilha	5		
	Verão	Vaca	4	<i>Subtotal HV verão</i>	14
		Novilha	10		
<i>Subtotal HV</i>					29
GV	Inverno	Vaca	11	<i>Subtotal GV inverno</i>	16
		Novilha	5		
	Verão	Vaca	7	<i>Subtotal GV verão</i>	13
		Novilha	6		
<i>Subtotal GV</i>					29
<i>Subtotal Inverno</i>					45
<i>Subtotal Verão</i>					42
<i>Subtotal Vaca</i>					48
<i>Subtotal Novilha</i>					39
<i>Total</i>					<b>87</b>

HI: Embriões produzidos no inverno, a partir de doadoras da raça Holandês, inseminadas com sêmen de touros da raça Gir; HV: Embriões produzidos no verão, a partir de doadoras da raça Holandês, inseminadas com sêmen de touros da raça Gir; GV: Embriões produzidos no verão, a partir de doadoras da raça Gir, inseminadas com sêmen de touros da raça Holandês.

Em relação às vacas receptoras de embrião, os dados de peso vivo, de idade, dias pós-parto, produção de leite, e o diâmetro do folículo dominante, no início da sincronização, do intervalo da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e o estro observado, da área do corpo lúteo no dia da inovulação, nas duas diferentes épocas; bem como do diâmetro do folículo dominante entre os animais que responderam ao não à sincronização e da área de corpo lúteo, dias pós-parto e produção de leite entre os animais gestantes ou não gestantes, foram submetidos à análise de variância, segundo modelo linear geral, considerando-se o efeito fixo de

tratamento, e as médias comparadas pelo teste F. O escore de condição corporal ao parto foi comparado pelo teste de Wilcoxon. As taxas de sincronização e gestação em vacas nas diferentes épocas, bem como as taxas de gestação de vacas e de novilhas, e em relação aos diferentes grupos de embriões produzidos foram comparadas pelo teste Exato de Fisher.

As análises foram realizadas utilizando-se o programa estatístico SAEG (Fundação Arthur Bernardes - UFV), versão 9.1.

### 3.1.4. Experimento 4: *Cultivo in vitro dos embriões F1 Holandês x Gir*

Este experimento visou avaliar, por meio de cultivo *in vitro*, a viabilidade dos embriões provenientes das mesmas coletas que resultaram as inovulações anteriores, como forma de aferição da metodologia de classificação e de congelamento utilizadas. O experimento foi conduzido no Laboratório de Fecundação *in vitro* do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias da Escola de Veterinária da UFMG, nos períodos de 30/08/2007 a 03/09/2007 e 31/10/2007 a 04/11/2007. Foram utilizados 72 embriões F1 Holandês x Gir, de estágio de desenvolvimento variando de mórula compacta a blastocisto expandido e qualidade excelente (grau 1) ou boa (grau 2) (Lindner e Wright, 1983), provenientes da superovulação cinco e três novilhas da raça Holandês no inverno (HI) e verão (HV), respectivamente, e de duas novilhas da raça Gir no inverno (GI), conforme descrito em 3.1. A distribuição dos embriões cultivados encontra-se na Tabela 5.

As palhetas foram descongeladas em ar por 10 segundos e, subsequentemente, em água aquecida a 30°C por 20 segundos (semelhante ao realizado quando da inovulação dos embriões). Com o auxílio de estereomicroscópio<sup>1</sup> (40x), os embriões foram colocados em placas de Petri, sendo distribuídos em gotas de meio SOFaaci (Holm et al., 1999) suplementado com 0,5µg/mL de inositol<sup>2</sup> e 0,1µg/mL de tricitrato de sódio<sup>2</sup>, sob óleo mineral<sup>2</sup>, respeitando-se a proporção de 10µl de meio para cada

<sup>1</sup> Olympus S240 - Japão

<sup>2</sup> Sigma Aldrich - França

embrião presente na gota. Em seguida, os embriões foram submetidos ao cultivo em incubadora a 38,7°C contendo 5 % de CO<sub>2</sub>, 5 % de O<sub>2</sub>, 90 % de N<sub>2</sub> e umidade saturada. Embriões que, após o descongelamento, apresentaram ruptura de zona pelúcida (ZP) e extravasamento da massa embrionária (que se encontrava degenerada) não foram submetidos ao cultivo, mas foram incluídos no número total de embriões.

**Tabela 5: Distribuição dos embriões cultivados *in vitro*, segundo o grupo de produção e sua qualidade**

Grupo	Qualidade	
	Excelente (Grau 1)	Bom (Grau 2)
HI	31	23
HV	5	6
GI	5	2
<i>Total</i>	41	31

HI: Embriões produzidos no inverno, a partir de doadoras da raça Holandês, inseminadas com sêmen de touros da raça Gir; HV: Embriões produzidos no verão, a partir de doadoras da raça Holandês, inseminadas com sêmen de touros da raça Gir; GI: Embriões produzidos no inverno, a partir de doadoras da raça Gir, inseminadas com sêmen de touros da raça Holandês.

Os embriões cultivados foram avaliados quanto à viabilidade e eclosão após 24, 48, 72 e 96 horas de cultivo, usando-se estereomicroscópio<sup>1</sup> (40x). Considerou-se que os embriões estavam viáveis quando apresentaram reexpansão da blastocelule (no caso de blastocistos submetidos ao cultivo) ou avanço no seu estágio de desenvolvimento, no caso das mórulas compactas.

Para as análises das taxas de viabilidade e eclosão, procedeu-se, respectivamente, os testes Qui-quadrado e Exato de Fisher, utilizando-se o programa estatístico Statview (SAS Institute Inc.), versão 5.0.

#### 4. Resultados e discussão

##### 4.1. Experimento 1: *Produção de embriões a partir de doadoras da raça Holandês*

Os parâmetros climáticos referentes às duas épocas de produção dos embriões, na Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa (FEPHB – Igarapé - MG), encontram-se na Tabela 6.

**Tabela 6: Parâmetros climáticos durante os períodos experimentais de inverno e verão, na Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa (FEPHB)**

Parâmetro	Inverno		Verão	
	Média ± s	Varição	Média ± s	Varição
Temperatura máxima (°C)	28,9 ± 1,7 <sup>a</sup>	24,0 - 31,5	26,5 ± 1,6 <sup>b</sup>	23,0 - 29,0
Temperatura mínima (°C)	13,1 ± 1,9 <sup>b</sup>	9,0 - 17,0	19,5 ± 0,8 <sup>a</sup>	18,0 - 21,0
Temperatura 6h (°C)	13,6 ± 1,6 <sup>b</sup>	10,5 - 16,5	20,5 ± 0,8 <sup>a</sup>	19,0 - 22,0
Umidade Relativa 6h (%)	86,2 ± 12,4 <sup>b</sup>	36,0 - 100	93,6 ± 3,0 <sup>a</sup>	87,3 - 100
ITU às 6h	59,3 ± 2,1 <sup>b</sup>	55,0 - 62,9	69,9 ± 1,1 <sup>a</sup>	67,2 - 71,6
Temperatura 12h (°C)	27,7 ± 2,5 <sup>a</sup>	22,0 - 32,0	25,2 ± 1,8 <sup>b</sup>	21,0 - 28,0
Umidade Relativa 12h (%)	38,3 ± 12 <sup>b</sup>	9,5 - 71,8	80,7 ± 6,4 <sup>a</sup>	71,0 - 95,6
ITU às 12h	73,4 ± 2,6 <sup>b</sup>	67,2 - 77,3	75,0 ± 2,1 <sup>a</sup>	70,5 - 79,5
Temperatura 18h (°C)	23,9 ± 2,6 <sup>b</sup>	16,0 - 28,0	26,2 ± 2,4 <sup>a</sup>	21,0 - 30,0
Umidade Relativa 18h(%)	47,7 ± 18,5 <sup>b</sup>	7,1 - 88,3	78,0 ± 9,3 <sup>a</sup>	58,1 - 95,6
ITU às 18h	69,7 ± 3,0 <sup>b</sup>	60,8 - 75,5	76,1 ± 2,5 <sup>a</sup>	70,5 - 79,1
Pluviosidade durante o período (mm)	4,1		166,0	

Médias na mesma linha, seguidas por letras distintas, diferem entre si (p<0,05)

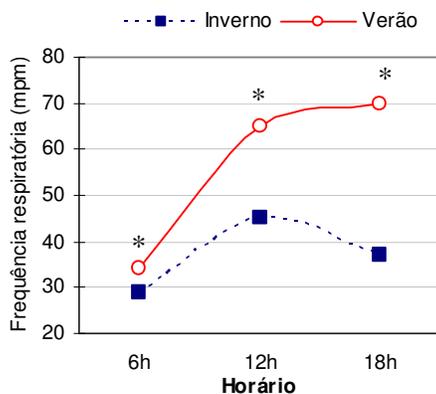
Durante os períodos experimentais, as temperaturas variaram entre 9,0°C a 31,5°C no inverno, e entre 18,1°C a 29,0°C no verão. Na primeira época, a média das temperaturas máximas foi maior, e das temperaturas mínimas foi menor, quando comparadas com as da última (p<0,05). O ITU foi mais elevado no verão em relação ao inverno, no três horários em que foram mensurados (p<0,05), e isso se explica pela maior UR observada no verão (p<0,05). As médias das temperaturas ambiente e do ITU obtidas nos horários das 12h, nas duas épocas, e no horário das 18h, no verão, foram superiores aos limites estabelecidos para conforto térmico de

bovinos, que são de 25°C (Shearer e Beede, 1990) e 72 (Armstrong, 1994), para temperatura ambiente e ITU, respectivamente. Logo, os animais permaneceram sob condições ambientais potencialmente estressantes nas duas épocas. Além disso, durante o verão, a exposição a essas condições ocorreu por período mais longo, com valores que ultrapassaram os limites de conforto tanto às 12h, quanto às 18h.

A FR das novilhas foi maior (p<0,05) no verão em relação ao inverno, nos três horários analisados (Gráfico 1).

Segundo Shearer e Beede (1990), a partir de 21°C de temperatura ambiente, bovinos passam a utilizar a evaporação através das vias respiratórias como principal forma de dissipação de calor. Assim, as médias de temperatura ambiente acima de 20,5°C, e os maiores valores de UR e de ITU, observados no verão, relacionam-se à maior FR das novilhas a nessa época. Quanto maior a UR, menor será a capacidade dos animais em trocar calor pelos mecanismos evaporativos e, conseqüentemente, a FR se elevará para compensar a menor eficiência. Sendo assim, as médias de temperatura ambiente acima de 20,5°C, e os maiores valores de UR e de ITU, observados no verão, podem explicar a maior FR das novilhas a nessa época. No inverno, mesmo com a temperatura ambiente, obtida às 12h, superior em relação ao verão, a FR das novilhas se mostrou inferior. Tal fato, possivelmente, se deve à reduzida UR nessa primeira época, que permitiu maior eficiência na troca de calor por métodos evaporativos.

**Gráfico 1: Frequência respiratória média das doadoras da raça Holandês, no inverno e verão**

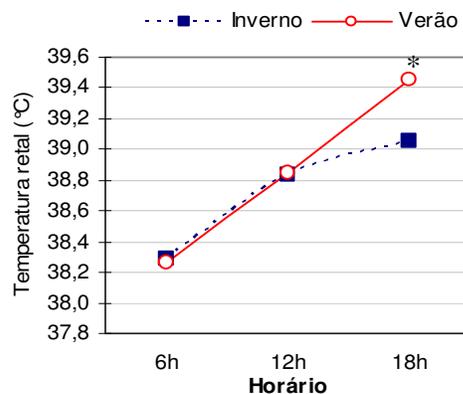


\* p<0,05

O aumento na frequência respiratória às 6h e 12h no verão foi, provavelmente, o fator determinante para a manutenção da temperatura retal das doadoras semelhante ( $p>0,05$ ) nas duas épocas (Gráfico 2).

No entanto, às 18h, observou-se maior ( $p<0,05$ ) TR no verão em relação ao inverno, o que pode estar relacionado ao maior ganho e à menor eficiência de troca de calor por evaporação, em decorrência do elevado ITU observado nesse horário, durante o verão. Também pode ser observado que a TR, independente da época, apresentou aumento entre 6h e 18h. Esse comportamento pode estar relacionado à taxa de ganho de calor do animal, acompanhando o aumento da temperatura ambiente, e devido ao padrão bifásico do ritmo circadiano ou nictemeral (Beatty et al., 2006) da temperatura corporal dos bovinos.

**Gráfico 2: Temperatura retal média das doadoras da raça Holandês, no inverno e verão**



\* p<0,05

Todas as fêmeas, durante o inverno, apresentaram estro após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona, enquanto que no verão, uma não apresentou. A porcentagem de animais que respondeu à superovulação foi 71,4% (5/7) no inverno e 85,7% (6/7) no verão. Os dois animais que não responderam à superovulação, no inverno, apresentaram um ou dois corpos lúteos no dia da coleta, sendo recuperados um e dois embriões respectivamente, de cada doadora. No verão, a doadora que não respondeu à superovulação não apresentou nenhum corpo lúteo no dia da coleta e, portanto, não foi submetida a esse procedimento.

Segundo Hahn (1992), cerca de 20 a 30% dos animais não respondem tratamento superovulatório. Trabalhos com superovulação em novilhas da raça Holandês reportaram que 84% (Ax et al., 2005) e 87,8% (Chagas e Silva et al., 2002b) desses animais produziram embriões, independente da quantidade recuperada. A eficiência da superovulação observada no presente trabalho assemelha-se à registrada pelos autores acima, porém, neste estudo o parâmetro utilizado para avaliar se houve resposta à superovulação foi a produção de um número maior que dois corpos lúteos nos ovários, uma vez que novilhas, ocasionalmente, podem apresentar duplas ovulações (Sartori et al., 2004).

O intervalo da retirada do dispositivo intravaginal e a detecção do estro foi de  $33,4 \pm 11,6$  horas, não sendo observada diferença entre as duas épocas ( $p > 0,05$ ). Esse valor é semelhante ao reportado por Lafri et al. (2002), de  $31,9 \pm 0,7$ h entre a retirada do CIDR e a observação do estro. O intervalo da primeira inseminação e a coleta dos embriões foi, em média, de 7,1

$\pm 0,7$  dias no inverno e  $6,5 \pm 0,2$  dias no verão. Os estádios de desenvolvimento dos embriões recuperados encontram-se na Tabela 7, sendo a maioria deles em estádios compatíveis com dados da literatura (Lindner e Wright, 1983).

**Tabela 7: Estruturas recuperadas a partir da superovulação de doadoras da raça Holandês, no inverno e verão, classificadas segundo seu estágio de desenvolvimento**

Estrutura	Inverno		Verão	
	Número	%	Número	%
Mo	2	1,42	0	0,00
Mc	39	27,66	43	71,67
Bi	25	17,73	7	11,67
Bl	18	12,77	0	0,00
Bx	17	12,06	0	0,00
Bec	1	0,71	0	0,00
Deg	27	19,15	6	10,00
NF	12	8,51	4	6,67
<i>Total</i>	141	100,00	60	100,00

Mo = mórula; Mc= mórula compacta; Bi = blastocisto inicial; Bl = blastocisto; Bx = blastocisto expandido; Bec = Blastocisto eclodido; Deg = degenerada; NF = não fecundada

Nota-se que no inverno foram coletados 25,54% das estruturas em estádios mais avançados (de blastocisto a blastocisto eclodido), enquanto que no verão todos os embriões se encontravam nos estádios de mórula compacta ou blastocisto inicial, o que se explica pela coleta em período um pouco mais avançado, na primeira época.

Na Tabela 8 são apresentados o número médio e a porcentagem de estruturas recuperadas a partir das doadoras da raça Holandês, nas épocas de inverno e verão, conforme sua classificação quanto a sua qualidade.

No dia da coleta não foi possível avaliar a taxa de recuperação de embriões, visto a grande resposta superovulatória da maioria das doadoras, que não permitiu a quantificação precisa do número de corpos lúteos.

A comparação entre as estruturas recuperadas durante as duas épocas não apontou diferença ( $p>0,05$ ) em nenhum dos parâmetros avaliados.

Tal fato relaciona-se à característica da resposta à superovulação, de elevado coeficiente de variação (Peixoto et al., 2006). Este padrão de resposta pode ser atribuído à instabilidade de variáveis que envolvem resposta hormonal (Sampaio, 2002) e, também, à grande variação individual no número de folículos ovarianos (Monniaux et al., 1983), fator que se relaciona com a capacidade de resposta à superovulação.

**Tabela 8: Estruturas recuperadas a partir da superovulação de doadoras da raça Holandês nas épocas de inverno e verão**

Estruturas recuperadas	Inverno			Verão		
	Total	Média ± s	%	Total	Média ± s	%
Excelente (grau 1)	68	9,7 ± 10,2	48,2	37	5,3 ± 4,9	61,6
Boa (grau 2)	25	3,6 ± 3,1	17,7	9	1,3 ± 1,5	15,0
Regular (grau 3)	9	1,3 ± 2,1	6,4	4	0,6 ± 1,5	6,7
Degenerada	27	3,9 ± 6,7	19,2	6	0,9 ± 1,5	10,0
Não fecundada	12	1,7 ± 2,6	8,5	4	0,6 ± 1,1	6,7
<b>Total</b>	141	20,1 ± 17,5	100,0	60	8,6 ± 9,4	100,0
(Variação)		(1 a 49)			(0 a 23)	
Viáveis ( 1, 2 e 3)	102	14,6 ± 11,9	72,3	50	7,1 ± 7,2	83,3
Congeláveis (1 e 2)	93	13,3 ± 11,4	65,9	46	6,6 ± 6,2	76,6

Médias na mesma linha não diferem entre si ( $p>0,05$ ).

Segundo Rodrigues (2001), 30% das doadoras produz número de embriões viáveis superior a sete. No presente trabalho, 57% (8/14) das coletas resultou na recuperação de mais de sete estruturas. Além disso, as médias de embriões viáveis/coleta (14,6 e 7,1 no inverno e verão, respectivamente) foram superiores às reportadas na literatura para novilhas da raça Holandês, de 6,4 (Chagas e Silva et al., 2002b) e 4,7 (Ax et al., 2005).

Fatores como a condição nutricional das doadoras (Gong et al, 2002), ou à dose de FSH utilizada no protocolo podem estar relacionados à resposta obtida no presente experimento. Uma vez que a resposta ao FSH é um fator de grande variabilidade individual, é recomendável que a dose ideal para cada doadora seja estabelecida de acordo com a resposta obtida em superovulações anteriores, o que não ocorreu neste experimento.

