VALÉRYA FERNANDES MELLO

**Influência da receptora e do embrião sobre a viabilidade
embrionária e sexo determinados através da ultra-
sonografia**

São Paulo
2003

VALÉRYA FERNANDES MELLO

**Influência da receptora e do embrião sobre a viabilidade
embrionária e sexo determinados através da ultra-
sonografia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Alicio Martins Júnior

São Paulo
2003

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1313 Mello, Valérya Fernandes
FMVZ Influência da receptora e do embrião sobre a viabilidade embrionária e sexo determinados através da ultra-sonografia / Valérya Fernandes Mello. – São Paulo : V. F. Mello, 2003.
104 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2003.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Alicio Martins Júnior.

1. Fertilização *in vitro*. 2. Embriões. 3. Ultra-sonografia.
4. Receptora. 5. Bovino. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: MELLO, Valérya Fernandes

Título: Influência da receptora e do embrião sobre a viabilidade embrionária e sexo determinados através da ultra-sonografia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

Data ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

**“Eu avistei mais longe do que muitos,
porque fiquei de pé em ombros de gigantes.”**

Albert Einstein

Este trabalho é dedicado a minha mãe Ilizabete
por ter sido minha faculdade permanente,
tentando me passar experiências
para evitar a dor de algumas delas.
Ela é o meu melhor exemplo.

AGRADECIMENTOS

Sou profundamente grata

Ao Prof. Dr. Alicio Martins Júnior, por transmitir seus conhecimentos na orientação deste trabalho

Ao Prof. Dr. Renato Campanarut Barnabé, pelo carinho e paciência com todos os pós-graduandos do Departamento de Reprodução Animal da FMVZ-USP

Ao Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira, pelo incentivo nos meus primeiros passos como pós-graduanda

Aos professores da 9ª Turma de Medicina Veterinária da Unoeste, pelos anos de ensinamentos e preciosa amizade

Aos pós-graduandos Renata Sanches Calegari e José Eduardo de Oliveira Zanon, pela valiosa colaboração no trabalho

À Prof. Ass. Dr^a. Silvia Helena Venturoli Perri, pela realização da análise estatística

Aos médicos veterinários Luis Fernando Lot Canellas e Eduardo Augusto Tozzi Rodrigues pela participação efetiva no projeto

Ao médico veterinário Emilson Soriano, por me mostrar que o futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos

Às Fazendas Cafezinho e Fortaleza pela oportunidade de realizar o trabalho

À todos minha admiração, gratidão e respeito.

RESUMO

MELLO, V. F. **Influência da receptora e do embrião sobre a viabilidade embrionária e sexo determinados através da ultra-sonografia.** [Influence of the recipient and embryo on embryonic viability and sex determined by ultrasonographic exam]. 2003. 104 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

Este trabalho foi conduzido com a finalidade de se verificar a influência da receptora e do embrião sobre o índice de prenhez (IP) e proporção de sexo. Um total de 431 embriões produzidos *in vitro* foram transferidos não cirurgicamente para o corno uterino de receptoras mestiças, previamente sincronizadas, de acordo com o desenvolvimento embrionário e grau de qualidade do embrião. O primeiro exame de diagnóstico de prenhez (DP) foi realizado aos 26-28 dias da transferência e o segundo, aos 50-52 dias, quando foram também realizadas as avaliações das receptoras e a determinação do sexo dos fetos através da ultra-sonografia. O índice de prenhez foi de 38,0% (164/431) para o primeiro DP e 92,1% (151/164) das receptoras permaneceram prenhes aos 50-52 dias, evidenciando 7,9% (13/164) de perdas embrionárias e/ou fetais entre os exames. Maiores índices de prenhez ($P < 0,05$) foram obtidos para embriões classificados como de grau 1 (86,5%) e desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto expandido (Bx; 40,1%). A avaliação das receptoras revelou maior ocorrência de corpos lúteos (CL) no ovário direito (65,1% vs. 34,9%), contudo, sem influenciar no IP, com 92,8% e 88,5% de prenhez, respectivamente, para CL no ovário direito e esquerdo. O tipo de CL (grau 1, 2 ou 3) afetou o IP, com o CL de grau 1 (53,8%) produzindo mais animais prenhes ($P < 0,05$) do que os demais. A presença de folículo em um ou ambos ovários, não influenciou ($P > 0,05$) o IP, a despeito de sua ocorrência no lado direito (90,6%) ou esquerdo (92,0%). Mais ($P < 0,05$) fetos macho (66,67%) do que fêmea (33,33%)

foram obtidos a partir de embriões transferidos ao estágio de blastocisto inicial. Contudo, considerando os estágios de mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido, não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre a proporção de fetos diagnosticados como sendo macho ou fêmea. Os diâmetros dos corpos lúteos, respectivamente, de 1,83, 1,88, 1,81 e 1,85cm, para receptoras com pelagem clara, malhada, marrom e preta, não influenciaram ($P>0,05$) os índices de prenhez, o mesmo acontecendo com relação ao tamanho do folículo, o qual variou de 0,50 a 1,6 cm de diâmetro. Baseado nos resultados obtidos, podemos concluir que tanto a receptora quanto o embrião influenciaram os índices de prenhez, sendo que o estágio do embrião também afetou a proporção de sexo dos fetos.

Palavras-chave: Fertilização *in vitro*. Embriões. Ultra-sonografia. Receptora. Bovino.

ABSTRACT

MELLO, V. F. **Influence of the recipient and embryo on embryonic viability and sex determined by ultrasonographic exam.** [Influência da receptora e do embrião sobre a viabilidade embrionária e sexo determinados através da ultra-sonografia]. 2003. 104 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

This study was carried out to verify the influence of the recipient and embryo on pregnancy rate (PR) and proportion of sex. A total of 431 *in vitro*-produced embryos were non-surgically transferred to the uterine horns from crossbred recipients previously synchronized, according to the embryo development stage and quality grade. The first exam for pregnancy was performed between 26th-28th day of embryo transfer following a second exam between 50th-52th day, when recipient evaluation and fetal sex determination were performed by ultrasonography. The pregnancy rate was 38,0% (164/431) for the first exam and 92,1% (151/164) of the recipients were kept pregnant on day 50-52, leading a 7,9% (12/164) of embryonic and/or fetal loss between the exams. Higher pregnancy rate ($P<0,05$) were obtained for embryo graded as 1 (86,5%) and embryo development at expanded blastocyst stage (EB;40,1%). The recipients evaluation showed more corpora lutea (CL) in the right ovary (65,1% vs.34,9%); however, it did not influence PR, with 92,8% and 88,5% of pregnancies, respectively, to CL in the right or left ovary. The type of CL affected the PR, with CL graded as 1 (53,8%) producing more pregnancies ($P<0,05$) than the others. The presence of a follicle in one or both ovaries did not influence ($P>0,05$) the PR, in despite of its presence in the right side (90,6%) or in the left side (92,0%). More ($P<0,05$) male fetus (66,67%) than female ones (33,33%) were obtained from transferred embryos to the early blastocyst stage. However, considering the early blastocyst, blastocyst and expanded blastocyst stages, no difference ($P>0,05$)

between the proportion of sex fetus was found. The CL diameters, respectively, from 1,83, 1,88, 1,81 and 1,85 cm for light-hair, threshed, brown and black recipients, did not affect ($P>0,05$) the PR, and the same happend in relation to the size of the follicle, which varied from 0,50 to 1,6 cm in diameter. These results suggest that the recipient and the embryo can influence the pregnancy rate and embryo development stage also affect the proportion of sex.

Key words: in vitro fertilization. Embryos. Ultrasonography. Recipient. Bovine.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número e percentagem de receptoras de embriões, segundo a cor da pelagem - Araçatuba/SP - 2002	51
Tabela 2 -	Distribuição (n/%) de receptoras prenhes e não prenhes, determinada aos 50-52 dias de prenhez, segundo a cor da pelagem - Araçatuba/SP - 2002	52
Tabela 3 -	Número e percentagem de embriões produzidos <i>in vitro</i> selecionados para transferência, segundo grau de qualidade (de 1 a 4) - Araçatuba/SP - 2002.....	53
Tabela 4 -	Influência do grau de qualidade do embrião sobre o número e percentagem de receptoras prenhes e não prenhes, aos 50-52 dias da transferência - Araçatuba/SP - 2002.....	54
Tabela 5 -	Distribuição de embriões (n/%) selecionados para a transferência, segundo o estágio de desenvolvimento - Araçatuba/SP - 2002	55
Tabela 6 -	Influência do estágio de desenvolvimento embrionário sobre o número e percentagem de receptoras prenhes e não prenhes, aos 50-52 dias da transferência dos embriões - Araçatuba/SP - 2002	56
Tabela 7 -	Resultados de mensurações dos corpos lúteos, através de ultra-sonografia, no dia da sexagem fetal, segundo a cor da pelagem das receptoras - Araçatuba/SP - 2002	57
Tabela 8 -	Valores mínimo, máximo, médio, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros (cm) dos corpos lúteos e folículos das receptoras, observadas ao exame ultra-sonográfico nos dias 50-52 após a transferência dos embriões - Araçatuba/SP - 2002	58
Tabela 9 -	Distribuição de corpos lúteos (n/%), no dia da sexagem fetal, segundo o lado de ocorrência no ovário - Araçatuba/SP - 2002	59
Tabela 10 -	Número e percentagem de receptoras, segundo o lado do corpo lúteo e de transferência do embrião - Araçatuba/SP - 2002.....	60

Tabela 11 - Influência do lado de ocorrência do corpo lúteo sobre o número e percentagem de receptoras prenhes e não prenhes aos 50-52 dias da transferência - Araçatuba/SP - 2002	61
Tabela 12 - Número e percentagem de receptoras de embrião, segundo a classificação do corpo lúteo à palpação por via retal, no dia da transferência do embrião - Araçatuba/SP - 2002	62
Tabela 13 - Influência do tipo de corpo lúteo sobre os índices de prenhez e não prenhez, aos 50-52 dias da transferência dos embriões - Araçatuba/SP - 2002	63
Tabela 14 - Distribuição dos folículos (n/%), no dia da sexagem fetal, segundo o lado de ocorrência no ovário - Araçatuba/SP - 2002.....	64
Tabela 15 - Média e desvio padrão dos diâmetros (cm) dos corpos lúteos e dos folículos de receptoras prenhes e não prenhes aos 50-52 dias da transferência dos embriões - Araçatuba/SP - 2002.....	65
Tabela 16 - Influência do lado de ocorrência do folículo sobre o número e percentagem de receptoras prenhes e não prenhes aos 50-52 dias da transferência dos embriões - Araçatuba/SP - 2002.....	66
Tabela 17 - Distribuição de sexo dos fetos a abortos, segundo o desenvolvimento embrionário - Araçatuba/SP - 2002	67
Tabela 18 - Influência do estágio embrionário, sobre o número e percentagem de fetos sexados - Araçatuba/SP - 2002.....	68
Tabela 19 - Distribuição de sexo (n/%) de fetos examinados com ultra-som de imagem aos 50-52 dias da transferência dos embriões - Araçatuba/SP - 2002.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição de receptoras (%), segundo a cor da pelagem.....	51
Figura 2 -	Percentagens de animais prenhes e não prenhes, de acordo com a cor da pelagem	52
Figura 3 -	Distribuição de embriões (%) utilizados para a transferência, segundo o grau de qualidade.....	53
Figura 4 -	Resultados de receptoras prenhes (%) e não prenhes aos 50-52 dias da transferência dos embriões.....	54
Figura 5 -	Percentagens de embriões transferidos, segundo o estágio de desenvolvimento <i>in vitro</i>	55
Figura 6 -	Índices de prenhez e não prenhez de receptoras, segundo o estágio do embrião ao momento da transferência	56
Figura 7 -	Distribuição das médias (cm) dos diâmetros dos corpos lúteos de receptoras examinadas com ultra-som, aos 50-52 dias da transferência, conforme a pelagem.....	57
Figura 8 -	Média e desvio padrão dos diâmetros dos corpos lúteos e folículos das receptoras, 50 a 52 dias após transferência.....	58
Figura 9 -	Percentagens de corpos lúteos, conforme o lado de ocorrência no ovário	59
Figura 10 -	Distribuição dos corpos lúteos (%), com base no lado de ocorrência e considerado para a transferência do embrião	60
Figura 11 -	Percentagens de receptoras prenhes e não prenhes, segundo o lado da transferência do embrião	61
Figura 12 -	Percentagem de receptoras, segundo a classificação do corpo lúteo no momento da transferência do embrião	62

Figura 13 -	Percentagem de receptoras prenhes e não prenhes, segundo a classificação do corpo lúteo no momento da transferência do embrião	63
Figura 14 -	Percentagem de folículos, segundo o lado de ocorrência no ovário ...	64
Figura 15 -	Diâmetros médios de corpos lúteos e folículos de receptoras prenhes e não prenhes	65
Figura 16 -	Percentagens de receptoras prenhes e não prenhes, segundo o lado da transferência do embrião	66
Figura 17 -	Resultados (%) de sexagem fetal e de abortos, segundo o estágio de desenvolvimento do embrião	67
Figura 18 -	Percentagem de fetos machos e fêmeas, segundo o estágio de desenvolvimento do embrião	68
Figura 19 -	Percentagem de fetos, segundo o sexo	69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
3 MATERIAL E MÉTODO	39
3.1 Animais e nutrição	40
3.2 Indução e detecção do estro	40
3.3 Seleção das receptoras	40
3.4 Transferência dos embriões	41
3.5 Diagnóstico de gestação	41
3.6 Exame ultra-sonográfico do feto.....	42
3.7 Exame ultra-sonográfico dos ovários	43
3.8 Análise estatística	44
4 RESULTADOS	45
5 DISCUSSÃO	70
6 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	89

1 Introdução

A demanda por animais de alto mérito genético tem sido intensa na pecuária bovina, principalmente após o advento de biotécnicas aplicadas à reprodução animal, como a transferência de embriões (TE) e, mais recentemente, a fertilização *in vitro* (FIV).

A difusão da FIV, especialmente em zebuínos, aliada ao aumento da produção animal, alavancou o mercado e receptoras prenhes e sexadas de embriões geneticamente superiores, têm tido enorme procura.

Desde que foi implementada em reprodução animal, a ultra-sonografia de imagem tem dado um suporte decisivo na avaliação do sistema genital feminino, propiciando um exame mais acurado do útero, ovários e suas estruturas funcionais, tornando possível, também, a determinação do sexo fetal.

Por ser um método não invasivo, permite que repetidos exames possam ser realizados sem prejudicar o potencial reprodutivo, além de não ter efeito adverso sobre o conceito (RIBADU; NAKAO, 1999).

Resultados de prenhez de embriões produzidos através da TE, têm sido relatados na literatura, levando em consideração o estágio de desenvolvimento do embrião, grau qualidade, lado de transferência, tipo de corpo lúteo, entre outros. Contudo, os dados para embriões produzidos *in vitro*, bem como a avaliação das receptoras, tem merecido menor atenção.

O sucesso da TE e FIV depende da interação entre embrião e receptora (SPELL et al., 2001). Mortalidade embrionária associada com esse período pode causar significativas perdas econômicas (BINELLI et al., 2001).

Face ao mencionado, julgamos propício investigar a influência da receptora (cor da pelagem, tamanho, tipo e lado de ocorrência do corpo lúteo, lado de transferência do embrião, tamanho do folículo, número de folículos e lado de

ocorrência) e do embrião (estágio de desenvolvimento, grau de qualidade e sexo) sobre a viabilidade embrionária e proporção de sexo, através da ultra-sonografia de imagem, analisando os índices de prenhez e de sexo dos fetos.

2 Revisão da Literatura

O estabelecimento da gestação em receptoras de embriões é um evento multifatorial que envolve a interação de fatores hormonal, bioquímico e fisiológico (FARIN et al., 2001).

