LAIS MENDES VIEIRA

Fatores associados à produção e à sobrevivência embrionária
em programas de superovulação e transferência de embriões
em fêmeas da raça Holandesa em clima tropical

São Paulo

2013

LAIS MENDES VIEIRA

Fatores associados à produção e à sobrevivência embrionária em programas de superovulação e transferência de embriões em fêmeas da raça Holandesa em clima tropical

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2013

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP.

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2749
FMVZ

Vieira, Lais Mendes

Fatores associados à produção e a sobrevivência embrionária em programas de superovulação e transferência de embriões em fêmeas da raça Holandesa em clima tropical / Lais Mendes Vieira. -- 2013.

96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2013.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Doadoras Holandesa. 2. Superovulação. 3. Produção in vivo de embriões. 4. Transferência de embriões. 5. Estresse térmico. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Fatores que influenciam a eficiência reprodutiva de doadoras e receptoras da raça holandesa de alta produção", protocolado sob o nº 2198/2011, não utilizando animais, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Factors affecting reproductive efficiency of high production Holstein donors and recipients", protocol number 2198/2011, not using animals, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: VIEIRA, Lais Mendes

Título: Fatores associados à produção e à sobrevivência embrionária em programas de superovulação e transferência de embriões em fêmeas da raça Holandesa em clima tropical

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedicatória

Aos meus queridos pais, Roberval Daiton Vieira e Maria Cristina Mendes Vieira, pelo amor, confiança e apoio, principalmente, nas decisões mais difíceis.

Aos meus irmãos, Tais Mendes Vieira, Roberval Daiton Vieira Júnior e Célia Bortolin Vieira, pela amizade, pelos conselhos e por serem meus exemplos de sucesso, nos quais me espelho.

Ao meu namorado, João Alves Salgado Neto, por me amar, compreender e, principalmente, por sempre me apoiar e encorajar a seguir.

As minhas sobrinhas, Helena Bortolin Vieira e Luíza Bortolin Vieira, por serem minha fonte de inspiração e alegria.

Dedico.

Agradeço

*Aos meus **queridos pais** que suportaram todas as minhas “andanças” nas estradas. À minha mãe que confia e apoia as minhas decisões, porém sempre preocupada com o meu bem-estar. Ao meu pai pelo apoio moral e financeiro, e por ser um exemplo de perseverança e de profissional. Obrigada, pai e mãe! Sem vocês eu não estaria aqui hoje.*

*Aos meus **irmãos, Taís, Roberval e Célia**, por acreditarem, compreenderem e me apoiarem em todos os momentos.*

*Ao meu **namorado, amigo e companheiro João**, pela paciência, carinho e amor nas horas mais difíceis. Obrigada pela compreensão e por sempre estar ao meu lado, me apoiando e me encorajando. Obrigada, amor!*

*Ao **Prof. Pietro**, exemplo de profissionalismo e dedicação. Sem dúvida, parte da minha carreira e amadurecimento pessoal se deve aos seus valiosos exemplos e conselhos. Obrigada Professor pela orientação, confiança, paciência e encorajamento.*

*Ao meu **grande amigo Carlos Alberto Rodrigues (Carlão)**, pois sem ele hoje não estaria aqui. Agradeço o constante aprendizado e as inúmeras oportunidades que me foram concedidas. Obrigada por ter acreditado e confiado em mim e no meu trabalho. Digo que tenho o meu pai biológico, Roberval, e o meu pai “veterinário”, Carlão. Muito obrigada!!*

*Às queridas **Harumi, Thais e Roberta** por todo apoio durante esse tempo no VRA. Vocês são nota dez.*

*Às minhas queridas **amigas e companheiras do apto. 31, Júlia (Gleyci) e Roberta (Japinha)**. Amizades que começaram por acaso, mas que não poderiam ser melhores!! Meninas, obrigada pelos inúmeros momentos de alegria e descontração! Obrigada pela excelente convivência!*

*Aos **amigos do grupo**, Roberta, Gustavo, Bruno, Mili, Rodrigo, Bruna Guerreiro, Tomás, Majo, Mariana e Gabriela. Obrigada pelo constante aprendizado e ajuda durante todo período do meu mestrado.*

Aos **amigos do departamento**, Miguel, Bruna Oliveira, Carina , Carolzinha, Profª. Camila, Profª. Cláudia, Profª. Mayra, Prof. Mário, Profª. Carla, Prof. Visintin e Prof. Ricardo. Obrigada pela excelente convivência durante esse período.

Aos meus amigos, **Alexandre Souza, José Nélío e Prof. Dr. Milo**. Obrigada pela paciência, pelos conselhos, sugestões, discussões e pelas constantes ajudas na estatística. Muito obrigada!

Aos meus amigos, **Manoel Sá Filho e Márcio Mendanha**. Sem dívida esse trabalho não existiria se não fosse a ajuda e colaboração de vocês. Os meus mais sinceros agradecimentos por cada minuto que deixaram de lado os seus afazeres para me ajudar. Muito obrigada!

Em especial, ao **Prof. Dr. José Eduardo P. Santos**, que desde o primeiro contato nunca hesitou em ajudar, principalmente, com a complexa análise estatística. Grande parte do mérito desse trabalho se deve a experiência e sabedoria que o senhor, constantemente, depositou. Muito obrigada pela imensa colaboração, paciência e constante atenção.

A todos da **fazenda Santa Rita – Agrindus**, em especial, ao Roberto e ao Jorge Jank, por terem disponibilizado a fazenda e os dados para que este estudo pudesse ser realizado; Beco, Thiago, Micky, Laércio, obrigada pelo companheirismo e pelo enorme apoio.

Aos **queridos companheiros de fazenda**: Péricles (Naim), Alessandra (Davida) e Andressa (Xu) , Bruna (P...) e Cecília (Purga). Obrigada por serem 100%. Davida, obrigada por todo o apoio e incentivo no momento da minha decisão em fazer ou não o mestrado.

À **Universidade de São Paulo** por ter me acolhido nesse etapa fundamental da minha carreira.

À **CAPES** pelo apoio financeiro durante a fase do mestrado.

E por fim, agradeço às **queridas vacas de leite**. Devo respeito a vocês.

RESUMO

VIEIRA, L. M. **Fatores associados à produção e à sobrevivência embrionária em programas de superovulação e transferência de embriões em fêmeas da raça Holandesa em clima tropical.** [Factors associated to embryo production and survival in superovulation and embryo transfer programs in Holstein females raised in tropical climate]. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A alta variabilidade na resposta aos tratamentos superovulatórios e na produção de embriões tem sido relacionada a causas multifatoriais. Além disso, são restritas as informações que relacionam fatores correlatos ao embrião à concepção. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de variáveis relacionadas às doadoras (categoria animal e época do ano de produção do embrião) na eficiência de programas de superovulação (SOV), assim como na eficiência reprodutiva de receptoras em programas de transferência de embrião. Foram avaliados dados de 1.562 protocolos de SOV (609 em vacas em lactação e 953 em novilhas da raça Holandesa) e 4.076 transferências de embrião (receptoras Holandesas em lactação). A taxa de SOV (número de doadoras com dois ou mais CL) foi semelhante entre novilhas e vacas em lactação (89,7 vs. 91,9%, respectivamente; $P = 0,26$). A época do ano, também, não influenciou a taxa de SOV (época quente = 89,3% vs. época não quente = 92,2%; $P = 0,09$). Doadoras lactantes apresentaram maior número de CL ($10,6 \pm 0,6$ vs. $7,5 \pm 0,4$; $P < 0,0001$), de estruturas recuperadas ($7,6 \pm 0,6$ vs. $4,6 \pm 0,4$; $P < 0,0001$) e taxa de recuperação (77,6 vs. 58,7%; $P < 0,0001$) que novilhas. Doadoras superovuladas na época quente apresentaram menor número de CL ($8,3 \pm 0,5$ vs. $9,7 \pm 0,5$; $P = 0,03$), de estruturas recuperadas ($5,3 \pm 0,5$ vs. $6,7 \pm 0,5$; $P = 0,04$) e taxa de recuperação (65,7 vs. 72,3%; $P = 0,007$) que doadoras superovuladas na época não quente. A taxa de fertilização (47,9 vs. 82,4%; $P < 0,0001$), de embriões viáveis (31,5 vs. 67,4%; $P < 0,0001$) e embriões viáveis grau I e II (15,4 vs. 42,1%; $P < 0,0001$) foram inferiores em doadoras lactantes. Semelhantemente, inferiores taxas de embriões viáveis (44,6 vs. 54,0%; $P = 0,002$) e embriões viáveis grau I e II (21,4 vs. 32,8%; $P < 0,0001$) foram verificadas durante a época quente do ano. No entanto, a queda na taxa de embriões grau I e II durante a época quente foi mais acentuada em doadoras lactantes (21,7 e 10,7%), quando comparada à observada em novilhas (46,2 e 38,1%; $P = 0,02$). Apesar da época do ano não ter influenciado a taxa de fertilização (época quente = 64,9 vs. época não quente = 70,0%; $P = 0,07$), foi observado

relação negativa com a temperatura máxima média durante os 15 dias do protocolo de SOV ($P = 0,006$). A taxa de embriões viáveis também se mostrou negativamente relacionada com a temperatura máxima durante os 15 dias do protocolo de SOV ($P = 0,03$). O número de embriões viáveis foi semelhante entre as categorias (novilhas = $3,8 \pm 0,3$ vs. vacas em lactação = $3,3 \pm 0,4$; $P = 0,16$), porém foi inferior quando produzido durante a época quente ($2,8 \pm 0,3$ vs. $4,4 \pm 0,4$; $P = 0,03$). A taxa de concepção dos embriões oriundos de doadoras em lactação foi maior aos 31 (36,0 vs. 30,7%; $P = 0,001$) e aos 45 dias de gestação (28,3 vs. 23,1%; $P = 0,001$). No entanto, a categoria da doadora não influenciou a perda gestacional (novilhas = 18,2% vs. vacas em lactação = 16,6%; $P = 0,49$). Ainda, as taxas de concepção aos 31 dias (30,5 vs. 31,7%; $P = 0,47$) e aos 45 dias (25,3 vs. 25,1%; $P = 0,94$) e perda gestacional (17,4 vs. 22,1%; $P = 0,07$) das receptoras não diferiram conforme a época de produção dos embriões, época quente e não quente, respectivamente. Também não foi verificado diferença nas taxas de concepção aos 31 dias (31,5 vs. 30,5%; $P = 0,66$) e aos 45 dias (25,1 vs. 25,4%; $P = 0,89$) e perda gestacional (18,4 vs. 16,5%; $P = 0,49$) das receptoras conforme a época de transferência dos embriões, época quente e não quente, respectivamente. Porém, a taxa de concepção aos 31 ($P = 0,02$) e aos 45 dias ($P = 0,02$) tiveram relação negativa com a média da temperatura máxima entre o estro e a TE. Em conclusão, apesar das doadoras em lactação apresentarem maior resposta superovulatória, as novilhas apresentaram semelhante número de embriões viáveis, porém maior taxa de embriões viáveis. A resposta ao tratamento superovulatório e a produção de embriões foram inferiores durante a época quente do ano. Embriões originados de doadoras Holandesas lactantes apresentaram maior taxa de concepção aos 31 e aos 45 dias de gestação do que embriões originados de novilhas. Apesar da época do ano não influenciar na taxa de concepção e na perda gestacional, verificou-se relação negativa da temperatura máxima entre o estro e a TE na taxa de concepção.

Palavras-chave: Doadoras Holandesa. Superovulação. Produção *in vivo* de embriões. Transferência de embriões. Estresse térmico.

ABSTRACT

VIEIRA, L. M. **Factors associated to embryo production and survival in superovulation programs and embryo transfer in Holstein females raised in tropical climate.** [Fatores associados à produção e a sobrevivência embrionária em programas de superovulação e transferência de embriões em fêmeas da raça Holandesa em clima tropical]. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

The high variability in the response to superovulatory treatments and embryo production has been related to multifactorial causes. Furthermore, there are restricted data that correlates factors related to the embryo to the conception. Thus, the objective of the present study was to evaluate the influence of variables related to donors (animal type and season of embryo production) in the efficiency of superovulation (SOV) programs and reproductive performance of dairy cows submitted to embryo transfer. We evaluated data from 1,562 SOV protocols (609 in lactating Holstein cows and 953 in heifers) and 4,076 embryo transfers (lactating Holstein recipient). The SOV rate (number of donor with two or more CL) was similar among lactating cows and heifers (89.7 vs. 91.9%, respectively; $P = 0.26$). Also, the season did not influence the SOV rate (warm season = 89.3% vs. not warm season = 92.2%; $P = 0.09$). Lactating donor had higher number of CL (10.6 ± 0.6 vs. 7.5 ± 0.4 ; $P < 0.0001$), of recovered structures (7.6 ± 0.6 vs. 4.6 ± 0.4 ; $P < 0.0001$) and recovery rate (77.6 vs. 58.7%; $P < 0.0001$) than heifers. Donors superovulated during warm season had fewer number of CL (8.3 ± 0.5 vs. 9.7 ± 0.5 ; $P = 0.03$), of recovered structures (5.3 ± 0.5 vs. $6, 7 \pm 0.5$; $P = 0.04$) and recovery rate (65.7 vs. 72.3%; $P = 0.007$). The fertilization rate (47.9 vs. 82.4%; $P < 0.0001$), viable embryos rate (31.5 vs. 67.4%; $P < 0.0001$) and embryos grade I and II rate (15.4 vs. 42.1%; $P < 0.0001$) were lower in lactating donor. Similarly, lower viable embryos rate (44.6 vs. 54.0%; $P = 0.002$) and embryos grade I and II rate (21.4 vs. 32.8%; $P < 0.0001$) were observed during the warm season. However, the decrease in the embryos grade I and II rate during the warm period was more pronounced in lactating donors (21.7 and 10.7%) compared to that observed in heifers (46.2 and 38.1%; $P = 0.02$). Although the season did not influence fertilization rate (warm season = 64.9 vs. not warm season = 70.0%, $P = 0.07$), it was observed a negative relationship with the average maximum temperature during the 15 days of the SOV protocol ($P = 0.006$). The viable embryos rate was also negatively correlated with the maximum temperature during the 15 days of the SOV protocol ($P = 0.03$). The

number of viable embryos was similar between categories (heifers = 3.8 ± 0.3 vs. lactating cows = 3.3 ± 0.4 ; $P = 0.16$), but was lower when produced during the warm season (2.8 ± 0.3 vs. 4.4 ± 0.4 ; $P = 0.03$). The conception rate of embryos from lactating donors was higher at 31 (36.0 vs. 30.7%; $P = 0.001$) and at 45 days of pregnancy (28.3 vs. 23.1%; $P = 0.001$). However, the donor category did not influence pregnancy loss (heifers = 18.2% vs. lactating cows = 16.6%; $P = 0.49$). Still, the recipients conception rate at 31 days (30.5 vs. 31.7%; $P = 0.47$) and at 45 days of pregnancy (25.3 vs. 25.1%; $P = 0.94$) and pregnancy loss (17.4 vs. 22.1%; $P = 0.07$) did not differ according to the embryo production season; warm and not warm season, respectively. Also, no difference was verified in recipients conception rates at 31 days (31.5 vs. 30.5%; $P = 0.66$) and at 45 days (25.1 vs. 25.4%; $P = 0.89$) and pregnancy loss (18.4 vs. 16.5%; $P = 0.49$) according to the embryo transfer season; warm and not warm season, respectively. However, conception rate at 31 ($P = 0.02$) and 45 days ($P = 0.02$) had a negative relationship with the average maximum temperature between estrus and TE. In conclusion, despite the lactating donors had higher superovulatory response, heifers presented similar number of viable embryos, but higher viable embryos rate. The superovulatory response and the embryo production were lower during the warm season. Embryos from lactating Holstein donors had higher conception rate at 31 and 45 days of gestation than embryos from heifers. Although the season did not influence the conception and pregnancy loss rates, there was a negative relationship between average maximum temperature during estrus and TE and conception rate.