A porcentagem de estruturas viáveis e a predominância de estruturas excelentes (grau 1) recuperadas nas duas épocas indicam que a maior temperatura retal das doadoras observada às 18h no verão não acarretou redução na qualidade dos embriões. Rivera e Hansen (2001) reportaram que danos aos embriões provocados por estresse calórico ocorreram a partir de sua exposição a temperaturas superiores (40,5 °C) às observadas nesse experimento. Sendo assim, a temperatura ambiente e UR, observadas nas duas épocas, podem não ter provocado aumento na temperatura corporal das doadoras com intensidade suficiente para ocasionar efeitos deletérios à produção e desenvolvimento embrionários. Tal fato pode ser relacionado à maior eficiência de novilhas (em relação a vacas) em controlar o aumento temperatura corporal em decorrência do aumento progressivo da temperatura ambiente (Sartori et al., 2002). Putney et al. (1989) mostraram que a redução da qualidade e desenvolvimento de embriões de novilhas da raça Holandês superovuladas ocorreu quando a temperatura ambiente máxima atingiu valores superiores a 32,2°C, durante os sete dias antecedentes à recuperação dos embriões. No presente trabalho, no entanto, os valores de temperatura ambiente observados situaram-se abaixo desse limiar.

Finalmente, outro fator que pode ter contribuído para a não variação da qualidade embrionária em decorrência do aumento da TR das doadoras durante o verão seria a utilização de sêmen proveniente de raça zebuína para a inseminação das mesmas. Tal fato pode ocasionado a produção de embriões com maior resistência ao estresse calórico

(em relação a embriões taurinos puros), assim como observado em estudo *in vitro* (Eberhardt et al., 2005).

Em relação à utilização de novilhas como doadoras de embrião, alguns autores reportaram que a superovulação de animais dessa categoria resulta na produção de menor número de estruturas em relação à utilização de vacas (Kanuya et al., 1997; Callesen et al., 1998), ou que poderia haver maior dificuldade para transposição de cérvix nas novilhas durante a coleta (Hasler et al., 1983), sendo estes fatores, portanto, desvantagens da escolha dessa categoria como doadoras de embrião. Por outro lado, outros trabalhos mostraram que novilhas, tanto da raça Holandês (Ax et al., 2005) quanto mestiças Holandês-Zebu (Borges et al., 2001) produziram embriões viáveis em número compatível com o reportado em trabalhos com animais adultos (Tonhati et al., 1999; Chagas e Silva et al., 2002b; Hasler, 2003). O número de estruturas viáveis recuperadas no presente trabalho também mostrou que a superovulação de novilhas, nas condições estudadas, produz resultados satisfatórios.

Fatores importantes que encorajam a utilização de novilhas, especialmente da raça Holandês, como doadoras de embrião, estão relacionados à menor susceptibilidade dessa categoria ao estresse calórico, bem como à ausência do efeito negativo da lactação sobre o metabolismo, que pode ocasionar redução na qualidade embrionária, e conseqüentemente, na eficiência do processo de produção de embriões (Sartori et al., 2002; Leroy, 2005).

**4.2. Experimento 2: Produção de embriões a partir de doadoras da raça Gir**

na Fazenda Experimental de Felixlândia (FEFX) da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), encontram-se na Tabela 9.

Os parâmetros climáticos referentes às duas épocas de produção dos embriões,

**Tabela 9: Parâmetros climáticos durante os períodos experimentais de inverno e verão, na Fazenda Experimental de Felixlândia (FEFX)**

Parâmetro	Inverno		Verão	
	Média ± s	Varição	Média ± s	Varição
Temperatura máxima (°C)	27,2 ± 0,8 <sup>b</sup>	26,0 - 28,5	31,3 ± 2,82 <sup>a</sup>	26,5 - 35,0
Temperatura mínima (°C)	14,2 ± 1,3 <sup>b</sup>	11,0 - 16,0	22,3 ± 0,86 <sup>a</sup>	20,0 - 24,0
Temperatura 6h30min (°C)	15,3 ± 1,4 <sup>b</sup>	11,5 - 17,0	23,3 ± 1,8 <sup>a</sup>	21,5 - 30,0
Umidade Relativa 6h30min (%)	13,9 ± 1,2 <sup>b</sup>	10,5 - 15,5	91,1 ± 6,8 <sup>a</sup>	66,8 - 95,8
ITU às 6h30min	61,6 ± 1,9 <sup>b</sup>	56,4 - 64,0	73,3 ± 2,0 <sup>a</sup>	71,2 - 80,2
Temperatura 12h (°C)	24,8 ± 1,8 <sup>b</sup>	19,5 - 26,5	28,2 ± 2,7 <sup>a</sup>	25,0 - 33,0
Umidade Relativa 12h (%)	52,6 ± 10,6 <sup>b</sup>	37,8 - 78,2	74,6 ± 11,3 <sup>a</sup>	52,4 - 92,1
ITU às 12h	71,4 ± 1,5 <sup>b</sup>	66,9 - 72,6	78,5 ± 2,6 <sup>a</sup>	74,4 - 83,1
Temperatura 17h30min (°C)	25,8 ± 2,0 <sup>b</sup>	21,0 - 28,0	29,1 ± 3,5 <sup>a</sup>	23,0 - 35,0
Umidade Relativa 17h30min (%)	52,7 ± 11,4 <sup>b</sup>	38,4 - 83,1	72,1 ± 13,6 <sup>a</sup>	49,1 - 91,8
ITU às 17h30min	72,7 ± 1,8 <sup>b</sup>	68,7 - 74,8	79,4 ± 3,2 <sup>a</sup>	73,0 - 84,5
Pluviosidade durante o período (mm)	0,0		127,6	

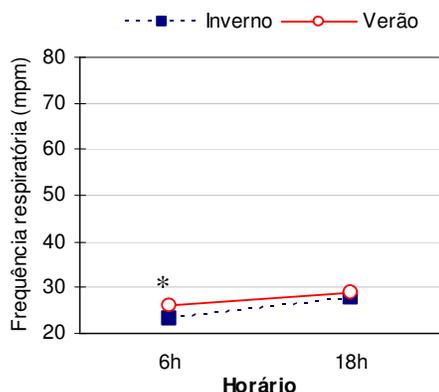
Médias na mesma linha, seguidas por letras distintas, diferem entre si (p<0,05).

Os animais permaneceram sob temperaturas que variaram entre 11,0°C e 28,5°C no inverno, e entre 20,0°C a 35,0°C no verão. O ITU médio, nos três horários, variou entre 61,6 e 72,7 no inverno, e entre 73,3 e 79,4 no verão. As temperaturas máxima e mínima diárias, bem como a temperatura ambiente, UR e o ITU foram superiores no verão em relação ao inverno, nos horários das 6h30min, 12h e 17h30min. Durante as duas épocas, observou-se que a temperatura ambiente e o ITU apresentavam comportamento crescente entre a manhã e a tarde, sendo que as temperaturas máximas diárias superaram

os valores do horário das 17h30min. Segundo Azevedo et al. (2005), o nível crítico superior de ITU para vacas meio-sangue Holandês x Zebu, em lactação, foi de 79 ou 80, quando se considerou, respectivamente, a FR ou a TR como indicadores de estresse calórico. No presente trabalho, foram utilizados animais zebuínos e não lactantes. Portanto, supõe-se que os valores críticos de ITU para os animais deste experimento sejam semelhante ou superiores aos reportados para animais mestiços em lactação, visto que a adaptabilidade às condições de alta temperatura e umidade seja atribuída à

subespécie zebuína e, além disso, o processo de lactação é relacionado à maior susceptibilidade dos animais ao estresse calórico (Sartori et al., 2002).

**Gráfico 3: Frequência respiratória média das doadoras da raça Gir, no inverno e verão**



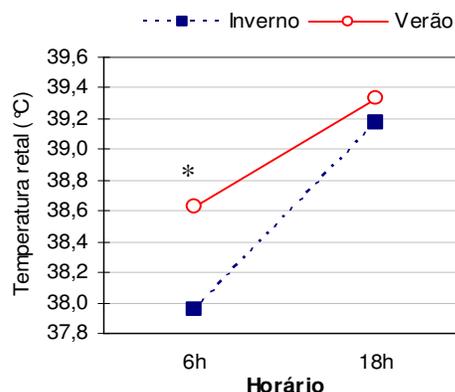
\*  $p < 0,05$

A TR e a FR média das doadoras às 6h foram superiores ( $p < 0,05$ ) no verão, em relação ao inverno. Tal fato pode estar relacionado à maior diferença (de  $8,0^{\circ}\text{C}$  e  $11,7$ ) entre a temperatura ambiente e ITU no horário da manhã para as duas épocas, o que aconteceu de forma menos pronunciada ( $2,3^{\circ}\text{C}$  e  $6,7$ ) à tarde, quando não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) entre as épocas, em relação a esses parâmetros fisiológicos.

No presente experimento, a TR média às 18h foi  $39,2^{\circ}\text{C}$  no inverno, e de  $39,3^{\circ}\text{C}$  no verão, valores próximos ao considerado normal ( $39^{\circ}\text{C}$ ) para bovinos (Stöber, 1993). A FR média, nesse horário, foi de 27,7 e 28,8 mpm, nas duas épocas, respectivamente, encontrando-se entre os valores de 24 a 36 mpm também considerados normais (Stöber, 1993), e inferiores ao valor de

As médias da TR e FR no inverno e verão, nos dias e horários analisados, encontram-se nos Gráficos 3 e 4.

**Gráfico 4: Temperatura retal média das doadoras da raça Gir, no inverno e verão**



\*  $p < 0,05$

60 mpm, quando, segundo Baccari Jr. et al. (2001), bovinos apresentam sinais de hipertermia.

O aumento da TR entre os horários de 6h e 18h está, provavelmente, relacionado ao maior ganho de calor devido ao aumento da temperatura ambiente, bem como ao ritmo circadiano da temperatura corporal de bovinos (Beatty et al., 2006).

O menor incremento na FR entre esses dois horários possivelmente se deve à menor necessidade de dissipação de calor (indicando que os animais não estariam sofrendo estresse calórico) ou à utilização de outro mecanismo para facilitação da perda de calor como, por exemplo, a sudorese. No entanto, a primeira hipótese parece ser mais adequada, pois, acordo com Shearer e Beede (1990), animais zebuínos entram

em processo de sudção quando a temperatura ambiente ultrapassa 35°C, o que não ocorreu durante o experimento.

A taxa de manifestação de estro das doadoras foi de 80,0% (4/5) no inverno e de 85,7% (6/7) no verão. O intervalo médio da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e a detecção do estro foi de 37,1 ± 10,1 horas (34,4 ± 12,3 horas no inverno e de 41,0 ± 8,1 horas no verão,  $p>0,05$ ). Visto que a aplicação de PGF<sub>2α</sub> ocorreu 12 horas antes da retirada do dispositivo, o intervalo médio da indução da luteólise ao estro foi de 49,1 ± 10,8 horas, sendo superior aos valores de 39,0 ± 0,8 (Coelho, 1988) ou 40,1 ± 17,0 horas (Coelho e Azevedo, 1991), em trabalhos com superovulação de zebuínos. Contudo, esses autores não utilizaram implantes de progestógeno nos protocolos de superovulação.

No verão, três animais que não apresentaram estro até 36 horas após a retirada do dispositivo de progesterona foram inseminados a partir desse momento. No entanto, esses animais apresentaram estro após a primeira inseminação, sendo, portanto, inseminados por mais três vezes, intervaladas de 12 horas. A decisão de se inseminar os animais que não apresentaram estro baseou-se na premissa de que a detecção desse comportamento pode ser problemática em animais zebuínos sob condições tropicais (Galina e Arthur, 1990) e de que, segundo Bolanos et al. (1997) 19% de vacas zebuínas com corpo lúteo ativo após tratamento com progestógeno, não manifestaram estro.

A porcentagem de animais que respondeu ao protocolo de superovulação foi de 60% (3/5) no inverno, e de 85,7% (6/7) no verão. O intervalo médio da primeira inseminação à coleta de embriões foi de 7,0 ± 0,6 dias no inverno e 7,1 ± 0,3 dias no verão ( $p>0,05$ ). O número de estruturas coletadas em cada época, de acordo com o estágio de desenvolvimento, encontra-se na Tabela 10.

**Tabela 10: Estruturas recuperadas a partir da superovulação de doadoras da raça Gir, durante o inverno e o verão, classificadas segundo seu estágio de desenvolvimento**

Estrutura	Inverno		Verão	
	Número	%	Número	%
Mo	0	0,00	16	29,63
Mc	8	66,67	32	59,26
Bi	0	0,00	0	0,00
Bl	0	0,00	0	0,00
Bx	0	0,00	0	0,00
Deg	2	16,67	3	5,56
NF	2	16,67	3	5,56
<i>Total</i>	12	100,00	54	100,0

Mo = mórula; Mc= mórula compacta; Bi = blastocisto inicial; Bl = blastocisto; Bx = blastocisto expandido; Deg = degenerada; NF = não fecundada.

A maior proporção dos embriões coletados encontrava-se no estágio de mórulas compactas, estágio condizente com embriões de idade de seis dias (Lindner e Wright, 1983). Como alguns animais (n=3) foram inseminados antes de apresentarem estro, o intervalo da primeira inseminação à coleta pode não ser um parâmetro adequado para a avaliação da idade do embrião.

O intervalo do estro à coleta foi de 6,9 e 7,5 dias no verão e inverno, respectivamente. Segundo Lopes (2003), o início das ovulações, em vacas da raça

Gir superovuladas, ocorre em média  $29,22 \pm 4,49$  horas após o início do estro, sendo que 95% das ovulações ocorre num período de 12 horas. Sendo assim, presume-se que, se no presente experimento, o comportamento ovulatório ocorreu de forma semelhante ao relatado por essa última autora, a idade dos embriões recuperados encontra-se dentro do esperado. No

entanto, a avaliação mais precisa da idade embrionária não foi possível, pois, neste experimento, o momento das ovulações não foi avaliado.

Na Tabela 11 são apresentados o número médio e a porcentagem de estruturas recuperadas a partir das doadoras da raça Gir, nas épocas de inverno e verão, e classificadas segundo sua qualidade.

**Tabela 11: Estruturas recuperadas a partir da superovulação de doadoras da raça Gir nas épocas de inverno e verão**

Estruturas recuperadas	Inverno			Verão		
	Total	Média $\pm$ s	%	Total	Média $\pm$ s	%
Excelente (grau 1)	5	$1,00 \pm 1,41$	41,67	31	$4,43 \pm 4,65$	57,41
Boa (grau 2)	2	$0,40 \pm 0,89$	16,67	2	$0,29 \pm 0,76$	3,70
Regular (grau 3)	1	$0,20 \pm 0,45$	8,33	15	$2,14 \pm 3,02$	27,78
Degenerada	2	$0,67 \pm 1,15$	16,67	3	$0,43 \pm 0,79$	5,56
Não fecundada	2	$0,40 \pm 0,89$	16,67	3	$0,43 \pm 0,53$	5,56
<b>Total</b>	12	$2,4 \pm 4,34$	100,00	54	$7,71 \pm 6,63$	100,00
(Variação)		(0 a 10)			(0 a 19)	
Viáveis ( 1, 2 e 3)	8	$1,60 \pm 2,61$	66,67	48	$6,86 \pm 6,12$	88,89
Congeláveis (1 e 2)	7	$1,40 \pm 2,19$	58,33	33	$4,71 \pm 4,89$	61,11

Médias na mesma linha não diferem entre si ( $p > 0,05$ ).

Foi observada grande variação na resposta superovulatória, sendo que o número total de estruturas recuperadas por doadora variou entre 0 a 10 no inverno, e 0 a 19 no verão. Sendo assim, foi possível se observar diferença entre a produção qualidade embrionária durante as duas épocas ( $p > 0,05$ ). O número médio de embriões viáveis coletados no inverno e verão foi, respectivamente, inferior e superior aos dados reportados na literatura para animais da raça Gir, que variam entre 2,3 a 4,1 (Coelho, 1988, Lopes, 2003; Márquez et al., 2005;

Pugliesi et al., 2005; Prado, 2006, Peixoto et al., 2006; Viana et al., 2007). O número médio de corpos lúteos das doadoras da raça Gir, no dia da coleta, foi de  $4,20 \pm 5,76$  e  $8,57 \pm 5,16$  e nas épocas de inverno e verão, respectivamente. A taxa de recuperação de estruturas foi de 57,1% no inverno e 90% no verão ( $p < 0,01$ ), sendo que todas as coletas e rastreamentos das estruturas foram realizadas pelos mesmos técnicos, nas duas épocas.

A recuperação de estruturas, após a superovulação, é influenciada pelo

número ovulações, pela capacidade das tubas uterinas em captar os oócitos e pela eficiência do processo de lavagem do útero. Segundo Monniaux et al. (1983), folículos que crescem em resposta ao tratamento superestimulatório podem ovular ou luteinizar. Sendo assim, as estruturas luteais de ovários superestimulados podem ser corpos lúteos ou folículos luteinizados. Dessa forma, há possibilidade de que os folículos que cresceram no inverno teriam sofrido luteinização, em vez de ovular. Tal fato pode ser relacionado com as alterações na produção de LH e resposta ovariana a esse hormônio, relatado em animais zebuínos. Foi observado que nessa época ocorre redução do pico pré-ovulatório de LH (Plasse et al., 1970) e da resposta das células luteais ao estímulo do LH *in vitro* (Rhodes et al., 1982) em animais de raças zebuínas, quando comparados às taurinas. Além disso, Nogueira et al. (2007) relataram que a secreção de LH em novilhas da raça Nelore, pertencentes a um rebanho da região sudeste do Brasil, apresenta correlação positiva com a variação percentual do fotoperíodo.

A qualidade folicular é outro fator que pode influenciar a capacidade de ovulação dos folículos, após a superovulação. Segundo Monniaux et al. (1983) folículos iniciando o processo de atresia não são capazes de ovular, sofrendo apenas luteinização após o estímulo pré-ovulatório de LH.