A partir da disponibilidade de um embrião de boa qualidade e da habilidade de um técnico, a receptora passa a ser determinante do sucesso da transferência (BROADBENT et al., 1991). Como considerações iniciais para inclusão de animais em um grupo de receptoras, o genótipo, idade, parição, estado fisiológico, condição corporal, sanidade e histórico reprodutivo, devem ser avaliados.

Tendo sobrepujado essas condições, serão avaliadas com base na habilidade de exibir estro dentro de um determinado tempo (BROADBENT et al., 1991), e finalmente, para constatação de um corpo lúteo adequado no momento da transferência. Receptoras qualificadas nesses critérios serão utilizadas para a transferência.

A disponibilidade, custo e adaptação ao meio ambiente, em termos de suplementação nutricional, sanidade e mudanças climáticas, são provavelmente os fatores mais importantes governando a escolha da receptora (BROADBENT et al., 1991). Assim, animais mestiços são preferidos aos puros, uma vez que são mais férteis e viáveis.

Segundo Broadbent et al. (1991), as novilhas são preferidas por serem menos susceptíveis ao estresse nutricional e doenças. O suplemento energético e a condição corporal são fatores determinantes para o sucesso reprodutivo da receptora.

Park et al. (2000), desenvolveram um teste baseado na mensuração do nitrogênio urêico do plasma sanguíneo de receptoras no dia da transferência. Observaram que receptoras com valores entre 12 e 16 mg/dL de nitrogênio urêico

apresentavam maior índice de prenhez (60%) do que as com valores menores (42,0%) ou maiores (30,8%).

A interrupção da gestação, em bovinos, é maior durante o período embrionário, ou seja, da concepção à organogênese (dia 1 a 42) do que durante os períodos fetal (término da diferenciação dos órgãos - dia 42 a 280) ou neonatal, do parto até o dia 28 após o mesmo (HUBBERT, 1974).

A viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* é sabidamente inferior aos obtidos através da técnica de TE (GREVE, 1992; GREVE et al., 1993), provavelmente devido a alterações morfológicas e funcionais provocadas em condições *in vitro* (AVERY; GREVE, 1995).

Durante a segunda semana de desenvolvimento o embrião bovino se alonga, sinalizando sua presença e formando os três folhetos germinativos.

Na terceira semana, o alongamento continua e a placenta inicia seu desenvolvimento. Entre 4 e 8 semanas os órgãos se desenvolvem, a placenta se forma e fluído se acumula nas cavidades amnióticas e corioalantoideanas. Ao dia 42, o período embrionário termina e começa o fetal (KASTELIC, 1996).

No bovino, o conceito precisa estar presente entre os dias 14 e 16 para prevenir a luteólise (BETTERIDGE et al., 1980). De acordo com os autores, a remoção do conceito antes do dia 15 não afeta o tempo para a regressão luteal nem o comprimento do ciclo estral. Contudo, se o conceito for removido depois do dia 15, o aparecimento do estro ocorre entre 5 e 10 dias (BETTERIDGE et al., 1980; NORTHEY; FRENCH, 1980).

Segundo Greve et al. (1996), o embrião com viabilidade reduzida pode resultar no aumento da incidência de mortalidade fetal após transferência de embriões produzidos através da FIV.

Índices de abortos entre 9 e 47% têm sido relatados (DAVIS et al., 1989; REICHENBACH et al., 1992; MASSIP et al., 1995a; REINDERS et al., 1995) no primeiro e segundo trimestre de prenhez de embriões produzidos *in vitro*.

Estimativas de morte embrionária tardia (de 27 a 42 dias), variam entre 10 a 12% (VAN CLEEFF et al., 1992; SMITH; STEVENSON, 1995; VASCONCELOS et al., 1997). Kastelic (1996), relata que para 67% de vacas prenhes aos 25-42 dias da inseminação, ocorreram perdas de aproximadamente 20%.

Allen (1997), menciona índices de 26 a 40% de morte embrionária precoce, representando 60 a 80% do total de perdas de gestações. Relata, também, que a morte fetal situa-se entre 20 e 40% do total de perdas.

Segundo Boyd et al. (1969); Kastelic (1996) e Vasconcelos et al. (1997), ao redor de 8% de gestações terminam em perda fetal.

A interrupção da prenhez, após transferência de embriões bovinos produzidos *in vitro*, freqüentemente ocorre antes do dia 21 de gestação (MARKETTE et al., 1985; FARIN, 1995). Markette et al. (1985), relataram 54,7% de animais gestantes aos 60 dias da transferência. O retorno ao estro, de acordo com o dia de gestação, foi de 1,5% entre os dias 2 e 16,5, de 24,4%, entre 17 e 24, 2,6% entre 24,5 e 34, 9,2% entre 34,5 e 46,5, e 7,5% após o dia 47.

A incidência de aborto em receptoras que receberam embriões de FIV, de acordo com Farin et al. (2001), é relativamente baixa após dois meses de gestação. King et al. (1985), após transferência de 1776 embriões, mencionaram 3,15% e 2,14% de abortos, respectivamente, para 2 a 3 e 3 a 7 meses de gestação. Hasler et al. (1987), relataram 4,7% de abortos entre 2 e 6 meses de gestação.

Entre os fatores levando à mortalidade embrionária ou fetal, estão as anormalidades cromossômicas (KING, 1991). Perda embrionária ainda pode ser

decorrente de receptoras que não ganham peso (McCLURE, 1970), dieta com restrição de energia (SPITZER et al., 1978), de receptoras utilizadas mais de uma vez (TANABE et al., 1985), de alterações no perfil endócrino (GUSTAFSSON et al. 1986), de estresse provocado pelo calor (PUTNEY et al., 1988), da assincronia entre o embrião e o útero (ROBERTS et al., 1990), e devido a um corpo lúteo inadequado (HUNTER, 1991).

De acordo com Thatcher et al. (1994), aproximadamente 30% das vacas repetidoras de cio apresentam perda embrionária ao dia sete de gestação.

Baxter e Ward (1997), relataram que novilhas virgens e vacas jovens tendem a ter uma menor perda embrionária do que vacas velhas. Mencionaram, ainda, que o emprego do ultra-som para o diagnóstico de gestação, entre 30 e 40 dias de gestação, não aumenta o índice de morte fetal.

Os meios utilizados nos diferentes sistemas de produção de embriões *in vitro* (THOMPSON, 2000) e a qualidade do ovócito (SINCLAIR et al., 2000) afetam os índices de prenhez.

Ahmad et al. (1997) demonstraram que o índice de concepção e de sobrevivência embrionária são afetados pelo número de ondas foliculares. O padrão do desenvolvimento da onda folicular, resultando na secreção de 17β -estradiol, entre os dias 14 e 17 após a cobertura, pode ser um fator importante no estabelecimento de mortalidade embrionária, por agir no mecanismo de reconhecimento materno da gestação ou na manutenção do corpo lúteo.

O sistema de produção pode afetar o índice de abortos (VAN WAGTENDONK-LEEuw et al., 2000). Esses autores demonstraram que a percentagem de fetos abortados foi maior em embriões produzidos *in vitro* (2,6%) do que através de TE (1,1%) ou IA (1,3%). Da mesma forma, maior ocorrência de

mortalidade perinatal ocorreu na FIV do que na TE e IA. Contudo, salientaram que o baixo número de observações não mostrou grandes diferenças entre os três grupos.

Há evidências de que a morte embrionária tardia precede a luteólise. De oito novilhas, nas quais a morte embrionária foi detectada entre 25 e 40 dias do acasalamento, através de ultra-sonografia, em sete, o início da regressão luteal começou pelo menos três dias depois da morte embrionária, evidenciada pela falta de batimentos cardíacos.

O uso do ultra-som de imagem para detectar gestação em bovinos foi relatado por Pierson e Ginther (1984a), quando um estudo detalhado, em cinco novilhas, foi realizado a partir do quinto dia antes da ovulação até o dia 50^o dia de gestação. A ultra-sonografia de imagem tem sido utilizada para detectar o conceito e documentar a morte embrionária ou fetal espontânea (KASTELIC, 1991).

Szenci et al. (2003), desenvolveram um teste para determinação da morte embrionária tardia (MET), baseado no decréscimo da concentração da glicoproteína associada à gestação bovina 1 (PAG1), sugerindo que o mesmo pode ser um método alternativo à ultra-sonografia para determinar a MET em bovinos.

Esforços para melhorar a performance reprodutiva, a partir de técnicas que envolvem a manipulação de embriões, têm sido direcionados no estabelecimento de testes para avaliar a viabilidade embrionária *in vitro*, antes da transferência do embrião (OVERSTRÖM, 1997). Contudo, a avaliação subjetiva da qualidade do embrião, baseada na morfologia, permanece como o exame predominante para prever a qualidade do embrião de animais e de humanos.

Embriões com evidência de degeneração resultaram em baixo índice de gestação quando comparados com embriões com morfologia normal (SHEA, 1981). Entretanto, segundo o autor, muitos embriões classificados como de baixa

qualidade produziram prenhez. Resultados de prenhez para embriões classificados como de graus 2, 3 e 4 foram, respectivamente de 44, 56 e 71%, considerando o embrião 4 como de melhor qualidade.

Wright et al. (1976), relataram que os embriões respondem bem à cultura por 24 horas, resultando em alta percentagem de prenhez. Da mesma forma, Shea (1981), preconizou a cultura para embriões de questionável condição, com posterior análise morfológica após 24 horas.

Entretanto, Butler e Biggers (1989), reportaram que diversos aspectos logísticos limitam severamente a aplicação da cultura dos embriões em nível de campo. Um período de 12-24 horas seria requerido para distinguir embriões não-viáveis baseado no retardo do desenvolvimento *in vitro*, além de o procedimento necessitar de uma incubadora, a qual é custo elevado e sem praticidade para uso no campo.

O mais importante, de acordo com Hasler et al. (1995), vem de evidências que mostram que a competência para o desenvolvimento é comprometida independentemente de se tratar de embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo*.

Assim, o grau de morfologia é um indicador geral da qualidade do embrião, contudo, como teste de viabilidade embrionária é incapaz de objetivamente discriminar e prever diferenças na competência para desenvolvimento, as quais existem entre embriões para cada grau de morfologia (BOLAND et al., 1989; FARIN et al., 1995).

Essa limitação é ainda mais evidente quando se verifica o escore para embriões de grau morfológico intermediário (FARIN et al., 1995), e embriões produzidos *in vitro* (BAVISTER et al., 1992; HASLER et al., 2000).

Diversos termos têm sido descritos para diferentes procedimentos usados para avaliar os embriões *in vitro* (BOLAND et al., 1989; GREVE et al., 1993). Os termos mais comumente utilizados, como qualidade/grau do embrião, viabilidade embrionária e competência para o desenvolvimento, têm sido citados como índices de potencial para desenvolvimento de um embrião produzido *in vivo* ou *in vitro* (RENARD et al., 1982; GREVE et al., 1993).

A qualidade do embrião é avaliada e, em seguida, um grau é atribuído baseado em critérios morfológicos específicos revelados ao microscópio (BOLAND et al., 1989; RONDEAU et al., 1995). O grau de qualidade atribuído leva em consideração diversas características, incluindo a cor, homogeneidade e tamanho do blastômero, granulação do citoplasma e grau de fragmentação do blastômero (OVERSTRÖM, 1997).

Lindner e Wright (1983) e Boland et al. (1989) relataram sucesso de 55-65% quando embriões de excelente qualidade, obtidos através de TE, foram transferidos após classificação morfológica.

Índices de gestações de 70% podem ser obtidos após transferência de embriões de qualidade excelente (grau 1), ao redor de 35 e 55% de prenhez são esperados quando se transfere embriões de graus 3 e 2, respectivamente (SHEA, 1981; LINDNER; WRIGHT, 1983).

Looney et al. (1984) e Markette et al. (1985), não observaram diferença significativa entre os sucessivos grupos de qualidade com resultados de prenhez baixo e/ou pequeno número de animais transferidos. Entretanto, Takeda et al. (1986), demonstraram haver significativa diferença nos índices de gestação baseado na morfologia entre embriões agrupados em 3 ou 4 classes de qualidade.

Hasler et al. (1987), classificou os embriões, quanto à qualidade, utilizando dois critérios diferentes. Para embriões transferidos de 1980 a 1983, adotou a classificação de bom, regular e ruim, obtendo, respectivamente, 73%, 60% e 41% de prenhez, com diferença estatística entre os três grupos. De 1985 a 1986, adotou a classificação baseada nas graduações de 1, 2, 3 e 4, sendo que a 1 correspondia ao embrião de melhor qualidade. Um percentual maior de prenhez foi obtido para embriões de grau 1 (83%), com grau 2 (75%) sendo o segundo melhor resultado e graus 3 (63%) e 4 (46%) similares entre si.

Farin et al. (1995), demonstraram que para embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* e analisados por diferentes indivíduos, a concordância entre os avaliadores (84-95%) somente ocorreu para embriões de marcada morfologia (graus 1 a 4), enquanto que para os embriões com defeitos morfológicos variáveis, a concordância foi baixa.

Farin et al. (1999), analisaram os resultados de transferência de embriões de seis veterinários com experiência na avaliação de embriões. Após classificação dos embriões em diferentes graus de qualidade (grau 1= excelente; grau 2= bom; grau 3= pobre; grau 4= degenerado), os mesmos foram transferidos e a percentagem de receptoras que se tornaram prenhes, com embriões de graus 1, 2 e 3, foram de 66% a 76%, 62% a 69% e 54% a 60%, respectivamente, para embriões produzidos *in vivo*, e de 39% a 59%, 15% a 45% e 24% a 32%, no caso de embriões produzidos *in vitro*.

Comparando dois diferentes meios para cultura de embriões *in vitro*, Van Wagtendonk-De Leeuw et al. (2000), não detectaram diferenças entre os índices de prenhez de embriões de graus 1 (35,3% e 44,3%) e 2 (38,2% e 39,3%), para os meios utilizando co-cultura e SOF. respectivamente.

Spell et al. (2001), obtiveram índices de prenhez de 74,1% e 71,8%, após transferência de embriões produzidos *in vivo*, classificados como sendo de graus 1 (excelente) e 2 (bom), respectivamente. Concluíram que o grau de qualidade do embrião não afetou a percentagem de gestação.

Os embriões obtidos através de TE se encontram em diferentes estágios de desenvolvimento (SHEA, 1981). Embriões colhidos no dia sete após o cio, produziram, respectivamente, 0, 4, 7, 57 e 36 blastocistos eclodidos, blastocistos expandidos, blastocistos e mórulas. Nenhuma diferença foi detectada nos índices de prenhez (58% e 56%), respectivamente, para embriões dos dias sete e oito.

Shea (1981) obteve índices de gestações similares quando comparando resultados de embriões com diferentes estágios de desenvolvimento, de mórula a blastocisto expandido (53 a 64%), resultados esses comparados com os de Lindner e Wright (1983).

O mesmo foi relatado por Spell et al. (2001), os quais relataram ausência de diferença entre as percentagens de gestações para mórula compacta (73,4%), blastocisto inicial (73,1%) e blastocisto (63,2%), após transferência de 448 embriões.

Influência do estágio de desenvolvimento embrionário foi relatado por Wright (1981), Looney et al. (1984) e Donaldson (1985a), os quais obtiveram maiores índices de prenhez ao transferir blastocistos.

Hasler et al. (1987), reportaram efeito do estágio de desenvolvimento do embrião sobre o percentual de prenhez. Melhores resultados foram obtidos para blastocisto inicial (77%) e blastocisto (75%), contra 70%, 66% e 71%, respectivamente, para blastocisto expandido, eclodido e mórula.