Keywords: Holstein donors. Superovulation. *In vivo* embryo production. Embryo transfer. Heat stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Modelo hipotético da resposta ao protocolo de superovulação e taxa de concepção de embriões durante duas épocas do ano (quente e não quente), considerando a categoria da doadora35
Figura 2 -	Taxa de concepção de vacas Holandesas em lactação submetidas a IA (n = 39.393) de acordo com os meses do ano. Os meses do ano foram agrupados em época quente (novembro e dezembro e janeiro a maio) e época não quente (junho a outubro). Dados referentes aos anos de janeiro de 2006 a março de 2012 da Fazenda Santa Rita.....40
Figura 3 -	Programas de superovulação (SOV) com inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em doadoras Holandesas lactantes (A) e novilhas (B) e receptoras Holandesas em lactação.....42
Figura 4 -	Número de corpo lúteo (CL) no dia da coleta de embriões (A), total de estruturas recuperadas (B) e taxa de recuperação (C) de doadoras novilhas e vacas em lactação submetidas ao protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão médio e porcentagem.....51
Figura 5 -	Número de corpo lúteo (CL) no dia da coleta de embriões (A), total de estruturas recuperadas (B) e taxa de recuperação (C) de doadoras Holandesas submetidas ao protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo durante duas épocas do ano (quente e não quente). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão médio e porcentagem.....52
Figura 6 -	Taxa de fertilização após protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo de doadoras novilhas e vacas em lactação da raça Holandesa. Dados apresentados como porcentagem.....56

Figura 7 -	Número de estruturas fertilizadas após protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo de doadoras Holandesas durante duas época do ano (quente e não quente). Dados apresentados como porcentagem.....	57
Figura 8 -	Taxa de embriões viáveis após protocolo de superovulação em (A) duas categorias de animais (novilha e vaca em lactação) e (B) durante duas épocas do ano (quente e não quente). Dados apresentados como porcentagem.....	58
Figura 9 -	Taxa de concepção aos 31 (TC31) e 45 dias (TC45) e perda gestacional de receptoras Holandesa em lactação após transferência de embriões oriundos de (A) vacas raça Holandesa em lactação ou novilhas e (B) após transferência de embriões produzidos durante duas épocas do ano (quente e não quente). Dados apresentados como porcentagem.....	61
Figura 10 -	Probabilidade de concepção (A) aos 31 ($n = 4.076$) e (B) aos 45 dias ($n = 4.076$) de gestação após transferência de embrião de acordo com a média da temperatura máxima durante os sete dias que antecederam a TE [Concepção aos 31 dias = $0,2059 - 0,0249 * \text{temp max média durante os sete dias que antecederam a TE}$ ($P = 0,02$); Concepção aos 45 dias = $- 0,0161 - 0,0296 * \text{temp max média durante os sete dias que antecederam a TE}$ ($P = 0,02$)].....	62
Figura 11 -	Taxa de concepção aos 31 (TC31) e 45 dias (TC45) e perda gestacional de receptoras Holandesa em lactação após transferência de embriões de diferentes qualidades (A), estágios de desenvolvimento (B) e submetidos a criopreservação (fresco ou congelado; C). Dados apresentados porcentagem.....	67
Figura 12 -	Taxa de concepção aos 31 (TC31) e 45 dias (TC45) e perda gestacional de receptoras Holandesa em lactação após transferência de embriões de acordo com o tamanho (A) e número do corpo lúteo da receptora (B). Dados apresentados como porcentagem.....	68

Figura 13 -	Modelo hipotético dos possíveis fatores envolvidos na resposta ao protocolo de superovulação e taxa de concepção de embriões produzidos a partir de vacas em lactação e novilhas.....	71
Figura 14 -	Modelo hipotético dos possíveis fatores envolvidos na resposta ao protocolo de superovulação e taxa de concepção de embriões produzidos durante a época quente do ano, considerando a categoria da doadora.....	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estatística descritiva relacionada à produção de embriões.....	39
Tabela 2 -	Estatística descritiva relacionada à sobrevivência embrionária.....	45
Tabela 3 -	Taxa de superovulação (SOV), total de corpo lúteo (CL) no dia da coleta de embriões, total de estruturas recuperadas, taxa de recuperação, número e taxa de estruturas fertilizadas, número e taxa de embriões viáveis, número e taxa de embriões grau I e II e número e taxa de embriões degenerados de doadoras de diferentes categorias (novilha e vaca em lactação) submetidas ao protocolo de SOV com inseminação artificial em tempo fixo durante duas épocas do ano (quente e não quente). Dados apresentados como porcentagem e média $\pm$ erro padrão médio.....	50
Tabela 4 -	Taxa de concepção aos 31 (TC31) e 45 dias (TC45) e perda gestacional de receptoras Holandesas em lactação após transferência de embriões oriundos de doadoras da raça Holandesa de duas categorias animais (novilha e vaca em lactação) e durante duas épocas do ano (quente e não quente). Dados apresentados como porcentagem.....	61

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR EM BOVINOS	20
2.2	PROTOCOLOS DE MANIPULAÇÃO DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR PARA SUPEROVULAÇÃO	22
2.3	FATORES QUE INFLUENCIAM A RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES.....	25
2.3.1	Categoria animal.....	25
2.3.2	Estresse térmico	27
2.3.3	Lactação.....	29
2.4	FATORES QUE INFLUENCIAM A TAXA DE CONCEPÇÃO DE RECEPTORAS HOLANDESAS LACTANTES	31
3	HIPÓTESES.....	34
3.1	RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES DE NOVILHAS E VACAS EM LACTAÇÃO DA RAÇA HOLANDESA DURANTE DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO	34
3.2	TAXA DE CONCEPÇÃO DE RECEPTORAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO APÓS TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES ORIUNDOS DE NOVILHAS E VACAS EM LACTAÇÃO DA RAÇA HOLANDESA DURANTE DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO	34
4	OBJETIVO.....	36
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5.1	FAZENDA E ANIMAIS.....	37
5.2	AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLIMÁTICAS	38
5.3	PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO DAS DOADORAS	40
5.4	PRODUÇÃO, CONGELAMENTO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO	43
5.5	MANEJO REPRODUTIVO DAS RECEPTORAS	44
5.6	DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO	46
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
6.1	RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES DE NOVILHAS E VACAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO DURANTE DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO.....	49

6.2	TAXA DE CONCEPÇÃO DE RECEPTORAS HOLANDEASAS EM LACTAÇÃO APÓS TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES ORIUNDOS DE NOVILHAS E VACAS HOLANDEASAS EM LACTAÇÃO DURANTE DUAS ÉPOCAS DO ANO	60
6.2.1	EFEITO DA CATEGORIA ANIMAL DA DOADORA E DA ÉPOCA DE PRODUÇÃO DOS EMBRIÕES.....	60
6.2.2	EFEITOS RELACIONADOS AO EMBRIÃO E À RECEPTORA HOLANDESA EM LACTAÇÃO	66
7	CONCLUSÃO.....	69
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS	70
	REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, o Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, com aproximadamente 212,8 milhões de bovinos (IBGE, 2012), ocupando a segunda e quinta posições no ranking mundial de produção de carne e leite, respectivamente (EMBRAPA, 2011; FAO, 2012). Do total de bovinos, 20% (42 milhões) são representados pelo rebanho leiteiro brasileiro, e desses, 23 milhões são vacas ordenhadas anualmente (IBGE, 2012). Apesar da magnitude do rebanho, a produção brasileira anual de leite é de 32 milhões de litros, com produtividade de 1.400 L de leite/vaca/ano, comparado com 9.600 do rebanho americano, atualmente o maior produtor de leite do mundo (EMBRAPA, 2011).

Ainda, considerando que o consumo populacional nacional foi de 149 litros/per capita/ano (DBO, 2011) e o Brasil exportou 250.000 t de equivalente em leite em 2011, houve a necessidade de importação de 1.000.000 t de leite para atender a demanda nacional (BRASIL, 2012). O resultado foi o déficit de US\$ 463,4 milhões na balança comercial de lácteos no ano em questão (BRASIL, 2012). No entanto, apesar da baixa produtividade do rebanho brasileiro, o Brasil tem sido destaque como país com capacidade para aumentar o fornecimento de alimentos. A pecuária brasileira apresenta-se em ascensão e o aumento na produtividade está diretamente relacionado aos avanços tecnológicos na área de reprodução animal e melhoramento genético do rebanho.

Dentre os avanços biotecnológicos mais utilizados estão a inseminação artificial (IA), IA em tempo fixo (IATF), superestimulação e produção *in vivo* de embriões (SOV), aspiração e produção *in vitro* de embriões (FIV) e a transferência de embriões (TE) e TE em tempo fixo (TETF). Nesse contexto, visto a necessidade de intensificar a produção no setor agropecuário, estas biotécnicas estão sendo incorporadas na rotina das fazendas comerciais visando melhorar a eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos brasileiros.

A SOV-TE tem sido uma das principais técnicas de reprodução aplicadas para acelerar o ganho genético, consequentemente a produtividade dos rebanhos. Nos últimos anos, a produção *in vivo* de embriões apresentou aumento de 4,25%, com 732.862 embriões viáveis produzidos em 2011 (IETS, 2012). Entretanto, apesar da técnica possuir mais de 20 anos de aplicação (LINDSELL; MURPHY; MAPLETOFT, 1986), a eficiência do método tem se mantido constante nos últimos anos (6,2 embriões viáveis por coleta; IETS, 2012).

Em rebanhos leiteiros, embora a SOV-TE seja empregada há vários anos, a variabilidade na resposta aos tratamentos superestimulatórios têm sido importante limitação

do processo (MAPLETOFT; BÓ, 2012). A causa da variabilidade na resposta à SOV em vacas de leite é tida como multifatorial. Dentre os principais fatores, é possível citar estresse térmico, categoria animal, número de partos, dias em lactação, produção de leite, composição do leite e ainda, efeito de indivíduo (LEE et al., 2012; SENEDA; MARINHO, 2012).

Além da variabilidade na resposta encontrada nos programas de SOV-TE, nos últimos 50 anos, tem-se observado redução na fertilidade conforme o aumento da produção de leite. As vacas de alta produção apresentam estro de duração reduzida e menor taxa de concepção (SANGSRITAVONG et al., 2002; WILTBANK et al., 2006). Entretanto, apesar da produção de leite ser importante fator da redução da fertilidade dessas fêmeas, a causa também tem sido considerada multifatorial e dentre os fatores estão a ciclicidade, balanço energético, categoria animal, estresse térmico, número de partos, dieta e enfermidades, principalmente no peri-parto (EVANS; WALSH, 2012).

Estudos evidenciaram que quando programas de TE são implantados em rebanhos leiteiros maiores taxas de concepção são obtidas, principalmente durante os meses quentes do ano (RODRIGUES et al., 2004b; RODRIGUES et al., 2007a; CHEBEL; DEMÉTRIO; METZGER, 2008; VASCONCELOS et al., 2011b). Outra importante estratégia tem sido a utilização da técnica de TE em vacas repetidoras de serviço (RODRIGUES et al., 2004b; RODRIGUES et al., 2007b), ou seja, fêmeas com três ou mais IA que não se tornaram gestantes.

Dessa forma, visto que as características reprodutivas têm baixa herdabilidade (TIEZZI et al., 2011), a aplicação de biotecnologias da reprodução parece ser uma estratégia para contornar a queda da fertilidade no rebanho leiteiro. Portanto, além do ganho genético agregado ao rebanho, a utilização de programas de SOV seguidos de TE pode amenizar a baixa fertilidade das vacas de leite de alta produção, observada principalmente durante períodos de estresse térmico (AMBROSE et al., 1999; AL-KATANANI; HANSEN, 2002).

O aprimoramento dos programas de SOV-TE pode contribuir para o aumento da aplicação dessa biotecnologia nos rebanhos leiteiros e colaborar para o aumento da produtividade nacional. Portanto, são necessários mais estudos para melhor compreensão das causas de variação ao tratamento supervulatório e à concepção das receptoras de embriões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR EM BOVINOS

Ciclo estral define-se como sendo modificações cíclicas na fisiologia e morfologia dos órgãos reprodutivos da fêmea, assim como no perfil dos hormônios relacionados. A fêmea bovina é poliéstrica anual (MIES FILHO, 1977) e possui ciclo estral com duração média de 21 dias, sendo semelhante entre fêmeas zebuínas e taurinas (VACA et al., 1985; SIROIS; FORTUNE, 1988; BARROS; FIGUEIREDO; PINHEIRO, 1995). Nesse intervalo, o processo contínuo de sequência de eventos fisiológicos e endocrinológicos que envolvem o crescimento e a atresia dos folículos antrais é conhecido por dinâmica folicular (PIERSON; GINTHER, 1984; BORGES et al., 2004).

A teoria das ondas foliculares foi proposta por meio de estudos histológicos de ovários obtidos de abatedouros (RAJAKOSKI, 1960). O autor sugeriu a existência de duas ondas de crescimento de folículos antrais durante o ciclo estral, cada uma delas apresentando um folículo pré-ovulatório. Estudos posteriores comprovaram a teoria e que cada ciclo possuía duas a quatro ondas de crescimento folicular (PIERSON; GINTHER, 1988; SAVIO et al., 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988). Ainda, com a ultrassonografia, foi possível compreender a dinâmica folicular mediante a relação do tempo e os eventos endocrinológicos e morfológicos das estruturas ovarianas no decorrer do ciclo estral (SIROIS; FORTUNE, 1988; GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989a; ADAMS et al., 1992a; 1992b).