Viana et al. (2007), trabalhando com superovulação de vacas não lactantes da raça Gir, reportaram médias entre 11,4 a 17,4 folículos maiores que 9 mm de diâmetro nos ovários, após o tratamento superestimulatório. Porém, o número

médio de embriões viáveis obtidos foi de 3,1. Em outro experimento, os mesmos autores estudaram as concentrações plasmáticas de estradiol, além das concentrações intrafoliculares desse hormônio, de progesterona e de androstenediona em vacas da raça Gir, quatro dias após o tratamento com FSH, comparando-as com as de vacas controle (14<sup>o</sup> dia do ciclo estral). Foi observado que não houve diferença nas concentrações plasmáticas de estradiol entre os dois grupos; também, a capacidade esteroidogênica dos folículos superestimulados (diâmetro de 14 mm) assemelhava-se à dos folículos não dominantes (diâmetro de 7,2 mm), sendo inferiores às dos folículos dominantes dos animais controle. Os autores sugeriram que em animais da raça Gir a esteroidogênese folicular poderia ser negativamente afetada pelo tratamento com FSH exógeno. Tal fato pode estar então relacionado a falhas no processo de ovulação após o tratamento com FSH.

Além disso, segundo Barros e Nogueira (2001), crescimento folicular assíncrono, associado ou não a ovulações prematuras podem prejudicar os resultados do tratamento superovulatório.

Assim, uma possível causa para a menor recuperação de estruturas durante o inverno, no presente trabalho, poderia ter sido a presença de folículos de baixa qualidade nos ovários, durante essa época. Mesmo que esses fossem induzidos a crescer em resposta ao tratamento superestimulatório, sua baixa qualidade poderia resultar no comprometimento da esteroidogênese e, conseqüentemente, na sua capacidade de ovular.

Adicionalmente, ressalta-se que em sistemas de criação em pastejo, com animais suplementados ou não, os efeitos da estação do ano são altamente relacionados à nutrição. A condição nutricional do animal, no momento da superestimulação, pode afetar a resposta subsequente a esse tratamento. Insulina e IGF-1 estão dentre os mais importantes mediadores do efeito a dieta no desenvolvimento folicular ovariano (Ryan et al., 1994; Armstrong et al., 2001). A restrição alimentar e o BEN estão relacionados à redução das concentrações circulantes de insulina (Sinclair et al., 2002) e as de IGF-1 (Webb et al., 1999), e assim, podendo comprometer o desenvolvimento folicular, interferindo na taxa de crescimento e no tamanho do folículo ovulatório (Diskin et al., 2003).

Por outro lado, a suplementação de novilhas com dieta contendo 200% dos requisitos de manutenção acarretou aumento das concentrações séricas de insulina, e posteriormente, à melhor resposta superovulatória dessas fêmeas em relação ao grupo controle (Gong et al., 2002). Ademais, segundo Harrison et al. (1982), os fatores nutricionais se relacionam também ao efeito sazonal na onda pré-ovulatória de LH e no conteúdo de progesterona no tecido luteal.

Segundo Britt (1992), folículos em desenvolvimento podem carrear os efeitos negativos do ambiente metabólico ao qual foram expostos, desde o início de seu desenvolvimento (cerca de 60 a 100 dias antes da ovulação). E, como consequência, esses folículos produzem oócitos menos férteis e corpos lúteos menos funcionais.

No presente experimento, as doadoras utilizadas no inverno foram mantidas a pasto e começaram a receber suplementação 23 dias antes do início do protocolo superestimulatório. O desenvolvimento dos folículos presentes no momento do tratamento foi, provavelmente, iniciado quando os animais ainda estavam mantidos somente em regime de pastejo, numa época de menor disponibilidade de forragens em quantidade e qualidade. Sendo assim, é possível que naquela época tenham ocorrido prejuízos na qualidade do folículo e oócito que não puderam ser revertidos pela suplementação de curto prazo. Como consequência, a capacidade de crescimento e de ovulação, em resposta ao tratamento superestimulatório, pode ter sido prejudicada.

Da mesma forma, durante o experimento, no inverno do ano anterior não se obteve sucesso na tentativa de produção de embriões em três novilhas de raça Gir superovuladas, no mesmo rebanho. Naquela época, os animais também foram mantidos a pasto, mas começaram a receber suplementação no dia do início do protocolo hormonal de superovulação. Supõe-se que ocorreu efeito negativo da provável restrição nutricional, que também não pôde ser revertido pela suplementação alimentar imediata. Logo, propõe-se que as superovulações realizadas em épocas menos favoráveis, como o inverno (ou seca), naqueles sistemas de produção em que os animais são mantidos exclusivamente a pasto, deveriam ser precedidas por manejo nutricional adequado. Isto visa propiciar aos animais a manifestação de maior número de ciclos estrais prévios, situação que se

relaciona com melhores condições de resposta ovariana. Todavia, mais estudos são necessários para se estabelecer a melhor estratégia para suplementação de fêmeas destinadas a serem doadoras de embriões, em condições semelhantes à estudada neste experimento.

Todavia, pôde-se verificar que no verão, quando as condições de pastagem são favoráveis para atenderem aos requisitos nutricionais das doadoras, a resposta superovulatória obtida foi satisfatória e dentro do esperado para animais da raça Gir Leiteiro.

#### **4.3. Experimento 3: *Transferência de embriões FI***

##### **4.3.1. *Utilização de novilhas como receptoras***

O reduzido número de novilhas cíclicas utilizadas durante o inverno (n=8) indica que a maioria delas ainda não apresentava amadurecimento completo do sistema reprodutivo como um todo, ou que retomaram à condição de anestro, mesmo apresentando idade semelhante à das novilhas utilizadas no verão (n=25).

A porcentagem de novilhas que respondeu ao protocolo de sincronização foi de 92% (23/25), 100% (8/8) e 62,5% (10/16) para os grupos de novilhas sincronizadas no verão, com protocolo A (VA), novilhas sincronizadas no inverno com protocolo A (IA) e novilhas sincronizadas no inverno com protocolo B (IB), respectivamente. O intervalo da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e o estro observado foi de  $44,87 \pm 17,8$ ;  $67,50 \pm 14,25$  e  $49,50 \pm 14,25$  horas para os grupos VA, IA e IB, respectivamente, sendo observada

diferença ( $p < 0,05$ ) do grupo IA em relação aos demais. Considerando-se os grupos de novilhas que estavam ciclando no início do protocolo, a apresentação de estro, após a retirada do dispositivo de progesterona, dependeria tanto da ação do agente luteolítico para a regressão do corpo lúteo eventualmente presente ao final do protocolo, bem como da presença de estradiol em concentrações suficientes para sensibilizar os centros cerebrais de comportamento sexual. No caso do protocolo utilizado (A), o estradiol desencadeador desse comportamento, seria produzido como consequência do crescimento e maturação final do folículo dominante. Além da indução do estro, o estradiol produzido ainda teria a função de induzir o pico pré-ovulatório de LH, e consequentemente, a ovulação.

A ovulação, portanto, ocorreu em todos os animais dos grupos VA e IA que manifestaram estro, visto que todos apresentaram corpo lúteo no dia da inovulação. É possível que o maior tempo demandado pelos animais do grupo IA para apresentarem estro, em relação ao grupo VA, se deva a menor taxa de crescimento do folículo dominante dessas fêmeas sincronizadas no inverno, o que demandou maior tempo para a maturação folicular final e desencadeamento de estro e ovulação. A condição nutricional desses animais, mantidos sob regime de pastejo durante o inverno, foi, provavelmente, fator limitante para o desenvolvimento folicular em taxas semelhantes às dos animais sincronizados durante o verão.

Em relação ao grupo IB, observou-se que cinco novilhas desse grupo (31,2%) apresentaram comportamento de estro

sem ovulação. No caso dos animais sincronizados com o protocolo B, o comportamento de estro pode advir da ação do estradiol endógeno ou exógeno (aplicado no final do protocolo) e, portanto, não dependendo apenas, da condição de desenvolvimento folicular. A apresentação de estro, sem subsequente ovulação é um evento que pode acontecer em condições naturais, com relativa frequência (até 68% dos animais) em novilhas, sendo assim denominado estro não puberal (Ruter e Randel, 1986). Nesse caso, o estímulo do estradiol é suficiente para estimular os centros cerebrais responsáveis pelo comportamento sexual, mas não para desencadear liberação de LH necessário à indução a ovulação, devido à imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise-ovário desses animais. Segundo Escobedo et al. (1989), comportamento de estro sem ovulação também pode ocorrer em novilhas tratadas com progestógenos.

Não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) nas taxas de sincronização quando se compararam novilhas cíclicas em relação à época do ano (VA x IA), ou quando se compararam novilhas cíclicas ou acíclicas utilizadas no inverno (IA x IB). Entretanto, a taxa de sincronização de novilhas cíclicas (grupos VA mais IA), independente da época (93,9%), foi maior ( $p < 0,05$ ) em comparação a de novilhas acíclicas (grupo IB) (62,5%). A ausência de diferença nos resultados obtidos quanto à utilização de novilhas cíclicas ou acíclicas, somente durante o inverno, pode ser justificada pelo baixo número de animais disponíveis nesses dois grupos.

É provável que a capacidade de resposta ao protocolo de sincronização de estro esteja relacionada à maturidade do eixo hipotálamo-hipófise-ovário desses animais. Novilhas acíclicas podem não apresentar redução do *feed-back* negativo do estradiol num limiar suficiente para: desencadear o desenvolvimento dos folículos ovarianos até diâmetros pré-ovulatório, e permitir resposta do eixo hipotálamico-hipofisário ao estímulo endógeno ou exógeno (como utilizado no presente trabalho) de estradiol, desencadeando a ovulação.

Por outro lado, novilhas cíclicas responderam eficientemente ao protocolo de sincronização, com taxas de ovulação semelhantes às reportadas em trabalho com novilhas tratadas com protocolos que associaram estradiol e progestógeno (Sá Filho et al., 2005a).

A área do corpo lúteo foi maior em novilhas sincronizadas no verão, em relação àquelas sincronizadas no inverno, independente da condição de ciclicidade ao início do protocolo hormonal (Tabela 12).

Corpos lúteos de maior área também foram verificados durante a época das águas (verão), em relação à seca (inverno), tanto em vacas das raças Gir quanto Nelore, após estro natural (Borges et al. 2003). Tal fato pode ocorrer devido à menor produção de LH, à menor sensibilidade das células luteais a esse hormônio, ou pela ovulação de folículos maiores no verão, em decorrência do maior aporte nutricional que acarreta produção de folículos, e cosequentemente, corpos lúteos maiores,

assim como foi observado por Mollo et al. (2007) em novilhas da raça Nelore.

**Tabela 12: Área do corpo lúteo no dia da inovulação, nas novilhas receptoras de embrião**

Grupo	n	Área do corpo lúteo (cm <sup>2</sup> )
VA	23	2,48 ± 0,74 <sup>a</sup>
IA	8	1,31 ± 0,45 <sup>b</sup>
IB	10	1,46 ± 0,43 <sup>b</sup>

VA = novilhas sincronizadas no verão, com o protocolo A; IA = novilhas sincronizadas no inverno, com o protocolo A; IB = novilhas sincronizadas no inverno, com o protocolo B. Médias seguidas por letras distintas diferem entre si (p>0,05).

A taxa de gestação não diferiu (p>0,05) entre os três grupos experimentais,

sendo, em geral, de 41,03% e 33,34%, respectivamente aos 30 e 60 dias (Tabela 13). A taxa de perda de gestação entre 30 e 60 dias foi de 18,75% (3/16).

A taxa de gestação aos 30 dias foi semelhante às reportadas na literatura para embriões congelados em etilenoglicol, de: 44,7%, 36,7%, 45,4% e 41,0%, por Dochi et al. (1998), Sá et al. (2001), Martínez et al. (2002) e Béynei et al. (2006) respectivamente. Contudo, a taxa de gestação aos 60 dias foi inferior às reportadas nesses trabalhos, sendo que a taxa de perda foi maior do que a de 10% reportada por Béynei et al. (2006), que avaliou 282 novilhas receptoras de embrião, entre 35 e 75 dias de gestação.

**Tabela 13: Taxa de gestação aos 30 e 60 dias em novilhas receptoras de embrião**

Grupo	Receptoras Inovuladas	Gestação 30 dias		Gestação 60 dias	
		n	%	n	%
VA	23	12	52,17	10	43,48
IA	8	2	25,00	1	12,50
IB	8	2	25,00	2	25,00
<i>Geral</i>	39	16	41,03	13	33,34

VA = novilhas sincronizadas no verão, com o protocolo A; IA = novilhas sincronizadas no inverno, com o protocolo A; IB = novilhas sincronizadas no inverno, com o protocolo B. Taxas de gestação aos 30 e aos 60 dias não diferem entre os grupos (p>0,05).

A área do corpo lúteo não foi diferente (p<0,05) entre animais gestantes e não gestantes. Outros trabalhos também reportam que a qualidade ou tamanho do corpo lúteo não se relacionaram à taxa de gestação de receptoras de embrião (Remsen et al., 1982; Béynei et al., 2006).

Aspectos envolvendo a receptora de embrião, principalmente com relação à condição uterina, bem como a qualidade do embrião transferido, são fatores que

podem estar relacionados à taxa de gestação obtida.

É possível que as receptoras que não se tornaram gestantes ou que sofreram perda embrionária ainda não apresentassem condição uterina ideal para o estabelecimento e/ou manutenção da gestação. A condição uterina ótima é atingida em novilhas após estímulos alternados de estradiol e progesterona (Kinder et al., 1995), sendo que a chance de gestação aumenta à medida que novilhas são cobertas após o terceiro

estro, em comparação ao primeiro estro (Byerley et al., 1987). Da mesma forma, Staigmiller et al. (1993) observaram que a transferência de embriões criopreservados, provenientes de vacas, em receptoras novilhas, resultou em taxas de gestação de 13% e 53% naquelas inovuladas após o estro puberal ou no terceiro estro, respectivamente.

Em relação aos embriões, nota-se que, em novilhas, houve diferença entre as taxas de gestação obtidas a partir dos diferentes grupos de embriões transferidos, sendo que o grupo HV apresentou maior taxa, em relação aos demais (Tabela 14).

**Tabela 14: Taxas de gestação relativas aos diferentes grupos de embriões transferidos em novilhas**

Grupo de embriões	Embriões transferidos	Gestações obtidas	Taxa de gestação (%)
HI	13	3	23,08 <sup>b</sup>
HV	15	11	73,33 <sup>a</sup>
GV	11	2	18,18 <sup>b</sup>

HI: Embriões produzidos durante o inverno, a partir de doadoras da raça Holandês, inseminadas com sêmen de touros da raça Gir; HV: Embriões produzidos durante o verão, a partir de doadoras da raça Holandês, inseminadas com sêmen de touros da raça Gir; GV: Embriões produzidos durante o verão, a partir de doadoras da raça Gir, inseminadas com sêmen de touros da raça Holandês.

Valores seguidos por letras distintas na mesma coluna diferem entre si (p>0,05)

A possível melhor qualidade dos embriões do grupo HV pode estar relacionada a fatores que envolvem qualidade dos oócitos bem como o ambiente uterino das doadoras nessa época. A avaliação da qualidade dos embriões, a partir dos resultados das coletas (item 4.1), não apontou diferença

neste parâmetro, em relação à época do ano. Contudo a visualização dessas estruturas sob o estereomicroscópico pode não ter sido suficiente para a detecção de possíveis alterações que afetassem a qualidade embrionária. Sendo assim, a redução da viabilidade dos embriões pôde ser percebida somente após a avaliação dos resultados de transferência.

Um dos fatores que chama atenção em relação aos embriões produzidos, é a elevada média de estruturas, obtida por doadora, principalmente, em relação ao grupo HI (Tabela 15).

**Tabela 15: Número total de estruturas coletadas após a superovulação das doadoras dos embriões transferidos**

Grupo	Doadora	Estruturas recuperadas	
		Total	Média
HI	362	14	30,3
	364	36	
	366	49	
	349	22	
HV	359	9	12,0
	364	20	
	365	5	
	373	3	
	374	23	
GV	1464	10	13,0
	1834	10	
	1887	19	

HI: Embriões produzidos durante o inverno, a partir de doadoras da raça Holandês, inseminadas com sêmen de touros da raça Gir; HV: Embriões produzidos durante o verão, a partir de doadoras da raça Holandês, inseminadas com sêmen de touros da raça Gir; GV: Embriões produzidos durante o verão, a partir de doadoras da raça Gir, inseminadas com sêmen de touros da raça Holandês.

A presença de grande quantidade de embriões no trato reprodutivo de bovinos não é uma ocorrência natural e,

conseqüentemente, a captação dos oócitos pelas tubas, a fecundação e o desenvolvimento embrionário podem ser afetados pelos regimes de superestimulação (Shea, 1981). Segundo Ireland et al. (2007), há menor proporção de embriões transferíveis após a superestimulação em animais com grande número de folículos nos ovários, e essa alteração no desenvolvimento embrionário não aconteceu devido a diferenças na qualidade do oócito. Greeve e Callesen (2001) relataram que a superovulação pode afetar os processos de maturação dos oócitos e o transporte dos gametas nas tubas em decorrência do padrão endócrino alterado (em especial a relação estradiol-17 $\beta$ /progesterona), após o tratamento com gonadotropinas exógenas, acarretando aumento da incidência de estruturas não fecundadas e de embriões de pior qualidade. Foi verificado que altas concentrações de progesterona podem ser prejudiciais aos embriões (Nogueira et al., 2004). Siqueira et al. (2007) observaram correlação de 0,55 entre as concentrações de progesterona em doadoras de embrião no dia da coleta e o número de corpos lúteos obtidos, sendo que a concentração plasmática média obtida foi de 17,85  $\pm$  5,34 ng/mL. Outros autores observaram concentrações plasmáticas de progesterona médias de 36,41 ng/mL (Borges, 1999), 13,6 ng/mL (Pugliesi et al., 2005) e 79,92 ng/mL (Lopes, 2003), sendo que, neste último trabalho, as concentrações variaram entre 2,3 a 165 ng/mL, sendo obtidos, em média, 3,5 e 4,5 estruturas viáveis e totais, respectivamente.

Em relação aos embriões provenientes das doadoras da raça Gir (grupo GV), a média obtida por doadora foi semelhante

à obtida pelas doadoras do grupo HV, porém, obteve-se taxa de gestação inferior. Alguns autores reportam que embriões zebuínos podem ser mais sensíveis ao procedimento de criopreservação em relação aos taurinos (Zanenga, 1993; Visintin et al., 2002). É possível que essa maior sensibilidade, reportada aos zebuínos, possa também ocorrer em embriões F1 Holandês x Gir, mais especialmente, naqueles de base materna zebuína. No entanto, mais estudos são necessários para determinação do efeito da base materna e paterna na resistência de embriões à criopreservação.

#### *4.3.2. Utilização de vacas no período pós-parto como receptoras*

Dos animais avaliados, 81,82% (18/22) e 93,75% (30/33) responderam ao protocolo de sincronização, no verão e inverno, respectivamente, não havendo diferença entre as épocas do ano ( $p > 0,05$ ). Essas taxas mostram que o protocolo utilizado foi eficiente para a indução da ovulação e sincronização de estro em vacas no pós-parto recente.