Após análise dos embriões a decisão passa a ser quais receptoras disponíveis receberão os embriões na expectativa de obter um maior número de gestações (WRIGHT, 1981). A maioria dos veterinários que trabalham com TE confiam na palpação por via retal para identificar e caracterizar o tamanho e a integridade do corpo lúteo (SPELL et al. 2001).

O corpo lúteo (CL) é um órgão endócrino transitório necessário para a gestação em mamíferos (NISWENDER et al., 1994). O primeiro relato sobre a significância biológica dessa glândula foi publicado por Frankel (1903), o qual demonstrou que a gestação era interrompida em coelhos, após a remoção do CL. Posteriormente, Allen e Wintersteiner (1934), purificaram e cristalizaram a progesterona.

Durante a luteinização ocorre uma significativa hipertrofia e hiperplasia das células da teca (O'SHEA et al., 1980). A maior parte do parênquima do CL é constituído de células esteroidogênicas, conhecidas como células luteais (NISWENDER et al., 1994). Células suportes contam com aproximadamente 20% do volume e inclui elementos vasculares, células de musculatura lisa e fibroblastos (FARIN et al., 1986).

Segundo Ott et al. (1986), a determinação da maturidade do CL, via palpação pelo reto, é importante para uma acurada seleção de vacas elegíveis para a luteólise induzida pela prostaglandina.

Uma adequada diferenciação e desenvolvimento do CL é essencial para uma sincronização entre o embrião e o útero (THATCHER et al., 1994), assim como uma suficiente secreção de progesterona é crítica na manutenção de um ambiente antiluteolítico (MANN; LAMMING, 1995).

A gestação é estabelecida e mantida em resposta a uma série de interações entre o concepto (embrião e membranas associadas) e o trato reprodutivo materno (THATCHER et al., 1997).

A ultra-sonografia dos ovários, em bovinos, tem sido descrita com detalhes (PIERSON; GINTHER, 1984b; EDMONDSON et al., 1986), e utilizada para mensurar o corpo lúteo, bem como para melhor definir as características do corpo lúteo (KASTELIC et al., 1990a; SINGH et al., 1997).

Com base no número de exames ultra-sonográficos de corpos lúteos do ciclo (3222) e da gestação (1204), Grygar et al. (1997) concluíram que a média de incidência de corpos lúteos com centro não-luteinizado ou cavidade anecogênica foi de 33,88% e 28,65%, respectivamente. Esses autores relataram, ainda, diâmetro médio de 25,63 mm para CL do ciclo e 23,45 mm para CL gravídico.

Garcia e Salaheddine (2000), obtiveram diâmetro médio de corpos lúteos da ordem de 19,7 mm e 19,3 mm para animais gestantes e não-gestantes, respectivamente. Esses autores relataram ainda, ausência de diferença significativa nos índices de prenhez de novilhas com CL homogêneo (43,6%) ou CLs com diferentes cavidades (40,6%). De 236 animais examinados, 96 apresentaram CLs com cavidade, representando 41,0% do total.

Em trabalho procurando avaliar a qualidade do CL através de palpação por via retal e ultra-sonografia, Spell et al. (2001) obtiveram diâmetros médios de 23,6 mm e 25,0 mm para CLs classificados como excelente/bom (CL com diâmetro palpável > 10 mm e consistência firme) ou ruim (diâmetro palpável ≤ 10 mm e textura macia), respectivamente.

A identificação correta da presença do corpo lúteo, bem como do seu *status* funcional é importante para o sucesso do manejo reprodutivo e essencial no

processo de seleção da receptora antes da transferência de embrião (GARCIA; SALAHEDDINE, 2000).

A seleção da receptora para transferência de embrião tem sido baseada principalmente na avaliação da morfologia do corpo lúteo através da palpação por via retal (GARCIA; SALAHEDDINE, 2000)

Entretanto, a palpação do ovário somente, não é um método acurado de diagnóstico, avaliação ou previsão do estado funcional do CL (REMSSEN; ROUSSEL, 1982; OTT et al., 1986). A ultra-sonografia e a concentração de progesterona podem ser também utilizadas para melhorar tais diagnósticos (PIERSON; GINTHER, 1987; BROADBENT et al., 1991).

As características ultra-sônicas do corpo lúteo têm sido descritas por diversos investigadores (PIERSON; GINTHER, 1987; BOYD; OMRAN, 1991; RIBADU et al., 1994).

Ribadu et al. (1994), compararam a avaliação de corpos lúteos de meio de ciclo através de palpação via retal ultra-sonografia e concentração de progesterona plasmática e obtiveram uma sensibilidade, especificidade e predictibilidade positiva para a palpação de 85%, 95,7% e 89,7%, respectivamente. A ultra-sonografia teve uma sensibilidade de 95%, uma especificidade de 100% e valor de predictibilidade de 100%.

Da mesma forma, Kastelic et al. (1990b), concluíram que a avaliação de CL através do ultra-som é uma alternativa viável para constatação da concentração plasmática de progesterona na avaliação da função luteal.

Wright (1981), Remsen e Roussel (1982), Looney et al. (1984), Donaldson (1985), Donaldson (1986) e Coleman et al. (1987), não observaram

correlação entre o escore do CL e a percentagem de prenhez de receptoras de embriões.

Embora a aparência do corpo lúteo possa ser usada para estimar o estágio do ciclo estral no bovino (IRELAND et al., 1980), não apresenta forte correlação com os níveis de progesterona circulante (HASLER et al., 1980).

Hasler et al. (1987), relataram, também, que receptoras com diferentes CLs, graduados de 1, 2 ou 3, não apresentaram diferenças nos índices de gestação, correspondendo a 76%, 72% e 79%, respectivamente.

Contudo, Baruselli et al. (2000), demonstraram uma associação positiva entre a área do CL e a concentração de progesterona no dia seis após o estro. A classificação das receptoras quanto ao tamanho do CL mostrou que novilhas com um maior CL também tiveram um maior índice de prenhez. Assim, CL1 ($>2,0 \text{ cm}^2$), CL2 ($1,5 \text{ a } 2,0 \text{ cm}^2$) e CL3 ($<1,5 \text{ cm}^2$), corresponderam, respectivamente, a 58,4%, 41,5% e 31,8% de prenhez, com significativa diferença entre os três tipos.

De acordo com Vasconcelos et al. (2001), CLs maiores secretam mais progesterona e assim pode ter um efeito positivo no reconhecimento materno da prenhez e, conseqüentemente, nos índices de inseminação artificial.

Em contraste, Battocchio et al. (1999), reportaram que o volume do CL detectado através de ultra-sonografia pode não se um bom critério para caracterização da capacidade do CL para secretar progesterona.

Spell et al. (2001), obtiveram índices de prenhez similares quando avaliaram a qualidade dos CLs os quais foram classificados em excelente/bom ou ruim, com respectivos percentuais de prenhez de 70% e 80%.

A ocorrência do CL mostra uma maior freqüência para o lado direito em relação ao esquerdo (REECE; TURNER, 1938; HASLER et al., 1980).

Hasler et al. (1987), relataram que 57% dos CLs foram encontrados do lado direito. O lado da transferência do embrião, correspondendo ao ovário contendo o CL, não revelou diferença no percentual de prenhez, considerando-se os lados direito e esquerdo. Obtiveram índices de prenhez de 74 e 72%, respectivamente, após transferência de 2239 e 2899 embriões para os cornos esquerdo e direito.

Em outros estudos, utilizando a transferência não-cirúrgica (WRIGHT, 1981), cirúrgica ventral (HASLER et al., 1980) e cirúrgica no flanco (REMSSEN; ROUSSEL, 1982), os autores não detectaram diferença nos índices de prenhez entre as transferências efetuadas nos cornos direito ou esquerdo.

O monitoramento dos folículos ovarianos através da ultra-sonografia tem se constituído numa poderosa ferramenta para o estudo da dinâmica folicular durante o ciclo estral (SIROIS; FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989a), assim como a relação intra-ovariana entre folículos dominantes e subordinados (GINTHER et al., 1989b).

A dinâmica folicular ovariana ocorre através de estágios integrados de recrutamento, seleção e dominância (THATCHER et al., 1996). Trata-se de um processo recorrente no qual um ou dois folículos anovulatórios dominantes se desenvolvem antes do folículo ovulatório (SIROIS; FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989a; GINTHER et al., 1989b).

Esses autores demonstraram que o desenvolvimento dos folículos ocorre de uma maneira distinta e regular. Cada onda consiste da emergência de um grupo de folículos contemporâneos de cinco milímetros ou mais de diâmetro. Dentro de alguns dias, um folículo cresce mais do que os outros do grupo e passa a ser dominante (FORTUNE et al., 1988; SAVIO et al., 1988).

Pierson e Ginther (1988), Ginther et al. (1989c) e Knopf et al. (1989), revelaram a existência de duas ondas foliculares por ciclo estral, em novilhas, enquanto que, Savio et al. (1988), demonstraram a ocorrência de três ondas.

Alguns autores reportaram a existência de uma correlação entre o diâmetro folicular mensurado através de ultra-som e o diâmetro folicular determinado após a dissecação do ovário (PIERSON; GINTHER, 1988; PIERSON et al., 1990; DRIANCOURT et al., 1991).

Folículos antrais > 2 mm em diâmetro podem ser detectados através do exame ultra-sonográfico (PIERSON; GINTHER, 1984a) e freqüentemente são classificados de acordo com seu tamanho.

A dinâmica folicular em novilhas e vacas durante a gestação inicial foi investigada por Pierson e Ginther (1986), Ginther et al. (1989c) e Taylor e Rajamanhendran (1991). O padrão de onda de crescimento e regressão de grandes folículos foi observada entre os dias 60 e 70 de gestação. Concluíram que a dinâmica folicular durante os primeiros 60-70 dias de prenhez foi similar aos animais não-prenhes.

Bergfelt et al. (1991), demonstraram que a emergência de uma onda folicular anovulatória, periódica e contínua, em novilhas prenhes, estava associada com a contínua produção de progesterona, como visto pela periódica e continuada emergência de ondas foliculares em novilhas não-prenhes tratadas com progesterona.

Lazar e Maracek (1994), caracterizaram o recrutamento e o crescimento de folículos em relação à presença de um CL nas diferentes fases do ciclo estral. A percentagem máxima de folículos pequenos ($< 4,9$ mm), médios (5,0 a 9,9 mm) e grandes (> 10 mm), foi observada nos dias 18-21 (93,4%), 1-4 (16,6%) e

11-17 (4,8%), respectivamente. Nenhum efeito do CL foi observado no que tange a presença de folículos médios e grandes.

A determinação do sexo fetal tem diversas implicações na indústria animal (RIBADU; NAKAO, 1999). A sexagem fetal através de ultra-sonografia foi descrita pela primeira vez por Muller e Wittkowski (1986).

O sexo do feto pode ser detectado pela visualização do tubérculo genital (CURRAN et al., 1989) ou escroto e glândula mamária (MULLER; WITTKOWSKI, 1986), com a técnica sendo acurada mesmo quando executada em nível de campo (CURRAN; GINTHER, 1991).

O período mais apropriado para a sexagem fetal, segundo Ribadu e Nakao (1999), é entre 55 e 60 dias de gestação, embora, Stroud (1996), preconize o exame entre 58 e 90 dias.

Viana e Marx (1994), efetuaram exames entre 60 e 90 dias de prenhez, em 716 receptoras de embriões, constatando, após o nascimento dos bezerros, 96,3% de diagnósticos corretos.

Stroud (1996), relatou uma margem de erro de diagnóstico de 3%. Segundo o autor, a presença de túberculo masculino é suficiente para afirmar que o feto é um macho; entretanto, se o feto for diagnosticado como não sendo macho, o tubérculo genital feminino deve ser procurado para confirmar que se trata de um feto fêmea.

A distribuição de sexos de bezerros produzidos através de inseminação artificial (IA) tem sido relatada ser ao redor de 1:1, com 52,9% de machos e 47,1% de fêmeas (FOOTE, 1975). Essa tendência também prevalece entre embriões e bezerros produzidos através de IA em programas de TE (KING et al., 1991; KING et al., 1995).

Contudo, a proporção de sexos de bezerros resultantes de embriões produzidos *in vitro* difere dessa esperada relação (VAN SOOM; DE KRUIF, 1992; MASSIP et al., 1995b; HASLER et al., 1995; KOCHHAR et al., 2001).

O mecanismo invocado para explicar a desigual distribuição de machos e fêmeas, a partir de embriões bovinos produzidos *in vitro*, envolve fatores favorecendo o espermatozóide que carrega o cromossomo Y, antes da fertilização, e suporte preferencial, pós-fertilização, ou uma seletiva vantagem de embriões machos sobre embriões fêmeas sob condições *in vitro* (KOCHHAR et al., 2001; KOCHHAR et al., 2003).

Yadav et al. (1993) e Dominko e First (1997), mostraram que a maioria dos embriões que completaram o primeiro ciclo celular, dentro de 30 horas após a inseminação, eram machos.

Dominko e First (1997), Gutierrez-Adan et al. (1999) e Rorie (1999), demonstraram que o estado de maturação do ovócito ao momento da inseminação tem um grande impacto sobre a distribuição de sexo dos embriões. Ovócitos inseminados imediatamente após a extrusão do primeiro corpúsculo polar ou poucas horas antes da ovulação *in vivo*, tendem a se desenvolver para embriões fêmeas.

Porém, segundo Dominko e First (1997), a maioria dos ovócitos inseminados oito horas depois da extrusão ou poucas horas após a ovulação, desenvolveram-se para embriões machos.

Mais machos do que fêmeas são recuperados se a interação entre os gametas for retardada até que os ovócitos estejam completamente maturados (DOMINKO e FIRST, 1997).

A proporção de sexos de embriões produzidos *in vitro* varia de acordo com o método de produção, cultura e análise (BERNARDI; DELOUIS, 1996;

GUTIERREZ-ADAN et al., 2001a; LARSON et al., 2001). Em geral, a distorção entre a relação de sexo de embriões de FIV tem sido atribuída à composição do meio (LECHNIAK et al., 2003).

A suplementação do meio com soro fetal e glucose influenciou a razão de sexo de blastocistos de FIV (GUTIERREZ-ADAN et al., 2001b; LARSON et al., 2001). Larson et al. (2001), mostraram que na presença de glucose, mais de 75% dos blastocistos produzidos em meio SOF eram machos.

Gutierrez-Adan et al. (2001b), concluíram que o meio SOF com soro fetal não somente acelera o desenvolvimento, mas também incrementa a sobrevivência de blastocistos machos. A co-cultura com células, em meio TCM, mudou a razão de sexo de blastocistos do dia sete em favor de macho, mas não no dia oito, o qual foi favorável às fêmeas.

Diversos pesquisadores têm relatado que embriões bovinos machos, oriundos de FIV, crescem mais rapidamente em cultura do que embriões fêmeas, durante os primeiros oito dias após a inseminação *in vitro* (AVERY et al., 1989; AVERY et al., 1991; XU et al., 1991; MARQUANT-LE GUIENNE et al., 1992; KOCHHAR et al., 2001).

Yadav et al. (1993) e Carvalho et al. (1996), relataram que embriões machos também se desenvolvem para estágios mais avançados em cultura do que embriões fêmeas. A seleção desses embriões mais avançados pode ser uma das causas da preponderância de machos entre bezerros produzidos *in vitro* (HASLER, 2000).

A identificação das condições que levam ao desvio da proporção de sexo de 1:1, poderia levar ao desenvolvimento de métodos que poderiam alterar tal relação para aplicações comerciais. O papel dos genes ligados ao cromossomo X

pode fornecer uma explicação para esse fenômeno (RIEGER, 1992), especialmente enzimas envolvidas na detoxificação de radicais de oxigênio, como a hipoxantina fosforibosil transferase - HPRT (DOWNS; DOW, 1991), ou envolvidas no metabolismo energético (glicose-6-fosfato dihidrogenase - G6PDH), a qual controla a entrada de glicose na via da pentose-fosfato.