O ciclo estral pode ser dividido em duas fases: 1. fase folicular, que se inicia com a regressão do corpo lúteo (CL) e estende-se até a ovulação; e 2. fase luteínica, que compreende o período de atividade do CL, período de produção de progesterona (IRELAND; MURPHEE; COULSON, 1980; HAFEZ, 1995). A primeira onda de crescimento folicular, denominada fase de recrutamento, é caracterizada pela presença de folículos antrais (3 a 5 mm) responsivos a gonadotrofinas (GINTHER et al., 2003). Essa etapa está associada à elevação das concentrações plasmáticas do hormônio folículo estimulante (FSH), sendo o crescimento folicular dependente do FSH (ADAMS et al., 1992b).

A divergência folicular ocorre ao redor do terceiro dia após o recrutamento, momento em que o folículo dominante (FD) atinge diâmetro folicular de 8,5 mm em fêmeas *Bos taurus* (GINTHER et al., 1996) e 6,2 mm em *Bos indicus* (GIMENES et al., 2008). A divergência

folicular é caracterizada pela contínua taxa de crescimento do FD e declínio nas taxas de crescimento dos demais folículos, denominados subordinados (GINTHER et al., 2001). As altas concentrações de estradiol e inibina produzidas pelo FD provocam diminuição das concentrações plasmáticas de FSH a níveis basais e por mecanismo de retroalimentação negativa no eixo hipotalâmico-hipofisário interrompem o crescimento dos folículos subordinados (FSH-dependentes). No entanto, o FD adquire receptores para o hormônio luteinizante (LH) nas células da granulosa e passa a responder com crescimento contínuo (GARVERICK; ZOLLERS; SMITH, 1992).

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) é responsável pela proliferação celular, sensibilização das células do folículo ao FSH e LH e esteroidogênese (SPICER; ALPIZAR; ECHTERNKAMP, 1993; 1995). Dessa forma, considerando-se que o FD possui maior concentração de IGF-I livre, consequentemente maior biodisponibilidade de receptores de FSH, o FD apresenta maior ação das gonadotrofinas para estimulação do crescimento e diferenciação folicular, resultando no estabelecimento da dominância (RIVERA et al., 2001; RIVERA; FORTUNE, 2001).

Com ausência de secreção contínua dos andrógenos produzidos pelo FD ocorre diminuição da produção de estradiol e aumento da secreção de LH, iniciando-se o período de dominância. No entanto, após a divergência, e na presença de altos níveis de progesterona - que promove redução da frequência na pulsatilidade de LH - o folículo dominante torna-se anovulatório. A partir desse momento começa o processo de atresia e perda da dominância, dando início a uma nova onda de crescimento folicular (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989b; ADAMS et al., 1992b). Esse evento pode ocorrer de uma a três vezes em um mesmo ciclo estral (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989a; BARROS; FIGUEIREDO; PINHEIRO, 1995).

O processo de crescimento e de atresia folicular permanece enquanto o CL mantiver-se funcional, inclusive durante a gestação (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989a; GINTHER et al., 1996; THOMPSON et al., 2011). Quando não há cópula, fecundação ou o reconhecimento materno da gestação, determinado pela produção de interferon- γ pelo concepto, ocorre o processo de luteólise (THATCHER et al., 2001). A ocorrência de luteólise nessa fase do ciclo estral determina que o FD presente será o folículo ovulatório (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989a). O folículo ovulatório aumenta a produção e concentração de estrógeno, resultando na ativação do mecanismo de retroalimentação positiva para secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), com consequente pico de LH que promove

a ovulação (STOCK; FORTUNE, 1993). Por fim, uma vez desencadeado o processo de ovulação, uma nova onda de crescimento folicular se estabelece.

2.2 PROTOCOLOS DE MANIPULAÇÃO DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR PARA SUPEROVULAÇÃO

As fêmeas bovinas tem como característica fisiológica do ciclo estral, o crescimento de um grupo de folículos antrais, dos quais apenas um torna-se dominante e adquire capacidade ovulatória, ou seja, é uma espécie mono ovular. No entanto, com os avanços no conhecimento sobre a manipulação hormonal do ciclo estral, a suplementação com gonadotrofinas exógenas possibilitou a indução do crescimento de mais de um folículo dominante, e conseqüentemente, a ovulação de dois ou mais folículos ovulatórios. Essa técnica foi denominada superovulação (SOV) ou múltipla ovulação.

No início, os protocolos de SOV eram baseados na administração de gonadotrofina coriônica equina (eCG) no período da regressão natural do CL. Com a introdução da prostaglandina F2 α (PGF2 α), o início dos tratamentos com gonadotrofinas tornou-se mais flexível (revisado por MAPLETOFT; BÓ, 2012). No entanto, estudos evidenciaram que a resposta superovulatória é superior quando os tratamentos de gonadotrofinas são iniciados na segunda onda de crescimento folicular (DONALDSON, 1984; LERNER et al., 1986; LINDSELL; MURPHY; MAPLETOFT, 1986; PIERSON; GINTHER, 1987; SAVIO et al., 1991; NASSER et al., 2011; RIVERA et al., 2011), mais precisamente no momento da emergência da segunda onda folicular (ADAMS et al., 1992b; NASSER et al., 1993; ADAMS et al., 1994). Ainda, sabendo-se do elevado número de folículos dominantes com produção ativa de estradiol, alguns pesquisadores incorporaram uma fonte de progesterona (P4) ao protocolo, evitando que as doadoras antecipassem a expressão de estro (revisado por MAPLETOFT; BÓ, 2012).

Com os avanços na manipulação do ciclo estral foi possível determinar o momento da emergência da nova onda de crescimento folicular, permitindo que o estímulo superovulatório fosse realizado sem prévia detecção do estro (BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2006; BARUSELLI et al., 2011; MARTINS et al., 2012). Atualmente, existem vários métodos para sincronização do momento da emergência da onda de crescimento folicular, dentre eles: 1. ablação dos maiores folículos (BERGFELT et al., 1997; BARACALDO et al., 2000); 2.

ovulação induzida por GnRH (KOHRAM et al., 1998b) e 3. associação de P4/progestágenos e estradiol (BÓ et al., 1993; 1994; 1995; 1996). Quando os dois primeiros métodos são utilizados, a emergência da nova onda ocorre um a dois dias após o procedimento (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; BERGFELT et al., 1997; KOHRAM et al., 1998a; KOHRAM et al., 1998b). Enquanto com o método de associação P4 e E2 a emergência da nova onda de crescimento folicular ocorre quatro dias após a administração dos fármacos (BO et al., 1995; BARUSELLI et al., 2011).

No entanto, vale ressaltar que as taxas de ovulação após a administração de GnRH em dia aleatório do ciclo estral tem alta variabilidade (PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; COLAZO et al., 2009). Essa variação da resposta ao GnRH torna a resposta ao tratamento de superestimulação inconsistente, visto que, a ocorrência da ovulação é necessária para emergência de nova onda de crescimento folicular (MARTINEZ et al., 1999).

Por outro lado, o tratamento com P4/progestágeno associado ao estradiol suprime a liberação do hormônio folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), resultando em atresia dos folículos na fase inicial da onda de crescimento folicular. Uma vez que o estradiol foi metabolizado, o FSH restabelece sua liberação e ocorre a emergência de uma nova onda de crescimento folicular (BO et al., 1995). Portanto, devido à eficiente sincronização da emergência de uma nova onda de crescimento folicular, o método de associação P4/progestágeno e estradiol está sendo muito utilizado (revisado por MAPLETOFT; BÓ, 2012), exceto nos Estados Unidos, Nova Zelândia e alguns países da União Européia onde a comercialização de estrógenos não é permitida.

Outra etapa importante do protocolo de superovulação é a superestimulação dos folículos. Visto que o FSH possui meia vida curta (aproximadamente cinco horas), são necessárias duas aplicações diárias durante quatro ou cinco dias consecutivos para induzir a superestimulação em fêmeas bovinas (LOONEY et al., 1981; MONNIAUX; CHUPIN; SAUMANDE, 1983; DONALDSON, 1984; BARROS; NOGUEIRA, 2005; BARUSELLI et al., 2006). No entanto, estudos realizados em fêmeas *Bos indicus* reportaram semelhante resposta superovulatória e produção de embriões em doadoras superovuladas com três ou quatro aplicações de FSH, comparado com o tratamento convencional (MARTINS et al., 2008).

Outro hormônio utilizado para superovulação é a eCG, visto a sua atividade nos receptores de FSH e LH (STEWART; ALLEN; MOOR, 1976; LICHT et al., 1979; MURPHY; MARTINUK, 1991), vários pesquisadores relataram ação benéfica quando as duas últimas dose de FSH foram substituídas por doses de eCG (BARROS et al., 2008; REANO et al.,

2009; MATTOS et al., 2011). No entanto, a eficiência da eCG nos protocolos de SOV permanece controversa (BARUSELLI et al., 2008; VIEIRA et al., 2010).

Novas pesquisas têm se direcionado ao desenvolvimento e associação de fármacos com eficiência similar ou superior aos existentes, porém que viabilizam programas de SOV com manejos reduzidos. A administração da eCG, em dose única, para tratamentos superestimulatórios apresentou resultados semelhantes aos observados após o tratamento convencional (oito aplicações) em fêmeas taurinas e zebuínas (MARTINS et al., 2006b; 2007; BARUSELLI et al., 2008). Os últimos estudos têm focado na associação do FSH a um diluente (ácido hialurônico) com mecanismo de liberação lenta, para induzir a superestimulação com aplicações reduzidas de gonadotrofinas (BÓ et al., 2010). Recentemente, várias pesquisas que testaram a administração de dose única de FSH (TRÍBULO et al., 2011a; BÓ; TRÍBULO; MAPLETOFT, 2012) ou a dose de FSH subdividida em duas aplicações (TRÍBULO et al., 2011b; BÓ; TRÍBULO; MAPLETOFT, 2012) demonstraram resultados semelhantes quando comparados ao tratamento convencional de oito aplicações durante quatro dias.

Após a superestimulação exógena, a inseminação artificial (IA) é normalmente realizada 12 e 24 h após o início do estro (revisado por MAPLETOFT; STEWARD; ADAMS, 2002). Em 2005, Barros e Nogueira desenvolveram o protocolo P-36 para fêmeas *Bos indicus*, que dispensa a necessidade de detecção de cio. O P-36 consiste na remoção do dispositivo de P4/progestágeno 36 h após a administração da primeira PGF2 α e a ovulação é induzida 12 h mais tarde com a administração de LH. Visto que a ovulação ocorre 24 a 36 h após aplicação do LH (NOGUEIRA; BARROS, 2003), as IA em tempo fixo são realizadas 12 e 24 h após tratamento, eliminando a necessidade de detecção do estro.

Diferentemente das fêmeas zebuínas (BARUSELLI et al., 2006; MARTINS et al., 2006a) e das novilhas taurinas (dados não publicados¹), estudos com fêmeas *Bos taurus* em lactação indicaram maior número de embriões congeláveis quando a fonte de P4 foi removida 36 h após a PGF2 α e o indutor de ovulação administrado 24 h mais tarde, ao invés de 12 h (MARTINS, 2005; RODRIGUES et al., 2005; BÓ et al., 2006; BARUSELLI et al., 2011; MARTINS et al., 2012).

Apesar da evolução, a eficiência da produção de embriões tem se mantido constante nos últimos anos (6,2 embriões viáveis por coleta; IETS, 2012). Portanto, estudos adicionais são necessários para promover novos avanços na eficiência da técnica, minimizando a alta variabilidade da resposta entre e dentre indivíduos (KAFI; MCGOWAN, 1997; LEE et al., 2012).

¹ RODRIGUES, C.A., VIEIRA, L.M., BARUSELLI, P.S. Efeito do atraso na aplicação do indutor de ovulação em protocolos de SOV de novilhas holandesas. 2011.

2.3 FATORES QUE INFLUENCIAM A RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES

2.3.1 Categoria animal

O sucesso da implantação de qualquer biotecnologia em uma criação bovina é dependente do conhecimento da fisiologia dos animais. Apesar de pertencerem ao mesmo gênero (*Bos*), as fêmeas bovinas taurinas (*Bos taurus taurus*) e zebuínas (*Bos taurus indicus*) apresentam peculiaridades fisiológicas reprodutivas (GINTHER et al., 1996; BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003; CARVALHO et al., 2008; GIMENES et al., 2008; SARTORI; BARROS, 2011a).

Existem diferenças na dinâmica folicular entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. Uma particularidade observada entre zebuínos e taurinos diz respeito ao número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral. Estudos realizados em animais da raça Holandesa demonstraram predominância de duas e três ondas de crescimento folicular por ciclo estral (SAVIO et al., 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988; GINTHER; KASTELIC; KNOFF, 1989a; WOLFENSON et al., 2004). Contudo, em zebuínos existem relatos que descrevem maior incidência de 3 ondas, sendo notificada a presença de até 4 ondas de crescimento folicular por ciclo estral (RHODES; DE'ATH; ENTWISTLE, 1995; FIGUEIREDO et al., 1997).

Em geral, as fêmeas taurinas apresentam menor número de folículos antrais com diâmetro de 3-5 mm no momento da emergência de nova onda de crescimento folicular (GINTHER et al., 1996; ALVAREZ et al., 2000), comparado com fêmeas zebuínas (BURATINI JR. et al., 2000). Outras diferenças evidentes são o maior diâmetro do folículo dominante no momento da divergência folicular (SARTORI et al., 2001; GIMENES et al., 2008), maior diâmetro máximo do folículo dominante (CARVALHO et al., 2008; SARTORI et al., 2010) e maior diâmetro do folículo dominante com capacidade ovulatória (SARTORI et al., 2001; CARVALHO et al., 2008; GIMENES et al., 2008) observados em fêmeas taurinas quando comparados com os fêmeas zebuínas (SARTORI; BARROS, 2011b). Ainda, fêmeas *Bos taurus* geralmente apresentam estro de duração mais longa comparado as fêmeas *Bos indicus* (MIZUTA, K., 2003; revisado em BÓ; BARUSELLI; MARTINEZ, 2003), exceto as vacas de alta produção de leite (WILTBANK et al., 2006).

Dessa forma, sabendo-se que o diâmetro do folículo ovulatório e o volume do corpo lúteo são positivamente correlacionados (SARTORI; ROSA; WILTBANK, 2002; BARUSELLI et al., 2003), o volume do corpo lúteo de fêmeas taurinas, principalmente de vacas em lactação, é maior quando comparado ao de fêmeas zebuínas (SARTORI et al., 2004; CARVALHO et al., 2008). Estas diferenças na dinâmica fisiológica ovariana entre *Bos taurus* e *Bos indicus*, provavelmente são as principais razões para o grande sucesso de programas de produção de embriões *in vitro* no rebanho zebuino.

Além das diferenças entre raças, é importante ressaltar as diferenças existentes entre as categorias animais (novilhas e vacas) do mesmo grupo genético, principalmente em raças leiteiras. Assim como apresentado anteriormente, de acordo com as pesquisas, as novilhas taurinas apresentam diâmetros foliculares inferiores (SARTORI et al., 2004; WOLFENSON et al., 2004) quando comparados aos das vacas lactantes, consequentemente, o volume do corpo lúteo também é menor (SARTORI; ROSA; WILTBANK, 2002; 2004).