O intervalo da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona e a observação de estro foi menor ( $p < 0,05$ ) no verão (31,34  $\pm$  10,20 horas) em relação ao inverno (41,60  $\pm$  6,09 horas). Mesmo com o fato do maior folículo no dia do início do tratamento não ter sido diferente entre as épocas, a apresentação de estro num período mais cedo após a retirada do implante, durante o verão possivelmente se relaciona ao maior aporte nutricional oferecido aos animais nessa época. Tal fato pode estar relacionado à presença de maiores

concentrações plasmáticas de insulina e IGF-1, que, por sua vez, influenciam positivamente a esteroidogênese e o crescimento folicular (Beam e Butler, 1997; Gong, 2002; Webb et al., 2004).

Durante o período pós-parto, várias ondas foliculares podem se desenvolver antes da primeira ovulação (Diskin et al., 2003). O restabelecimento dos estoques de LH, no hipotálamo, e a alta frequência de liberação desse hormônio são necessários para que o folículo dominante se desenvolva até tamanhos pré-ovulatórios, e para que produza quantidade suficiente de estradiol capaz de induzir a onda pré-ovulatória de LH (Jolly et al., 1995). O BEN reduz a frequência de pulsos de LH (Butler e Smith, 1989; Schillo, 1992), o desenvolvimento folicular (Lucy et al., 1991) e o tamanho máximo do folículo dominante (Diskin et al., 1999).

No presente trabalho, os animais que ovularam após o tratamento hormonal apresentavam maior ( $p < 0,05$ ) diâmetro de folículo dominante (13,1 mm), antes do tratamento, em relação aos que não ovularam (10,6 mm). Essa relação também foi observada por Carvalho et al. (2007). Além disso, Burke et al.

(2001) mostraram que a maturidade do folículo dominante presente no momento do tratamento com benzoato de estradiol, em vacas de corte amamentando, influencia a taxa de ovulação e a função luteal, sendo que vacas que possuíam folículos imaturos apresentaram pior resposta. Segundo Rhodes et al. (2003), as concentrações circulantes de IGF-1 são envolvidas na otimização da resposta das células da teca e da granulosa ao estímulo gonatodrópico, e quadros de ausência de ovulação ou ocorrência de folículos que não atingem tamanhos pré-ovulatórios são observados na maioria das vacas com período entre o parto e a primeira ovulação prolongado, especialmente, naquelas mantidas sob condição de pastejo.

Não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) entre épocas com relação à área do corpo lúteo no dia da inovulação, sendo, em média, de  $3,22 \pm 1,01 \text{ cm}^2$  ( $3,19 \pm 0,75 \text{ cm}^2$  e  $3,24 \pm 1,15 \text{ cm}^2$  no verão e inverno, respectivamente).

As taxas de gestação obtidas a partir da transferência de embriões estão apresentadas na Tabela 16.

**Tabela 16: Taxas de gestação aos 30 e 60 dias, em vacas receptoras de embrião no período pós-parto**

Época	Receptoras Inovuladas	Gestação 30 dias		Gestação 60 dias	
		n	%	n	%
Verão	18	5	27,78	4	22,23
Inverno	30	2	6,67	2	6,67
<i>Geral</i>	48	7	14,58	6	12,50

Taxas de gestação aos 30 e aos 60 dias não diferem entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

O reduzido número de gestações não permitiu observar diferença nas taxas de

gestação ( $p > 0,05$ ) entre verão e inverno, cujos valores foram de 14,58% e 12,50%

aos 30 e 60 dias, respectivamente, sendo inferiores às reportadas pela literatura (Dochi et al., 1998; Sá et al., 2001; Martínez et al., 2002; Béynei et al., 2006). A taxa de perda de gestação entre 30 e 60 dias foi de 14,29% (1/7). A área de corpo lúteo no dia da inovulação, o número de dias pós-parto e produção de leite não foram diferentes ( $p>0,05$ ) entre receptoras que se tornaram gestantes ou não.

Alguns autores observaram que as concentrações circulantes de progesterona no dia da transferência, podem se relacionar à taxa de gestação de receptoras de embrião (Remsen et al., 1982; Chagas e Silva et al., 2002a; Baruselli et al., 2003). Mesmo não se observando diferença da área do corpo lúteo entre receptoras gestantes ou não gestantes, as concentrações de progesterona poderiam estar reduzidas nessas últimas. Borges et al. (2003) observaram correlações medianas entre área do corpo lúteo e concentração plasmática de progesterona, em vacas das raças Gir e Nelore. Isso se explica pelo fato de que as concentrações desse hormônio variam de acordo com sua produção, secreção e metabolismo (Villa-Godoy et al., 1998; Sangsritavong et al., 2002).

No presente experimento, o corpo lúteo das vacas em lactação foi proveniente de um folículo que se desenvolveu em meio a um ambiente metabólico condizente com o estágio lactacional e provável BEN das receptoras e, portanto, alterações em sua qualidade e potencial de desenvolvimento podem ter ocorrido, assim como foi demonstrado por Leroy (2005). Sendo assim, folículos que sofrem alterações negativas em sua

qualidade, resultam na produção de corpos lúteos de menor qualidade (Burke et al., 2001). Dessa forma, esses corpos lúteos estariam relacionados à produção de progesterona em concentrações insuficientes para a manutenção da gestação.

Chagas e Silva et al. (2002a) observaram que baixas concentrações de progesterona, no dia sete de ciclo estral, afetaram a sobrevivência embrionária em vacas lactantes utilizadas como receptoras, especialmente quando foram transferidos embriões criopreservados. As concentrações circulantes de progesterona afetam a sobrevivência embrionária quando estão abaixo do limiar necessário para a manutenção da gestação, mas pode ser que não determinem aumento na taxa de gestação quando se encontram acima desse limiar. Tal fato foi observado por Remsen et al. (1982), que reportaram taxas de gestação de 20% em receptoras apresentando concentrações plasmáticas de progesterona abaixo de 2 ng/ml, e de 74% e 60% em receptoras cujas concentrações estavam entre 2 e 5 ng/ml ou acima de 5 ng/ml, respectivamente.

Outro fator que pode ter colaborado para a obtenção das baixas taxas de gestação nas vacas utilizadas neste experimento, seria a utilização dessas receptoras após o primeiro estro pós-parto, quando são observadas menores taxas de gestação em relação à utilização dos estros subsequentes (Thatcher e Wilcox, 1973; Ferguson, 2005). A ocorrência de ciclos estrais de curta duração após a primeira ovulação pós-parto (Day et al., 1990), resultando na regressão precoce do corpo lúteo, relaciona-se à obtenção de baixas taxas de gestação. Mesmo que o

tratamento prévio com progesterona reduza a incidência de ciclos curtos subsequentes (Breuel et al., 1993; Zollers et al., 1993), esta ocorrência ainda pode ser observada, mesmo em baixa frequência, após a segunda ovulação pós-parto (Royal et al., 2000). Dessa forma, infere-se que mesmo com o tratamento prévio de progestógeno, os animais utilizados poderiam não possuir, ainda, condições uterinas ótimas para manter a gestação. Ruas et al. (2007) utilizaram o mesmo protocolo de indução de estro do presente experimento, em vacas mestiças F1 HZ acíclicas, e obtiveram taxa de gestação de 35,48% após a inseminação.

Segundo Butcher et al. (1992), o corpo lúteo de vida curta não é o único fator de baixa taxa de gestação no primeiro estro pós-parto, sendo que a qualidade do oócito e o ambiente da tuba e útero podem estar envolvidos. No presente estudo, em que se realizou transferência de embriões, a qualidade dos mesmos e o ambiente uterino podem ter influenciado a taxa de gestação.

A qualidade dos embriões transferidos pode ter colaborado para a obtenção de baixas taxas de gestação, mas, provavelmente, não foi o fator limitante para o estabelecimento da gestação em vacas no pós-parto, visto que embriões produzidos a partir das mesmas superovulações e transferidos em novilhas resultaram em as taxas de gestação maiores do que as observadas nas vacas (Tabela 17).

**Tabela 17: Taxas de gestação aos 30 e 60 dias, em vacas e novilhas receptoras de embrião**

Categoria das receptoras	Taxa de gestação (%)	
	30 dias	60 dias
Novilhas	41,03 <sup>a</sup>	33,34 <sup>a</sup>
Vacas	14,58 <sup>b</sup>	12,50 <sup>b</sup>

Valores seguidos por letras distintas, na mesma coluna, diferem entre si quadrado ( $p < 0,05$ ).

Sendo assim, em vacas no pós-parto, não foi possível observar diferença entre as taxas de gestação, considerando-se os três grupos de embriões transferidos (Tabela 18).

**Tabela 18: Taxas de gestação relativas aos diferentes grupos de embriões transferidos em vacas**

Grupo de embriões	Embriões transferidos	Gestações obtidas	Taxa de gestação (%)
HI	16	2	12,50
HV	14	4	28,57
GV	18	1	5,56

HI: Embriões produzidos durante o inverno, a partir de doadoras da raça Holandês, inseminadas com sêmen de touros da raça Gir; HV: Embriões produzidos durante o verão, a partir de doadoras da raça Holandês, inseminadas com sêmen de touros da raça Gir; GV: Embriões produzidos durante o verão, a partir de doadoras da raça Gir, inseminadas com sêmen de touros da raça Holandês.

Valores na mesma coluna não diferem entre si ( $p > 0,05$ )

A condição do útero no pós-parto também pode ter influenciado a chance de estabelecimento e manutenção de gestação das vacas. Essa condição é, e parte, determinada pelo grau de involução uterina, sendo este, um processo fisiológico caracterizado pela recuperação do útero da gestação anterior, envolvendo a redução do seu tamanho, perda de tecido residual e regeneração endometrial (McEntee, 1990). Segundo Short et al. (1990), a involução uterina está completa em torno

de 20 a 40 dias pós-parto, não sendo a condição uterina, após este período, um empecilho para o desenvolvimento de uma nova gestação. No presente trabalho, no entanto, o protocolo de sincronização iniciou-se entre 21 e 65 dias após o parto, sendo que metade das receptoras foi sincronizada com menos de 40 dias. Mesmo tendo sido utilizadas apenas aquelas com útero involuído macroscopicamente à palpação tranretal, e não apresentando líquido no lúmen uterino, detectável por ultrassom, é possível que em alguns desses animais, a regeneração total do endométrio não tenha ocorrido, a ponto de possibilitar condição para a produção adequada de fatores necessários à sobrevivência embrionária (por exemplo, o histotrofo) ou que alguma contaminação ainda estivesse presente.

Além disso, a progesterona utilizada no protocolo de sincronização poderia ter influenciado negativamente o ambiente uterino. Segundo Lewis (1997), atividade luteal precoce pode comprometer negativamente a involução uterina, pois a progesterona deprime o sistema imune e pode fazer com que o útero se torne mais susceptível a infecções. Smith e Wallace (1998) reportaram que vacas que retornaram à atividade ovariana cíclica com menos de 21 dias pós-parto apresentaram menores taxas de gestação e maior intervalo parto-concepção. Sakagushi et al. (2004) observaram atraso na involução uterina de vacas que ovularam após uma única onda folicular no pós-parto.

Finalmente, outro fator que pode ter contribuído para a redução da probabilidade de gestação é o aumento de secreção uterina de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , que pode ocorrer após a primeira ovulação pós-parto. Mesmo em concentrações sub-luteolíticas, a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  pode causar perda embrionária durante os primeiros estádios de desenvolvimento devido sua ação direta sobre o embrião (Buford et al., 1996; Scena et al. 2004), ou pela indução de liberação de fatores embriotóxicos (por exemplo, a oxitocina) pelo corpo lúteo (Inskip, 2004).

#### 4.4. Experimento 4: *Cultivo in vitro de embriões F1*

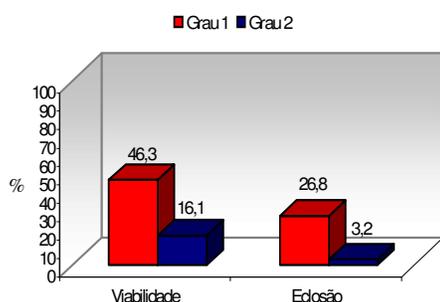
Após o descongelamento, cinco embriões grau 1 e três grau 2 apresentaram ruptura de zona pelúcida e extravasamento da massa embrionária (degenerada) e não foram submetidos ao cultivo, porém foram considerados no número total e embriões (Tabela 19).

O reduzido número de embriões avaliados, dos grupos HV e GI não permitiu a verificação do efeito do grupo de produção em relação à viabilidade embrionária. Dessa forma, os embriões foram agrupados, sendo avaliados considerando-se apenas a classificação atribuída antes do congelamento (grau 1 ou grau 2). As taxas de viabilidade e eclosão dos embriões de grau 1 foram superiores em relação às dos embriões de grau 2 (Gráfico 7).

**Tabela 19: Embriões F1 cultivados *in vitro***

Grupo	Total de embriões	Ruptura de ZP		Viáveis	Eclodidos	Momento da eclosão				
		Início	Final			0 -24	24 - 48	48 - 72	72 - 96	
						h.	h.	h.	h.	
Grau 1	HI	31	2	6	14	10	8	0	1	1
	HV	5	3	3	2	0	0	0	0	0
	GI	5	0	2	3	1	1	0	0	0
<i>Subtotal Grau 1</i>		<i>41</i>	<i>5</i>	<i>11</i>	<i>19</i>	<i>11</i>	<i>9</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>1</i>
Grau 2	HI	23	2	9	3	0	0	0	0	0
	HV	6	1	2	2	1	0	1	0	0
	GI	2	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>Subtotal Grau 2</i>		<i>31</i>	<i>3</i>	<i>12</i>	<i>5</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>0</i>	<i>0</i>

**Gráfico 5: Taxas de viabilidade e eclosão de embriões F1 Holandês x Gir cultivados *in vitro***



Taxas de viabilidade e eclosão são diferentes entre os grupos ( $p < 0,01$ ).

A comparação das taxas de viabilidade e eclosão, entre os dois grupos, mostra que houve relação entre a classificação morfológica, realizada antes da criopreservação, e a capacidade de sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* do embrião. A classificação morfológica de embriões relaciona-se com o número de células apoptóticas presentes nessas estruturas e com a chance de estabelecimento de gestação sendo que embriões classificados como de melhor qualidade (grau 1) apresentam menor número de células apoptóticas (Márquez et al., 2005) e

resultam em maiores taxas de gestação (Linder e Wright, 1983; Hasler, 2001; Peixoto et al., 2007), quando comparados aos classificados morfológicamente como grau 2.

A literatura aponta taxas de viabilidade após 24 horas de cultivo *in vitro*, de 69% a 91% (Voekel e Hu, 1992) e 90% (Sá et al., 2001) para embriões de graus 1 e 2, produzidos *in vivo* e congelados em etilenoglicol 1,5M. Os valores de viabilidade obtidos nesse experimento são inferiores aos reportados acima, mesmo considerando-se apenas o grupo classificado como grau 1. Tal fato permite a colocação de que os embriões transferidos neste trabalho já apresentavam comprometimento em sua viabilidade, o que contribui para a elucidação dos fatores que afetaram negativamente o estabelecimento e a manutenção das gestações.

A redução da qualidade dos embriões transferidos pode ter ocorrido em diversas fases da produção e processamento dos mesmos. Primeiramente, os embriões foram

produzidos a partir do cruzamento entre uma raça taurina e outra zebuína. Fisher et al. (2000) reportaram haver heterose negativa estimada de -45% para o desenvolvimento embrionário *in vitro*, quando foram comparados embriões *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* com embriões puros dessas duas subespécies. Talvez seja possível que esse efeito possa também influenciar a qualidade e o desenvolvimento de embriões produzidos *in vivo*. No entanto, quando outros fatores que influenciam a taxa de gestação estão presentes, esse efeito pode não ser observado, assim como foi relatado por Pegorer et al. (2007), que obtiveram maior taxa de gestação em vacas da raça Holandês, submetidas ao estresse calórico, quando essas foram inseminadas com sêmen de touros da raça Gir, em comparação a touros da raça Holandês.

Além disso, os embriões podem ter sido expostas a condições adversas antes da coleta, ou seja, no ambiente uterino das doadoras, como já discutido anteriormente. Mesmo sendo classificados como grau 1, esses embriões poderiam apresentar alterações que não pudessem ser observadas sob estereomicroscópio, assim como foi observado por Aguilar et al. (2002) que mostraram que 50% dos embriões F1 Holandês x Gir, classificados como sendo de boa qualidade, apresentavam características de degeneração, quando avaliados sob microscopia eletrônica.

Adicionalmente, os embriões podem ter sofrido efeitos deletérios em sua qualidade, de diferentes amplitudes, num momento pós-coleta, ou seja, durante a criopreservação. Sabe-se que o processo de criopreservação pode causar danos

aos embriões (Márquez-Alvarado et al., 2004; Park et al., 2006). Fatores que afetam a sobrevivência de embriões criopreservados incluem: conteúdo lipídico dos embriões, taxas de resfriamento e aquecimento, tamanho e estágio de desenvolvimento do embrião, permeabilidade das células e propriedades osmóticas e toxicidade dos crioprotetores (Palasz e Mapletoft, 1996).

Os procedimentos que envolvem o envase e congelamento de embriões ainda são realizados de forma manual, gerando como consequência fatores de variação difíceis de serem controlados. Dentre esses fatores, destacam-se dois: o tempo em que o embrião permanece na solução com o crioprotetor até ser congelado, e a disposição do embrião na palheta, no que tange, principalmente, o tamanho das colunas do crioprotetor (que contém o embrião) e de ar. Segundo Sá et al. (2001), a redução da qualidade do embrião, após a criopreservação, pode indicar tanto a penetração incompleta como a superexposição ao crioprotetor, e esse problema se relaciona à dificuldade em padronizar o tempo de permanência de cada embrião no crioprotetor, especialmente em coletas com a produção de grande número de embriões, como foi o caso deste experimento. Martínez et al. (2002) reportaram que os embriões que permaneceram em equilíbrio, por 20 minutos, antes de serem congelados, em solução de etilenoglicol, produziram menor taxa de gestação, quando comparado com os que ficaram em equilíbrio por cinco minutos. Por outro lado, se a penetração do crioprotetor não for realizada de forma eficiente, cristais de gelo podem ser formados durante o

processo de congelamento, ocasionando lesão de estruturas celulares como, por exemplo, rompimento de zona pelúcida. Tal fato foi observado, neste experimento, em 26,82% (11/41) dos embriões grau 1 e em 38,71 (12/31)% dos embriões grau 2 cultivados (Tabela 19). Além disso, os diferentes momentos em que foi observada a eclosão dos embriões indica que, estes se desenvolveram em taxas diferentes, resultado da variação do potencial de desenvolvimento de cada estrutura, sendo que essa heterogeneidade pode ser resultado de variações de tempo de exposição do embrião ao crioprotetor, causando danos mais ou menos severos nessas estruturas.