As diferenças na velocidade de crescimento entre zigotos XX e XY sugerem que algum gene ligado ao cromossomo Y poderia expressar-se em fases muito precoces do desenvolvimento (ZWINGMAN et al., 1993; PERGAMENT et al., 1994).

Carvalho et al. (1996), sexaram embriões produzidos *in vitro* através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Diferença significativa foi observada nas percentagens de embriões macho e fêmea para os estágios de mórula, blastocisto expandido e blastocisto eclodido, sendo que mais fêmeas (28%) do que machos (9%), originaram de mórula e mais machos (39% e 9%) do que fêmeas (18% e 0%) foram obtidos a partir de blastocistos expandidos e eclodidos, respectivamente.

Utilizando a técnica de PCR, Pergoraro et al. (1998), relataram um maior índice de embriões fêmea no estágio de blastocisto inicial (Bi; 63,3% vs. 36,7%), enquanto que blastocistos (B) e blastocistos expandidos (Bx) corresponderam a embriões sexados como macho, respectivamente, com 62,2% vs. 37,8% e 76% vs. 24% para embriões cultivados em meio com células do oviduto bovino (BOEC). Quando em cultura em meio *vero cells*, independente do estágio, mais embriões macho (61,1%, 56% e 66,6%, respectivamente, para Bi, B e Bx), foram observados.

Hasler et al. (2002), após sexagem de embriões produzidos através de FIV, utilizando PCR, observaram desvio na proporção de macho:fêmea, com embriões ao estágio de mórula (M) produzindo mais fêmeas (62,6%) do que machos (37,4%). Para os estágios de Bi, B e Bx, não houve diferença significativa. Para embriões oriundos de TE, embriões ao estágio de Bx produziram mais fêmeas (60,3%) do que machos (39,7%). Quando comparou embriões de FIV com de TE, mais embriões machos (53% vs. 49,2%) foram obtidos para aqueles produzidos *in vitro*.

Kochhar et al. (2003), investigando os efeitos de diferentes tempos de co-incubação dos gametas sobre a proporção de sexos, demonstraram que a proporção de embriões sexados de macho no grupo 6 horas, para zigotos com 2, 4 e 8 células, foi maior que os demais grupos (9, 12 e 18 horas). Acima de 70% de embriões que alcançaram os estágios de 4 e 8 células, no grupo 6 horas, e a maioria dos zigotos de 8 células, em todos os grupos, foram machos.

3 Material e Método

3.1 Animais e nutrição

Este estudo foi realizado em receptoras de embriões, mestiças, mantidas nas fazendas Cafezinho e Fortaleza, ambas na região de Araçatuba-SP. Durante todo o experimento estiveram sob regime de pasto, em piquetes de capim Tanzânia (*Panicum maximum*), recebendo sal mineral e água *ad libidum*.

3.2 Indução e detecção do estro

Um total de 431 animais foram utilizados como receptoras no programa de transferência de embriões produzidos *in vitro*. As receptoras foram induzidas ao estro através de administração de 2,0 mL de cloprostenol sódico (Ciosin[®]), via intramuscular, na tarde do dia D₋₂.

O dia D₀, correspondeu ao dia das punções foliculares para obtenção dos ovócitos das doadoras, e o D₇, ao dia da transferência dos embriões, independentemente do estágio de desenvolvimento, desde que classificados como sendo mórula, blastocisto inicial, blastocisto ou blastocisto expandido, e grau de qualidade 1 (excelente), 2 (bom), 3 (regular) e 4 (ruim).

O estro das receptoras foi observado pela manhã e à tarde, por um período de 50 minutos, sobre um período de 72 horas, a partir da administração da prostaglandina.

3.3 Seleção das receptoras

Somente animais apresentando estro, entre 24 e 72 horas da indução, foram apartados para posterior exame de palpação, por via retal, para avaliação dos ovários e útero, bem como genitália externa.

Os ovários foram analisados quanto à presença de um corpo lúteo (CL), sua qualidade e lado de ocorrência. A qualidade do CL foi avaliada, adotando-se a seguinte classificação: CL1= $\geq$ a 1,0 cm de diâmetro; CL2= de 0,5 a 1,0 cm de diâmetro; CL3= $\leq$ 0,5 cm de diâmetro. O útero foi avaliado quanto ao tônus e tamanho da cérvix.

3.4 Transferência dos embriões

Os animais selecionados foram submetidos à anestesia epidural baixa, com 5,0 mL de cloridrato de lidocaína a 2% (Xylestesin[®]), e higienização da genitália externa, com água. Os embriões, produzidos em Central de FIV, foram escolhidos para a transferência com base na sincronia com a receptora e, então, transferidos não cirurgicamente para o corno uterino ipsilateral ao ovário com o corpo lúteo. A seguir, foram alocadas em piquete próprio para posterior diagnóstico de gestação.

Desta forma, no dia 7 ou 8 do ciclo estral das receptoras, essas foram selecionadas e receberam embriões classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento, bem como de acordo com o grau de qualidade.

Os embriões, provenientes da Central de FIV, foram enviados já envasados, um em cada palheta, com as respectivas informações quanto aos pais, estágio de desenvolvimento e grau de qualidade.

3.5 Diagnóstico de gestação

A detecção de prenhez foi realizada através de ultra-som de imagem (Scanner Pie Medical 480 VET), com transdutor de 5 MHz, entre 26^a a 28 dias da transferência, com interpretação das imagens segundo Kastelic et al. (1988),

levando-se em consideração a visualização do conceito e constatação de viabilidade através da verificação dos batimentos cardíacos.

As receptoras diagnosticadas como prenhes foram mantidas em piquete de gestação, até serem submetidas ao segundo exame ultra-sonográfico para confirmação de prenhez e determinação do sexo dos fetos.

3.6 Exame ultra-sonográfico do feto

O exame dos ovários e a sexagem fetal foram realizados entre os dias 50-52 de gestação, utilizando-se para um Scanner (Pie Medical 200 VET), com probe transretal de 6 MHz.

À medida que as receptoras eram contidos, procedia-se à classificação das mesmas de acordo com o predomínio da cor da pelagem, a saber: clara, malhada, marrom e preta.

Seguida da evacuação do reto, a probe transretal foi inserida através do reto e com movimentos lentos o útero foi localizado, bem como o feto a ser examinado. Após constatação de um feto viável, procedeu-se à determinação do sexo, de acordo com Stroud (1996).

O reconhecimento do tubérculo genital masculino ou feminino, baseou-se na identificação de um denso tecido hiperecogênico, respectivamente, próximo ao cordão umbilical ou da base da cauda, independentemente de se tratar de um corte frontal ou longitudinal.

Após a localização da cabeça do feto, o transdutor era movido através do tórax para confirmar a viabilidade do feto (batimento cardíaco) e, na seqüência, direcionado para localizar o cordão umbilical. A presença de um tubérculo genital

imediatamente associado ao cordão era suficiente para diagnosticar o feto como sendo macho.

Entretanto, quando um tubérculo não era detectado nessa posição, obrigatoriamente a presença de um tubérculo genital feminino tinha que ser observada próximo à base da cauda para confirmação de um feto fêmea.

A ausência ou presença de um feto, porém com tamanho reduzido e sem batimento cardíaco, era considerada como morte embrionária ou fetal e, ainda que o sexo pudesse ser determinado, não era computado para essa finalidade.

3.7 Exame ultra-sonográfico dos ovários

Na seqüência do exame, e somente para os animais com fetos sexados, viáveis, procedeu-se ao exame ultra-sonográfico dos ovários, como descrito por Pierson et al. (1988). Cada ovário foi avaliado em diferentes planos para identificar a presença de corpo lúteo e folículo(s).

Uma imagem, em corte transversal, dos corpos lúteos e folículos era congelada, em seus diâmetros máximos, e suas alturas e larguras mensuradas através de calípers eletrônicos, para definir o tamanho das estruturas. O número de folículos, em ambos ovários, também era verificado.

3.8 Análise estatística

As análises estatísticas foram efetuadas empregando-se o programa SAS (Statistical Analysis System).

Estatística descritiva, com cálculo da média, desvio padrão e coeficiente de variação, foi realizada para as variáveis quantitativas, com cálculo da percentagem para as variáveis qualitativas.

Para as variáveis cor da pelagem, lado do corpo lúteo e lado do folículo foram realizados os testes exato de Fisher ou Qui-quadrado, respectivamente, para a associação entre as variáveis e os grupos prenhe e não prenhe.

O teste de Qui-quadrado também foi empregado para comparar as proporções de estágios de desenvolvimento e grau de qualidade com a prenhez, bem como para verificar a associação entre os estágios de desenvolvimento e o sexo do feto.

Para as variáveis tamanho do corpo lúteo e do folículo foram realizados os testes t de Student, para comparar os grupos prenhe e não prenhe, considerando as variâncias iguais ou diferentes, respectivamente, conforme resultado do teste F para a igualdade das variâncias.

As análises estatísticas foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

4 Resultados

Para verificar a influência da receptora e do embrião no estabelecimento da prenhez e do sexo, 431 novilhas, mestiças, foram selecionadas para receberem correspondente número de embriões, os quais variaram em grau de qualidade e estágio de desenvolvimento. Todos os embriões transferidos foram produzidos *in vitro*.

Do total de receptoras utilizadas, 164 (38,0%) foram diagnosticadas como prenhes após exame ultra-sonográfico aos 26-28 dias da transferência.

Aos 50-52 dias da TE, os animais prenhes foram novamente examinados, através de ultra-som, para confirmação da prenhez, determinação do sexo fetal e avaliação dos ovários.

Confirmada a prenhez, os animais foram classificados de acordo com a cor da pelagem. Assim, 30 (18,3%) eram de pelagem clara, 20 (12,2%) malhada, 22 (13,4%) marrom e 92 (56,1%) preta (Tabela 1 e Figura 1).

A cor da pelagem não influenciou ($P>0,969$) nos índices de prenhez (93,3%, 90,0%, 95,5% e 91,3%), respectivamente, para animais de pelagem clara, malhada, marrom e preta (Tabela 2 e Figura 2). No total, 151 (92,1%) receptoras, independentemente da pelagem, estavam prenhes ao segundo exame ultra-sonográfico, contra 13 (7,9%) de perdas embrionárias e/ou fetais

Os embriões transferidos foram classificados com base na qualidade (Tabela 3 e Figura 3), constatando-se que 140 (87,0%) eram embriões de grau 1, 13 (8,1%) de grau 2, 6 (3,7%) de grau 3 e 2 (1,2%) de grau 4.

Na tabela 4 e figura 4 são mostrados os resultados referentes às percentagens de prenhez em relação ao grau de qualidade dos embriões. Mais ($P<0,05$) receptoras se tornaram prenhes (86,49%) quando embriões de grau 1

foram utilizados, com embriões de graus 2 e 3 exibindo índices de prenhes similares (7,78% e 4,05%, respectivamente).

Contudo, não houve diferença ($P>0,05$) nos percentuais após transferência de embriões de graus 3 (4,05%) e 4 (0,68%). Comparando-se os resultados de receptoras prenhes e não prenhes, nenhuma diferença ($P>0,2097$) foi observada.

Os embriões transferidos também foram classificados segundo o estágio de desenvolvimento embrionário (Tabela 5 e Figura 5). Assim, 7 (4,4%) embriões eram mórulas, 37 (23,1%) blastocistos iniciais, 54 (33,8%) blastocistos e 62 (38,8%) blastocistos expandidos.

Diferença significativa ($P<0,05$) foi observada nos índices de prenhez conforme o estágio de desenvolvimento do embrião (Tabela 6 e Figura 6). A transferência de blastocistos expandidos resultou em melhor índice de prenhez (40,1%) do que os demais estágios. Blastocistos iniciais e blastocistos produziram resultados similares (24,5% e 32,0%, respectivamente), e mórula o menor percentual de prenhez (3,4%).

Resultados de média e desvio padrão das mensurações dos diâmetros dos corpos lúteos, em relação a cor da pelagem, são mostrados na tabela 7 e figura 7. Os valores de $1,83\pm 0,25\text{cm}$, $1,88\pm 0,30\text{cm}$, $1,81\pm 0,19\text{cm}$ e $1,85\pm 0,29\text{cm}$, corresponderam às pelagens clara, malhada, marrom e preta. Não houve diferença significativa ($P>0,8599$) entre os diferentes diâmetros de corpos lúteos, considerando-se a cor da pelagem.

Dados referentes à estatística descritiva do diâmetro dos corpos lúteos e folículos, bem como número de folículos são mostrados na tabela 8 e figura 8. Os valores para o diâmetro mínimo, máximo, média, desvio padrão e coeficiente de

variação foram, respectivamente de 0,95, 2,65, 1,85, 0,27 e 14,8% para o corpo lúteo e 0,50, 1,60, 0,71, 0,27 e 37,7% para o folículo. Com relação ao número de folículos, os valores foram de 0,0, 3,0, 1,16, 0,46 e 39,5%, respectivamente.

As percentagens de corpos lúteos, segundo o lado de ocorrência no ovário (Tabela 9 e Figura 9), foram maiores (65,1%) no lado direito do que no esquerdo (34,9%).

Desta forma, um maior percentual de embriões foram transferidos para o corno ipsilateral ao ovário com o corpo lúteo, ou seja, 61,5% do lado direito e 38,5% do lado esquerdo (Tabela 10 e Figura 10).

O lado de ocorrência do corpo lúteo determinou o lado da transferência dos embriões, contudo, não foi detectada diferença significativa ($P>0,378$) entre os percentuais de prenhez e não prenhez (Tabela 11 e Figura 11) em relação ao lado da TE.

A distribuição das receptoras de acordo com a classificação dos corpos lúteos (Tabela 12 e Figura 12), ao momento da transferência, mostrou uma maior percentagem ($P<0,05$) de corpos lúteos do tipo 1 (55,9%), do que tipos 2 (33,6%) e 3 (10,5%), com o tipo 2 ocorrendo em maior percentual ($P<0,05$) do que o tipo 3.

Os resultados de tipo de corpo lúteo e índices de prenhez acham-se descritos na Tabela 13 e Figura 13. Não houve diferença significativa ($P>0,221$) entre os índices de prenhez e não prenhez para os diferentes tipos de CL.

Porém, quando considerado somente os índices de receptoras prenhes, constatou-se um maior ($p<0,05$) percentual de prenhez (53,8%) para receptoras portadoras de CL tipo 1 do que para os tipos 2 (34,8%) e 3 (11,4%), com tipo 2 resultando em mais prenhez do que o tipo 3.

Com relação à distribuição (n/%) dos folículos nos ovários, verificada ao dia da sexagem fetal, foi constatado que 42,4% e 57,6% ocorreram, respectivamente, nos ovários direito e esquerdo (Tabela 14 e Figura 14), sem diferença estatística ($P>0,05$) entre os lados de ocorrência.

Análise descritiva (média $\pm$ desvio padrão) do diâmetro dos corpos lúteos e dos folículos foi efetuada para receptoras prenhes e não prenhes (Tabela 15 e Figura 15). Não houve diferença significativa ($P>0,0592$) entre receptoras prenhes ($1,87\pm0,26\text{cm}$) e não prenhes ($1,65\pm0,37\text{cm}$), considerando-se os valores para o tamanho do corpo lúteo.

Entretanto, com relação ao diâmetro do folículo, diferença significativa ($P<0,0078$) foi observada, com animais não prenhes apresentando um diâmetro maior ($0,91\pm0,32\text{cm}$) do que os prenhes ($0,69\pm0,26\text{cm}$).

Os resultados do lado de ocorrência do folículo em relação à percentagem das receptoras prenhes e não prenhes, aos 50-52 dias da TE, são mostrados na tabela 16 e figura 16. Não houve diferença ($P>0,774$) entre os índices de animais prenhes (90,6%) e não prenhes (92,0%).