Entretanto, apesar de apresentarem estruturas ovarianas menores (folículo dominante e corpo lúteo), quando dosagens hormonais foram realizadas, constatou-se que novilhas taurinas da raça leiteira apresentam maior pico de estradiol e maiores concentrações de progesterona (SARTORI; ROSA; WILTBANK, 2002) quando comparadas com vacas lactantes. Possivelmente, vacas em lactação, por apresentarem maior folículo dominante e maior corpo lúteo, também possuem maior produção de hormônios esteróides. No entanto, o alto *clearance*, devido a sua alta taxa de ingestão de matéria seca, reduz esses níveis hormonais (SANGSRITAVONG et al., 2002; VASCONCELOS et al., 2003; WILTBANK et al., 2006) em vacas em lactação comparadas às novilhas. Ainda, o dia da emergência da nova onda de crescimento folicular após início do protocolo de sincronização (implante de P4 e estradiol) pode variar entre categoria animal e tipo de estradiol utilizado (SÁ FILHO et al., 2011).

Além das diferenças entre raças e categoria animal, a variação individual reflete-se em grande variabilidade entre doadoras na produção de embriões. Em programas de superovulação, apenas 30% das vacas produzem 70% dos embriões, e 25% das vacas tratadas não produzem embrião (SENEDA; MARINHO, 2012).

Uma vez conhecidas as peculiaridades entre raças e categorias animais, tornou-se essencial o desenvolvimento e a adaptação de protocolos de sincronização para superovulação. Um vez estabelecido o protocolo para superovulação com inseminação artificial em tempo fixo (BARROS; NOGUEIRA, 2005), vários estudos foram realizados para adequar a dose de FSH superestimulante (SON et al., 2007), o momento da retirada da fonte

de progesterona (MARTINS, 2005; 2012) e da indução das múltiplas ovulações (BÓ et al., 2006; MARTINS et al., 2012; dados não publicados¹) de acordo com cada categoria animal.

Apesar da evolução dos tratamentos de superovulação e produção de embrião, a eficiência da técnica tem se mantido constante. Com a utilização dos protocolos atuais, pesquisadores relataram taxa de fecundação inferior em vacas em lactação quando comparado à novilhas (56,8 vs. 71,6%; (SARTORI; BASTOS; WILTBANK, 2010). Entretanto, outros autores afirmam não ser diferente a taxa de fecundação entre essas categorias (LEROY et al., 2005; SALES et al., 2008). Com relação a produção de embriões, as novilhas taurinas púberes têm obtido em média 4,5 a 5,1 embriões viáveis por coleta, representando 55,0 a 73,5% do total de estruturas recuperadas (AX et al., 2005; LEROY et al., 2005; SALES et al., 2008; SARTORI; BASTOS; WILTBANK, 2010). Com relação às doadoras em lactação o número de embriões viáveis por colheita possui maior variação (3,1 a 6,1), resultando em taxa de embriões viáveis de 42,0 a 53,0% do total de estruturas recuperadas (LEROY et al., 2005; SALES et al., 2008; SARTORI; BASTOS; WILTBANK, 2010).

Ainda, dados da literatura reportaram semelhante número de estruturas recuperadas em doadoras lactantes e novilhas, porém, menor proporção de embriões viáveis (LEROY et al., 2005; SALES et al., 2008) e maior número de oócitos não fecundados em vacas lactantes (SALES et al., 2008; SARTORI; BASTOS; WILTBANK, 2010). Dessa forma, mais estudos são necessários para reduzir a variabilidade da resposta e aumentar a eficiência dos protocolos de superovulação e produções de embrião, principalmente em doadoras da raça Holandesa.

2.3.2 Estresse térmico

O estresse térmico é definido como a tensão exercida pelos componentes do ambiente térmico sobre organismo, determinando reação fisiológica proporcional à intensidade do estímulo aplicado e à capacidade de compensação do organismo (SILVA, 2000; HANSEN, 2009). O objetivo dessas modificações é adaptar o indivíduo à nova situação de estresse (LAY; WILSON, 2001). O animal em estresse térmico reduz o consumo de ração, a produtividade e a reprodução (SARTORI et al., 2002; AMBROSE; GOVINDARAJAN; GOONEWARDENE, 2006; COLLIER; DAHL; VANBAALE, 2006; TORRES-JÚNIOR et al., 2008; HANSEN, 2009; UDOMPRASERT; WILLIAMSON, 1987).

¹ RODRIGUES, C.A., VIEIRA, L.M., BARUSELLI, P.S. Efeito do atraso na aplicação do indutor de ovulação em protocolos de SOV de novilhas holandesas.2011.

Dentre os efeitos mais importantes do estresse térmico, está a alteração na função do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. O estresse agudo ou crônico resulta no atraso ou bloqueio do padrão pulsátil de LH, secreção de estradiol reduzida, pico de LH retardado, e ovulação tardia ou inexistente (HUSZENICZA et al., 1998; DOBSON et al., 2001). Portanto, as alterações em resposta ao estresse térmico estão diretamente relacionadas à eficiência reprodutiva de fêmeas bovinas.

No caso das vacas de leite (*Bos taurus*), a situação de estresse térmico não se limita a climas quentes, uma vez que vacas em lactação em regiões com temperaturas entre 25 e 28 °C já foram diagnosticadas com hipertermia (BERMAN et al., 1985; SARTORI et al., 2002). A zona de conforto térmico para animais *Bos taurus* é entre 0 e 16 °C, enquanto que para os zebuínos é entre 10 e 27 °C (PEREIRA, 2005)

Além da diferença entre raças, vacas taurinas em lactação são mais sensíveis ao estresse térmico do que novilhas (BADINGA et al., 1985; SARTORI et al., 2002; FERREIRA et al., 2011). As vacas em lactação além da produção de leite possuem maior consumo de matéria seca, consequentemente, maior produção de calor (BERMAN et al., 1985; BERMAN, 2005). Entretanto, apesar de mais resistente, a exposição de novilhas da raça Holandesa ao estresse térmico aumentou a proporção de embriões anormais e de oócitos não fecundados (PUTNEY et al., 1989), além de reduzir a produção *in vitro* de embriões (FERREIRA et al., 2011) em relação as novilhas mantidas em termoneutralidade.

A temperatura ambiental, corporal e uterina estão diretamente relacionadas a taxa de concepção, principalmente durante a maturação final dos oócitos e desenvolvimento embrionário precoce (THATCHER et al., 1974; PUTNEY; DROST; THATCHER, 1988; PUTNEY et al., 1989; EALY et al., 1994; KRININGER; STEPHENS; HANSEN, 2002; MOGHADDAM; KARIMI; POOYANMEHR, 2009). Dessa forma, o desempenho de doadoras de embrião produzidos *in vivo* pelo método de superovulação está diretamente relacionado a temperatura ambiental.

Estudos *in vitro* reportaram que quando o estresse térmico ocorre no primeiro dia de desenvolvimento embrionário, as doadoras de embriões apresentam menor quantidade de embriões viáveis, além de maior proporção de embriões com atraso no desenvolvimento (EALY et al., 1994; PAULA-LOPES et al., 2002). Outros autores reportaram que durante os períodos quentes do ano, as doadoras apresentam menor taxa de fecundação (CHEBEL; DEMÉTRIO; METZGER, 2008), principalmente fêmeas em lactação (SARTORI et al., 2002).

Ainda, a intensidade dos efeitos deletérios do estresse térmico são dependentes do estágio do embrião, sendo os embriões de duas a quatro células mais sensíveis por não terem o mecanismo de *apoptose induzida pelo estresse* ativado (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002). Outro mecanismo de proteção em resposta ao estresse térmico é a expressão transitória de genes para a produção de proteínas de estresse ou choque térmico (heat shock ou heat stress proteins; Hsps), evitando a desnaturação proteica. Essas proteínas previnem a formação de agregados proteicos não específicos e auxiliam na aquisição da conformação nativa das proteínas (RICHTER; HASLBECK; BUCHNER, 2010). O aumento dos níveis de Hsps sintetizada em resposta a condições moderadas de estresse são a base para essa resistência (LINDQUIST, 1986).

2.3.3 Lactação

A lactação, processo fisiológico que tem início após o parto, consiste na síntese, armazenamento e secreção do leite pela glândula mamária. Uma vez iniciada a lactação, a prioridade do organismo animal passa a ser a produção de leite. Portanto, quanto maior a capacidade de produção de leite da vaca, maior será a necessidade de substratos e energia para glândula mamária. A lactação bovina é caracterizada por uma curva, a qual apresenta pico de produção entre 60 e 100 dias de lactação. A partir desse momento a produção tende a decrescer (KAWASHIMA et al., 2012).

As vacas em lactação com alta produção de leite possuem alta incidência de anormalidades reprodutivas: 1. Maior diâmetro do folículo ovulatório; 2. Menor duração do estro; 3. Variação no momento da ovulação; 4. Maior incidência de múltipla ovulação; 5. Taxa de concepção reduzida; e 6. Maior probabilidade de se tornar repetidora de serviço (SARTORI et al., 2002; 2004; LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004b; WILTBANK et al., 2006; RODRIGUES et al., 2012). A alta incidência de múltipla ovulação resulta em aumento da incidência de gestações gemelares, e consequentemente, maior intervalo parto-concepção, menor taxa de concepção e, maior taxa de perda embrionária tardia ou aborto (ANDREU-VÁZQUEZ et al., 2012).

A alta produção de leite depende da alta ingestão de matéria seca, e consequentemente, induz alto metabolismo hepático (SANGSRITAVONG et al., 2002). O alto metabolismo acarreta rápida degradação dos hormônios esteróides (WOLFENSON et al., 1997; WILSON

et al., 1998; SANGSRITAVONG et al., 2002; WILTBANK et al., 2006), reduzindo as concentrações circulantes, e consequentemente, alterando as funções reprodutivas. Além da produção de leite propriamente dita, existem outros fatores relacionados a lactação que interferem na fisiologia reprodutiva, como número de partos e dias em lactação (ISOGAI; SHIMOHIRA; KIMURA, 1993; KONIG et al., 2007).

Considerando os fatores relacionados à lactação e a resposta ao tratamento superovulatório, os resultados da literatura ainda são bastante contraditórios. Alguns autores relatam que a resposta ao tratamento superestimulatório não está correlacionada aos níveis de produção de leite (CHEBEL; DEMÉTRIO; METZGER, 2008; LEE et al., 2012). Contrariamente, outros autores verificaram correlação negativa entre essas variáveis (KONIG et al., 2007). Assim como a produção de leite, autores reportaram que os dias em lactação não estão relacionados com a resposta ao protocolo de superovulação e a produção de embriões (LEE et al., 2012). No entanto, outros autores relataram redução no número de embriões recuperados de doadoras com mais de 461 dias em lactação (ISOGAI; SHIMOHIRA; KIMURA, 1993).

Outro parâmetro para avaliação da resposta ao protocolo de superestimulação é o número de partos da doadora. Alguns autores (LERNER et al., 1986) já demonstraram que a taxa de fertilização, a qualidade dos embriões e o número de embriões transferíveis diminuíram com o aumento da idade da doadora. Por outro lado, nenhuma diferença foi encontrada para essa variável nos estudos de Lee et al. (2012).

Estudos recentes relataram que o alto teor de gordura no leite está diretamente associado com a alta taxa de embriões degenerados (KONIG et al., 2007; LEE et al., 2012). Entretanto, os teores de proteína não foram correlacionados com a resposta ao protocolo de superovulação (KONIG et al., 2007). Ainda, baixos níveis de proteína degradável na ração foram associados à maior taxa de fertilização e embriões transferíveis em doadoras Holandesas (BLANCHARD et al., 1990). O alto teor de proteína na dieta animal acarreta queda do pH uterino e consequentemente danos à produção e desenvolvimento embrionário (FERGUSON; CHALUPA, 1989). Portanto, a relação proteína/gordura, associada ao nível de nitrogênio ureico do leite, foram apontadas como parâmetro de avaliação e seleção de doadoras com maior número de embriões transferíveis por coleta (LEE et al., 2012).

2.4 FATORES QUE INFLUENCIAM A TAXA DE CONCEPÇÃO DE RECEPTORAS HOLANDESAS LACTANTES

Nos últimos 50 anos, tem-se observado redução na fertilidade conforme o aumento da produção de leite. Concomitantemente à seleção de animais altamente produtivos, houve redução na eficiência reprodutiva dos animais (LABEN et al., 1982; DE VRIES; VEERKAMP, 2000; LUCY, 2001; WASHBURN et al., 2002; 2005; 2007). Pesquisas em vários países relataram decréscimo na taxa de concepção na ordem de vacas em lactação 0.5 a 1% ao ano (BUTLER; SMITH, 1989; BEAM; BUTLER, 1999; ROYAL et al., 2000a; 2000b). Ainda, foi observado aumento no número de inseminações por concepção (1,75 para 3,0) nos últimos anos (LUCY, 2001; MEE; ROSS; DILLON, 2004). No entanto, visto que as características reprodutivas têm baixa herdabilidade (TIEZZI et al., 2011), a aplicação de biotecnologias da reprodução parece ser uma estratégia para contornar a queda da fertilidade no rebanho leiteiro.

Fêmeas com alta produção de leite possuem altas concentrações sanguíneas de somatotropina e prolactina (BONCZEK et al., 1988), fatores que estimulam a lactação. No entanto, esses animais apresentam baixas concentrações de insulina (KAWASHIMA et al., 2012), hormônio diretamente relacionado ao desenvolvimento dos folículos, do corpo lúteo e à esteroidogênese (EINSPANIER et al., 1990; MCARDLE et al., 1991; ARMSTRONG et al., 2001; GONG, 2002; 2003; SHIMIZU et al., 2008). Apesar das modificações hormonais promoverem maior produção de leite, as mesmas tornam a fêmea mais propensa a distúrbios fisiológicos (NEBEL; MCGILLIARD, 1993).

Assim como a técnica de IA (DEMETRIO et al., 2007), a eficiência da TE também é influenciada pelas características produtivas da lactação (VASCONCELOS et al., 2006). Os autores mostraram que quanto maior a produção de leite, menor a probabilidade das receptoras tornarem-se gestantes e maior a probabilidade de perda embrionária tardia. Ainda, quanto maior os dias em lactação da receptora de embrião, maior a probabilidade da fêmea tornar-se gestante. Contrariamente, outros pesquisadores não observaram efeito de produção de leite na taxa de concepção de receptoras Holandesas lactantes (CHEBEL; DEMÉTRIO; METZGER, 2008).