## 5. Conclusões

- A época do ano não afetou a qualidade de embriões F1 Holandês x Gir, produzido a partir de doadoras de ambas as raças, quando avaliados sob estereomicroscópio;

- A época do ano não afetou a taxa de sincronização de estro de novilhas mestiças (Holandês x Zebu) que se encontravam cíclicas ou de vacas F1 (Holandês x Zebu) que se encontravam no período de anestro pós-parto, após a utilização de protocolos hormonais associando estradiol e progesterona;

-A condição ginecológica de novilhas afetou a resposta à sincronização de estro com protocolos associando estradiol e progesterona, sendo que houve menor eficiência de

sincronização, quando novilhas acíclicas foram submetidas ao tratamento hormonal, em comparação àquelas que apresentavam corpo lúteo no início do protocolo;

- O diâmetro do folículo dominante no início do tratamento hormonal, caracterizado pela associação de estradiol e progesterona, influenciou a taxa de sincronização do estro de vacas F1 (Holandês x Zebu) que se encontravam no período de anestro pós-parto;

- A taxa de gestação após a transferência de embriões F1 criopreservados, tanto em vacas no pós-parto quanto em novilhas, não foi influenciada pela época do ano;

- A utilização de vacas F1 Holandês x Zebu acíclicas como receptoras de embrião, após indução do estro e ovulação no período pós-parto, resultou em baixa taxa de gestação;

- A área corpo lúteo no dia da inovulação (para vacas e novilhas), bem como o número de dias pós-parto e a produção de leite em vacas sincronizadas entre 21 e 65 dias pós-parto, não influenciou a taxa de gestação após a transferência de embriões F1 criopreservados;

- A classificação morfológica de embriões F1, antes da criopreservação, se relacionou à sua sobrevivência *in vitro* pós-descongelamento.

## 6. Referências Bibliográficas

- ADAMS, G. P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle implications for synchronization and superstimulation. *Theriogenology*, v. 41, p. 19-24, 1994.
- ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J. et al. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, v. 69, p. 72-80, 2008.
- AGUILAR M. M.; GALINA, C. S.; MERCHANT, H. et al. Comparison of stereoscopy, light microscopy and ultrastructural methods for evaluation of bovine embryos. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 37, p. 341-346, 2002.
- AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 390-396, 2002.
- ALVAREZ, P. SPICER, L. J.; CHASE JR., C. C. et al. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. *J. Anim. Sci.*, v. 78, p. 1291-1302, 2000.
- AMBROSE, J. D.; DROST, M.; MONSON, R. L. et al. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen *in vitro* produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stresses dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 82, p. 2369-2376, 1999.
- ARIAS, P.; RODRIGUEZ, M.; SZWARCFARB, B. et al. Effect of insulin on LHRH release by perifused hypothalamic fragments. *Neuroendocrinology*, v.56, p.415-418, 1992.
- ARMSTRONG, D. G.; MCEVOY, T. G. BAXTER, G. et al. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol. Reprod.*, v. 64, p. 1624-1632, 2001.
- ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*, v.93, p.7-24, 1993.
- ARMSTRONG, D.V. Heat stress interaction with shade and cooling. *J. Dairy Sci.*, v.77, p.2044-2050, 1994.
- AROEIRA, L.J.M.; PACIULLO, D.S.C. Produção de leite a pasto. *Inform. Agropec.*, v.25, p.56-63, 2004.
- ASBIA. *Relatório Estatístico de Produção, Importação e Comercialização de Sêmen*. 2006. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br>>. Acesso em 12 dez. 2007.
- AX, R. L.; ARMBRUST, S.; TAPPAN, R. et al. Superovulation and embryo recovery from peripubertal Holstein heifers. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 85, p. 71-80, 2005.
- AZEVEDO, M.; PIRES, M. F. A.; SATURNINO, H. M. 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. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 34, p. 200-208, 2005.
- BACCARI JR., F. *Manejo ambiental da vaca leiteira em climas quentes*.

- Londrina: Editora da Universidade Estadual de Londrina, 2001. 142p.
- BADINGA, L.; COLLIER, R. J.; THATCHER, W. W. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in sub-tropical environment. *J. Dairy Sci.*, v. 68, p. 78-85, 1985.
- BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; DIAZ, T. et al. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v.39, p.797-810, 1993.
- BARACALDO, M. I.; MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P. et al. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*, v. 53, p. 1239-1250, 2000.
- BARB, C. R. The brain pituitary-adipocyte axis: role of leptin in modulating neuroendocrine function. *J. Anim. Sci.*, v. 77, p. 1249-1257, 1999.
- BARBOSA, P.F. Heterose: conceito e seus efeitos na pecuária bovina leiteira. *Inform. Agropec.*, v.25, p.32-39, 2004.
- BARREIROS, T. R. R.; BALARIN, O. F.; BARUSELLI, P. S. et al. Efeito do período pós-parto sobre a taxa de concepção de vacas nelore submetidas à inseminação artificial em tempo fixo com uso de CIDR. *Acta Sci. Vet.*, v. 33, p. 281, 2005 (resumo).
- BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. G. F. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, v.56, p. 1483-1496, 2001.
- BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; et al. Dinâmica folicular e taxa de gestação em receptoras de embrião (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo “Ovsynch” para inovulação em tempo fixo. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 40, p.98-107, 2003.
- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v. 31, p. 205-211, 2007.
- BASTIDAS, P.; RANDEL, R. D. Seasonal effects on embryo transfer in Brahman cows. *Theriogenology*, v. 28, p. 531-540, 1987.
- BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol. Reprod.*, v.56, p.133-142, 1997.
- BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Energy balance, metabolic hormones and early postpartum follicular development in dairy cows fed prilled lipid. *J. Dairy Sci.*, v. 81, p. 121-131, 1998.
- BEATTY, D. T.; BARNES, A.; TAYLOR, E. et al. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged continuous heat and humidity. *J. Anim. Sci.*, v. 84, p. 972-985, 2006.
- BÉNYEI, B.; KOMLÓSI, I.; PÉCSI, A. et al. The effect of internal and external factors on bovine embryo transfer results in a tropical environment. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 93, p. 268-279, 2006.

- BERGFELT, D. R.; LIGHTFOOT, K. C.; ADAMS, G. P. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, v. 42, p. 895-907, 1994.
- BLOCK, J.; CHASE JR., C. C.; HANSEN, P. J. Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal versus paternal contribution. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 63, p. 32-37, 2002.
- BÓ, G. A.; TRIBULO, H.; CACCIA, M. et al. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and transferred without estrus detection. *Theriogenology*, v.55, p.357, 2001 (resumo).
- 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.
- BOLANOS, J. M.; GALINA, C.S. ESTRADA, S. et al. Resumption of postpartum ovarian activity monitored by plasma progesterone in anocious zebu (*Bos indicus*) cattle following temporary weaning and progesterone treatment. *Reprod. Dom. Anim.*, v.32, p. 267-271, 1997.
- BORGES, Á. M. *Dinâmica folicular e superovulação em novilhas mestiças tratadas com somatotrofina bovina (rBST) e efeito da temperatura na qualidade dos embriões*. 1999.100f. Tese (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- BORGES, Á. M. *Influência de diferentes manejos e tratamentos hormonais na dinâmica ovariana durante o ciclo estral e no anestro pós-parto de vacas Gir e Nelore*. 2001. 134 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- BORGES, Á. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M. et al. Desenvolvimento luteal e concentrações plasmáticas de progesterona em vacas das raças Gir e Nelore. *Rev. Bras. Zootec.* v. 32, p. 276-286, 2003.
- BORGES, Á. M.; SATURNINO, H.M.; RUAS, J. R. M. et al. Otimização da reprodução do rebanho. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO DE GADO DE LEITE, 3, 2007, 12p. (CD-ROM).
- BREUEL, K. F.; LEWIS, P. E.; INSKEEP, E. K. et al. Endocrine profiles and follicular development in early-weaned postpartum beef cows. *J. Reprod. Fert.*, v. 97. p. 205-212, 1993.
- BRIDGES, P. J.; BRUSIE, M. A.; FORTUNE, J. E. Elevated temperature (heat stress) *in vitro* reduces androstenedione and estradiol and increases progesterone secretion by follicular cells from bovine dominant follicles. *Dom. Anim. Endoc.*, v.29, p.508–522, 2005.
- BRITT, J. H. Reproductive performance as affected by nutrition and environment. In: FLORIDA RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM, 3, 1992, Gainesville. *Proceedings...*Gainesville, 1992. p.93-104.

- BROADBENT, P. J.; STEWART, M.; DOLMAN, D. F. Recipient management and embryo transfer. *Theriogenology*, v.35, p.125-139, 1991.
- BUCKLEY, F.; O'SULLIVAN, K.; MEE, J. F. et al. Relationships among milk yield, body condition, cow weight, and reproduction in spring-calved Holstein-Friesians. *J. Dairy Sci.*, v. 86, p. 2308-2319, 2003.
- BUFORD, W. I.; AHMAD, N.; NEAL, S. et al. Embryotoxicity of a regressing corpus luteum in beef cows supplemented with progestogen. *Biol. Reprod.*, v. 54, p. 531-537, 1996.
- BURKE, C. R.; MACMILLAN, K. L.; BOLAND, M. P. Oestradiol potentiates progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomised cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.45, p.13-28, 1996.
- 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. *Anim. Reprod. Sci.*, v.66, p.161-174, 2001.
- BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F. J.; IRELAND, J. L. H. et al. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.*, v.73, p.54-62, 2005.
- BUTCHER, R. L.; REBER, J. E.; LISHMAN, A. W. et al. Maintenance of pregnancy in postpartum beef cows that have short-lived corpora lutea. *J. Anim. Sci.*, v. 70, p. 3831-3837. 1992.
- BUTLER, W. R.; SMITH, R. D. Interrelationship between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 72, 767-783, 1989.
- BYERLEY, D. J.; STAIGMILLER, K. B.; BERARDINELLI, J. G. et al. Pregnancy rates of beef heifers bred either on pubertal or third estrus. *J. Anim. Sci.*, v. 65, p. 645-650, 1987.
- CALLESEN, H.; GREVE, T.; AVERY, B. Embryo technology in cattle: brief review. *Acta. Agric. Scand.*, v. 29, p. 19-29, 1998.
- CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; RAMOS, A. A. et al. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology*, v. 68, p. 626-632, 2007.
- CARVALHO, B. C.; RUAS, J. R. M.; SILVA FILHO, J. M. et al. Dinâmica folicular de vacas mestiças F1 holandês x Zebu (HZ) submetidas à indução da ovulação no pós-parto. *Acta Sci. Vet.*, v. 35, p. 1110, 2007 (resumo).
- CARVALHO, J. B. P. *Sincronização de ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) em novilhas B. indicus, B. indicus x B. taurus e B. taurus*. 2004. 122 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CHAGAS E SILVA J.; LOPES DA COSTA L.; ROBALO SILVA, J. Plasma

- progesterone profiles and factors affecting embryo-fetal mortality following embryo transfer in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 58, p. 51-59, 2002a.
- CHAGAS E SILVA, J.; LOPES DA COSTA, L.; ROBALO SILVA, J. Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. *Anim Reprod.Sci.*, v. 69, p. 1-8, 2002b.
- COELHO E. N.; AZEVEDO, N. A. Particularidades da transferência de embriões zebuínos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 9, 1991, Belo Horizonte: *Anais...* Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1991. p.33-45.
- COELHO, S. G. *Transferência de embriões da raça zebuína*. 1988. 54 f. Tese (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- COOPER, D. A.; CARVER, D. A.; VILLENEUVE, P. et al. Effects of progestagen treatment on concentration of prostaglandins and oxytocin in plasma from the posterior vena cava of postpartum beef cows. *J. Reprod. Fert.*, v. 91, p. 411-421, 1991.
- DAY, M. L. Entendendo a fisiologia do anestro para determinar métodos hormonais para induzir ciclicidade. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 9, 2005, Uberlândia. *Anais...* Botucatu: UNESP, 2005. p. 183-190.
- DAY, M.L.; DYER, R. M.; WILSON, G. W. et al. Influence of estradiol on duration of anoestrus and incidence of short estrus cycles in postpartum cows. *Dom. Anim. Endoc.*, v.7, p.19-25, 1990.
- DHIMAN, T. R.; ZAMAN, M. S. Desafios dos sistemas de produção de leite em confinamento em condições de clima quente. In: SIMPÓSIO DE NUTRIÇÃO E PRODUÇÃO DE GADO DE LEITE, 2, 2001, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2001. p. 05-20.
- DISKIN, M. G.; STAGG, K.; MACKEY JR., D. R. Nutrition and oestrus and ovarian cycles in cattle. 1999. Disponível em: <http://www.teagasc.ie/research/reports/beef/4009/eopr-4009.htm>. Acesso em: 27 Jan. 2008.
- DISKIN, M. G.; MACKEY, D. R.; ROCHE, J. F. et al. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicular fluid of cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78, p. 345-370, 2003.
- DOCHI, O.; YAMAMOTO, Y.; SAGA, H. et al. Direct transfer of bovine embryos frozen-thawed in the presence of propylene glycol or ethylene glycol under on farm conditions in an integrated embryo transfer program. *Theriogenology*, v. 49, p. 1051-1058, 1998.
- EALY A.D.; DROST M.; ROBINSON O. W. et al. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. *J. Dairy Sci.*, v.76, p.2899-905, 1993.
- EBERHARDT, B. G.; SATRAPA, R. A.; CAPINZAIK, R. L. et al. M. Influência da raça do touro e da raça da vaca na resistência de embriões bovinos

- estresse térmico *in vitro*, durante a fase inicial de desenvolvimento. *Acta Sci. Vet.*, v. 33, p. 362, 2005 (resumo).
- EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol. Reprod.*, v.55, p.340-346, 1996.
- EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and pre-implantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.*, v.46, p.138-145, 1997.
- ELSDEN, R. P.; NELSON, L. D.; SEIDEL JR., G. E. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotropin. *Theriogenology*, v. 9, p. 17-26, 1978.
- ESCOBEDO F.; ENCISO A.; GOMEZ G. et al. Norgestomet (N) induces estrus but not ovulation in prepubertal *B Taurus x Bos indicus* heifers. *J. Anim. Sci.*, v.67, p. 410, 1989 (resumo).
- FERGUSON, J. D. Nutrition and reproduction in dairy herds. *Vet. Clin. North. Am.- Food. Anim. Pract.*, v.21, p. 325-347, 2005.
- FERREIRA, A. M. *Estudo da amamentação e do nível nutricional na atividade ovariana de vacas mestiças leiteiras*. 1990. 134 f. Tese (Doutorado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- FINCH, V. A. Body temperature in beef cattle: its control and relevance to production in the tropics. *J. Anim. Sci.*, v. 62, p. 531-542, 1986.
- FISCHER A. E.; BERNAL D. P.; GUTIERREZ-ROBAYO, C. et al. Estimates of heterosis for *in vitro* embryo production using reciprocal crosses in cattle. *Theriogenology*, v.54, p. 1433-1442, 2000.
- FUQUAY, J.W. Heat stress as it affects animal production. *J. Anim. Sci.*, v.52, p.164-182, 1981.
- GALINA, C. S.; ARTHUR, G. H. Review on cattle reproduction in the tropics. Part 4. Oestrus cycles. *Anim. Breeding Abstr.*, v.58, p.697-707, 1990.
- GARCIA G. J. K.; SEIDEL JR., G. E.; ELSDEN, R. P. Efficacy of shortened FSH treatment for superovulating cattle. *Theriogenology*, v. 17, p. 90, 1982 (resumo).
- GARCIA, M. R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S. W. et al. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous. *J. Anim. Sci.*, v.80, p. 2158-2167, 2002.
- GARCIA-WINDER M.; LEWIS, P. E.; DEEVER, P. E. et al. Endocrine profiles associated with life span of induced corpora lutea in postpartum beef cows. *J. Anim. Sci.*, v.62, p.1353-1362, 1987.
- GONG, J. G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Dom. Anim.Endocr.*, v. 23, p. 229-241, 2002.
- GONG, J. G.; ARMASTRONG, D. G.; BAXTER, G. et al. The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in

- heifers. *Theriogenology*, v. 57, p. 1591-1602, 2002.
- GREVE, T.; CALLESEN, H. Rendezvous in the oviduct: implications for superovulation and embryo transfer. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.41, p.451-459, 2001.
- GUTIERREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle stimulating hormone and morphological characteristics. *Biol. Reprod.*, v.56, p.608-616, 1997.
- GWAZDAUSKAS, F. C.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Physiological, environmental, and hormonal factors at insemination witch may affect conception. *J. Dairy Sci.*, v. 56, p. 873-877, 1973.
- GWAZDAUSKAS, F.C.; THATCHER, W. W.; KIDDY, C. A. et al. Hormonal pattern during heat stress following PGF2alpha-tham salt induced luteal regression in heifers. *Theriogenology*, v.16, p.271-285, 1981.
- HAFEZ E. S.S. *Adaptación de los animales domésticos*. Barcelona: Labor, 1973. 563p.
- HAHN, J. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*, v. 38, p. 269-265, 1992.
- HANSEN, P. J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. *J. Anim. Sci.*, v. 80, p. 33-44, 2002.
- HANSEN, P. J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82, p. 349-360, 2004.
- HANSEN, P.J., EALY, A.D. Effects of heat stress on the establishment and maintenance of pregnancy in cattle. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9, 1991, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1991. p.108-119.
- HARRISON, L. M.; HANSEN, T.R.; RANDEL, R.D. Evidence for seasonal and nutritional modification of ovarian and pituitary function in crossbred. *J. Anim. Sci*, v.55, p.649-656, 1982.
- HASLER, J. F. Factor affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, v. 56, p. 1401-1415, 2001.
- HASLER, J. F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 79, p. 245-264, 2003.
- HASLER, J. F.; MACCAULEY, A. D.; SCHERMERHORN, E. C.; Foote, R. H. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, v. 9, p. 353-362, 1983.
- HEMSWORTH, P. H.; BARNETT, J. L.; BEVERIDGE, L. et al. The welfare of extensively managed dairy cattle: a review. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, v.42, p.161-182, 1995.
- HENDRICKS, D. M.; RONE, J. D. A note on the effect of nutrition on ovulation and ovarian follicular populations in the individually fed post-