Os dados referentes ao estágio de desenvolvimento embrionário e índices de fetos sexados como macho ou fêmea são apresentados na tabela 17 e figura 17. Mais ($P<0,05$) fetos fêmea originaram de embriões ao estágio de blastocisto expandido (43,5%) e blastocisto (36,2%) do que blastocisto inicial (17,4%) e mórula (2,9%), sendo que Bi produziu resultado superior ao de Mo.

Com relação aos fetos machos, resultados similares foram obtidos para os estágios de Bx (37,2%), BI (28,2%) e Bi (30,8%), sendo superiores ($P<0,05$) aos obtidos com Mo (3,8%).

Entretanto, quando comparadas as proporções entre fetos fêmea e macho, com base nos mesmos estágios de desenvolvimento mencionados (Tabela 18 e Figura 18), maior percentual ($P < 0,05$) de fetos machos (66,67%) do que fêmea (33,33%) originaram de blastocistos iniciais, com os estágios de Mo, BI e Bx produzindo percentuais similares de fetos fêmea (40,0%, 53,19% e 50,85%, respectivamente) ou macho (60,0%, 46,81% e 49,15%, respectivamente).

Quando computados no total (Tabela 19 e Figura 19), não foi observada diferença significativa ($p > 0,5689$) entre as proporções de sexos, com 47,7% (72/151) de fetos fêmeas e 52,3% (79/151) de fetos machos.

Tabela 1 - Número e percentagem de receptoras de embriões, segundo a cor da pelagem - Araçatuba/SP – 2002

Cor da pelagem	N	%
Clara	30	18,3
Malhada	20	12,2
Marrom	22	13,4
Preta	92	56,1
Total	164	100,0

Figura 1 - Distribuição de receptoras (%), segundo a cor da pelagem

Tabela 2 - Distribuição (n/%) de receptoras prenhes e não prenhes, aos 50-52 dias de prenhez, segundo a cor da pelagem - Araçatuba/SP – 2002

Cor da pelagem	Prenhe		Não prenhe		Total		P ⁽¹⁾
	N	%	N	%	N	%	
Clara	28	93,3	2	6,7	30	100,0	0,969
Malhada	18	90,0	2	10,0	20	100,0	
Marrom	21	95,5	1	4,5	22	100,0	
Preta	84	91,3	8	8,7	92	100,0	
Total	151	92,1	13	7,9	164	100,0	

⁽¹⁾ nível descritivo do teste exato de Fisher

Figura 2 - Percentagens de animais prenhes e não prenhes, de acordo com a cor da pelagem

Tabela 3 - Número e percentagem de embriões produzidos *in vitro* selecionados para transferência, segundo o grau de qualidade - Araçatuba/SP – 2002

Grau de qualidade	N	%
1	140	87,0
2	13	8,1
3	6	3,7
4	2	1,2
Total	161	100,0

Figura 3 - Distribuição de embriões (%) utilizados para a transferência, segundo o grau de qualidade

Tabela 4 - Influência do grau de qualidade do embrião sobre o número e percentagem de receptoras prenhes e não prenhes, aos 50-52 dias da transferência - Araçatuba/SP – 2002

Qualidade do embrião	Prenhe		Não prenhe		P ⁽¹⁾
	N	% ⁽²⁾	N	%	
1	128	86,49 ^a	12	92,31	0,2097
2	13	8,78 ^b	0	0,00	
3	6	4,05 ^{bc}	0	0,00	
4	1	0,68 ^c	1	7,69	
Total	148	100,00	13	100,00	

⁽¹⁾ nível descritivo do teste exato de Fisher

⁽²⁾ proporções seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si (p>0,05)

Figura 4 - Resultados de receptoras prenhes (%) e não prenhes aos 50-52 dias da transferência dos embriões

Tabela 5 - Distribuição de embriões (n/%) selecionados para a transferência, segundo o estágio de desenvolvimento - Araçatuba/SP – 2002

Estágio do embrião	N	%
Mo	7	4,4
Bi	37	23,1
Bl	54	33,8
Bx	62	38,8
Total	160	100,0

Figura 5 - Percentagens de embriões transferidos, segundo o estágio de desenvolvimento *in vitro*

Tabela 6 - Influência do estágio de desenvolvimento embrionário sobre o número e percentagem de receptoras prenhes e não prenhes, aos 50-52 dias da transferência dos embriões - Araçatuba/SP – 2002

Estágio do embrião	Prenhe		Não prenhe	
	N	% ⁽¹⁾	N	%
Mo	5	3,4 ^a	2	15,4
Bi	36	24,5 ^b	1	7,7
Bl	47	32,0 ^{bc}	7	53,8
Bx	59	40,1 ^c	3	23,1
Total	147	100,0	13	100,0

⁽¹⁾ Proporções seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si ($P>0,05$)

Figura 6 - Índices de prenhez e não prenhez de receptoras, segundo o estágio do embrião ao momento da transferência

Tabela 7 - Resultados de mensurações dos corpos lúteos através, de ultra-sonografia, no dia da sexagem fetal, segundo a cor da pelagem das receptoras - Araçatuba/SP – 2002

Cor da pelagem	Média $\pm$ desvio padrão (cm)	P ⁽¹⁾
Clara	1,83 $\pm$ 0,25	0,8599
Malhada	1,88 $\pm$ 0,30	
Marrom	1,81 $\pm$ 0,19	
Preta	1,85 $\pm$ 0,29	

⁽¹⁾ nível descritivo da estatística F, da análise de variância

Figura 7 - Distribuição das médias (cm) dos diâmetros dos corpos lúteos de receptoras examinadas com ultra-som, aos 50-52 dias da transferência, conforme a pelagem

Tabela 8 - Valores mínimo, máximo, médio, desvio padrão e coeficiente de variação dos diâmetros (cm) dos corpos lúteos e folículos das receptoras, observadas ao exame ultra-sonográfico nos dias 50-52 após a transferência dos embriões - Araçatuba/SP – 2002

Estatística	Diâmetro do corpo lúteo	Número de folículos	Diâmetro do folículo
Mínimo	0,95	0,00	0,50
Máximo	2,65	3,00	1,60
Média	1,85	1,16	0,71
Desvio padrão	0,27	0,46	0,27
Coeficiente de variação (%)	14,80	39,50	37,70

Figura 8 - Média e desvio padrão dos diâmetros dos corpos lúteos e folículos das receptoras, 50 a 52 dias após a transferência

Tabela 9 - Distribuição de corpos lúteos (n/%), no do dia da sexagem fetal, segundo o lado de ocorrência no ovário - Araçatuba/SP – 2002

Ovário	N	%
Direito	97	65,1
Esquerdo	52	34,9
Total	149	100,0

Figura 9 - Percentagens de corpos lúteos, conforme o lado de ocorrência no ovário

Tabela 10 - Número e percentagem de receptoras, segundo o lado do corpo lúteo e de transferência do embrião - Araçatuba/SP – 2002

Lado do corpo lúteo	N	%
Direito	88	61,5
Esquerdo	55	38,5
Total	143	100,0

Figura 10 - Distribuição dos corpos lúteos (%), com base no lado de ocorrência e transferência

Tabela 11 - Influência do lado de ocorrência do corpo lúteo sobre o número e percentagem de receptoras prenhes e não prenhes aos 50-52 dias da transferência - Araçatuba/SP – 2002

Lado do corpo lúteo	Prenhe		Não prenhe		Total		P ⁽¹⁾
	N	%	N	%	N	%	
Direito	90	92,8	7	7,2	97	100,0	0,378
Esquerdo	46	88,5	6	11,5	52	100,0	
Total	136	91,3	13	8,7	149	100,0	

⁽¹⁾ nível descritivo do teste exato de Fisher

Figura 11 - Percentagens de receptoras prenhes e não prenhes, segundo o lado da transferência do embrião

Tabela 12 - Número e percentagem de receptoras de embrião, segundo a classificação do corpo lúteo à palpação por via retal, no dia da transferência do embrião - Araçatuba/SP – 2002

Classificação do corpo lúteo	N	% ⁽¹⁾
1	80	55,9 ^a
2	48	33,6 ^b
3	15	10,5 ^c
Total	143	100,0

⁽¹⁾ Proporções seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si ($P < 0,05$)

Figura 12 - Percentagem de receptoras, segundo a classificação do corpo lúteo no momento da transferência do embrião

Tabela 13 - Influência do tipo de corpo lúteo sobre os índices de prenhez e não prenhez, aos 50-52 dias da transferência dos embriões - Araçatuba/SP – 2002

Classificação do corpo lúteo	Prenhe		Não prenhe		Total	P ⁽¹⁾
	N	% ⁽²⁾	N	%	N	
1	71	53,8 ^a	9	81,8	80	0,221
2	46	34,8 ^b	2	18,2	48	
3	15	11,4 ^c	0	0,0	15	
Total	132	100,00	11	100,0	143	

⁽¹⁾ nível descritivo do teste exato de Fisher

⁽²⁾ proporções seguidas de letras diferentes, na coluna, diferem entre si pelo teste qui-quadrado ($p < 0,05$)

Figura 13 - Percentagem de receptoras prenhes e não prenhes, segundo a classificação do corpo lúteo no momento da transferência do embrião

Tabela 14 - Distribuição dos folículos (n/%), no dia da sexagem fetal, segundo o lado de ocorrência no ovário - Araçatuba/SP – 2002

Ovário	N	%
Direito	64	42,4
Esquerdo	87	57,6
Total	151	100,0

Figura 14 - Percentagem de folículos, segundo o lado de ocorrência no ovário

Tabela 15 - Média e desvio padrão dos diâmetros (cm) dos corpos lúteos e dos folículos de receptoras prenhes e não prenhes, aos 50-52 dias da transferência dos embriões - Araçatuba/SP – 2002

	Estatística	Prenhe	Não prenhe	P ⁽¹⁾
Corpo lúteo	N	136	13	0,0592
	Média	1,87	1,65	
	Desvio padrão	0,26	0,37	
Folículo	N	120	12	0,0078
	Média	0,69	0,91	
	Desvio padrão	0,26	0,32	

⁽¹⁾ Nível descritivo do teste t de Student

Figura 15 - Diâmetros médios de corpos lúteos e folículos de receptoras prenhes e não prenhes

Tabela 16 - Influência do lado de ocorrência do folículo sobre o número e percentagem de receptoras prenhes e não prenhes, aos 50-52 dias da transferência dos embriões - Araçatuba/SP – 2002

Lado do folículo	Prenhe		Não prenhe		Total		P ⁽¹⁾
	N	%	N	%	N	%	
Direito	58	90,6	6	9,4	64	100,0	0,774
Esquerdo	80	92,0	7	8,0	87	100,0	
Total	138	91,4	13	8,6	151	100,0	

⁽¹⁾ nível descritivo do teste de Qui-Quadrado

Figura 16 - Percentagens de receptoras prenhes e não prenhes, segundo o lado da transferência do embrião

Tabela 17 - Distribuição de sexo dos fetos e abortos, segundo o desenvolvimento embrionário - Araçatuba/SP – 2002

Estágio do embrião	Fêmea		Macho		Aborto	
	N	% ⁽¹⁾	N	% ⁽¹⁾	N	%
Mo	2	2,9 ^a	3	3,8 ^a	2	15,4
Bi	12	17,4 ^b	24	30,8 ^b	1	7,7
Bl	25	36,2 ^c	22	28,2 ^b	7	53,8
Bx	30	43,5 ^c	29	37,2 ^b	3	23,1
Total	69	100,0	78	100,0	13	100,0

⁽¹⁾ Proporções seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si ($P>0,05$)

Figura 17 - Resultados (%) de sexagem fetal e de abortos, segundo o estágio de desenvolvimento do embrião

Tabela 18 - Influência do estágio embrionário, sobre o número e percentagem de fetos sexados - Araçatuba/SP – 2002

Estágio do embrião	Fêmea		Macho	
	N	%	N	%
Mo	2	40,00 ^a	3	60,00 ^a
Bi	12	33,33 ^a	24	66,67 ^b
Bl	25	53,19 ^a	22	46,81 ^a
Bx	30	50,85 ^a	29	49,15 ^a

(1) Proporções seguidas de mesma letra, na mesma linha, não diferem entre si ($P>0,05$)

Figura 18 - Percentagem de fetos machos e fêmeas, segundo o estágio de desenvolvimento embrionário

Tabela 19 - Distribuição de sexo (n/%) de fetos examinados com ultra-som de imagem aos 50-52 dias da transferência dos embriões - Araçatuba/SP – 2002

Sexo	N	%	P ⁽¹⁾
Fêmea	72	47,7	0,5689
Macho	79	52,3	
Total	151	100,0	

⁽¹⁾ nível descritivo do teste de Qui-Quadrado

Figura 19 - Percentagem de fetos, segundo o sexo

5 Discussão

O estudo dos fatores envolvidos no estabelecimento da prenhez e do sexo tem merecido a atenção de diversos pesquisadores.

A obtenção de um índice satisfatório de prenhez em receptoras é fator primordial a ser considerado em programas de transferência de embriões.

Contudo, para que isso ocorra, a seleção de animais com maior aptidão é necessária, e acabaria promovendo uma redução nos custos de produção de prenhez.

Vários critérios têm sido utilizados para a seleção de receptoras, tais como: genótipo, idade, estado fisiológico, condição corporal, sanidade, histórico reprodutivo e adaptabilidade ao ambiente (BROADBENT et al., 1991).

Na literatura consultada não foi encontrada referência ao tipo de pelagem, seja na cor da pele, pêlos ou aspecto da mesma, o que impossibilita comparações e discussões mais direcionadas.

A classificação dos animais em quatro grupos, com base no predomínio da cor e/ou padrão de distribuição, mostrou uma maior ocorrência de animais com pelagem preta (56,1%), a qual aliada ao aspecto fenotípico, indica uma maior concentração de sangue de animais de raça leiteira, comum e de grande disponibilidade na região.

Contudo, não foi constatada a influência da cor da pelagem nos índices de animais prenhes e não prenhes, levando em consideração o tamanho amostral (164 receptoras). A ausência de relatos a respeito da cor da pelagem torna mais difícil uma discussão, porém, não significa que essa abordagem deva ser descartada, uma vez que pode refletir em um maior conforto térmico para o animal, diminuindo os riscos de estresse.

Certamente, a redução do estresse térmico, principalmente sob nossas condições, implicaria em melhor ingestão de alimentos e, conseqüentemente, afetaria o balanço energético e a condição corporal. Tais fatores foram considerados de importância por Broadbent et al. (1991) para uma performance reprodutiva satisfatória da receptora.

O estresse tem uma influência adversa sobre todos os aspectos da reprodução e pode advir de uma série de fontes (MABERG, 1976). Diversos autores (GWAZDAUSKAS et al., 1981; BADINGA et al., 1993; RUTLEDGE, 2001) têm demonstrado que os índices de prenhez, a partir de IA ou monta natural, caem dramaticamente devido ao estresse pelo calor.

Esses achados foram confirmados por Ryan et al. (1993) e EALY et al. (1993), os quais relataram efeito deletério da temperatura sobre o embrião, em trabalhos conduzidos *in vitro* e *in vivo*, respectivamente. Entretanto, Putney et al. (1989), em estudo retrospectivo de transferência de embriões não encontrou evidências de sazonalidade.

A opção por animais mestiços, os quais se adaptam mais facilmente às condições de manejo, clima e nutrição, além da disponibilidade local, são critérios concordes com Turner et al. (1968).

Uma menor susceptibilidade ao estresse nutricional e a doenças, também, fazem parte do rol de critérios adotados para a seleção da receptora, e encontra respaldo em Broadbent et al. (1991).

Visando um diagnóstico precoce de prenhez e subsequente determinação do sexo dos fetos, as receptoras foram submetidas a dois exames ultra-sonográficos, respectivamente aos 26-28 e 50-52 dias, contados a partir da data de transferência dos embriões.