Entretanto, apesar da produção de leite ser importante fator da redução da fertilidade dessas fêmeas, a causa de comprometimento da reprodução tem sido considerada multifatorial. Dentre os fatores, estão a ciclicidade, balanço energético, estresse térmico,

número de partos, dieta e enfermidades, principalmente no peri-parto (HANSEN; ARÉCHIGA, 1999; GRÖHN; RAJALA-SCHULTZ, 2000; LUCY, 2001; MOREIRA et al., 2001; CARTMILL et al., 2001a; KADZERE et al., 2002; SANTOS et al., 2004a).

O reduzido desempenho reprodutivo de vacas taurinas em lactação também tem sido diretamente relacionado ao efeito deletério do estresse térmico sobre o desenvolvimento embrionário (AMBROSE et al., 1999; HANSEN; ARÉCHIGA, 1999). A diminuição da fertilidade durante os períodos quentes do ano também é tida como problema multifatorial (THATCHER et al., 2001). A hipertermia compromete a função celular em vários tecidos do trato reprodutivo da fêmea (WOLFENSON et al., 1995; HANSEN et al., 2001). O estresse térmico compromete a dinâmica folicular ovariana (BADINGA et al., 1993) incluindo: capacidade de dominância (WOLFENSON et al., 1995); codominância folicular (SARTORI et al., 2004; TORRES-JÚNIOR et al., 2008) e ciclo estral com menor duração (MONTY; WOLFF, 1974). Ainda, o estresse térmico acarreta em menor concentração circulante de hormônios esteróides (WOLFENSON et al., 1997; WILSON et al., 1998), menor proporção de animais que demonstram o estro (THATCHER et al., 1986) e menor secreção endometrial de proteínas (THATCHER et al., 2001).

Nesse contexto, a transferência de embriões (TE) tornou-se importante ferramenta para o manejo reprodutivo dos rebanhos leiteiros. Inicialmente, o tratamento superestimulatório associado à TE tinha como objetivo acelerar a disseminação de animais geneticamente superiores (LOHUIS, 1995). Atualmente, a técnica tornou-se uma estratégia importante para amenizar os efeitos deletérios do estresse térmico sobre a fertilidade (DROST et al., 1994; RUTLEDGE, 2001; AL-KATANANI; HANSEN, 2002; RODRIGUES et al., 2007a; STEWART et al., 2011) e ainda, melhorar a eficiência reprodutiva em vacas repetidoras de serviço (RODRIGUES et al., 2004b; 2007b; 2010).

A taxa de concepção pós IA é extremamente influenciada pela temperatura ambiental (SARTORI et al., 2002; AMBROSE; GOVINDARAJAN; GOONEWARDENE, 2006; KADOKAWA, 2007; UDOMPRASERT; WILLIAMSON, 1987), atingindo 10,0 a 20,0% durante os meses mais quentes do ano (WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000; RENSIS; SCARAMUZZI, 2003; RODRIGUES et al., 2007a). No entanto, quando a técnica de transferência de embrião é implementada, maiores taxas de concepção são obtidas, principalmente durante o período quente do ano (40,0%; DEMETRIO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007a; CHEBEL; DEMÉTRIO; METZGER, 2008). Com relação às vacas repetidoras de serviço, a diferença na taxa de concepção após IA (17,9%) ou TE

(41,7%) é bastante expressiva, sendo ainda maior durante o período quente (IA: 10,0 e TE: 39,0%; RODRIGUES et al., 2007b).

Por fim, de acordo com o modelo estatístico de MCMILLAN (1998), apenas 50 a 70% dos embriões e das receptoras possuem potencial suficiente para se desenvolverem e manterem a gestação até o momento do parto. O mesmo autor afirma que as variações existentes na taxa de concepção de receptoras de embrião se deve, principalmente, a variações na receptora e não na competência do embrião. Entretanto, estudos adicionais são necessários para elucidar o potencial de influência da origem do embrião na taxa de concepção das receptoras.

3 HIPÓTESES

3.1 RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES DE NOVILHAS E VACAS EM LACTAÇÃO DA RAÇA HOLANDESA DURANTE DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO

- A resposta ao protocolo de superovulação e a produção de embriões são *menores* em vacas Holandesas em lactação, comparado com novilhas (Figura 1);
- A resposta ao protocolo de superovulação e a produção de embriões são *menores* durante os meses mais quentes do ano, tanto em vacas lactantes quanto em novilhas Holandesas (Figura 1);
- O efeito da elevada temperatura ambiental durante os meses quentes do ano afeta de maneira mais significativa a resposta ao protocolo de superovulação e a produção de embriões em vacas em lactação do que novilhas (Figura 1).

3.2 TAXA DE CONCEPÇÃO DE RECEPTORAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO APÓS TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES ORIUNDOS DE NOVILHAS E VACAS EM LACTAÇÃO DA RAÇA HOLANDESA DURANTE DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO

- A taxa de concepção das receptoras é *menor* quando os embriões são oriundos de doadoras Holandesas em lactação, comparado aos embriões de doadoras novilhas (Figura 1);
- A taxa de concepção das receptoras é *menor* quando os embriões são produzidos durante os meses quentes do ano (Figura 1);
- O efeito da elevada temperatura ambiental durante a produção de embriões afeta de maneira mais acentuada a taxa de concepção das receptoras quando os embriões são oriundos de doadoras lactantes, comparada aos embriões de doadoras novilhas (Figura 1).

Figura 1 - Modelo hipotético da resposta ao protocolo de superovulação e taxa de concepção de embriões produzidos durante duas épocas do ano (quente e não quente), considerando a categoria da doadora.

4 OBJETIVO

Para testar as hipóteses, o presente estudo teve como objetivo avaliar a influência de variáveis relacionadas às doadoras de embrião (categoria animal e época do ano de produção do embrião) na resposta superovulatória, assim como na taxa de concepção das receptoras em programas de SOV-TE em fêmeas da raça Holandesa

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 FAZENDA E ANIMAIS

O estudo avaliou dados de 1.562 protocolos de superovulação (609 em vacas em lactação e 953 em novilhas da raça Holandesa) e de 4.076 fêmeas que receberam um embrião fresco ou congelado (vacas em lactação). Os procedimentos foram realizados em duas propriedades de produção leiteira, localizadas no município de Descalvado (Fazenda Santa Rita) e Franca (Fazenda Petrópoles), ambas no estado de São Paulo. Foram utilizados 36 touros para realização das inseminações artificiais em tempo fixo dos protocolos de SOV. Os dados foram coletados durante os anos de 2007 a 2010, sendo todas as técnicas realizadas pelo mesmo médico veterinário (Tabela 1).

As vacas em lactação permaneceram em sistema confinado tipo *Free-stall*, enquanto as novilhas foram mantidas a pasto, recebendo suplementação de acordo com o manejo das propriedades. As fêmeas em lactação eram ordenhadas três vezes ao dia, com intervalo de aproximadamente oito horas e apresentaram produção média de $25,8 \pm 7,6$ (doadoras) e $23,5 \pm 5,8$ L de leite por dia (receptoras), durante o protocolo de SOV e a TE, respectivamente. Ainda, as vacas em lactação receberam 500 mg de somatotropina bovina recombinante (bST; Boostin[®], MSD Saúde Animal, Brasil) a cada 12 dias, assim como, as demais fêmeas em lactação das propriedades.

Ambas as categorias, lactantes e novilhas, receberam dietas balanceadas a base de silagem de milho e concentrado de milho e soja, suficientes para atingir ou exceder os requerimentos nutricionais mínimos das respectivas categorias (NRC, 2001).

5.2 AVALIAÇÃO DAS VARIÁVEIS CLIMÁTICAS

Os meses do ano foram agrupados em época quente, meses de novembro e dezembro e janeiro a maio, e época não quente, os meses de junho a outubro (Tabela 1). Tal agrupamento foi baseado no comportamento da taxa de concepção após IA ao longo dos meses do ano observado na Fazenda Santa Rita (Figura 2).

Os dados de temperatura máxima foram registrados na Fazenda Santa Rita no período de 2007 a 2010, por meio de termômetro de bulbo seco. A temperatura máxima ali colhida foi utilizada para análise retrospectiva das condições climáticas, conforme proposto por García-Ispuerto et al. (2007).

Também foi considerado para a análise a média das temperaturas máximas durante os 15 dias e entre os dias sete e dez do protocolo de SOV, sendo o último correspondente ao período de crescimento folicular final até o momento da ovulação. Ainda, a média da temperatura máxima dos sete dias que antecederam o dia da TE também foi calculada.

Tabela 1 - Estatística descritiva relacionada à produção de embriões.

Itens	Número de protocolos de SOV
Total de protocolos de SOV	1.562
Fazenda	
A	1.354
B	208
Ano	
2007	272
2008	503
2009	374
2010	413
Categoria animal (doadora)	
Novilha <i>(época quente/não quente)</i>	953 (354/599)
Vaca em lactação <i>(época quente/não quente)</i>	609 (270/339)
Época do ano da produção do embrião	
Época quente <i>(novilha/vaca em lactação)</i>	624 (354/270)
Época não quente <i>(novilha/vaca em lactação)</i>	938 (599/339)
Touros	36

Figura 2 - Taxa de concepção de vacas Holandesas em lactação submetidas a IA (n = 39.393) de acordo com os meses do ano. Os meses do ano foram agrupados em época quente (novembro e dezembro e janeiro a maio) e época não quente (junho a outubro). Dados referentes aos anos de janeiro de 2006 a março de 2012 da Fazenda Santa Rita.

5.3 PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO DAS DOADORAS

Em dia aleatório do ciclo estral (D0), as doadoras receberam implante auricular de norgestomet [um implante para novilhas (3 mg) e dois para vacas em lactação (6 mg); Crestar®, MSD Saúde Animal, Brasil], Benzoato de Estradiol (BE, 2,0 mg; Gonadiol®, MSD Saúde Animal, Brasil) e Progesterona injetável (P4, 50 mg; Afisterone®, Hertape Calier, Brasil). Concomitantemente ao início do tratamento (D0), todas as doadoras receberam uma dose de complexo vitamínico e aminoácidos (Aminopool®, Aminogel, Brasil) e uma infusão intrauterina de Cefapirina (Metricure®, MSD Saúde Animal, Brasil).

No D4 iniciou-se o tratamento superestimulatório por meio da administração de doses decrescentes do hormônio folículo estimulante (FSH, 250 UI para novilhas e 500 UI para vacas em lactação; Pluset®, Hertape Calier, Brasil) a cada 12 h, durante três dias (D4 a D6). No D6, juntamente com a quinta e sexta dose de FSH, os animais receberam uma dose de Prostaglandina F2α (PGF2α, 0,53 mg cloprostenol sódico; Ciosin®, MSD Saúde Animal, Brasil). No D7 foi administrado gonadotrofina coriônica equina (eCG, 400 UI para novilhas e 500 UI para vacas em lactação; Folligon®, MSD Saúde Animal, Brasil) pela manhã e os

implantes foram removidos no período da tarde. O hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH, 0,25 mg de gonadorelina; Fertagyl[®], MSD Saúde Animal, Brasil) foi administrado 12 e 24 h após a remoção do implante para novilhas e vacas em lactação, respectivamente. As inseminações artificiais foram realizadas 12 e 24 h após o GnRH e a coleta dos embriões seis dias e meio após a primeira IA (Figura 3; RODRIGUES et al., 2005; MATTOS et al., 2011; MARTINS et al., 2012; RIGOGGIO et al., 2012).

Imediatamente antes das coletas, as doadoras foram avaliadas via palpação retal para avaliar a presença e quantidade de corpo lúteo (CL). A coleta só foi realizada em animais que possuíam dois ou mais CL.

Figura 3 – Programas de superovulação (SOV) com inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em doadoras Holandesas lactantes (A) e novilhas (B) e receptoras Holandesas em lactação.

A

	Doadora (vaca em lactação)		Receptora
Dia do tratamento	MANHÃ	TARDE	MANHÃ
0			Implante de Norgestomet + BE
1		Implante de Norgestomet + BE	
5		FSH (22%)	
6	FSH (22%)	FSH (17%)	
7	FSH (17%)	FSH (11%) + PGF2 α	
8	FSH (11%) + PGF2 α	eCG	Remoção do implante + PGF2 α + CE + eCG
9	Remoção do implante		Estro observado
10	GnRH	IATF	Estro observado/ estimado
11	IATF		Estro observado
17	Coleta		TE / TETF + GnRH

B

	Doadora (novilha)		Receptora
Dia do tratamento	MANHÃ	TARDE	MANHÃ
0			Implante de Norgestomet + BE
2	Implante de Norgestomet + BE		
6	FSH (22%)	FSH (22%)	
7	FSH (17%)	FSH (17%)	
8	FSH (11%) + PGF2 α	FSH (11%) + PGF2 α	Remoção do implante + PGF2 α + CE + eCG
9	eCG	Remoção do implante	Estro observado
10	GnRH	IATF	Estro observado/ estimado
11	IATF		Estro observado
17	Coleta		TE / TETF + GnRH

5.4 PRODUÇÃO, CONGELAMENTO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO

Os programas para produção, congelamento e transferência de embrião foram conduzidos por uma empresa brasileira de transferência de embriões (SAMVET - São Carlos, São Paulo, Brasil). Todos os procedimentos foram realizados pelo mesmo médico veterinário. Os embriões recuperados ($n = 4.076$) foram mantidos em placas de cultura de células contendo solução de manutenção TQC[®] (AB Tecnologia, Nutricell, Brasil). As estruturas recuperadas foram avaliadas com auxílio de esteriomicroscópio (SMZ 645, Nikon, Japão) com aumento de 50 vezes. Inicialmente, as estruturas foram classificadas em fertilizadas (embriões viáveis ou degenerados) ou não fertilizadas. Ainda, os embriões viáveis foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (mórula, blastocisto, blastocisto inicial e blastocisto expandido) e sua qualidade (Grau 1: massa celular esférica, simétrica, homogênea e com pelo menos 85% da massa intacta; Grau 2: massa celular com moderadas irregularidades de conformação e cor e com pelo menos 50% da massa intacta; e Grau 3: massa celular com consideráveis irregularidades de conformação e cor e com pelo menos 25% da massa intacta) de acordo com o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (ROBERTSON; NELSON, 1998).

Os embriões frescos foram envasados, posteriormente às classificações, em palhetas de 0,25 mL (IMV, França) e mantidos em temperatura ambiente (25 °C) até o momento da transferência. Os embriões congelados foram submetidos ao processo de congelamento com etileno glicol TQC[®] (AB Technology, Nutricell, Brasil), utilizando-se uma máquina de congelamento automático (TK 2000[®], programa P1-01, BOV/E/O1; TK e Nutricell, Brasil). Ao final do processo, as palhetas (0,25 mL, IMV, França) foram transferidas para botijões com nitrogênio líquido (-196 °C), onde foram armazenadas até o momento da transferência do embrião. Para descongelar os embriões, as palhetas foram removidas do nitrogênio líquido, mantidas em temperatura ambiente durante 10 segundos e imersas em água a 25 °C por mais 10 segundos. Todos os embriões foram transferidos pelo método não cirúrgico para o corno uterino ipsilateral ao CL.