- partum beef heifer. *Anim. Prod.*, v. 43, p. 557-560, 1986.
- HERNANDEZ-CERÓN, J.; CHASE JR., C.; HANSEN, P. J. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano, and Angus breeds. *J. Dairy Sci.*, v. 87, p. 53-58, 2004.
- HOLM, P.; BOOTH, P.J.; SCHMIDT, M.H. et al. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol or without serum-proteins. *Theriogenology*, v.52, p.683-700, 1999.
- IBGE. *Produção Pecuária Municipal*. Rio de Janeiro, v. 34, p.1-62, 2006.
- INSKEEP, E. K. Factor that affect fertility during oestrus cycles with short or normal luteal phases in postpartum cows. *J. Reprod. Fert.* (Supl. 49), p. 493-503, 1995.
- INSKEEP, E. K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J. Anim. Sci.*, v. 82, p. 24-39, 2004.
- IRELAND, J. I.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASSEL, F. et al. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Human Reprod.*, v. 22, p. 1687-1695, 2007.
- JOLLY, P. D.; MCDOUGALL, S.; FITZPATRICK, L. A. et al. Physiological effects of undenutrition on postpartum anoestrus in cows. *J. Reprod. Fert.* (Supl. 49), p. 477-492, 1995.
- JOUSAN, F. D.; HANSEN, P. J. Insulin-like Growth Factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. *Biol. Reprod.*, v. 71, p.1665-1670, 2004.
- JU, C. G. Cellular responses of oocytes and embryos under thermal stress: hints to molecular signaling. *Anim. Reprod.*, v.2, p.79-90, 2005.
- KANITZ, W.; BECKER, F.; SCHNEIDER, F. et al. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. *Reprod. Nutr. Dev.*, v. 42, p. 587-599, 2002.
- KANUYA, R.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P. et al. Superovulatory response of dairy cattle (*Bos taurus*) in a tropical environment. *Theriogenology*, v. 47, p. 1583-1593, 1997.
- KINDER, J. E.; OBERSON, M. S.; WOLFE, M. W. et al. Management Factors Affecting puberty in the Heifer. In: FIELDS, M. J.; SAND, E.D. *Factors Affecting Calf Crop*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p. 69-89.
- KINDER, J. E.; BERGFELD, E. G. M.; WEHRMAN, M. E. et al. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. *J. Reprod. Fert.* (Supl. 49), p. 393-407, 1995.
- HASLER, J. F.; MACCAULEY, A. D.; SCHERMERHORN, E. C.; Foote, R. H. Superovulatory responses of Holstein cows. *Theriogenology*, v. 9, p. 353-362, 1983.

- LAFRI, M.; PONSART, C. NIBART, M. et al. Influence of CIDR treatment during superovulation on embryo production and hormonal patterns in cattle. *Theriogenology*, v.58, p. 1141-1151, 2002.
- LAMMING, G. E.; WATHES, D. C.; PETERS, A. R. Endocrine patterns of the post-partum cow. *J Reprod. Fertil.* (Supl. 30), p.155-70, 1981.
- LEMOS, A.M.; TEODORO, R.L., MADALENA, F.E. Comparative performance of six-Holstein-Friesian x Guzera grades in Brasil. 9. Stayability, herd life and reasons for disposal. *Rev. Bras. Gen.*, v.19, p.259-264, 1996.
- LERNER, S. P.; THAYNE, W. V.; BAKER, R. D. et al. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in holstein cows. *J. Anim. Sci.*, v. 63, p. 176-183, 1986.
- LEROY, J. L. M. R. *Metabolic changes in high producing dairy cows and the consequences on oocyte and embryo quality*. 2005. 252 f. Tese (Doctor in Veterinary Medicine) - Gent University, Maandag.
- LEWIS, G. S. Symposium: health problems of the postpartum cow: uterine health and disorders. *J Dairy Sci.*, v. 80, p. 984-994, 1997.
- LINDNER, G. M.; WRIGHT, W. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, v. 20, p. 407-416. 1983.
- LOONEY, C. R.; NELSON. J. S.; SCHNEIDER, H. J. et al. Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology*, v. 65, p. 201-209, 2006.
- LOPES, B. C. *Comportamento sexual e concentração de progesterona de fêmeas zebuínas (Bos taurus indicus) em diferentes estações climáticas após: I – Luteólise natural ou induzida, e II – superovulação*. 2003. 237 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J. Dairy Sci*, v. 84, p.1277–1293, 2001.
- LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; MICHEL, F. M. et al. Energy balance and size and number of ovarian follicles detected by ultrasonography in early postpartum dairy cows. *J. Dairy. Sci.*, v. 74, p. 473-482, 1991.
- MADALENA, F. E. Por que F1? In: ENCONTRO DE PRODUTORES DE GADO DE LEITE F1, 5, 2004. Belo Horizonte. *Anais...*Belo Horizonte: UFMG- Escola de Veterinária, 2004. p. 1-21.
- MADALENA, F. E.; LEMOS, A. M.; TEODORO, R.L. et al. Dairy production and reproduction in Holstein-Friesian and Guzera crosses. *J. Dairy Sci.*, v. 73, p. 1872-1886, 1990a.
- MADALENA, F. E.; TEODORO, R. L.; LEMOS, A. M. et al. Evaluation of strategies for crossbreeding of dairy cattle in Brazil. *J. Dairy Sci.*, v. 73, p. 1887-1901, 1990b.
- MADALENA, F. E.; ABREU, F. E.; SAMPAIO, I. B. et al. Práticas de

- cruzamentos em fazendas leiteiras afiliadas à Cooperativa Central de Produtores Rurais de Minas Gerais. *Rev. Bras. Zootec.*, v. 26, p. 924-934, 1997
- MANN, G.E.; LAMMING, G. E. The role of suboptimal pre-ovulatory oestradiol secretion in the etiology of premature luteolysis during the short oestrus cycle in the cow. *Anim. Reprod. Sci.*, v.64, p.171-180, 2000.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction*, v.121, p.175-180, 2001.
- MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, v. 42, p. 601-611, 2002.
- MARCATTI NETO, A.; RUAS, J. R. M.; AMARAL, R. Vaca de leite, bezerro de corte. *Inform. Agropec.*, v. 21, p.64-69, 2000.
- MARCATTI NETO, A.; RUAS, J. R. M.; BORGES, L. E. et al. Desenvolvimento e performance produtiva e reprodutiva de fêmeas F1 Holandês/Zebu. In: ENCONTRO DE PRODUTORES DE GADO DE LEITE F1, 5, 2004, Belo Horizonte. *Anais...*Belo Horizonte: UFMG- Escola de Veterinária, 2004. p.91-115.
- MÁRQUEZ, Y. C.; GALINA, C. S.; MORENO, N. T. I. Seasonal effect on zebu embryo quality as determined by their degree of apoptosis and resistance to cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 40, p. 553-558, 2005.
- MÁRQUEZ-ALVARADO, Y. C.; GALINA, C. S.; CASTILLS, B. et al. Evidence of damage in cryopreserved and fresh bovine embryos using the tunnel technique. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 39, p. 140-145. 2004.
- MARTÍNEZ, A. G.; BROGLIATTI, G. M.; VALCARCEL, A. et al. Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: a field trial. *Theriogenology*, v. 58, p. 963-972, 2002.
- MASSEY, J. M.; ODEN, A. J. No season effect on embryo donor performance in the southwest region of the USA. *Theriogenology*, v. 21, p. 196-217, 1984.
- McENTEE, K. *Reproductive Pathology of Domestic Mammals*. San Diego: Academic Press, 1990. 401p.
- McEVOY, T. G.; ROBINSON, J. J.; AITKEN, R. P. et al. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent *in vivo* and *in vitro* development of their ova. *Anim. Reprod. Sci.*, v.39, p.89-107, 1995.
- MENEGHTTI, M.; LOSI, T. C.; MARTINS JR., A. P. et al. Efeito de diferentes estímulos ovulatórios na taxa de sincronização. *Acta Sci. Vet.*, v. 33, p. 256, 2005 (resumo).
- MIHM, M.; GOOD, T. E. M.; IRELAND, J. H. L. et al. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentration alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. *Biol. Reprod.*, v. 57, p. 1328-1337, 1997.

- MOLLO, M. R.; RUMPF, R.; MARTINS, A. C. et al Produção de embriões em novilhas superovuladas submetidas à baixa ou alta ingestão alimentar. *Acta Sci. Vet.*, v. 35, p. 1241, 2007 (resumo).
- MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle, *Theriogenology*, v.19, p. 55-82, 1983.
- MOOR, R. M.; KRUIP, T. A. M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation? *Theriogenology*, v. 21, p. 103-116, 1984.
- MORAES, A. C. A.; COELHO, S. G.; RUAS, J. R. M. et al. Estudo técnico e econômico de um sistema de produção de leite com gado mestiço F<sub>1</sub> Holandês x Zebu. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, p. 745-749, 2004.
- MORENO, D.; CUTAIA, L. VILLATA, M.L. et al. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*, v.55, p.408, 2001 (resumo).
- MORRIS, D. G.; GREALY, M.; LEESE, H. J. et al. Cattle embryo growth, development and viability. *Beef Production Series*, v. 36, p. 1-32, 2001. Disponível em <<http://www.teagasc.ie/research/reports/beef/4388/eopr-4388.htm>> Acesso em: 27 Jan. 2008.
- MÜLLER, P. B. *Bioclimatologia aplicada aos animais domésticos*. Porto Alegre: Sulina, 1989. 262p.
- NASSER, L. T.; ADAMS, G. P.; BO, G. A. et al. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, v. 40, p. 713-724, 1993.
- NETT, T. M. Function of the hypothalamic-hypophysial axis during the post-partum period in ewes and cows. *J. Reprod. Fert.*, v. 34, p. 201-213, 1987.
- NEWCOMB; R.; CHRISTIE, W. B.; ROWSON, L. E. A. et al. Influence of dose, repeated treatment and batch of hormone on ovarian response in heifers treated with PMSG. *J. Reprod. Fert.*, v. 56, p. 113-118, 1979.
- NOGUEIRA, G. P.; OLIVEIRA, D. J. C.; CIPRIANO, R. S. Variação sazonal de secreção de LH em novilhas nelore. *Acta Sci. Vet.*, v. 35, p. 1018, 2007 (resumo).
- NOGUEIRA, M. F. G.; MELO, D. S.; CARVALHO, L. M. et al. Do high progesterone concentrations decrease pregnancy rates in embryo recipients synchronized with PGF<sub>2</sub> $\alpha$  and eCG? *Theriogenology*, v. 61, p. 1283-1290, 2004.
- O'CALLAGHAN, D. O.; BOLAND, M. P. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim. Sci.*, v. 68, p. 299-314, 1999.
- PALASZ, A. T.; MAPLTOFT, R. J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes recent advances. *Biotech. Adv.*, v. 14, p. 127-149, 1996.

- PARK, S. Y.; KIM, E. Y.; CUI, X. S. et al. Increase in DNA fragmentation and apoptosis-related gene expression in frozen-thawed bovine blastocysts. *Zigote*, v. 14, p. 125-131, 2006.
- PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. *Biol. Reprod.*, v. 66, p.1169-1177, 2002.
- PAULA-LOPES, F. F.; CHASE JR., C. C.; AL-KATANANI, Y. M. et al. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. *Reproduction*, v. 125, p. 285-294, 2003.
- PAYTON, R. R.; ROMAR, R.; COY, P. et al. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v. 71, p.1303-1308, 2004.
- 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, 2006.
- PEIXOTO, M. G. C.D.; FONSECA, C. G.; PENNA, V. M. et al. Análise multivariada de resultados da ovulação múltipla seguida de transferência de embriões de doadoras zebuínas. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 54, p. 492-500, 2002.
- PEIXOTO, M. G. C. D.; BERGMANN, J. A. G.; FONSECA, C. G. et al. Effects of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 58, p. 567-574, 2006.
- PEIXOTO, M. G. C. D.; BERGMANN, J. A. G.; SUYAMA, E. et al. Logistic regression analysis of pregnancy rate following transfer of *Bos indicus* embryos into *Bos indicus* x *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, v. 67, p. 287-292, 2007.
- PEREIRA, J.C.C. *Melhoramento genético aplicado à produção de leite*. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1998, 159p.
- PIRES, M. F. A.; FERREIRA, A. M.; COELHO, S. G. Estresse calórico em bovinos de leite. *Cad. Tec. Vet. Zootec.*, v. 29, p. 23-37, 1999.
- PIRES, M. F. A.; FERREIRA, A. M.; SATURNINO, H. M. et al. Taxa de gestação em fêmeas da raça Holandês confinadas em free-stall, no verão e no inverno. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 54, p.57-63, 2002.
- PLASSE, D.; WARNICK, A. C.; KOGER, M. Reproductive behavior of *Bos indicus* females in a subtropical environment. IV. Length of estrous cycle, duration of estrus, time of ovulation, fertilization and embryo survival in grade Brahman heifers. *J. Anim. Sci.*, v.30, p.63-72, 1970.
- PRADO, F. R. A. *Protocolo de superovulação em vacas da raça Gir quanto ao número de estruturas totais, embriões viáveis e degenerados*. 2006. 50 f. Dissertação (Mestrado em

- Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- PUGLIESI, G.; BORGES, A. M.; SILVA FILHO, J. M. et al. Resposta superovulatória ao FSH em vacas da raça Gir Leiteiro. In: SEMANA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 15, 2005, Belo Horizonte, *Anais...*, Belo Horizonte, 2005 (CD-Rom).
- PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology*, v.30, p. 195-209, 1988.
- PUTNEY, D.J.; MULLINS, S.; THATCHER, W. W. et al. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperature between the onset of estrus and insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, v.19, p.37–51, 1989.
- RANDEL, R. D. Seasonal effects on female reproductive function in the bovine (Indian Breeds). *Theriogenology*, v.21, p.170-185, 1984.
- REMSEN L. G.; ROUSSEL, J. D.; KARIHALOO, A. K. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. *Theriogenology*, v. 18, p. 365-372, 1982.
- RHODES F. M.; MCDUGALL, S.; BURKE, C. R. et al. Treatment of cows with extended postpartum anestrous interval. *J. Dairy Sci.* v.86, p.1876-194, 2003.
- RIVERA, R. M.; HANSEN, P. J. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction*, v.121, p.107–15, 2001.
- RIVERA, R. M.; KELLEY, K.L.; ERDOS, G. W. et al. Alterations in ultra structural morphology of two-cell bovine embryos produced *in vitro* and *in vivo* following a physiologically-relevant heat shock. *Biol. Reprod.*, v. 70, p. 1852-1862, 2003.
- RIVERA, R. M.; KELLEY, K.L.; ERDOS, G. W. et al. Reorganization of microtubules and microfilaments by thermal stress in two-cell bovine embryos. *Biol. Reprod.*, v.70, p.1852–1862, 2004a.
- RIVERA, R.M.; DAHLGREN, G. M.; KENNEDY, R. T. et al. Actions of thermal stress in two cell bovine embryos: oxygen metabolism, glutathione and ATP content, and the time-course of development. *Reproduction*, v. 128, p.33–42, 2004b.
- ROBERTS, A. J.; NUGENT III, R. A.; KLINDT, J. et al. Circulating insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, growth hormone, and resumption of estrus in postpartum cows subjected to dietary energy restriction. *J. Anim. Sci.*, v. 75, p. 1909-1917, 1997.
- ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R. et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, v. 49, p. 657-667, 1998.

- RODRIGUES, J. L. Transferência de embriões bovinos – histórico e perspectivas atuais. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.25, p. 102 – 107, 2001.
- ROSENKRANS, K. S.; HARDIN, D., K. Repeatability and accuracy of reproductive tract scoring to determine pubertal estrus in beef heifers. *Theriogenology*, v.59, p.1087–1092, 2003.
- ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, A. et al. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from preovulatory heat-stressed cows. *Reproduction*, v.122, p.737–44, 2001.
- ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol. Reprod.*, v.71, p.1898–1906, 2004.
- ROTH, Z.; HANSEN, P. J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction*, v. 129, p. 235-244, 2005.
- ROYAL, M.; MANN, G. E.; FLINT, A. P. F. Strategies for revising the trend towards subfertility in dairy cattle. *The Vet. J.*, v.160, p.53-60, 2000.
- RUAS, J. R. M.; BORGES, L. E.; MARCATTI NETO, A. et al. Cria e recria de fêmeas F1 holandês x zebu para a produção de leite. *Inform. Agropec.*, v.25, p.40-46, 2004.
- RUAS, J. R. M.; AMARAL, R.; MARCATTI NETO, A. et al. Produção de leite e bezerro comercial com vacas F1 Holandês-zebu. In: ENCONTRO DE MÉDICOS VETERINÁRIOS E ZOOTECNISTAS DOS VALES DO MUCURI, 26, 2005, Jequitinhonha e Rio Doce: *Anais...*2005, p.44-58, a.
- RUAS, J. R. M.; BRANDÃO, F. Z.; SILVA FILHO, J. M. et al. Indução do estro no pós-parto em vacas primíparas Holandês-Zebu. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 57, p. 476-484, 2005b.
- RUAS, J. R. M.; CARVALHO, B. C.; SILVA FILHO, J. M. et al. Eficiência reprodutiva de vacas mestiças F1 Holandês x zebu (HZ) submetidas ou não a indução da ovulação. *Acta Sci. Vet.*, v. 35, p. 1148, 2007 (resumo).
- RUBIN, K. C. P.; MAX, M. C.; PONTES, J. H, F. et al. M. Influência da estação do ano na produção de oócitos em vacas da raça nelore. *Acta Sci. Vet.*, v. 33, p. 372, 2005 (resumo).
- RUTTER, L. M.; RANDEL, R. D. Nonpuberal estrus in beef heifers. *J. Anim. Sci.*, v. 63, p. 1049-1053, 1986.
- RYAN, D. F.; SPOON, R. A.; GRIFFITH, M. K. et al. Ovarian follicular recruitment, granulosa cell steroidogenic potential and growth hormone/insulin-like growth factor-1 relationship in beef cows consuming high lipid diets: effects of graded differences in body condition maintained during the puerperium. *Dom. Anim. Endoc.*, v. 11, p. 161-174, 1994.
- SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; MADUREIRA, E. H. et al. Dinâmica folicular de novilhas Nelore (*Bos Indicus*) pré-puberes tratadas com implante auricular de norgestomet e

- benzoato de estradiol associado ou não à progesterona injetável. *Acta Sci. Vet.*, v. 33, p. 261, 2005 (resumo)a.
- SÁ FILHO, M. F.; PENTEADO, L.; REIS, E. L. et al. Efeito da ciclicidade e do tratamento com eCG na dinâmica folicular e na taxa de concepção de novilhas Nelore tratadas com implante auricular de norgestomet e benzoato de estradiol. *Acta Sci. Vet.*, v. 33, p. 265, 2005 (resumo) b.
- SÁ. W. F.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. et al. Efeito de diferentes crioprotetores sobre a taxa de gestação de embriões da raça Holandês. *Rer. Bras. Reprod. Anim.* v. 25, p. 424-426, 2001.
- SAKAGUCHI, M.; SASAMOTO, Y.; SUZUKI, T. et al. Postpartum ovarian follicular dynamics and estrous activity in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 87, p. 2114-2121, 2004.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2002. 221p.
- SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D.K.; SARTORI, R. et al. High feed intake increase liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 $\beta$  in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, v.85, p.2831-2842, 2002.
- SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A. et al. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.*, v. 85, p. 2803-2812, 2002.
- SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D. et al. Comparison of ovarian function during the estrous cycle of Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.*, v. 87, p. 905-920, 2004.
- SCENNA, F. N.; EDWARDS, J. L.; ROHRBACH, N. R. et al. Detrimental effects of prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  on preimplantation bovine embryos. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.*, v. 73, p. 215-226, 2004.
- SCHAM, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle - an overview. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 39, p.241-251, 2004.
- SCHILLO, K. K.; HALL, J. B.; HILEMAN, S. M. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J. Anim. Sci.*, v. 70, p. 3994-4005, 1992.
- SERGERSON, E. C.; HANSEN, T. R.; LIBBY, D. W. et al. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *J. Anim. Sci.*, v. 59, 1026-1046, 1984.
- SHEA, B. F. Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology*, v. 15, p. 31-42, 1981.
- SHEARER, J. K.; BEEDE, D. K. Thermoregulation and physiological responses of dairy cattle in hot weather. *Agri-practice*, v. 11, p. 5-17, 1990.
- SHORT, R. E.; BELLOWS, R. A.; CARR J. B. et al. induced or synchronized puberty in heifers. *J. Anim. Sci.*, v. 43, p. 1254-1258, 1976.