O presente estudo mostrou que é possível obter aceitável índice de prenhez (38,0%) ao se transferir embriões bovinos produzidos *in vitro*. Contudo, esse percentual reflete o atual estágio de desenvolvimento da técnica de FIV e corresponde a um índice bem inferior aos obtidos com embriões oriundos de TE, cujos resultados giram ao redor de 70-80% para embriões transferidos a fresco e de 40-50% para os criopreservados.

Porém, sabidamente a viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* é inferior aos obtidos através de TE (GREVE, 1992; GREVE et al. 1993), e segundo Avery e Greve (1995), isso provavelmente acontece devido às alterações morfo-funcionais que ocorrem *in vitro*.

Os resultados referentes aos índices de prenhez serão discutidos quando abordada a influência do grau de qualidade e do estágio de desenvolvimento do embrião no estabelecimento da prenhez.

Ao segundo exame ultra-sonográfico, entre 50-52 dias da TE, constatou-se que 7,9% das receptoras diagnosticadas como prenhes aos 26-28 dias, haviam perdido seus conceitos durante o período embrionário e/ou fetal. Isso correspondeu a um índice final de prenhez, da ordem de 35%.

Como não houve um monitoramento da prenhez, as perdas ocorridas não foram classificadas em embrionárias ou fetais.

De acordo com Hubbert (1974), a interrupção da prenhez é maior durante o período embrionário do que no fetal, e seus achados foram confirmados por Makette et al. (1985) e Farin e Farin (1995), os quais demonstraram que o término da prenhez, após transferência de embriões bovinos produzidos *in vitro*, ocorre freqüentemente antes do 21^o dia de gestação.

O índice de 7,9% observado no presente trabalho, independentemente de ser de origem embrionária ou fetal, foi similar aos percentuais de 10 a 12% de morte embrionária tardia (27 a 42 dias), relatados por Van Cleeff et al. (1992), Smith e Stevenson (1995) e Vasconcelos et al. (1997).

Perdas fetais ao redor de 8% foram relatadas por Boyd et al. (1969), Kastelic (1996) e Vasconcelos et al. (1997), concordando com os achados deste estudo.

Entretanto, índices de 20 a 40% de perdas mencionadas por Allen (1997), discordam do presente resultado. Independentemente do período e causa da perda embrionária, o conceito parece ser expulso e não reabsorvido (Kastelic, 1996).

A incidência de aborto em receptoras que receberam embriões de FIV, de acordo com Farin et al. (2001), King et al. (1985) e Hasler et al. (1987), é relativamente baixa após dois meses de gestação, mas não foi alvo de avaliação no presente trabalho.

A perda fetal após a transferência de embriões de FIV é muito maior do que para embriões de TE (KING et al., 1985; HASLER et al., 1987).

O sistema de produção pode afetar o índice de abortos (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000). Esses autores demonstraram que a percentagem de fetos abortados foi maior em embriões produzidos *in vitro* (2,6%) do que através de TE (1,1%) ou IA (1,3%).

Diversos fatores têm sido levantados para explicar a mortalidade embrionária ou fetal, entre eles: anormalidades cromossômicas (KING, 1991), estado nutricional (MCCLURE, 1970), dieta (SPITZER et al., 1978), re-utilização da receptora (TANABE et al., 1985), perfil endócrino (GUSTAFSSON et al., 1986),

estresse (PUTNEY et al., 1988), assincronia (ROBERTS et al., 1999), corpo lúteo deficiente (HUNTER, 1991), meios de FIV (THOMPSON, 2000) e qualidade do ovócito (SINCLAIR et al., 2000).

Além disso, placentas de embriões de FIV têm defeitos de desenvolvimento (WELLS et al., 1999; FARIN et al., 2000). Problemas associados com diminuição do contato materno-fetal tanto macroscópico quanto microscópico (FARIN et al. 2000), provavelmente leva a um estresse fetal, promovendo mudanças nas trocas gasosas e de nutrientes entre mãe-feto, com posterior aborto.

A exposição à determinadas condições *in vitro*, durante os primeiros sete dias de vida, pode influenciar a morfologia do embrião, a expressão gênica e o desenvolvimento da placenta materna e fetal (FARIN et al., 2001).

Entretanto, muito ainda precisa ser entendido sobre a interrelação de fatores que atuam para assegurar a prenhez e os mecanismos que podem interromper esse delicado processo de início da vida.

O potencial de desenvolvimento de um embrião *in vivo*, após maturação e fertilização do ovócito e cultura do mesmo, por alguns dias, *in vitro*, é difícil de prever. Esforços têm sido direcionados para o estabelecimento de testes para avaliar a qualidade e viabilidade embrionária pré-transferência.

No entanto, o estabelecimento da gestação em receptoras de embriões é um evento multifatorial, o qual envolve a interação de vários fatores (FARIN et al., 2001).

Os resultados de prenhez estão diretamente relacionados com a qualidade do embrião e o estágio de desenvolvimento, independentemente de ter sido produzido *in vivo* ou *in vitro*. A análise morfológica do embrião, antes da

transferência, é o método mais comum e subjetivo empregado para avaliar o potencial do mesmo para estabelecer e levar uma gestação a termo.

O grau de qualidade atribuído leva em consideração diversas características, incluindo a cor, homogeneidade e tamanho do blastômero, granulação do citoplasma e grau de fragmentação do blastômero (OVERSTRÖM, 1997).

A classificação adotada, agrupando os embriões em quatro categorias (1 a 4), revelou significativa diferença nos percentuais de prenhez a favor dos embriões de grau 1, estando em concordância com os achados de Shea (1981), Lindner e Wright (1983), Hasler et al. (1995), Hasler et al. (1987), Boland et al. (1989), Farin et al. (1995), Farin et al. (1999) e Hasler et al. (2002), os quais obtiveram maiores índices de prenhez ao transferirem embriões de grau 1 (excente).

Discordaram, contudo, dos resultados de Looney et al. (1984), Markette et al. (1985), Van Wagtendonk et al. (2000) e Spell et al. (2001), que relataram resultados semelhantes nos índices de prenhez para embriões de graus 1 e 2.

Outros fatores como o tempo necessário para a maturação do ovócito, bem como interação dos gametas, podem influenciar na qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (GIANAROLI et al., 1996; DOMINKO; FIRST, 1997).

Importante salientar que, embora seja um método não invasivo, simples e rápido, a avaliação morfológica é um método subjetivo de análise que requer treinamento especializado e experiência para acuradamente classificar os embriões.

Os embriões, ainda que de um mesmo dia, podem estar em diferentes fases de desenvolvimento, afetando os índices de prenhez, principalmente se um adequado sincronismo não ocorrer com a receptora.

Neste estudo, todos os embriões eram do dia sete pós-fertilização e índices mais elevados de prenhez foram obtidos em receptoras que receberam embriões em estágio mais avançado de desenvolvimento, no caso, blastocisto expandido.

Diferença entre os estágios também foi descrita por Wright (1981), Looney et al. (1984) e Donaldson (1985a), porém, esses autores obtiveram índices maiores de prenhez com embriões ao estágio de blastocisto. Diferença também foi relatada por Hasler et al. (1987), contudo, mais animais prenhes resultaram de embriões aos estágios de blastocisto inicial e blastocisto.

Considerando a literatura consultada, a maioria dos autores não detectaram diferenças entre os diferentes estágios e os percentuais de prenhez, o que discorda do resultado mencionado neste trabalho.

Assim, Shea (1981), Lindner e Wright (1983), Spell et al. (2001) e Hasler et al. (2002) reportaram resultados semelhantes de prenhez, independentemente do estágio de desenvolvimento. Desta forma, não se pode afirmar categoricamente que determinado estágio está associado com maior proporção de prenhez.

Interessante que, Ealy et al. (1993), demonstraram que a tolerância térmica é adquirida à medida que o embrião envelhece, e que embriões em estágios mais avançados promoveriam maiores índices de prenhez.

Definidos os embriões a serem transferidos, os esforços se concentram na seleção das receptoras que receberão os embriões. Entre os critérios utilizados para tal seleção, a palpação de um corpo lúteo de tamanho e consistência adequados pode ser fator determinante a prenhez.

O exame ultra-sonográfico dos ovários, em bovinos, foi descrito com detalhes por Pierson e Ginther (1984a) e Edmondson et al. (1986) e utilizado para mensurar e definir suas características morfológicas (KASTELIC et al., 1990a; SINGH et al., 1997).

Embora esteja sendo introduzido na rotina de TE, no presente estudo, devido ao manejo adotado nas propriedades no dia da transferência, os animais foram selecionados com base na palpação do corpo lúteo, não sendo utilizado o ultra-som para avaliação do CL.

A mensuração dos corpos lúteos foi, então, realizada no dia da sexagem, aos 50-52 dias da TE, nos animais prenhes e não prenhes. O valor médio (1,85 cm) e máximo (2,65 cm) foram tomados com base nos diâmetros, conforme descrito anteriormente.

Esses diâmetros foram inferiores aos mencionados por Grygar et al. (1997), com média de 2,34 cm, para CL da gestação, e Spell et al. (2001), com 23,6 cm, para CL classificado com excelente. Esse maior diâmetro pode estar relacionado com o padrão de receptora utilizada, as quais eram cruzadas leiteiras ou puras (Angus), respectivamente, nos trabalhos dos primeiros e segundos autores citados.

Neste estudo foram utilizadas somente receptoras mestiças. Porém, resultados similares foram relatados por Garcia e Salaheddine (2000), com médias de 1,97cm e 1,93cm para animais prenhes e não prenhes, respectivamente.

A diferenciação e desenvolvimento do CL é essencial para uma adequada sincronização entre o embrião e o útero (THATCHER et al., 1994), assim como, uma secreção suficiente de progesterona é crítica na manutenção de um ambiente antiluteolítico (MANN;LAMMING, 1995).

Os resultados de prenhez, com base no tipo de CL avaliado, através de palpação por via retal, mostrou que CL tipo 1 (maior diâmetro), promoveu um maior índice de prenhez (53,8%) do que os tipos 2 e 3, em concordância com os achados de Baruselli et al. (2000) e Vasconcelos et al. (2001).

Segundo Vasconcelos et al. (2001), CLs maiores secretam mais progesterona e assim podem ter um efeito positivo no reconhecimento materno da prenhez, contrastando com Battocchio et al. (1999), os quais reportaram que o volume do CL pode não ser um bom critério para caracterização da capacidade do CL para secretar progesterona.

Resultados discordantes foram mencionados por Wright (1981), Remsen e Roussel (1982), Looney et al. (1984), Donaldson (1985b), Donaldson (1986), Coleman et al. (1987), Hasler et al. (1987) e Spell et al. (2001), os quais obtiveram índices de prenhez similares para diferentes tipos de CLs.

Porém, nem sempre existe uma correspondência entre o provável e o efetivo tamanho do CL, já que a palpação não deixa de ser um exame subjetivo.

Spell et al. (2001), relataram a ocorrência de maior número de gestações em receptoras que teriam sido rejeitadas por causa de um CL classificado como ruim à palpação, mas que na realidade eram maiores do que os classificados como excelentes e bons.

O lado de maior ocorrência do corpo lúteo deu-se no ovário direito (97/149; 65,1%), concordando com observações de Reece e Turner (1938), Hasler et al. (1980) e Hasler et al. (1987).

Contudo, não houve diferença entre os índices de prenhez para embriões transferidos para os cornos direito e esquerdo, correspondendo aos

resultados obtidos por Wright (1981), Hasler et al. (1980), Remsen e Roussel (1982) e Hasler et al. (2000).

O monitoramento dos folículos ovarianos através da ultra-sonografia tem se constituído numa poderosa ferramenta para o estudo da dinâmica folicular durante o ciclo estral (SIROIS; FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989a).

Poucos estudos têm sido efetuados sobre a dinâmica folicular durante a gestação. Não foi proposta do trabalho estudar tal fenômeno, mas a ocorrência, tamanho e número de folículos fizeram parte da avaliação ovariana ao momento da sexagem fetal.

O diâmetro médio observado neste estudo foi de 0,71 cm, com similar distribuição entre os ovários. Os diâmetros mínimo e máximo foram de 0,50 e 1,60 cm, respectivamente, com número médio de 1,16, folículos.

Considerando-se os animais prenhes e não prenhes, diferença significativa ocorreu com relação ao tamanho médio do folículo. Animais não prenhes, no dia do exame de sexagem, tiveram folículos maiores, provavelmente devido à emergência de uma onda folicular.

Achados semelhantes foram descritos por Pierson e Ginther (1986), Ginther et al. (1989a) e Taylor e Rajamanhendran (1991). Esses autores observaram que o padrão de onda de crescimento e regressão de grandes folículos, aos dias 60 e 70 de gestação, era similar ao de animais não prenhes.

Bergfelt et al. (1991), demonstraram que a emergência de uma onda folicular anovulatória, periódica e contínua, em novilhas prenhes, está associada com uma constante produção de progesterona. O desenvolvimento folicular no ovário com CL e ipsilateral ao concepto é retardado no início da gestação (THATCHER et al., 1994).

A determinação do sexo do feto tem diversas implicações na indústria animal (RIBADU; NAKAO, 1999), e desde a primeira descrição do uso da ultrasonografia para essa finalidade (MULLER; WITTKOWSKI, 1986), somente nos últimos anos a mesma tem sido empregada, ainda de forma bastante reduzida.

O sexo do feto pode ser detectado pela visualização do tubérculo genital (CURRAN et al., 1989) e/ou escroto e glândula mamária (MULLER; WITTKOWSKI, 1986).

O período mais apropriado para a sexagem fetal, segundo Ribadu e Nakao (1999), e confirmado neste trabalho, situa-se entre 57 e 59 dias de prenhez, fase em que a localização do útero e o tamanho do feto, facilitam o diagnóstico.

Exames mais tardios, ao redor de 90 dias, dificultam a determinação do sexo e aumentam as chances de erro de diagnóstico. No presente trabalho, obteve-se 100% de acertos nos diagnósticos, contrastando com os resultados de Marx (1994), com 3,7% de diagnósticos incorretos, de Stroud (1996), o qual obteve 3,0% de erros, e mais recentemente, com resultados de Barros e Visintin (2001), relatando erros da ordem de 2,4 e 3,9%.

A distribuição de sexos de bezerros produzidos através de inseminação artificial (IA) tem sido ao redor de 1:1, com 52,9% de machos e 47,1% de fêmeas (FOOTE, 1975). Essa tendência também prevalece entre embriões e bezerros produzidos através de programas de TE (KING et al., 1991; KING et al., 1995). Tais dados estão em concordância com os achados deste trabalho, os quais mostraram resultados similares na distribuição de sexos entre fetos macho (52,3%) e fêmea (47,7%).

Vários autores relataram que essa proporção difere quando se trata de embriões produzidos *in vitro* (VAN SOOM; DE KRUIF, 1992; MASSIP et al., 1995; HASLER et al., 1995; KOCHHAR et al., 2001), contrariando nossos achados.

A proporção de sexo, de embriões produzidos *in vitro*, varia de acordo com o método de produção, cultura e análise (BERNARDI; DELOUIS, 1996; GUTIERREZ-ADAN et al., 2001b; LARSON et al., 2001). Em geral, a distorção entre a relação de sexo de embriões de FIV tem sido atribuída à composição do meio (LECHNIAK et al., 2003).

Levando-se em consideração a distribuição de sexo, em relação aos estágios, mais fetos fêmea resultaram de blastocistos expandidos e blastocistos. No caso de fetos macho, além de BI e Bx, Bi.

Tais resultados discordam dos achados de Carvalho et al. (1996), Pergoraro et al. (1998), Hasler et al. (2002), os quais mostraram uma maior ocorrência de fetos fêmeas, a partir de mórulas e blastocistos iniciais; foram concordes quando se tratou de fetos machos, para os quais estágios mais avançados caracterizaram esse gênero.