5.5 MANEJO REPRODUTIVO DAS RECEPTORAS

Foram utilizadas como receptoras para os embriões vacas em lactação com mais de 150 dias em lactação ou aquelas consideradas como “repeat breeders” (três ou mais serviços prévios). As receptoras foram submetidas a protocolo de sincronização ou observação de estro, previamente estabelecidos (RODRIGUES et al., 2010), para posterior transferência de embrião. O protocolo de sincronização para TE compreendia a inserção de um implante auricular de norgestomet e BE (2 mg) no D0. No D8, o implante foi removido e administrado 400 UI de eCG, 0,530 mg de PGF2 α e 1 mg de Cipionato de Estradiol (CE). A TE foi realizada no D17 do protocolo (receptoras sincronizadas) ou no D6, D7 ou D8 pós observação do estro (Figura 3). Imediatamente antes da TE, todas as receptoras foram avaliadas por meio de palpação retal para verificar a presença, tamanho e quantidade (1 e $\geq$ 2) de CL, sendo que apenas os animais com pelo menos um CL receberam embrião (HANZEN et al., 2000).

A classificação do tamanho do CL foi realizada por meio da palpação retal (HANZEN et al., 2000; YOSHIDA et al., 2012) seguindo os critérios utilizados pelo médico veterinário (volume CL:volume ovário): 1 = quando o CL ocupava 75% do volume do ovário; 2 = quando o CL ocupava 50% do volume do ovário; e 3 = quando o CL ocupava 25% do volume do ovário. Ainda, para classificação do tamanho do CL a sincronia doadora-receptora foi considerada (SPELL et al., 2001). Todos os embriões foram transferidos pelo método não cirúrgico para o corno uterino ipsilateral ao CL. Ainda, imediatamente após a transferência do embrião, todas as receptoras receberam 0,1 mg de GnRH (Tabela 2).

Tabela 2 - Estatística descritiva relacionada à sobrevivência embrionária.

Itens	Número de TE	Itens	Número de TE
Total de TE	4.076	Estágio embrionário¹	
Fazenda		Mórula	2.224
A	4.030	Blastocisto inicial	983
B	46	Blastocisto	760
Ano		Blastocisto expandido	109
2007	787	Grau de qualidade embrionária¹	
2008	951	Grau I	662
2009	1.007	Grau II	2.202
2010	1.331	Grau III	1.212
Origem do embrião		Número de CL (receptora)	
Novilha	2.314	1	3.750
(época quente/não quente de produção)	(596/1.718)	≥ 2	326
Vaca em lactação	1.762	Tamanho do CL (receptora)²	
(época quente/não quente de produção)	(576/1.186)	Categoria I	2.249
Época do ano da produção do embrião		Categoria II	1.676
Época quente	1.172	Categoria III	151
(novilha/vaca em lactação)	(596/576)	Época do ano da TE	
Época não quente	2.904	Época quente	2.012
(novilha/vaca em lactação)	(1.718/1.186)	(novilha/vaca em lactação)	(1.205/807)
Embrião fresco/congelado		Clima não quente	2.064
Fresco	2.279	(novilha/vaca em lactação)	(1.109/955)
Congelado	1.797		

¹ Classificação de acordo com o Manual da IETS (ROBERTSON; NELSON, 1998); ² Categoria 1: CL ocupa 75% do volume do ovário; Categoria 2: 50% e Categoria 3: 25%.

5.6 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação foi realizado aos $24,5 \pm 6,5$ dias após a TE ($31,5 \pm 6,5$ dias após estro presumido; TC31) por ultrassonografia transretal (Aloka SSD 500, transdutor linear 5 MHz, Tokyo, Japão). A prenhez foi caracterizada pela presença de uma vesícula embrionária com um embrião viável (presença de batimentos cardíacos). A gestação foi confirmada aos $38,5 \pm 6,5$ dias após a TE ($45,5 \pm 6,5$ dias após estro presumido; TC45) por palpação retal. A confirmação da prenhez foi caracterizada pela presença de uma assimetria entre os cornos uterinos, detecção da vesícula amniótica e palpação do alanto-córium. A taxa de concepção foi calculada com base na proporção de vacas prenhes aos 31 e 45 dias de gestação com relação ao número de fêmeas que receberam um embrião. Ainda, a perda gestacional foi calculada com base na proporção de vacas não gestantes aos 45 dias com relação ao número de vacas prenhes aos 31 dias de gestação.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS 9.2 (Statistical Analysis Software, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) e as variáveis foram caracterizadas como distribuição Poisson ou Binomial. As variáveis independentes incluídas no modelo utilizado para análise da produção de embriões foram fazenda, ano da produção dos embriões, categoria animal da doadora, época do ano da produção dos embriões, interação categoria animal da doadora e época do ano de produção dos embriões, e média da temperatura máxima durante os 15 dias e entre o dia sete e dez do protocolo de SOV. As variáveis resposta foram taxa de superovulação (número de doadoras com dois ou mais CL / número total de doadoras submetidas ao protocolo de SOV), número de CL no momento da coleta, número de estruturas totais recuperadas, taxa de recuperação (número de estruturas totais recuperadas / número total de CL no momento da coleta), taxa de fertilização (número de embriões viáveis e degenerados / número de estruturas totais recuperadas), número e taxa de embriões viáveis (número de embriões viáveis / número de estruturas totais recuperadas), taxa de embriões grau I e II (número de embriões grau I e II / número de estruturas totais

recuperadas) e taxa de embriões degenerados (número de embriões degenerados / número de estruturas totais recuperadas).

Foram considerados efeitos aleatórios, animal dentro de fazenda e época do ano de produção dentro de ano quando a taxa de superovulação e o número de CL no momento da coleta foram avaliados. Para análise do número de estruturas totais recuperadas, taxa de recuperação, taxa de fertilização, número e taxa de embriões viáveis, taxa de embriões grau I e II e taxa de embriões degenerados os efeitos aleatórios foram animal dentro de fazenda, época do ano dentro de ano e touro dentro de fazenda.

Para a análise da taxa de concepção e perda gestacional das receptoras foram incluídos no modelo inicial os efeitos de categoria animal da doadora, época do ano de produção, interação categoria animal da doadora e época do ano de produção, temperatura máxima média entre o D7 e D10 do protocolo de SOV, estágio e qualidade do embrião, estado do embrião (fresco ou congelado), tamanho e quantidade do CL da receptora, época do ano da transferência do embrião, interação categoria animal da doadora e época do ano da transferência do embrião e média da temperatura máxima dos sete dias que antecederam a transferência de embrião. Foram considerados efeitos aleatórios animal dentro de fazenda, época do ano dentro de ano e touro dentro de fazenda, quando a taxa de concepção e perda gestacional foram analisadas. Para a análise das variáveis binomiais, foi utilizado o modelo “backward stepwise regression”, e as variáveis explanatórias foram sequencialmente removidas do modelo estatístico seguindo o critério de Wald se $P > 0,20$.

No modelo final para análise da concepção aos 30 dias foram mantidos os efeitos de categoria animal da doadora, qualidade do embrião, tamanho e quantidade de CL e média da temperatura máxima dos sete dias que antecederam a transferência de embrião. Para análise aos 45 dias foram mantidos os efeitos categoria animal da doadora, qualidade do embrião, estado do embrião (fresco ou congelado), tamanho e quantidade de CL da receptora e média da temperatura máxima dos sete dias que antecederam a transferência de embrião. Por fim, para análise da perda gestacional entre 30 e 45 dias de gestação foram mantidos no modelo final efeitos de época do ano de produção, média da temperatura máxima entre o D7 e D10 do protocolo de SOV, qualidade do embrião e estado do embrião (fresco ou congelado).

Foi, também, determinada a associação entre a média da temperatura máxima dos sete dias que antecederam a transferência de embrião e a probabilidade de concepção aos 30 e 45 dias, assim como perda gestacional. As curvas de regressão logística foram obtidas utilizando os coeficientes gerados pelo artifício “interactive data analyses” do programa estatístico SAS

e da fórmula $y = \exp(\alpha \times x + b) / [1 + \exp(\alpha \times x + b)]$, onde: y = probabilidade de sucesso de concepção ou perda gestacional; exp = exponencial, α = inclinação da equação logística; b = intercepto da equação logística; x = média da temperatura máxima dos sete dias que antecederam a transferência de embrião em graus celsius.

Os resultados foram apresentados pela média ajustada obtida pelo LS Means. Valores de $P < 0,05$ foram considerados como significantes.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES DE NOVILHAS E VACAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO DURANTE DIFERENTES ÉPOCAS DO ANO

No geral, 88,7% das doadoras submetidas ao protocolo de superovulação (SOV) responderam com dois ou mais corpos lúteos no momento da coleta de embriões. A média do total de CL foi $9,3 \pm 0,2$, com $7,1 \pm 0,2$ estruturas totais recuperadas, resultando em 68,6% de taxa de recuperação. Do total de estruturas recuperadas, 64,4% eram estruturas fertilizadas ($4,6 \pm 0,1$). No entanto, apenas 54,1% das estruturas recuperadas eram embriões viáveis ($3,8 \pm 0,1$ embriões viáveis por coleta) e 10,3% ($0,7 \pm 0,04$) eram embriões degenerados. Com relação aos efeitos de fazenda e ano da coleta de embrião, dentre todas as variáveis analisadas, apenas o número de CL no momento da coleta foi diferente entre os anos ($P = 0,04$).

A taxa de SOV (número de doadoras com dois ou mais CL por protocolo de SOV) foi semelhante entre novilhas (89,7%) e vacas em lactação (91,9%, $P = 0,26$; Tabela 3). A época do ano também não influenciou a taxa de SOV (época quente = 89,3% vs. época não quente = 92,2%, $P = 0,09$; Tabela 3). Ainda, doadoras lactantes apresentaram maior número de CL ($10,6 \pm 0,6$ vs. $7,5 \pm 0,4$; $P < 0,0001$) que novilhas (Figura 4 A). E menor número de CL foi obtido em doadoras superovuladas na época quente do ano ($8,3 \pm 0,5$ vs. $9,7 \pm 0,5$, $P = 0,03$; Figura 5 A). Não houve interação categoria e época do ano de produção do embrião para nenhuma das variáveis previamente citadas ($P > 0,05$; Tabela 3).

Tabela 3 – Taxa de superovulação (SOV), total de corpo lúteo (CL) no dia da coleta de embriões, total de estruturas recuperadas, taxa de recuperação, número e taxa de estruturas fertilizadas, número e taxa de embriões viáveis, número e taxa de embriões grau I e II e número e taxa de embriões degenerados de doadoras de diferentes categorias (novilha e vaca em lactação) submetidas ao protocolo de SOV com inseminação artificial em tempo fixo durante duas épocas do ano (quente e não quente). Dados apresentados como porcentagem e média $\pm$ erro padrão médio.

	Novilha		Vaca em lactação		Categoria	Valor de <i>P</i>	
	Não quente (n = 599)	Quente (n = 354)	Não quente (n = 339)	Quente (n = 270)		Época	Categoria* Época
Taxa SOV (%) ^a	92,5	86,1	91,9	91,9	0,26	0,09	0,05
Total CL (n)	8,1 $\pm$ 0,5	6,8 $\pm$ 0,4	11,3 $\pm$ 0,7	9,8 $\pm$ 0,7	< 0,0001	0,03	0,94
Total estruturas (n)	5,2 $\pm$ 0,5	4,1 $\pm$ 0,4	8,5 $\pm$ 0,7	6,7 $\pm$ 0,7	< 0,0001	0,04	0,45
Taxa Recuperação (%) ^b	64,1	53,1	79,3	76,4	< 0,0001	0,007	0,18
Estruturas fertilizadas (n)	5,1 $\pm$ 0,3	3,7 $\pm$ 0,4	5,5 $\pm$ 0,4	3,8 $\pm$ 0,5	0,45	0,03	0,55
Taxa de Fertilização (%) ^c	83,1	81,6	52,4	43,2	< 0,0001	0,07	0,27
Embriões viáveis (n)	4,4 $\pm$ 0,4	3,2 $\pm$ 0,4	4,3 $\pm$ 0,5	2,4 $\pm$ 0,4	0,16	0,03	0,10
Taxa embriões viáveis (%) ^d	69,5	65,2	37,8	25,8	< 0,0001	0,002	0,11
Embriões grau I e II (n)	1,9 $\pm$ 0,2 ^{Aa}	1,6 $\pm$ 0,2 ^{Bx}	1,6 $\pm$ 0,7 ^{Xa}	0,8 $\pm$ 0,1 ^{Yy}	< 0,0001	0,03	< 0,0001
Taxa de embriões Grau I e II (%) ^e	46,2 ^{Aa}	38,1 ^{Bx}	21,7 ^{Xb}	10,7 ^{Yy}	< 0,0001	< 0,0001	0,02
Embriões degenerados (n)	0,5 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,1	0,0006	0,14	0,67
Taxa embriões degenerados (%) ^f	9,6	11,9	8,6	11,1	0,49	0,06	0,88

^a Taxa de SOV: n° de doadoras com dois ou mais CL / n° de protocolos de SOV; ^b Taxa de recuperação: n° de estruturas recuperadas / n° de CL no momento da coleta; ^c Taxa de fertilização: número de estruturas fertilizadas / número total de estruturas recuperadas; ^d Taxa de embriões viáveis: n° de embriões viáveis / n° total de estruturas recuperadas; ^e Taxa de embriões Grau I e II: n° de embriões graus I e II / n° total de estruturas recuperadas; ^f Taxa de embriões degenerados: n° de embriões degenerados / n° total de estruturas recuperadas. Letras maiúsculas diferentes (^A e ^B / ^X e ^Y) na mesma linha diferem dentro da mesma categoria (*P* < 0,05) e letras minúsculas diferentes (^a e ^b / ^x e ^y) na mesma linha diferem dentro na mesma época do ano (*P* < 0,05).

Figura 4 – Número de corpo lúteo (CL) no dia da coleta de embriões (A), total de estruturas recuperadas (B) e taxa de recuperação (C) de doadoras novilhas e vacas em lactação submetidas ao protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão médio e porcentagem.

Figura 5 – Número de corpo lúteo (CL) no dia da coleta de embriões (A), total de estruturas recuperadas (B) e taxa de recuperação (C) de doadoras Holandesas submetidas ao protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo durante duas épocas do ano (quente e não quente). Dados apresentados como média $\pm$ erro padrão médio e porcentagem.

Taxa semelhante de SOV foi reportada em doadoras lactantes por Chebel; Demétrio; Metzger (2008) e ainda, assim como o presente estudo, os autores não encontraram diferença na taxa de SOV quando o protocolo foi aplicado durante a época quente ou não quente do ano. O número de CL encontrados entre as categorias, também, está de acordo com dados encontrados na literatura para doadoras da raça Holandesa (LEROY et al., 2005; MARTINS et al., 2012).