- SHORT, R. E.; BELLOWS, R. A.; STAIGMILLER, R. B. et al. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *J. Anim. Sci.*, v. 68, p. 799-816, 1990.
- SIDDIQUI, M. A. R.; SHAMSUDDIN, M.; BHUIYAN, M. M. U. et al. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. *Reprod. Dom. Anim.*, v. 37, p. 37-41, 2002.
- SILVA, R. G. *Introdução à Bioclimatologia Animal*. São Paulo: Nobel, 2000. 286p.
- SILVESTRE, J. R. A.; MADALENA, F. E.; MADUREIRA, A. P. Fazendeiros de Minas Gerais fazem cruzamento meio sangue F1 para produção de leite. *Cad. Téc. Vet. Zootec.*, v.18, p.3740,1996.
- SINCLAIR, K. D.; REVILLA, R.; ROCHE, J. F. et al. Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 postpartum in suckling beef cows. *J. Anim. Sci.*, v. 75, p, 115-126, 2002.
- SIQUEIRA, L. G. B.; VIANA, J. H. M.; SOUZA, E. D. et al. Eficiência na introdução da luteólise em diferentes dias após a coleta de embriões em bovinos (resultados parciais). *Acta Sci. Vet.*, v. 35, p. 1230, 2007 (resumo).
- SMITH, M. C. A.; WALLACE, J. M. Influence of early post partum ovulation on the re-establishment of pregnancy in multiparous and primiparous dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, v. 10, p. 207-216, 1998.
- SMITH, G. D.; JACKSON, L. M.; FOSTER, D. L. Leptin regulation of reproductive function and fertility. *Theriogenology*, v.57, p.73-86, 2002.
- SNIJDERS, S. E. M.; DILLON, P. G.; O'CALLAGHAN, D. et al. Effect of genetic merit, milk yield, body condition and lactation number on *in vitro* oocyte development in dairy cows. *Theriogenology*, v.53, p.981-989, 2000.
- SOUZA, J. A. T.; MACEDO, N. A.; CARTER, J. A. et al. Eficiência de doadoras e receptoras de embriões segundo a época do ano, a categoria e genótipo das receptoras. *Acta Sci. Vet.*, v. 35, p. 1235, 2007 (resumo).
- SPICER, L. J.; TUCKER, W.B.; ADAMS, G.D. Insulin-like growth factor-i in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. *J. Dairy Sci.*, v.73, p. 929-937, 1990.
- STAGG, K.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. et al. Follicular development in long-term anoestrus suckled beef cows fed two levels of energy postpartum. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 38, p. 49-61, 1995.
- STAIGMILLER, R. B.; BELLOWS, R. E.; SHORT, M. D. et al. Conception rates in beef heifers following embryo transfer at the pubertal or third estrus. *Theriogenology*, v.39, p.315, 1993 (resumo).
- STÖBER, M. Identificação, anamnese, regras básicas da técnica de exame clínico geral. In: DIRKSEN, G.; GRÜNDER, H.D.; STÖBER, M. *Exame*

- clínico dos bovinos*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. p.44-80.
- THATCHER, W. W.; MEYER, M. D.; DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. *J. Reprod. Fert.* (Supl. 49), p. 15-28, 1995.
- THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. *J. Dairy Sci*, v. 56, p. 608-610, 1973.
- THATCHER, W. W.; COLLIER, R. J. Effect of climate on bovine reproduction. In: MORROW, D.A. *Current Therapy in Theriogenology*. 2. ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co., 1986. p. 301-309.
- TONHATI, H.; LOBO, R. B.; OLIVEIRA, H. N. Repeatability and heritability of response to superovulation in Holstein cattle. *Theriogenology*, v. 51, p. 1151-1156, 1999.
- TORRES JR., J. R. S. *Produção in vitro de embriões em Bos indicus sob estresse calórico*. 2007. 134 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- TRIBULO, H.; BO, G. A.; JOFRE, F. et al. The effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v. 35, p. 286-291 (resumo).
- VASCONCELOS, J. L. M.; DEMÉTRIO, D. G. B.; SANTOS, R. M. et al. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology*, v. 65, p. 192-200, 2006.
- VERNEQUE, R. S.; TEODORO, R. L.; MARTINEZ, M. L. et al. Heterose ou Vigor Híbrido. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_234\\_21720039248.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_234_21720039248.html)> Acesso em 12 dez. 2007.
- VIANA, J. H. M.; CAMARGO, I. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. *Acta Sci. Vet.*, v. 35, p. 915-924, 2007.
- VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F. et al. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesq. Agrop. Bras.*, v. 35, p. 2501-2509, 2000.
- VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M. et al. Avances tecnológicos em la reproducción animal: superovulación y transferencia de embriones. In: MARTINS, C. E.; BRESSAN, M.; CÓSER, A. C. et al. *Tecnologías para la producción de leche en los trópicos*. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2002. p.171-181.
- VILELA, D. Cruzamento errado pode deteriorar genética. *Noticiário Tortuga*, São Paulo, ano 49, n.432, jul/ago., 2003. Disponível em: <[http://www.canaltortuga.com.br/noticiario/pag\\_noticia.asp?controle=98&categoria=6&edicao=432](http://www.canaltortuga.com.br/noticiario/pag_noticia.asp?controle=98&categoria=6&edicao=432)> Acesso em 12 dez 2007.
- VIANA, J. H. M.; CAMARGO, I. S. A.; SIQUEIRA, L. G. B.; et al. Characteristics of the superovulatory response in Gyr (*Bos indicus*) cattle. *Reprod. Fert. Dev.*, v. 19, p. 311-312, 2007(resumo).

- VILLA-GODOY, A.; HUGHES, T. L.; EMERY, R. S. et al. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.*, v. 71, p. 1063-1072, 1988.
- VISINTIN, J. A.; ARRUDA, R. P. D.; MADUREIRA, E. H. et al. Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelamento de embriões pelo método one step com etileno glicol. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 36, n. 5, p. 267-272, 1999.
- VISINTIN, J. A.; MARTINS, J. F. P.; BEVILACQUA, E. M. et al. Cryopreservation of bos taurus vs bos indicus embryos: are they really different? *Theriogenology*, v. 57, p. 345-359, 2002.
- VOELKEL, S. A.; HU, Y. X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, v. 37, p.23-37, 1992.
- WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; GARVERICK, H.A. et al. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *J. Reprod. Fertil.* (Supl.54, p.33-48, 1999).
- WEBB, R.; DUGAN, K.; QUINN, R. L. et al. Desenvolvimento folicular em espécies mono e poli-ovulatórias: do feto à fecundação. *Acta Sci. Vet.*, v.34, p.95-114, 2006.
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G. et al. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *J. Anim. Sci.* (Suppl) v.83, p.63-74, 2004.
- WETTEMANN, R. P.; BOSSIS, I. Energy intake regulates ovarian function in beef cattle. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.1-10, 2000.
- WILSON, S. J.; MARION, R. S.; SPAIN, J. N. et al. Effect of controlled heat stress on ovarian function in dairy cattle: I. Lactating cows. *J. Dairy Sci.*, v.81, p.2124-2131, 1998.
- WILTBANK, J. N.; ROUDEN, W. W.; INGALLS, J. E. et al. Effect of energy level on reproductive phenomena of mature Hereford cows. *J. Anim. Sci.*, v.21, p.219-225, 1962.
- WISE, M.E.; ARMSTRONG, D. V.; HUBER, J. T. et al. Hormonal alterations in the lactating dairy cow in response to thermal stress. *J. Dairy Sci.*, v.71, p.2480-2485, 1988.
- WOLFENSON, D.; THATCHER, W.W.; BADINGA, L. et al. The effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle dairy cattle. *Biol. Reprod.*, v.52, p.1106-13, 1995.
- WOLFENSON, D.; LEW, B. J.; THATCHER, W. W. et al. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cow. *Anim. Reprod. Sci.*, v.47, p.9-19, 1997.
- WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 60-61, p. 535-547, 2000.
- WRIGHT, J. M. Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology*, v.15, p. 43-56 1981.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology*, v. 54, p. 25-55, 2000.

YOULSEF, M. K. *Stress Physiology in Livestock*. Boca Raton: CRC press, 1985. 217p.

ZANENGA, C. A. Congelação de embriões em zebuínos: evolução e viabilidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 10, 1993, Belo Horizonte: *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1993, p.125-130.

ZERON, Y.; OCHERETNY, A.; KEDAR, O. et al. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction*, v.121, p.447-54, 2001.

ZOCCAL, R.; GOMES, A. T. Tendência do Mercado de Leite. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01\\_486\\_217200392422.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8/AG01/arvore/AG01_486_217200392422.html)> . Acesso em 12 dez. 2007.

ZOLLERS JR., W. G.; GARVERICK, H. A.; SMITH, M. F. et al. Concentration of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oclous cycle. *J. Reprod. Fert.*, v. 97, p. 329-337, 1993.

## 7 – Anexos

### Anexo 1: Análises estatísticas

#### **Análise 1: Idade das doadoras da raça Holandês no início do tratamento**

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	9,777857	9,777857	0,849	*****
Erro	12	138,2657	11,52214		
Coeficiente de variação		14,269			

#### **Análise 2: Peso das doadoras da raça Holandês no início do tratamento**

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	546,875	546,875	0,271	*****
Erro	12	24187,93	2015,661		
Coeficiente de variação		12,618			

#### **Análise 3: Escore da condição corporal das doadoras da raça Holandês no início do tratamento**

Teste de Wilcoxon	
Valor do teste	1,31961
Variância	51,82692
Significância	0,09349

#### **Análise 4: Idade das doadoras da raça Gir no início do tratamento**

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	385,857	385,857	0,849	0,03282
Erro	10	629,873	62,9873		
Coeficiente de variação		23,552			

#### **Análise 5: Peso das doadoras da raça Gir no início do tratamento**

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	4680,01	4680,01	3,782	0,08044
Erro	10	12373,66	1237,366		
Coeficiente de variação		10,171			

#### **Análise 6: Escore da condição corporal das doadoras da raça Gir no início do tratamento**

Teste de Wilcoxon	
Valor do teste	1,01419
Variância	35
Significância	0,15526

**Análise 7: Idade das novilhas mestiças, no início do protocolo de sincronização do estro**

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos	Quadrado	F	p
Época	2	18,28429	9,142147	0,556	*****
Erro	46	756,6413	16,44872		
Coeficiente de variação		15,695			

**Análise 8: Peso vivo das novilhas mestiças, no início do protocolo de sincronização do estro**

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos	Quadrado	F	p
Época	2	3110,01	1555,005	1,732	0,1883
Erro	46	41303,99	897,9128		
Coeficiente de variação		8,194			

**Análise 9: Peso ao parto das vacas F1 utilizadas como receptoras**

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos	Quadrado	F	p
		Quadrados	Médio		
Época	1	6641,732	6641,732	1,923	0,17139
Erro	52	179555,1	3452,982		
Coeficiente de variação		11,772			

**Análise 10: Escore da condição corporal ao parto das vacas F1 utilizadas como receptoras**

Teste de Wilcoxon	
Valor do teste	0,5704
Variância	2766,18872
Significância	0,28421

**Análise 11: Idade das vacas F1 utilizadas como receptoras**

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos	Quadrado	F	p
		Quadrados	Médio		
Época	1	656,4785	656,4785	1,705	0,19739
Erro	52	20021,98	385,0381		
Coeficiente de variação		23,333			

**Análise 12: Dias pós-parto no início do protocolo hormonal das vacas F1 utilizadas como receptoras**

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos	Quadrado	F	p
		Quadrados	Médio		
Época	1	36,62668	36,62668	0,246	*****
Erro	52	7729,966	148,6532		
Coeficiente de variação		29,471			

**Análise 13: Produção de leite na última pesagem das vacas F1 utilizadas como receptoras**

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos	Quadrado	F	p
		Quadrados	Médio		
Época	1	11,98509	11,98509	0,95	*****
Erro	52	656,0149	12,61567		
Coeficiente de variação		25,736			

**Análise 14:** Diâmetro do folículo dominante das vacas F1 utilizadas como receptoras

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	0,7069091	0,7069091	1,454	0,23334
Erro	52	2,528109	0,4861748		
Coeficiente de variação		17,093			

**Análise 15:** Temperatura máxima na FEPHB

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	61,14977	61,14977	22,306	0,00003
Erro	42	115,14	2,741429		
Coeficiente de variação		5,945			

**Análise 16:** Temperatura mínima na FEPHB

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	432,5297	432,5297	181,145	0
Erro	41	97,89778	2,387751		
Coeficiente de variação		9,81			

**Análise 17:** Temperatura ambiente às 6h na FEPHB

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	496,4806	496,4806	295,027	0
Erro	41	68,99611	1,682832		
Coeficiente de variação		7,851			

**Análise 18:** Umidade relativa do ar às 6h na FEPHB

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	567,2638	567,2638	6,063	0,0181
Erro	41	3836,333	93,56909		
Coeficiente de variação		10,83			

**Análise 19:** Índice de Temperatura e Umidade às 6h na FEPHB

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	1125,299	1125,299	355,555	0
Erro	41	129,7613	3,164909		
Coeficiente de variação		2,797			

**Análise 20:** Temperatura ambiente às 12h na FEPHB

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	68,26939	68,26939	14,008	0,00056
Erro	42	204,6895	4,873559		
Coeficiente de variação		8,289			

**Análise 21:** Umidade relativa do ar às 12h na FEPHB

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	19471,18	19471,18	195,103	0
Erro	42	4191,579	99,79949		
Coeficiente de variação		17,652			

**Análise 22:** Índice de Temperatura e Umidade às 12h na FEPHB

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	28,74397	28,74397	5,129	0,02875
Erro	42	235,3623	5,603865		
Coeficiente de variação		3,194			

**Análise 23:** Temperatura ambiente às 18h na FEPHB

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	52,66616	52,66616	8,212	0,00654
Erro	41	262,945	6,413293		
Coeficiente de variação		10,179			

**Análise 24:** Umidade relativa do ar às 18h na FEPHB

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	9604,553	9604,553	40,464	0
Erro	41	9731,722	237,3591		
Coeficiente de variação		25,531			

**Análise 25:** Índice de Temperatura e Umidade às 18h na FEPHB

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	431,9796	431,9796	54,046	0
Erro	41	327,704	7,99278		
Coeficiente de variação		3,908			

**Análise 26:** Frequência respiratória das doadoras da raça Holandês às 6h

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	1010,629	1010,629	9,188	0,00294
Dia	10	303,5895	30,35895	0,276	*****
Época x Dia	10	262,0604	26,20604	0,238	*****
Erro	131	14409,14	109,9935		
Coeficiente de variação		33,126			

**Análise 27:** Frequência respiratória das doadoras da raça Holandês às 12h

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	13123,72	13123,72	45,317	0,00002
Dia	10	5639,066	563,9066	1,947	0,04482
Época x Dia	10	4589,579	458,9579	1,585	0,11859
Erro	124	35910,1	289,5975		
Coeficiente de variação		30,856			

**Análise 28:** Frequência respiratória das doadoras da raça Holandês às 18h

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	38049,03	38049,03	165,307	0
Dia	9	9209,257	1023,251	4,446	0,00005
Época x Dia	9	9296,114	1032,902	4,488	0,00004
Erro	120	27620,57	230,1714		
Coeficiente de variação		28,35			

**Análise 29:** Temperatura retal das doadoras da raça Holandês às 6h

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	0,4733766	0,4733766	0,534	*****
Dia	10	1,994416	0,1994416	2,251	0,01849
Época x Dia	10	1,541948	0,1541948	1,74	0,07817
Erro	132	11,69714	0,8861472		
Coeficiente de variação		0,778			

**Análise 30:** Temperatura retal das doadoras da raça Holandês às 12h

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	0,04031336	0,04031336	0,261	*****
Dia	10	1,772705	0,1772705	0,148	0,33268
Época x Dia	10	1,467512	0,1467512	0,95	*****
Erro	123	18,99429	0,1544251		
Coeficiente de variação		1,011			

**Análise 31:** Temperatura retal das doadoras da raça Holandês às 18h

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	5,620031	5,620031	36,354	0
Dia	9	5,926611	0,6585124	4,26	0,00007
Época x Dia	9	4,088693	0,4542992	2,939	0,00348
Erro	119	18,39619	0,1545898		
Coeficiente de variação		1,002			