Nossos achados discordaram dos autores mencionados (CARVALHO et al., 1996; PERGORARO et al., 1998; HASLER et al., 2002), quando se considerou os estágios de desenvolvimento em relação à proporção de sexo. Assim, mais machos do que fêmeas resultaram de embriões ao estágio de blastocisto inicial.

O mecanismo para explicar a desigual distribuição de machos e fêmeas, a partir de embriões bovinos produzidos *in vitro*, envolve fatores favorecendo o espermatozóide com o cromossomo Y, antes da fertilização, e suporte preferencial ou uma seletiva vantagem, pós-fertilização, de embriões

machos sobre embriões fêmeas, sob condições *in vitro* (KOCHHAR et al., 2001; KOCHHAR et al., 2003),

Diversos pesquisadores têm relatado que embriões bovinos machos, oriundos de FIV, crescem mais rapidamente em cultura do que embriões fêmeas, durante os primeiros oito dias da fertilização (AVERY et al., 1989; AVERY et al., 1991; XU et al., 1991; YADAV et al., 1993; MARQUANT-LE GUIENNE et al., 1992; CARVALHO et al., 1996; KOCHHAR et al., 2001).

Entretanto, essa afirmativa contraria os nossos achados, pois 79,7% dos embriões sexados como fêmea corresponderam aos estágios de B e Bx, contra 65,4% de machos.

A proporção de sexos de embriões produzidos *in vitro* varia de acordo com o método de produção, cultura e análise (BERNARDI; DELOUIS, 1996; GUTIERREZ-ADAN et al., 2001; LARSON et al., 2001). Em geral, a distorção entre a relação de sexo de embriões de FIV tem sido atribuída à composição do meio (LECHNIAK et al., 2003).

A suplementação do meio com soro fetal e glucose influenciou a razão de sexo de blastocistos de FIV (GUTIERREZ-ADAN et al., 2001; LARSON et al., 2001). Larson et al. (2001), mostraram que na presença de glucose, em meio SOF, mais de 75% dos blastocistos eram machos.

As diferenças na velocidade de crescimento entre zigotos XX e XY sugerem que algum gene ligado ao cromossomo Y poderia expressar-se em fases muito precoces do desenvolvimento (ZWINGMAN et al., 1993; PERGAMENT et al., 1994).

A identificação das condições que levam ao desvio da proporção de sexo de 1:1, levaria ao desenvolvimento de métodos que poderiam alterar tal relação usando aplicação comercial.

6 Conclusões

A partir dos resultados obtidos podemos concluir que:

- Não houve diferença significativa ($P>0,969$) entre os diferentes tipos de pelagem e os índices de prenhez de animais prenhes e não prenhes
- Mais receptoras prenhes ($P<0,05$) resultaram de embriões classificados como de grau 1 (86,49%) do que os demais graus de qualidade, com resultados similares entre os graus 2 (8,78%) e 3 (4,05%)
- Não foi constatada diferença significativa ($P>0,2097$) entre os grupos de receptoras prenhes e não prenhes para a qualidade do embrião
- Maiores índices ($P<0,05$) de prenhez foram alcançados quando blastocistos expandidos foram transferidos (40,1%), em comparação com mórula (3,4%), blastocisto inicial (24,5%) e blastocistos (32,0%)
- Não foi detectada diferença ($P>0,8599$) entre os diâmetros dos corpos lúteos, segundo a cor da pelagem. Os valores variaram de $1,81\pm0,19$ a $1,88\pm0,30$
- A mensuração dos corpos lúteos mostraram valores mínimo, máximo e médio, respectivamente, de 0,95cm, 2,65cm e 1,85cm
- A mensuração dos folículos mostraram valores mínimo, máximo e médio, respectivamente, de 0,50cm, 1,60cm e 0,71cm
- Mais corpos lúteos foram detectados no ovário direito do que no esquerdo
- Nenhuma diferença ($P>0,378$) nos índices de animais prenhes e não prenhes em relação ao lado do corpo lúteo
- Maior percentagem ($P<0,05$) de corpos lúteos foram classificados com de grau 1 (55,9%), contra 33,6% e 10,5% dos tipos 2 e 3, respectivamente
- O tipo de corpo lúteo não influenciou ($P>0,221$) nos índices de animais prenhes e não prenhes

- O diâmetro (cm) dos corpos lúteos não foram diferentes ($P>0,0592$) entre animais prenhes e não prenhes, contudo, diferença ocorreu ($P>0,0078$) no diâmetro de folículos entre as duas categorias
- Nenhuma diferença foi observada ($P>0,774$) nos índices de animais prenhes e não prenhes em relação ao lado do folículo
- Mais ($P<0,05$) fetos fêmea originaram de Bx (43,5%) e BI (36,2) do que Bi (17,4%) e Mo (2,9%). De maneira similar, maior percentual ($P<0,05$) de fetos machos foram obtidos a partir de Bx (37,2%), BI (28,2%) e Bi (30,8%), entre estágios de desenvolvimento
- Maior percentagem ($P<0,05$) de fetos machos (66,67%) do que fêmea (33,33%) foi constatada quando considerado os resultados dentro de cada categoria de desenvolvimento embrionário
- Considerando os sexos, independentemente do desenvolvimento embrionário, nenhuma diferença ($P>0,05$) foi observada na proporção de sexos (47,7% vs, 52,3%), respectivamente para fetos fêmea e macho.

Concluindo, tanto a receptora quanto o embrião podem interferir no processo de estabelecimento da prenhez, e o embrião produzido *in vitro* pode influenciar na razão de sexos.

A intensificação de uso de métodos para a avaliação de receptoras, bem como a determinação de testes para análises morfo-funcionais de embriões, visando uma efetiva qualificação destes, são objetivos a serem perseguidos na expectativa de prever o potencial de receptoras e embriões no estabelecimento de prenhez.

Da mesma forma, esforços na identificação de condições que possam controlar o desvio da proporção de sexo, poderia levar ao desenvolvimento de métodos que alterassem tal relação, direcionando sua aplicação comercial.

Referências

AHMAD, N.; TOWNSEND, E. C.; DAILEY, R. A. et al. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 49, p. 13-28, 1997.

ALLEN, G. P. The pregnancy that doesn't stay-lessons from 25 years of observation. **Vet. J.**, v. 153, p. 239-244, 1997.

ALLEN, W. M.; WINTERSTEINER, O. Crystalline progestin. **Science**, v. 80, p. 190-191, 1934.

AVERY, B.; GREVE, T. Apparent abnormalities of *in vitro* produced bovine embryos. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM SIPZ, 30, 1995. **Proceedings...** p. 171-183.

AVERY, B.; BACK, A.; SCHMIDT, T. Differential cleavage rates and sex determination in bovine embryos. **Theriogenol.**, v. 32, p. 139-147, 1989.

AVERY, B.; BACK, A.; SCHMIDT, T. Sex and development in bovine *in vitro* fertilized embryos. **Theriogenol.**, v. 35, p. 953-963, 1991.

BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; THATCHER, T. et al. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenol.**, v. 39, p. 797-810, 1993.

BARROS, B. J. P.; VISINTIN, J. A. Controle ultra-sonográfico de gestações, de mortalidades embrionárias e fetais e do sexo de fetos bovinos zebuínos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 38, p. 74-79, 2001.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T. et al. Aumento da taxa de prenhez em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo "ovsynch" com ovulação em tempo fixo. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 28, p. 216, 2000.

BATTOCCHIO, M.; GABAI, G.; MOLLO, A. et al. Agreement between ultrasonic classification of the CL and plasma progesterone concentrations in dairy cows. **Theriogenol.**, v. 51, p. 1059-1069, 1999.

BAVISTER, B. D.; ROSE-HELLEKANT, T. A.; PINYOPUMMINTR, T. Development of *in vitro* matured/*in vitro* fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenol.**, v. 37, p. 127-146, 1992.

BAXTER, S. J.; WARD, W. R. Incidence of fetal loss in dairy cattle after pregnancy diagnosis using an ultrasound scanner. **Vet. Rec.**, v. 140, p. 287-288, 1997.

BERGFELT, D. R.; KATELIC, J. P.; GINTER, O. J. Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone treated heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 24, p. 193-204, 1991.

BERNARDI, M. L.; DELOUIS, C. Sex related differences in the developmental rate of *in vitro* matured/ *in vitro* fertilized ovine embryos. **Hum. Reprod.**, v. 11, p. 621-626, 1996.

BETTERIDGE, K. J.; EAGLESOME, M. D.; RANDALL, G. C. B. et al. Collection, description and transfer of embryos 10-16 days after oestrus in cattle. **J. Reprod. Fertil.**, v. 59, p. 205-216, 1980.

BINELLI, M.; THATCHER, W. W.; MATTOS, R. et al. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. **Theriogenol.**, v. 56, p. 1451-1463, 2001.

BOLAND, M. P.; CROSBY, T. F.; GORDON, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. **Theriogenol.**, v. 10, p. 175-180, 1989.

BOYD, H.; BACSICH, P.; YOUNG, A. Fertilization and embryonic survival in dairy cattle. **Brit. Vet. J.**, v. 125, p. 87-97, 1969.

BOYD, J. S.; OMRAN, S. N. Diagnostic ultrasonography of bovine female reproductive tract. **In Practice**, v. 13, p. 109-118, 1991.

BUTLER, J. E.; BIGGERS, J. D. Assessing the viability of preimplantation embryo *in vitro*. **Theriogenol.**, v. 31, p. 115-126, 1989.

BROADBENT, P. J.; STEWART, M.; DOLMAN, D. F. Recipient management and embryo transfer. **Theriogenol.**, v. 35, p. 125-139, 1991.

CARVALHO, R. V.; DEL CAMPO, M. R.; PALATSZ, Y. et al. Survival rates and sex ratio of bovine IVF embryos frozen at different developmental stages on day 7. **Theriogenol.**, v. 45, p. 489-498, 1996.

COLEMAN, D. A.; DAILEY, R. A.; LEFFEL, R. E. et al. Estrous synchronization and establishment of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. **J. Dairy Sci.**, v. 70, p. 858-866, 1987.

CURRAN, S.; GINTHER, O. J. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. **Theriogenol.**, v. 36, p. 809-814, 1991.

CURRAN, S.; KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Determining sex of bovine fetus by ultrasonic assessment of the relative location of the genital tubercle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 19, p. 217-227, 1989.

DAVIS, M. E.; HARVEY, W. R.; BISHOP, M. D. et al. Use of embryo transfer to induce twinning in beef cattle: embryos survival rate, gestation length, birth weight and weaning weight of calves. **J. Anim. Sci.**, v. 67, p. 301-310, 1989.

DOMINKO, T.; FIRST, N. L. Relationship between maturational state of oocytes at the time of insemination and sex ratio of subsequent early bovine embryos. **Theriogenol.**, v. 47, p. 1041-1050, 1997.

DONALDSON, L. E. Matching of embryo stages and grades with recipient oestrus synchrony in bovine embryo transfer. **Vet. Rec.**, v. 117, p. 489-491, 1985a.

DONALDSON, L. E. Recipients as a source of variation in cattle embryo transfer. **Theriogenol.**, v. 23, p. 188, 1985b.

DONALDSON, L. E. Day of embryo collection, quality and pregnancy rates in cattle. **Vet. Rec.**, v. 118, p. 661-663, 1986.

DOWNS, S. M.; DOW, M. P. D. Hypoxanthine-maintained 2-cell block in mouse embryos: dependence of glucose and effect of hypoxanthine phosphoribosyltransferase inhibitors. **Biol. Reprod.**, v. 44, p. 1025-1039, 1991.

DRIANCOURT, M. A.; THATCHER, W. W.; TEREQUI, M. et al. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. **Dom. Anim. Endocr.**, v. 8, p. 21-37, 1991.

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

EDMONDSON, A. J.; FISSORE, R. A.; PASHEN, R. L. et al. The use of ultrasonography for the study of the bovine reproductive tract I. Normal and pathological ovarian structures. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 12, p. 157-165, 1986.

FARIN, C. E.; MOELLER, C. L.; SAWYER, H. R. et al. Morphometric analysis of cell types in the ovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biol. Reprod.**, v. 35, p. 1299-1308, 1986.

FARIN, P. W.; FARIN, C. E. Transfer of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*: survival and fetal development. **Biol. Reprod.**, v. 52, p. 697-703, 1995.

FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenol.**, v. 55, p. 151-170, 2001.

FARIN, P. W.; SLENNING, B. D.; BRITT, J. H. Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Theriogenol.**, v. 52, p. 659-670, 1999.

FARIN, P. W.; BRITT, J. H.; SHAW, D. W. et al. Agreement among evaluators of bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Theriogenol.**, v. 44, p. 339-350, 1995.

FARIN, P. W.; STOCKBURGER, E. M. RODRIGUEZ, K. F. et al. Placental morphology is altered following transfer of bovine embryos produced *in vitro*. **Theriogenol.**, v. 53, p. 474, 2000.

FOOTE, R. H. Semen quality from the bull to the freezer: an assessment. **Theriogenol.**, v. 3, p. 219-235, 1975.

FORTUNE, J. E.; SIRIOS, J.; QUIRK, S. M. et al. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrous cycle. **Theriogenol.**, v. 29, p. 95-109, 1988.

FRANKEL, L. Die function des corpus luteum. **Arch. Gynaekol.**, v. 68, p. 438-443, 1903.

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Ultrasonic morphology of the corpora lutea and central luteal cavities during selection of recipients for embryo transfer. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 35, p. 113-118, 2000.

GIANAROLI, L.; FIORENTINO, A.; CRISTINA, M. M. et al. Prolonged sperm oocyte exposure and high sperm concentration affect human embryo viability and pregnancy rate. **Hum. Reprod.**, v. 11, p. 2507-2511, 1996.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOFF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 20, p. 187-200, 1989a.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOFF, L. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. **Theriogenol.**, v. 32, p. 787-795, 1989b.

GINTHER, O. J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J. P. Ovarian follicles dynamics in heifers during early pregnancy. **Biol. Reprod.**, v. 41, p. 247-254, 1989c.

GREVE, T. In vitro embryotechnologies in cattle with particular reference to their use in cattle breeding schemes. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 27, p. 22-28, 1992.

GREVE, T.; AVERY, B.; CALLESEN, H. Viability of in vivo and *in vitro* produced bovine embryos. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 28, p. 164-169, 1993.

GRYGAR, I.; KUDLAC, E.; DOLEZEL, R. et al. Volume of luteal tissue and concentration of serum progesterone in cows bearing homogeneous corpus luteum or corpus luteum with cavity. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 49, p. 77-82, 1997.

GUSTAFSSON, H.; LARSSON, K.; KINDAHL, H. et al. Sequential endocrine changes and behavior during oestrus and metoestrus in repeat breeder and virgin heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 10, p. 261-273, 1986.

GUTIERREZ-ADAN, A.; GRANADOS, J.; PINTADO, B. et al. Influence of glucose on the sex ratio of bovine IVM/IVF embryos cultured *in vitro*. **Reprod. Fertil. Develop.**, v. 13, p. 361-365, 2001a.

GUTIERREZ-ADAN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D. et al. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenol.**, v. 55, p. 1117-1126, 2001b.

GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ, G. S.; GRANADOS, J. et al. Relationship between sex ratio and time of insemination according to both time of ovulation and maturation state of oocyte. **Zigote**, v. 7, p. 37-43, 1999.

GWAZDAUSKAS, F. C.; THATCHER, W. W.; KIDDY, C. A. et al. Hormonal patterns during heat stress following PGF_{2α} than salt induced luteal regression in heifers. **Theriogenol.**, v. 16, p. 271-285, 1981.

HASLER, J. F. *In vitro* production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. **Hum. Reprod.**, v. 15, p. 47-58, 2000.