A resposta aos protocolos de superestimulação é influenciada pelo número de folículos que respondem aos estímulos e o número de ovulações. Em doadoras novilhas a falha na ovulação de alguns folículos tem sido discutida com base no tamanho dos folículos (menor diâmetro folicular) no início do tratamento com hormônio folículo estimulante (FSH). E o reduzido diâmetro folicular pode inviabilizar a maturação completa dos folículos superestimulados (D'OCCHIO; JILLELLA; LINDSEY, 1999), com consequente redução na taxa de ovulação ao final do protocolo.

Além do tamanho dos folículos, a concentração de progesterona durante as aplicações de FSH tem sido negativamente correlacionada com o número de folículos que atingem o estágio com capacidade ovulatória, taxa de ovulação e número de CL no momento da coleta de embriões (EL-SHERRY et al., 2010; KAFI; MCGOWAN, 2012). El-Sherry et al. (2010) sugerem que essa redução da resposta superovulatória em ambientes com concentrações de progesterona elevada pode estar relacionada à supressão dos pulsos de hormônio luteinizante – LH (STOCK; FORTUNE, 1993). Estudos iniciais realizados em cabras e vacas Holandesas reportaram que altas concentrações de progesterona podem suprimir a liberação do hormônio do crescimento – GH (YONEZAWA et al., 2005; EL-SHERRY et al., 2010), com consequente redução nas concentrações circulantes do fator de crescimento semelhante a insulina - IGF-I (CUSHMAN et al., 2001). Estudos *in vitro* reportaram que reduzidas concentrações de GH, resultaram em aumento na incidência de apoptose nas células da granulosa (SIROTKIN; MAKAREVICH, 1999). E o IGF-I está relacionado a proliferação celular (SPICER; ALPIZAR; ECHTERNKAMP, 1993), a sensibilização das células do folículo ao FSH e LH (SPICER; ECHTERNKAMP, 1995) e consequentemente ao crescimento folicular (CHASE JR et al., 1998).

Dessa forma, visto que novilhas apresentam maiores concentrações de progesterona do que vacas em lactação (SANGSRITAVONG et al., 2002; SARTORI et al., 2004), as superiores concentrações de progesterona podem justificar a menor resposta superovulatória em doadoras novilhas. Ainda, vale ressaltar que a dose de FSH utilizada no protocolo de doadoras novilhas foi inferior ao utilizado em vacas em lactação. Dessa forma, a dose do FSH

também pode ter influência na resposta superovulatório entre as categorias. Estudos constataram que adequada resposta superovulatória e produção de embriões em fêmeas *Bos indicus* são obtidas com doses de FSH 25 a 30% inferiores às doses utilizadas em fêmeas *Bos taurus* (LEWIS, 1992).

Outro fator importante é o fato das doadoras lactantes terem recebido 500 mg de somatotropina bovina recombinante (bST) a cada 12 dias, como tratamento de rotina adotado pela fazenda. Um experimento realizado em fêmeas não lactantes reportou maior número de CL em fêmeas tratadas com estradiol e bST e maior número de estruturas totais recuperadas em fêmeas tratadas apenas com bST (CUSHMAN et al., 2001). As fêmeas que receberam bST apresentaram maiores concentrações de GH e IGF-I, hormônios considerados essenciais para o desenvolvimento folicular pré-antral e antral (WANDJI; PELLETIER; SIRARD, 1992; LIU et al., 1998).

O efeito negativo do estresse térmico na resposta superovulatória de doadoras de embrião pode estar relacionado às alterações das células foliculares. Em experimento realizado em camundongos foi observado que as células da granulosa apresentam menor expressão de receptores de gonadotrofinas, maior suscetibilidade à apoptose e ainda, reduzida atividade esteroidogênica durante períodos de estresse térmico (SHIMIZU et al., 2005). Ainda, ROTH et al. (2001) observaram que exposição a altas temperaturas ambientais está associada a degeneração celular (células da teca e granulosa) em fêmeas bovinas, fator que pode comprometer a resposta superovulatória durante as épocas quentes do ano.

Doadoras lactantes apresentaram maior número de estruturas recuperadas ($7,6 \pm 0,6$ vs. $4,6 \pm 0,4$; $P < 0,0001$) que novilhas (Figura 4 B). E menor número de estruturas recuperadas ($5,3 \pm 0,5$ vs. $6,7 \pm 0,5$; $P = 0,04$) foi observado em doadoras superovuladas na época não quente (Figura 5 B). Também não houve interação categoria e época do ano de produção do embrião para número de estruturas recuperadas ($P = 0,45$; Tabela 3).

Altos níveis de progesterona ($\geq 4,6 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) tenderam a diminuir o total de estruturas recuperadas e o número de embriões transferíveis em doadoras novilhas (KAFI; MCGOWAN, 2012), assim como observado na resposta superovulatória (EL-SHERRY et al., 2010). Portanto, as maiores concentrações de progesterona observadas em doadoras novilha (SARTORI et al., 2004) pode, também, estar relacionada com o menor número de estruturas recuperadas nessa categoria. Ainda, uma vez comprometida a resposta superovulatória, o número de estruturas recuperadas também é reduzido como consequência. No entanto, outros pesquisadores não observaram diferença no total de estruturas recuperadas entre vacas lactantes e novilhas (HASLER, 2006; SALES et al., 2008).

Doadoras lactantes apresentaram maior taxa de recuperação (77,6 vs 58,7%; $P < 0,0001$) que novilhas (Figura 4 C). Ainda, menor taxa de recuperação foi observada em doadoras superovuladas durante a época quente do ano, comparado com doadoras superovuladas na época não quente (65,7 vs. 72,3 %, $P = 0,007$; Figura 5 C). Não houve interação categoria e época do ano de produção do embrião para nenhuma taxa de recuperação ($P = 0,18$; Tabela 3).

Em animais que apresentam grande resposta superovulatória, com mais de 20 ovulações, verificou-se que existe perda na taxa de recuperação de embriões (SHAW et al., 1995). Os autores discutem e sugerem que pode existir um comprometimento no transporte dos oócitos devido ao grande número de folículos pré-ovulatórios no ovário, os quais interferem na orientação espacial do infundibulum. Estudos realizados em búfalas superestimuladas constataram que altas concentrações de estradiol estão negativamente relacionadas com a taxa de recuperação, provavelmente devido ao estímulo do peristaltismo reverso e consequente perda de estruturas na cavidade abdominal (MISRA et al., 1998).

Dessa forma, a menor taxa de recuperação pode estar relacionada com as superiores concentrações de estradiol relatadas em novilhas após ovulação única (SARTORI et al., 2004). Outro fator importante é o estágio de desenvolvimento dos órgãos reprodutivos, que são menores em novilhas quando comparado com vacas em lactação. Os animais com menor tracto reprodutivo podem apresentar menor capacidade de captação dos oócitos. Ainda, o menor volume uterino pode dificultar a recuperação das estruturas embrionárias durante a lavagem uterina.

Inferior taxa de recuperação também foi observada quando os protocolos de superovulação foram realizados durante os meses quentes do ano. Esses resultados são suportados por dados da literatura que reportaram efeitos negativos do estresse térmico na qualidade oocitária (AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002b), com consequente comprometimento da taxa de recuperação dos oócitos (TORRES-JÚNIOR et al., 2008).

A taxa de fertilização foi inferior em doadoras lactantes (47,9 vs. 82,4%, $P < 0,0001$; Figura 6), corroborando dados da literatura (SARTORI et al., 2002; PEIPPO et al., 2010). Essa menor taxa de fertilização em vacas em lactação pode estar associada a: 1. maior produção de calor, dificultando a termoregulação do animal (BERMAN et al., 1985; AL-KATANANI; WEBB; HANSEN, 1999); e 2. maior dano oxidativo, visto que a atividade antioxidante das células está negativamente relacionada com a idade do animal (RANI; PANNEERSELVAM, 2001). Dessa forma, ambos os fatores podem estar prejudicando a

qualidade oocitária e o ambiente uterino, consequentemente, a capacidade de fecundação e desenvolvimento embrionário inicial.

Ainda, doadoras lactantes ou novilhas superovuladas apresentaram menor porcentagem de espermatozóides acessórios por estrutura não fecundada e/ou embrião degenerado (5 a 41%; HAWK AND TANABE, 1986; SAACKE et al., 1998; DALTON et al., 2000; SARTORI ET AL., 2004) quando comparadas a vacas e novilhas não superovuladas (18 a 42 espermatozóides acessórios na zona pelúcida por embrião/estrutura não fecundada; SARTORI et al., 2002),. Portanto, esses resultados são indicativos de que o processo de superovulação interfere negativamente na taxa de fertilização.

Figura 6 – Taxa de fertilização após protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo de doadoras novilhas e vacas em lactação da raça Holandesa. Dados apresentados como porcentagem.

Apesar da época do ano não ter influenciado a taxa de fertilização (época quente = 64,9 vs. época não quente = 70,0%, $P = 0,07$; Tabela 3), foi observado menor número de estruturas recuperadas durante o período quente do ano ($3,7 \pm 0,4$ vs. $5,3 \pm 0,3$, $P = 0,03$; Figura 7). Ainda, a taxa de fertilização apresentou relação negativa com a temperatura máxima média durante os 15 dias do protocolo de SOV ($P = 0,006$). Outros autores observaram menor taxa de fertilização em doadoras Holandesas durante a época quente do

ano (SARTORI et al., 2002; CHEBEL; DEMÉTRIO; METZGER, 2008). Visto que Sartori et al. (2002) reportaram presença de espermatozóides acessórios nas estruturas não fecundadas, os mesmos sugeriram que a falha na fertilização pode estar relacionada a problemas ligados a qualidade e maturação oocitária (LENZ et al., 1983; RIVERA; HANSEN, 2001b) durante períodos quentes do ano (AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002b; FERREIRA et al., 2011; GENDELMAN; ROTH, 2012).

Figura 7 – Número de estruturas fertilizadas após protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo de doadoras Holandesas durante duas época do ano (quente e não quente). Dados apresentados como porcentagem.

O número de embriões viáveis foi semelhante entre as categorias (novilhas = $3,8 \pm 0,3$ vs. vacas em lactação = $3,3 \pm 0,4$; $P = 0,16$; Tabela 3), assim como observado por Peippo et al. (2009). Contrariamente, SALES et al. (2008) observaram menor número de embriões viáveis em doadoras lactantes, comparado com novilhas. No entanto, o número de embriões viáveis foi inferior durante a época quente ($2,8 \pm 0,3$ vs. $4,4 \pm 0,4$, $P = 0,03$; Tabela 3), independentemente da categoria da doadora, corroborando os dados observados por Chebel; Demétrio; Metzger (2008). O número de embriões viáveis grau I e II apresentou-se inferior em doadoras lactantes superovuladas durante a época quente do ano ($P < 0,0001$; Tabela 3). Ainda, superior número de embriões degenerados foi observado em vacas em lactação comparado com novilhas ($0,8 \pm 0,1$ vs. $0,5 \pm 0,1$; $P = 0,0006$; Tabela 3).

A taxa de embriões viáveis ($31,5$ vs. $67,4\%$, $P < 0,0001$; Figura 8 A) e embriões grau I e II ($15,4$ vs. $42,1\%$, $P < 0,0001$; Tabela 3) foram inferiores em doadoras lactantes,

corroborando os achados da literatura (SARTORI et al., 2002; LEROY et al., 2005; SALES et al., 2008). Semelhantemente, inferiores taxas de embriões viáveis (44,6 vs. 54,0%, $P = 0,002$; Figura 8 B) e embriões grau I e II (21,4 vs. 32,8%, $P < 0,0001$; Tabela 3) foram verificadas durante a época quente do ano. No entanto, a queda na taxa de embriões grau I e II durante a época quente foi mais acentuada ($P = 0,02$) em doadoras lactantes (de 21,7% para 10,7%), quando comparada à observada em novilhas (de 46,2% para 38,1%). Ainda, a taxa de embriões viáveis também se mostrou negativamente relacionada com a temperatura máxima durante os 15 dias do protocolo de SOV ($P = 0,03$). A temperatura máxima média entre o dia sete e dez do protocolo de SOV não alterou nenhuma das variáveis resposta analisadas ($P > 0,05$).

Figura 8 – Taxa de embriões viáveis após protocolo de superovulação em (A) duas categorias de animais (novilha e vaca em lactação) e (B) durante duas épocas do ano (quente e não quente). Dados apresentados como porcentagem.

Assim como o estradiol, reduzidas concentrações de progesterona também têm sido relatadas em vacas em lactação (SARTORI et al., 2004; WILTBANK et al., 2006), comprometendo o desenvolvimento embrionário inicial (MANN; LAMMING, 1999). Além das reduzidas concentrações hormonais, vacas em lactação tendem a possuir maior concentração de radicais livres, quando comparadas com novilhas (CHAVES et al., 2000). Dessa forma, considerando que concentrações excessivas de radicais livres são tóxicas para o embrião e retardam o desenvolvimento embrionário (GUERIN; EL MOUATASSIM;

MENEZO, 2001), a menor eficiência do mecanismo antioxidante das células de vacas lactantes pode justificar a menor proporção de embriões viáveis e de embriões grau I e II.

Como observado no presente estudo, a produção de embriões em programas de superovulação é geralmente reduzida durante as estações quentes (ALFUJAIRI; ALIBRAHIM; ELNOUTY, 1993), assim como o desenvolvimento embrionário é comprometido (PUTNEY; DROST; THATCHER, 1988). Dados da literatura comprovaram que a exposição a altas temperaturas ambientais está associada a degeneração celular (células da teca e granulosa), oócitos de menor qualidade, menor taxa de fertilização, comprometimento do desenvolvimento embrionário e ainda, menor taxa de concepção (EALY; DROST; HANSEN, 1993; WOLFENSON; ROTH; MEIDAN, 2000; ROTH et al., 2001; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002; SARTORI et al., 2002; AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002b; CHEBEL et al., 2004; SHIMIZU et al., 2005; DEMETRIO et al., 2007). Dessa forma, os efeitos negativos da lactação e da idade associados aos efeitos deletérios do estresse térmico podem justificar a queda mais acentuada na taxa de embriões grau I e II durante a época quente em doadoras lactantes, comparado com doadoras novilhas.

6.2 TAXA DE CONCEPÇÃO DE RECEPTORAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO APÓS TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES ORIUNDOS DE NOVILHAS E VACAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO DURANTE DUAS ÉPOCAS DO ANO

6.2.1 EFEITO DA CATEGORIA ANIMAL DA DOADORA E DA ÉPOCA DE PRODUÇÃO DOS EMBRIÕES

No geral, foi verificada taxa de concepção aos 31 dias de gestação de 31,0% ($n = 4.076$) e aos 45 dias de 25,3% ($n = 4.076$), com perda gestacional entre 31 e 45 dias de 18,3% ($n = 1.513$) após TE em receptoras Holandesas lactantes.