**Análise 32:** Intervalo entre a retirada do CIDR e o estro das doadoras da raça Holandês

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	203,2968	203,2968	1,595	0,23279
Erro	11	1402,46	127,4963		
Coeficiente de variação		33,796			

**Análise 33:** Estruturas totais, e de graus 1, 2 e 3 obtidas a partir das doadoras da raça Holandês

Teste de Wilcoxon				
Variável	Estruturas	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Valor do teste	1,2152	0,77435	1,44581	1,42319
Variância	61,11538	60,03846	57,88462	44,55769
p	0,11215	0,21937	0,07412	0,07735

**Análise 34:** Estruturas viáveis, congeláveis, não fecundadas, fecundadas e degeneradas obtidas a partir das doadoras da raça Holandês

Teste de Wilcoxon					
Variável	Viáveis	Congeláveis	Não Fecundados	Degenerados	
Valor do teste	1,21924	1,22331	1,0685	1,2152	1,47706
Variância	60,71154	60,30769	49,26923	61,11538	55,46154
p	0,11138	0,11061	0,14266	0,11215	0,06983

**Análise 35:** Temperatura máxima na FEFX

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	152,9067	152,9067	36,714	0
Erro	35	145,769	4,164829		
Coeficiente de variação		6,992			

**Análise 36:** Temperatura mínima na FEFX

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	613,8272	613,8272	510,244	0
Erro	35	42,10526	1,203008		
Coeficiente de variação		6,044			

**Análise 37:** Temperatura ambiente às 6h30min na FEFX

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	572,0069	572,0069	207,479	0
Erro	34	93,73611	2,756944		
Coeficiente de variação		8,619			

**Análise 38:** Umidade relativa do ar às 6h30min na FEFX

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	225,9101	225,9101	6,521	0,01531
Erro	34	1177,821	34,64179		
Coeficiente de variação		6,646			

**Análise 39:** Índice de Temperatura e Umidade às 6h30min na FEFX

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	1227,802	1227,802	326,94	0
Erro	34	127,6848	3,755435		
Coeficiente de variação		2,874			

**Análise 40:** Temperatura ambiente às 12h na FEFX

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	106,7778	106,7778	20,605	0,00007
Erro	34	176,1944	5,18219		
Coeficiente de variação		8,599			

**Análise 41:** Umidade relativa do ar às 12h na FEFX

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	4347,114	4347,114	36,493	0
Erro	34	4050,127	119,1214		
Coeficiente de variação		17,168			

**Análise 42:** Índice de Temperatura e Umidade às 12h na FEFX

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	456,2496	456,2496	101,255	0
Erro	34	153,2016	4,505929		
Coeficiente de variação		2,833			

**Análise 43:** Temperatura ambiente às 17h30min na FEFX

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	99,19814	99,19814	12,665	0,00112
Erro	34	266,3019	7,832408		
Coeficiente de variação		10,239			

**Análise 44:** Umidade relativa do ar às 17h30min na FEFX

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	3406,272	3406,272	21,78	0,00005
Erro	34	5317,312	156,3915		
Coeficiente de variação		20,215			

**Análise 45:** Índice de Temperatura e Umidade às 17h30min na FEFX

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	400,3027	400,3027	60,696	0
Erro	34	224,2361	6,595179		
Coeficiente de variação		3,385			

**Análise 46:** Frequência respiratória das doadoras da raça Gir às 6h

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	105,523	105,523	11,844	0,00119
Dia	4	34,06033	8,515081	0,956	*****
Época x Dia	4	9,204185	2,301046	0,258	*****
Erro	49	436,5714	8,909621		
Coeficiente de variação					

**Análise 47:** Frequência respiratória das doadoras da raça Gir às 18h

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	10,21894	10,21894	0,414	*****
Dia	4	80,42855	20,10714	0,814	*****
Época x Dia	4	49,72188	12,43047	0,503	*****
Erro	47	1160,514	24,69179		
Coeficiente de variação		17,56			

**Análise 48:** Temperatura retal das doadoras da raça Gir às 6h

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	6,368972	6,368972	13,765	0,00053
Dia	4	2,243637	0,5609093	1,212	0,31765
Época x Dia	4	1,566532	0,3916329	0,846	0,31765
Erro	49	22,67271	0,4627085		
Coeficiente de variação		1,774			

**Análise 49:** Temperatura retal das doadoras da raça Gir às 18h

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	0,1883473	0,1883473	1,52	0,22369
Dia	4	1,046048	0,2615119	2,111	0,09429
Época x Dia	4	1,072214	0,2680536	2,164	0,08765
Erro	47	5,822286	0,1238784		
Coeficiente de variação		0,896			

**Análise 50:** Intervalo entre a retirada do CIDR e o estro das doadoras da raça Gir

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	103,1407	103,1407	0,872	*****
Erro	8	945,9259	118,2407		
Coeficiente de variação		29,336			

**Análise 51:** Taxa de recuperação de estruturas após a superovulação de doadoras da raça Gir

Época	Estruturas recuperadas	Estruturas não recuperadas	Total
Verão	54	6	60
Inverno	12	9	21
Teste estatístico	Valor	GL	p
Qui-quadrado	11,13	1	0,0008

**Análise 52:** Estruturas totais, e de graus 1, 2 e 3 obtidas a partir das doadoras da raça Gir

Teste de Wilcoxon				
Variável	Estruturas totais	Grau 1	Grau 2	Grau 3
Valor do teste	1,57335	1,21347	0,25071	1,37017
Variância	36,45833	33,27652	15,90909	29,96212
p	0,05782	0,11248	0,40103	0,08532

**Análise 53:** Estruturas viáveis, congeláveis, não fecundadas, fecundadas e degeneradas obtidas a partir das doadoras da raça Gir

Teste de Wilcoxon					
Variável	Viáveis	Congeláveis	Não	Fecundados	Degenerados
Valor do teste	1,60276	1,0422	0,48795	1,43135	0,28172
Variância	35,13258	33,14394	26,25	35,26515	12,6
p	0,0545	0,14867	0,3128	0,07617	0,38909

**Análise 54:** Intervalo entre a retirada do dispositivo intra-vaginal de progesterona e o estro das novilhas mestiças sincronizadas

Análise de variância				
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	p
Grupo	2	3055,221	1527,611	0,00505
Erro	44	11240,61	255,4684	
Coeficiente de variação		31,777		
Teste estatístico SNK		VA	IA	IB
		b	a	b

**Análise 55:** Taxa de sincronização de novilhas dos grupos VAx IA

Grupo	Sincronizadas	Não sincronizadas	Total
VA	23	2	25
IA	8	0	8
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	>0,9999

**Análise 56:** Taxa de sincronização de novilhas dos grupos IA x IB

Grupo	Sincronizadas	Não sincronizadas	Total
IA	8	0	8
IB	10	6	16
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	0,0664

**Análise 57:** Taxa de sincronização de novilhas dos grupos A x B

Grupo	Sincronizadas	Não sincronizadas	Total
A	31	2	33
B	10	6	16
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	0,0102

**Análise 58:** Área do corpo lúteo das novilhas receptoras de embrião, em relação aos grupos de sincronização

Análise de variância				
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	p
Grupo	2	11,95916	5,979579	0,00001
Erro	38	15,03504	0,395659	
Coeficiente de variação		31,451		
Teste estatístico SNK		VA	IA	IB
		a	b	b

**Análise 59:** Taxa de gestação aos 30 dias de novilhas dos grupos VA x IA

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
VA	12	11	23
IA	2	6	8
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	0,2399

**Análise 60:** Taxa de gestação aos 30 dias de novilhas dos grupos IA x IB

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
IA	2	6	8
IB	2	6	8
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	>0,9999

**Análise 61:** Taxa de gestação aos 30 dias de novilhas dos grupos A x B

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
A	14	17	31
B	2	6	8
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	0,4318

**Análise 62:** Taxa de gestação aos 60 dias de novilhas dos grupos VA x IA

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
AA	10	13	23
SA	1	7	8
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	0,2028

**Análise 63:** Taxa de gestação aos 60 dias de novilhas dos grupos IA x IB

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
IA	1	7	8
IB	2	6	8
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	>0,9999

**Análise 64:** Taxa de gestação aos 60 dias de novilhas dos grupos A x B

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
A	11	20	31
B	2	6	8
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	0,6942

**Análise 65:** Área do corpo lúteo das novilhas receptoras de embrião, gestantes ou não-gestantes

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Grupo	1	2,221549	2,221549	3,681	0,06277
Erro	37	22,32957	0,603502		
Coeficiente de variação		37,824			

**Análise 66:** Taxas de gestação dos embriões dos grupos HI e HV, transferidos em novilhas

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
HI	3	10	13
HV	11	4	15
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	0,0213

**Análise 67:** Taxas de gestação dos embriões dos grupos HI e GV, transferidos em novilhas

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
HI	3	10	13
GV	2	9	11
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	>0,9999

**Análise 68:** Taxas de gestação dos embriões dos grupos HV e GV, transferidos em novilhas

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
HV	11	4	15
GV	2	9	11
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	0,0154

**Análise 69:** Taxas de sincronização da vacas no pós parto

Época	Sincronizadas	Não sincronizadas	Total
Inverno	30	3	33
Verão	18	4	22
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	0,4193

**Análise 70:** Intervalo entre a retirada do dispositivo intra-vaginal liberador de progesterona e o estro das vacas F1 utilizadas como receptoras

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	1185,8	1185,8	19,185	0,00007
Erro	46	2843,2	61,8087		
Coeficiente de variação		20,826			

**Análise 71:** Taxa de gestação de aos 30 dias em vacas

Época	Gestantes	Não gestantes	Total
Inverno	2	28	30
Verão	5	13	18
Teste estatístico		GL	P
Exato de Fisher		1	0,0863

**Análise 72:** Taxa de gestação de aos 60 dias em vacas

Época	Gestantes	Não gestantes	Total
Inverno	2	28	30
Verão	4	14	18
Teste estatístico		GL	P
Exato de Fisher		1	0,1793

**Análise 73:** Diâmetro do folículo dominante das vacas F1 utilizadas como receptoras, que responderam ou não à sincronização

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Gestação	1	0,3519187	0,3519187	8,145	0,00619
Erro	52	2,246881	0,4320925		
Coefficiente de variação		16,114			

**Análise 74:** Área do corpo lúteo no dia da involução das vacas F1 utilizadas como receptoras, gestantes ou não gestantes

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Época	1	0,3226722	0,3226722	0,031	*****
Erro	46	47,96006	1,04261		
Coefficiente de variação		31,698			

**Análise 75:** Produção de leite no dia da involução das vacas F1 utilizadas como receptoras, gestantes ou não gestantes

Análise de variância					
Fonte de variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F	p
Gestação	1	0,1047097	0,1047097	0,101	*****
Erro	46	47,88762	1,041035		
Coefficiente de variação		31,674			

**Análise 76:** Taxa de gestação aos 30 dias, de vacas e novilhas

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
Vacas	7	34	41
Novilhas	16	23	39
Teste estatístico	valor	GL	p
Qui-quadrado	7,736	1	0,0054

**Análise 77:** Taxa de gestação aos 60 dias, de vacas e novilhas

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
Vacas	6	35	41
Novilhas	13	26	39
Teste estatístico	valor	GL	p
Qui-quadrado	5,471	1	0,0193

**Análise 78:** Taxas de gestação dos embriões dos grupos HI e HV, transferidos em vacas

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
HI	2	14	16
HV	4	10	14
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	0,3778

**Análise 79:** Taxas de gestação dos embriões dos grupos HI e GV, transferidos em vacas

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
HI	2	14	16
GV	1	17	18
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	0,5909

**Análise 80:** Taxas de gestação dos embriões dos grupos HV e GV, transferidos em vacas

Grupo	Gestantes	Não gestantes	Total
HV	4	10	14
GV	1	17	18
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	0,142

**Análise 81:** Taxa de viabilidade dos embriões cultivados *in vitro*

Grupo	Viáveis	Não viáveis	Total
Grau 1	19	22	41
Grau 2	5	26	31
Teste estatístico	valor	GL	p
Qui-quadrado	7,251	1	0,0071

**Análise 82:** Taxa de eclosão dos embriões cultivados *in vitro*

Grupo	Viáveis	Não viáveis	Total
Grau 1	11	30	41
Grau 2	1	30	31
Teste estatístico		GL	p
Exato de Fisher		1	0,0095

Anexo 2 - Alimentos fornecidos

**Tabela 20: Análise bromatológica dos alimentos fornecidos na Fazenda Experimental Prof. Hélio Barbosa (Igarapé - MG).**

AMOSTRA	ASE (%)	PROTEÍNA (%)	FDN (%)	DIVMS (%)
Silagem de Milho (Inverno)	92,47	7,29	56,11	58,28
Capim Elefante (Verão)	93,52	5,58	59,47	53,87
Concentrado (Inverno)	89,92	15,28	14,17	89,29
Polpa Cítrica (Inverno)	91,22	6,09	30,87	88,41
Concentrado (Verão)	87,72	26,48	24,00	90,07

**Tabela 21: Composição do Concentrado A fornecido na Fazenda Experimental de Felixlândia (Felixlândia, MG)**

Milho triturado	43%
Farelo de soja	10%
Farelo de trigo	43%
Calcário calcítico	1%
Suplemento vitamínico mineral	1%
NaCl	1%
Sulfato de amônio (NH <sub>3</sub> SO <sub>4</sub> )	1%

**Tabela 22: Composição do Concentrado B (mistura nitromineral) fornecido na Fazenda Experimental de Felixlândia (Felixlândia, MG)**

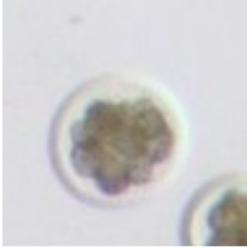
Uréia	55%
Calcário calcítico	9%
Fosfato bicálcico	5%
Suplemento vitamínico mineral	20%
Sulfato de amônio (NH <sub>3</sub> SO <sub>4</sub> )	11%

**Tabela 23: Análise bromatológica do concentrado total (80% de concentrado A mais 20% do concentrado B) oferecido aos animais na Fazenda Experimental de Felixlândia (Felixlândia, MG)**

AMOSTRA	ASE (%)	PROTEÍNA (%)	FDN (%)	DIVMS (%)
Concentrado (Inverno)	87,97	46,25	21,73	87,03

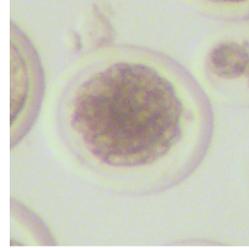
Anexo 3: *Estruturas recuperadas*

**Figura 1:**



Mórula  
Grau 1

**Figura 2:**



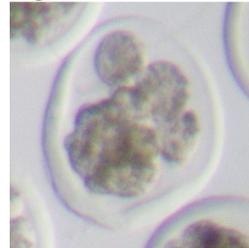
Mórula  
compacta  
Grau 1

**Figura 3:**



Mórula  
compacta  
Grau 2

**Figura 4:**



Mórula  
compacta  
Grau 3

**Figura 5:**



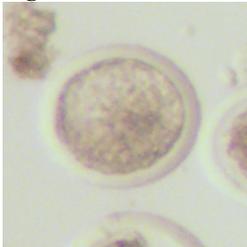
Blastocisto  
inicial  
Grau 1

**Figura 6:**



Blastocisto  
inicial  
Grau 2

**Figura 7:**



Blastocisto  
Grau 1

**Figura 8:**



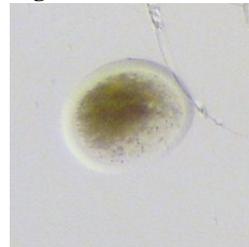
Blastocisto  
eclodido  
Grau 1

**Figura 9:**



Estrutura  
Degenerada

**Figura10:**



Estrutura  
Não fecundada

Anexo 4 – Índice de Temperatura e Umidade

Figura 11: Índice de Temperatura e Umidade (ITU) para bovinos

T (°C)	Umidade relativa do ar (%)										
	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
22,2											72
22,8										72	73
23x3									72	73	74
23,9								72	73	74	75
24,4							72	73	74	75	76
25,0						72	73	74	75	76	77
25,6					72	73	74	75	76	77	78
26,1					73	74	75	76	77	78	79
26,7				72	73	74	75	76	77	78	80
27,2				72	73	74	75	76	77	78	81
28,3			72	73	74	75	77	78	78	80	82
28,9			73	73	75	76	78	79	80	82	83
29,4		72	73	74	75	77	78	80	81	83	84
30,0		72	74	75	76	78	79	81	82	84	85
30,6	72	73	74	75	77	78	80	81	83	84	86
31,1	72	73	75	76	77	79	81	82	84	85	87
31,7	72	74	75	76	78	80	81	83	85	86	88
32,2	73	75	76	77	79	80	82	84	86	87	89
32,8	73	75	76	78	79	81	83	85	86	88	90
33,3	74	75	77	78	80	82	84	85	87	89	91
33,9	74	76	78	79	81	83	85	86	88	90	92
34,4	75	76	78	80	81	83	85	87	89	91	93
35,0	75	77	79	80	82	84	86	88	90	92	94
35,6	76	77	79	81	83	85	87	88	91	93	95
36,1	76	78	80	81	83	85	88	89	92	94	96
36,7	76	78	80	82	84	86	88	90	93	95	97
37,2	77	79	80	83	85	87	89	91	94	96	98
37,8	77	79	82	83	85	88	90	92	94	97	
38,3	78	80	82	84	86	88	91	92	95	98	
38,9	78	80	83	84	87	89	92	93	96		
39,4	79	81	83	85	87	90	92	94	96		
40,0	79	81	84	86	88	91	93	94	97		
40,6	80	82	84	86	89	91	94	95			
41,1	80	82	85	87	89	92	94	96			
41,7	81	83	85	88	90	93	95	97			
42,2	81	83	86	88	91	94	96				
42,8	81	84	87	89	92	94	97				
43,3	82	84	87	89	92	95					
43,9	82	85	88	90	93	96					
44,4	83	85	88	91	94	96					
45,0	83	86	89	91	94	97					
45,6	84	86	89	92	95						
46,1	84	87	90	92	96						
46,7	85	87	90	93	98						
47,2	85	88	91	94							
47,8	85	88	92	94							
48,3	86	89	92	96							

Fonte: adaptado de Armstrong (1994)

Legenda

	Ausência de estresse
	Estresse moderado
	Estresse térmico
	Ocorrência de morte