HASLER, J. F.; BOWEN, R. A.; NELSON, L. D. et al. Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfer. **J. Reprod. Fertil.**, v. 58, p. 71-77, 1980.

HASLER, J. F.; CARDEY, E.; STOKES, J. E. et al. Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. **Theriogenol.**, v. 58, p. 1457-1469, 2002.

HASLER, J. F.; HENDERSON, W. B.; HURTGEN, P. J. et al. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenol.**, v. 43, p. 141-152, 1995.

HASLER, J. F.; MCCAULEY, A. D.; LATHROP, W. F. et al. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. **Theriogenol.**, v. 27, p. 139-168, 1987.

HUBBERT, W. T. Factors affecting survival of the bovine fetus and neonate. **Theriogenol.**, v. 1, p. 15-34, 1974.

HUNTER, M. G. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. **J. Reprod. Fert.**, v. 43, p. 91-99, 1991.

IRELAND, J. J.; MURPHEE, R. L.; COULSON, P. B. Accuracy of predicting stages of bovine estrous cycle by gross appearance of the corpus luteum. **J. Dairy Sci.**, v. 63, p. 155-160, 1980.

KASTELIC, J. P. Embryonic development and embryonic loss in cattle. In: ANNUAL MEETING, 1996, Jeeksonville. **Proceedings** ... Jeeksonville: Society for Theriogenology, 1996. p. 117-127.

KASTELIC, J. P.; BERGEFELT, D. R.; GINTER, O. J. Relationship between ultrasonic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration in heifers. **Theriogenol.**, v. 33, p. 1269-1278, 1990a.

KASTELIC, J. P.; NORTHEY, D. L.; GINTER, O. J. Spontaneous embryonic death on days 20 to 40 in heifers. **Theriogenol.**, v. 35, p. 351-363, 1991.

KASTELIC, J. P.; PIERSON, R. A.; GINTER, O. J. Ultrasonic morphology of corporea lutea and central cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers. **Theriogenol.**, v. 34, p. 487-498, 1990b.

KING, K. K.; SEIDEL, J. G. E.; ELSDEN, R. P. Bovine embryo transfer pregnancies. I. Abortion rates and characteristics of calves. **J. Anim. Sci.**, v. 61, p. 747-757, 1985.

KING, W. A. Embryo-mediated pregnancy failure in cattle. **Can. Vet. J.**, v. 32, p. 99-103, 1991.

KING, W. A.; SUPPLIZI, A. V.; DIOP, H. et al. Chromosomal analysis of embryos produced by artificially inseminated superovulated cattle. **Genet. Sel. E.**, v. 27, p. 189-194, 1995.

KING, W. A.; YADAV, B. R.; XU, K. P. et al. The sex ratios of bovine embryos produced in vivo and *in vitro*. **Theriogenol.**, v. 36, p. 779-788, 1991.

KNOFF, L.; KASTELIC, J. P.; SCHALLENBERGER, E. et al. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Dom. Anim. Endocr.**, v. 6, p. 111-119, 1989.

KOCHHAR, H. S.; PEIPPO, J.; KING, W. A. Sex related embryo development. **Theriogenol.**, v. 55, p. 3-14, 2001.

KOCHHAR, H. S.; KOCHHAR, K. P.; BASRUR, P. K. et al. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rates and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 77, p. 33-49, 2003.

LARSON, A. M.; KIMURA, K.; KUBISCH, H. M. et al. Sexual dimorphism among bovine embryos in their ability to make the transition to expanded blastocyst and in the expression of the signaling molecule IFN- τ . In: ACADEMIC SCIENCE, 1998. USA. **Proceedings** ..., USA, 2001. p. 9677-9682.

LAZAR, L.; MARACEK, I. Growth and development of follicles in different phases of the oestrous cycle in cows in relation to the presence of the corpus luteum and na oestrogen-dominant follicle. **Vet. Med.**, v. 39, p. 653-661, 1994.

LECHNIAK, D.; STRABEL, T.; BOUSQUET, D. et al. Sperm pre-incubation prior to insemination affects the sex ratio of bovine embryos produced *in vitro*. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 38, p. 224-227, 2003.

LINDNER, G. M.; WRITH, R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenol.**, v. 20, p. 407-416, 1983.

LOONEY, C. R.; ODEN, A. J.; MASSEY, A. M. et al. Pregnancy rates following HCG administration at the time of transfer in embryo-recipient cattle. **Theriogenol.**, v. 21, p. 246, 1984.

MABERG, G. P. Effects of environment and management stress on reproduction in the dairy cow. **J. Dairy Sci.**, v. 59, p. 1618-1624, 1976.

MANN, G. E.; LAMMING, G. E. Progesterone inhibition of the development of the luteolytic signal in cows. **J. Reprod. Fertil.**, v. 104, p. 1-5, 1995.

MARKETTE, K. L.; SEIDEL, J. G. E.; ELSDEN, R. P. Estimation of embryonic losses in bovine embryo transfer recipients from progesterone profiles and returns to estrus. **Theriogenol.**, v. 23, p. 45-52, 1985.

MARQUANT-LE GUIENNE, B.; NIBART, M.; GUYADER, C. et al. DNA probe sexing of young *in vitro* fertilized bovine embryos. **Theriogenol.**, v. 37, p. 253, 1992.

MASSIP, A.; MERMILLOD, P.; DINNEYS, A. Morphology and biochemistry of *in vitro* produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Hum. Reprod.**, v. 10, p. 3004-3011, 1995.

MASSIP, A.; MERMILLOD, P.; VAN LANGENDONCKT, A. et al. Survival and viability of fresh and frozen-thawed *in vitro* bovine embryos. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 35, p. 3-10, 1995.

MCCLURE, T. J. An experimental study of the causes of a nutritional and lactational stress infertility of pasture-fed cows, associated with loss of bodyweight at about the time of mating. **Res. Vet. Sci.**, v. 2, p. 247-254, 1970.

MULLER, E.; WITTOWSKI, G. Visualization of male and female characteristics of bovine fetuses by real-time ultrasonics. **Theriogenol.**, v. 25, p. 571-574, 1986.

NISWENDER, G. D.; JUENGEL, J. L.; MCGUIRE, W. J. et al. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. **Biol. Reprod.**, v. 50, p. 239-247, 1994.

NORTHEY, D. L.; FRENCH, L. R. Effect to embryo removal and intrauterine infusion of embryo homogenates on the lifespan of the bovine corpus luteum. **J. Anim. Sci.**, v. 50, p. 205-216, 1980.

O'SHEA, J. D.; CRAN, D. G.; HAY, M. F. Fate of the theca interna following ovulation in the ewe. **Cell Tissue Res.**, v. 210, p. 305-319, 1980.

OTT, R. S.; BRETZLAFF, K. N.; HIXON, J. E. Comparison of palpable corporea lutea with serum progesterone concentrations in cows. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 188, p. 1417-1419, 1986.

OVERSTROM, E. W. Objective assessment of embryo quality. Proc. of the 16th Annual Convention of AETA, October 5-7, 1997 Madison, WI.

PARK, S. B.; IM, S. K.; WOO, J. S. et al. The usefulness of plasma urea nitrogen test as an indicator for recipient selection for bovine embryo transfer. **Theriogenol.**, v. 53, p. 315, 2000.

PEGORARO, L. M. C.; THUARD, J. M.; DELALLEAU, N. et al. Comparison of sex ratio and cell number of IVM-IVF bovine blastocysts co-cultured with bovine oviduct epithelial cells or with vero cells. **Theriogenol.**, v. 49, p. 1579-1590, 1998.

PERGAMEN, E.; FIDDLER, M. B.; CHO, N. et al. Sexual differentiation and preimplantation cell growth. **Hum. Reprod.**, v. 9, p. 1730-1732, 1994.

PIERSON, R. A.; GINTER, O. J. Ultrasonography of the bovine ovary. **Theriogenol.**, v. 21, p. 495-504, 1984a.

PIERSON, R. A.; GINTER, O. J. Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers. **Theriogenol.**, v. 22, p. 225, 1984b.

PIERSON, R. A.; GINTER, O. J. Ovarian follicular populations during early pregnancy in heifers. **Theriogenol.**, v. 26, p. 649-659, 1986.

PIERSON, R. A.; GINTER, O. J. Reliability of diagnostic ultrasonography for identification and measurement of follicles and detection of the corpus luteum in heifers. **Theriogenol.**, v. 28, p. 929-936, 1987.

PIERSON, R. A.; GINTER, O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenol.**, v. 29, p. 21-37, 1988.

PIERSON, R. A.; KASTELIC, J. P.; GINTER, O. J. Basic principles and techniques for transrectal ultrasonography in cattle and horses. **Theriogenol.**, v. 29, p. 3-20, 1990.

PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Embryonic development in dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between days 1 to 7 post insemination. **Theriogenol.**, v. 30, p. 195-209, 1988.

PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. **Theriogenol.**, v. 31, p. 765-778, 1989.

REECE, R. P.; TURNER, C. W. The functional activity of the right and left bovine ovary. **J. Dairy Sci.**, v. 21, p. 37-39, 1938.

REICHENBACH, H. D.; LIEBRICH, J.; BERG, U. et al. Pregnancy rates and births after unilateral or bilateral transfer of bovine embryos produced *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v. 95, p. 363-370, 1992.

REINDERS, J. M. C.; WURTH, Y. A.; KRUIP, T. A. M. From embryo to calf after transfer of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenol.**, v. 43, p. 306, 1995.

REMSEM, L. G.; ROUSSEL, J. D. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. **Theriogenol.**, v. 18, p. 365-372, 1982.

RENARD, J. P.; MENEZO, Y.; HEYMAN, Y. Alternative tests to assess viability of bovine embryos. **Theriogenol.**, v. 17, p. 106, 1982.

RIBADU, A. Y.; NAKAO, T. Bovine reproductive ultrasonography: a review. **J. Reprod. Devel.**, v. 45, p. 13-28, 1999.

RIBADU, A. Y.; WARD, W. R.; DOBSON, H. Comparative evaluation of ovarian structures in cattle by palpation per rectum, ultrasonography and plasma progesterone concentration. **Vet. Rec.**, v. 135, p. 452-457, 1994.

RIEGER, D. Relationship between early energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenol.**, v. 37, p. 75-93, 1992.

ROBERTS, R. M.; EALY, A. D.; ALEXENKO, A. P. et al. Trophoblast interferons. **Placenta**, v. 20, p. 259-264, 1999.

ROBERTS, R. M.; SCHALUE-FRANCIS, T.; FRANCIS, H. et al. Maternal recognition of pregnancy and embryonic loss. **Theriogenol.**, v. 33, p. 175-183, 1990.

RONDEAU, M.; GUAY, P.; GOFF, A. K. et al. Assessment of embryos potential by visual and metabolic evaluation. **Theriogenol.**, v. 44, p. 351-366, 1995.

RORIE, R. W. Effect of timing of artificial insemination on sex ratio. **Theriogenol.**, v. 52, p. 1273-1280, 1999.

RYAN, D. P.; PRICHARD, J. K.; KOPEL, E. et al. Comparing early embryo mortality in dairy cows during hot and cool seasons of the year. **Theriogenol.**, v. 39, p. 719-737, 1993.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT software**: changes and enhancements through release 6. 12. Carv: Statistical Analysis Institute. 1997. 1167 p.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J. Reprod. Fert.**, v. 83, p. 663-671, 1988.

SHEA, B. F. Evaluating the bovine embryo. **Theriogenol.**, v. 15, p. 31-42, 1981.

SINGH, J.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P. Ultrasound image attributes of the bovine corpus luteum: structural and functional correlates. **J. Reprod. Fertil.**, v. 109, p. 35-44, 1997.

SINCLAIR, K. D.; KURAN, M.; GEBBIE, F. E. et al. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. **J. Anim. Sci.**, v. 78, p. 2670-2680, 2000.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biol. Reprod.**, v. 39, p. 308-317, 1988.

SMITH, M. W.; STEVENSON, J. S. Fate of the dominant follicle, embryonal survival, and pregnancy rates in dairy cattle treated with prostaglandin F₂ α and progestins in the absence or presence of a functional corpus luteum. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 3743-3751, 1995.

SPELL, A. R.; BEAL, W. E.; CORAH, L. R. et al. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenol.**, v. 56, p. 287-297, 2001.

SPITZER, J. C.; NISWENDER, G. D.; SEIDEL, G. E. et al. Fertilization and blood levels of progesterone and LH in beef heifers on a restricted energy diet. **J. Anim. Sci.**, v. 46, p. 1071-1077, 1978.

STROUD, B. Fetal sexing by ultrasound. **Vet. Proc.**, v. 10, p. 653-659, 1996.

TAKEDA, T.; HOLLOWELL, S. V.; MCCAULEY, A. D. et al. Pregnancy rates with intact and split bovine embryos transferred surgically and nonsurgically. **Theriogenol.**, v. 25, p. 204, 1986.

TANABE, T. Y.; HAWK, H. W.; HASLER, J. F. Comparative fertility of normal and repeat-breeding cows as embryo recipients. **Theriogenol.**, v. 23, p. 687-696, 1985.

TAYLOR, C.; RAJAMANHENDRAN, R. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 74, p. 115-123, 1991.

THATCHER, W. W.; BINELLI, M.; BURKE, J. et al. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. **Theriogenol.**, v. 47, p. 131-140, 1997.

THATCHER, W. W.; SOTA, R. L.; SCHIMITT, E. J. P. et al. Control and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility. **Repro. Fertil. Dev.**, v. 8, p. 203-217, 1996.

THATCHER, W. W.; STAPLES, C. R.; DANET-DESNOYERS, G. et al. Embryo health and mortality in sheep and cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 72, p. 16-30, 1994.

THOMPSON, J. G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 60-61, p. 263-275, 2000.

TURNER, J. W.; FARTHING, B. R.; ROBERTSON, G. L. Heterosis in reproductive performance of beef cows. **J. Anim. Sci.**, v. 27, p. 336-338, 1968.

VAN CLEEFF, J. K.; LUCY, M. C.; WILCOX, C. J. et al. Plasma and milk progesterone and plasma LH in ovariectomized lactating cows treated with new used controlled internal drug release devices. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 27, p. 91-106, 1992.

VAN SOOM, A.; KRUIF, A. A comparative study of in vivo and *in vitro* derived bovine embryos. Proceedings of 12th International Congress on Animal Reproduction, Netherlands, 1992, p. 1363-1365.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M.; MULLAART, E.; DE ROOS, A. P. W. et al. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenol.**, v. 53, p. 575-597, 2000.

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N. et al. Reduction in size of ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenol.**, v. 56, p. 307-314, 2001.

VASCONCELOS, J. L. M.; SILCOX, R. L.; LACERDA, J. A. et al. Pregnancy rate, pregnancy loss and response to heat stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. **Biol. Reprod.**, v. 56, p. 140, 1997.

VIANA, G. I.; MARX, D. Sex determination of bovine fetuses by ultrasonography. **Tierärztliche-Umschau**, v. 49, p. 484-486, 1994.

WELLS, D. N.; MISICA, P. M.; TERVIT, H. R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 996-1000, 1999.

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

WRIGHT, R. W.; ANDERSON, G. B.; CUPPS, P. T. et al. Successful culture *in vitro* of bovine embryos to the blastocyst stage. **Biol. Reprod.**, v. 14, p. 157-162, 1976.

- XU, K. P.; YADAV, B. R.; RORIE, R. W. et al. Sex related differences in developmental rates of bovine embryos produced *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 31, p. 249-252, 1991.
- ZAR, J. H. **Biostatistical analysis**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1998. 930 p.
- ZWINGMAN, T.; ERICKSON, R. P.; BOYER, T. Transcription of the sex-determining region genes SRY and Zfy in the mouse preimplantation embryo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 90, p. 814-817, 1993.