A taxa de concepção dos embriões oriundos de doadoras em lactação foi maior aos 31 (36,0 vs. 30,7%, $P = 0,001$; Figura 9 A) e aos 45 dias de gestação (28,3 vs. 23,1%, $P = 0,001$; Figura 9 A). No entanto, a categoria da doadora não influenciou a perda gestacional (novilhas = 18,2% vs. vacas em lactação = 16,6%, $P = 0,49$; Figura 9 A). Ainda, as taxas de concepção aos 31 dias (época quente = 30,5 vs. época não quente = 31,7%; $P = 0,47$) e aos 45 dias (época quente = 25,3 vs. época não quente = 25,1%; $P = 0,94$) e perda gestacional (época quente = 17,4 vs. época não quente = 22,1%; $P = 0,07$) das receptoras não diferiram conforme a época de produção dos embriões (Figura 9 B). Não houve interação categoria e época do ano de produção do embrião para taxa de concepção aos 31 ($P = 0,55$) e aos 45 dias de gestação ($P = 0,63$) e perda gestacional ($P = 0,36$; Tabela 4). Também não foi verificada diferença nas taxas de concepção aos 31 dias (31,5 vs. 30,5%; $P = 0,66$) e aos 45 dias (25,1 vs. 25,4%; $P = 0,89$) e perda gestacional (18,4 vs. 16,5%; $P = 0,49$) das receptoras conforme a época de transferência dos embriões, época quente e não quente, respectivamente. Porém, as taxas de concepção aos 31 ($P = 0,02$) e aos 45 dias ($P = 0,02$) tiveram relação negativa com a média da temperatura máxima entre o cio observado/estimado e a TE (Figura 10). A média da temperatura máxima entre o D7 e D10 do protocolo de SOV não alterou a taxa de concepção aos 31 ($P = 0,56$) e aos 45 dias ($P = 0,77$) e perda gestacional ($P = 0,10$).

Figura 9 - Taxa de concepção aos 31 (TC31) e 45 dias (TC45) e perda gestacional de receptoras Holandesas em lactação após transferência de embriões oriundos de (A) vacas raça Holandesa em lactação ou novilhas e (B) após transferência de embriões produzidos durante duas épocas do ano (quente e não quente). Dados apresentados como porcentagem.

Tabela 4 - Taxa de concepção aos 31 (TC31) e 45 dias (TC45) e perda gestacional de receptoras Holandesas em lactação após transferência de embriões oriundos de doadoras da raça Holandesa de duas categorias animais (novilha e vaca em lactação) e durante duas épocas do ano (quente e não quente). Dados apresentados como porcentagem (%).

	Doadoras de embrião				Valor de P		
	Novilha		Vaca em lactação		Categoria	Época	Categ*Época
	Não quente	Quente	Não quente	Quente			
TC31	29,0 (1.718)	29,2 (596)	34,5 (1.186)	31,8 (576)	0,001	0,47	0,55
TC45	22,8 (1.718)	24,6 (596)	29,1 (1.186)	27,2 (576)	0,001	0,94	0,63
Perda gestacional	22,5 (603)	14,7 (193)	17,9 (479)	15,4 (206)	0,49	0,07	0,36

Figura 10 - Probabilidade de concepção (A) aos 31 (n = 4.076) e (B) aos 45 dias (n = 4.076) de gestação após transferência de embrião de acordo com a média da temperatura máxima durante os sete dias que antecederam a TE [Concepção aos 31 dias = $0,2059 - 0,0249 * \text{temp max média durante os sete dias que antecederam a TE}$ (P = 0,02); Concepção aos 45 dias = $- 0,0161 - 0,0296 * \text{temp max média durante os sete dias que antecederam a TE}$ (P = 0,02)].

A taxa de concepção das receptoras que receberam embriões originados de doadoras lactantes foi superior a taxa observada após transferência de embriões originados de doadoras novilhas, rejeitando a hipótese inicial do presente estudo. Chebel; Demétrio; Metzger (2008) e Maillo et al.(2012) não verificaram diferença na taxa de concepção entre embriões oriundos de doadoras lactantes ou não lactantes. Dentre os fatores que conduziram à elaboração da hipótese inicial dessa pesquisa, os efeitos da produção de leite e do estresse térmico sobre a fertilidade foram os principais. No entanto, o presente estudo constatou que, aproximadamente, 75% das doadoras lactantes estavam no terço final da lactação (acima de 180 dias), com produção média de $25,8 \pm 7,6$ L de leite por dia. De acordo com VASCONCELOS et al. (2011b), animais com baixa produção ($< 35 \text{ Kg} \cdot \text{dia}^{-1}$) são mais resistentes aos efeitos deletérios do estresse térmico do que vacas de alta produção, o que poderia explicar em parte os resultados inesperados encontrados nesse estudo. Entretanto, são poucos os estudos que analisaram o efeito da categoria da doadora de embrião na taxa de concepção de receptoras após transferência de embriões, o que dificulta maiores especulações.

Um dos fatores que também pode estar associado a melhor taxa de concepção de embriões oriundos de vacas lactantes seria o fato de que tais fêmeas receberam 500 mg de somatotropina bovina recombinante (bST) a cada 12 dias durante os períodos de coleta. Guzella et al. (2012) reportaram maior taxa de concepção de embriões oriundos de doadoras

tratadas com duas doses de bST durante o protocolo de superovulação. Estudos anteriores demonstraram que o tratamento com bST aumenta a fertilidade de vacas de leite cíclicas e lactantes inseminadas em tempo fixo (MOREIRA et al., 2000; 2001; ALBUQUERQUE et al. 2012), assim como fêmeas consideradas subférteis (MORALES-ROURA et al., 2001).

Os efeitos positivos da bST na fertilidade de vacas em lactação são correlacionados aos efeitos positivos do GH e IGF-I na fertilização e no desenvolvimento embrionário (MOREIRA et al., 2002a; 2002b). O IGF-I pode aumentar o crescimento folicular e a produção de estradiol (WEBB et al., 2004), melhorar o ambiente uterino (WATHES et al., 2003) e aumentar a taxa de crescimento embrionária inicial (BLOCK et al., 2007). Ainda, estudo *in vitro* com células da hipófise (ovelhas) tratadas com 10nM de IGF-I reportaram estímulo da secreção basal de LH (ADAM et al., 2000).

O ambiente uterino desempenha papel essencial na determinação da qualidade e desenvolvimento do embrião (RIZOS et al., 2002), sendo as concentrações de progesterona (DISKIN; MORRIS, 2008; LONERGAN, 2011) e IGF (LEROY et al., 2008) fatores essenciais para sobrevivência embrionária e manutenção da gestação (SARTORI; BASTOS; WILTBANK, 2010; WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011). Dessa forma, considerando o menor impacto dos fatores adversos relacionados às doadoras em lactação (AMBROSE et al., 1999; HANSEN; ARÉCHIGA, 1999; GRÖHN; RAJALA-SCHULTZ, 2000; HANSEN et al., 2001; LUCY, 2001; AL-KATANANI; HANSEN, 2002; FERREIRA et al., 2011; KAWASHIMA et al., 2012), possivelmente os embriões oriundos das doadoras lactantes, por terem sido coletados no dia sete do ciclo estral, foram capazes de alcançar valores semelhantes ou superiores aos embriões oriundos de novilhas Holandesas.

Ainda, todas as doadoras foram submetidas a protocolo de superovulação com indução de ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. O tratamento para indução da ovulação ao final do tratamento superovulatório evita o crescimento prolongado de folículos. Animais de alta produção apresentam efeitos negativos da elevada metabolização hepática da progesterona e do estrógeno, que promovem aumento da pulsatilidade de LH, com atraso do pico de LH e da ovulação, comprometendo a qualidade do oócito (WILTBANK et al., 2011). Estudos recentes em vacas de leite de alta produção reportaram maiores taxas de concepção em vacas inseminadas após protocolos de IATF do que após a detecção de cio (CERRI et al., 2004; STRICKLAND et al., 2010). Dessa forma, o emprego dos indutores de ovulação em protocolos de sincronização pode evitar ovulações atrasadas e comprometimentos na qualidade dos oócitos. Esses resultados podem explicar, parcialmente, o fato do presente

estudos não ter observado efeito negativo da produção de leite nas taxas de concepção de embriões oriundos de doadoras em lactação.

A temperatura ambiente e retal estão correlacionadas (SARTORI et al., 2002). Além disso, estudos anteriores demonstraram que o aumento da temperatura ambiente ou corporal reduz a taxa de concepção de vacas Holandesas lactantes após IA (HANSEN; ARÉCHIGA, 1999; DEMETRIO et al., 2007; BALOGH et al., 2012) ou TE (VASCONCELOS et al., 2006; DEMETRIO et al., 2007). Dessa forma, contrariamente a hipótese inicial e diferentemente de resultados encontrados por outros autores (PUTNEY; DROST; THATCHER, 1989; RODRIGUES et al., 2007a; CHEBEL; DEMÉTRIO; METZGER, 2008; FREITAS et al., 2010), no presente estudo não foi observado efeito de época do ano de produção dos embriões nas taxas de concepção e perda gestacional de receptoras após TE. No entanto, dados da literatura já reportaram taxas de concepção (LOPES et al., 2007) e perda gestacional (HUMBLLOT, 2001) semelhantes após IA entre diferentes épocas do ano (quente e fria).

Ainda, uma possível causa da semelhante taxa de concepção em ambas as épocas do ano de produção dos embriões seria pelo fato da sutil diferença observada entre as temperaturas máximas médias das épocas do ano definidas na região do presente estudo ($33,3 \pm 5,4$ °C durante a época quente e $30,6 \pm 5,4$ °C durante a época não quente) o que leva, provavelmente, a estresse térmico em ambas as épocas analisadas.

Apesar da época do ano da coleta e/ou transferência dos embriões não terem apresentado efeito na taxa de concepção após TE, as temperaturas máximas médias entre o estro/estro estimado e a TE das receptoras correlacionaram-se negativamente com a probabilidade de concepção aos 31 e 45 dias de gestação. Tais resultados corroboram o descrito por Demétrio et al. (2007). Esses dados são suportados por estudos que avaliaram o efeito do estresse térmico no desenvolvimento embrionário inicial (EALY; DROST; HANSEN, 1993; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002). Os autores verificaram maior redução no número total de células por embrião (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002) e atraso no desenvolvimento embrionário de doadoras submetidas ao estresse térmico até o terceiro dia de desenvolvimento (EALY; DROST; HANSEN, 1993). Portanto, a intensidade dos efeitos deletérios do estresse térmico são dependentes do estágio do embrião, sendo os embriões de duas a quatro células mais sensíveis por não terem o mecanismo de apoptose induzida pelo estresse ativado (PAULA-LOPES; HANSEN, 2002).

Outro fator diretamente relacionado ao período entre o estro e a TE (7 dias) ou os sete dias após IA é a concentração de progesterona (LAMMING; ROYAL; , 1999; MANN; LAMMING, 2001; INSKEEP, 2004; STRONGE et al., 2005; MCNEILL et al., 2006;

CLEMENTE et al., 2009a). Clemente et al. (2009b) constataram que a elevada concentração de progesterona nesse período está diretamente relacionado a qualidade do ambiente uterino, visto que os autores observaram embriões maiores no 16º dia de desenvolvimento após TE em receptoras previamente tratadas com implante de P4. Portanto, considerando que o estresse térmico pode comprometer a produção de esteróides (WOLFENSON et al., 1997; WILSON et al., 1998), possivelmente as altas temperaturas estão afetando tanto o desenvolvimento inicial no caso das doadoras (EALY; DROST; HANSEN, 1993; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002), quanto a receptividade uterina à gestação das receptoras (CLEMENTE et al., 2009a; FORDE et al., 2009).

Além dos eventos pós ovulação, é importante ressaltar a influência da qualidade oocitária entre diferentes épocas do ano no sucesso reprodutivo dessas fêmeas. Durante a época de estresse térmico, oócitos coletados de vacas (AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002b; GENDELMAN; ROTH, 2012) ou novilhas Holandesas (FERREIRA et al., 2011) resultaram em menor taxa de clivagem e desenvolvimento a estágio de blastocisto, quando comparados aos oócitos colhidos durante épocas de estresse térmico reduzido. Reduzida taxa de desenvolvimento a estágio de blastocisto também foi evidenciado quando doadoras de embrião da raça Gir foram introduzidas em câmaras climáticas por 28 dias (TORRES-JÚNIOR et al., 2008). Ainda, considerando que a foliculogênese tem duração média de 90 dias (FAIR, 2003), mesmo após a retirada do estresse térmico (sistemas climatizados), oócitos de fêmeas Holandesas não lactantes permaneceram com reduzidas taxas de clivagem e de blastocisto (AL-KATANANI; PAULA-LOPES; HANSEN, 2002b; TORRES-JÚNIOR et al., 2008), mostrando o comprometimento do oócito em estágio anterior ao do folículo antral.

Além da influência da temperatura ambiental na taxa de concepção (DEMETRIO et al., 2007), outros autores também reportaram efeitos deletérios do estresse térmico sobre a perda gestacional (AL-KATANANI; HANSEN, 2002; DEMETRIO et al., 2007; FREITAS et al., 2010). No entanto, no presente estudo não foi verificado efeito da época do ano e da temperatura ambiental sobre a perda gestacional das receptoras de embrião.

Dessa forma, os dados são indicativos de que o efeito da época de produção do embrião é mais evidente na resposta à superovulação e na produção embrionária do que na taxa de concepção da receptora. Provavelmente, a semelhante taxa de concepção entre as épocas do ano está relacionada a uma pré-seleção, com a qual apenas os embriões mais resistentes ao estresse térmico atingem o sétimo dia de desenvolvimento em condições viáveis e com capacidade de levar uma gestação a termo.

6.2.2 EFEITOS RELACIONADOS AO EMBRIÃO E À RECEPTORA HOLANDESA EM LACTAÇÃO

A qualidade embrionária está diretamente relacionada com a taxa de concepção aos 31 (Grau I = 37,8%^a, Grau II = 34,0%^a e Grau III = 28,4%^b; $P < 0,0001$) e 45 dias de gestação (Grau I = 30,7%^a, Grau II = 25,3%^b e Grau III = 21,3%^c; $P < 0,0001$; Figura 11 A), corroborando outros relatos da literatura (HASLER, 2001; SPELL et al., 2001; CHEBEL; DEMÉTRIO; METZGER, 2008). No entanto, a perda gestacional não foi influenciada pela qualidade embrionária (Grau I = 15,8%, Grau II = 21,8% e Grau III = 21,8%; $P = 0,08$; Figura 11 A).

Não foi observado efeito de estágio de desenvolvimento embrionário na taxa de concepção aos 31 ($P = 0,26$) e aos 45 dias de gestação ($P = 0,68$) e perda gestacional ($P = 0,34$) das receptoras (Figura 11 B), corroborando dados observados na literatura (HASLER, 2001; SPELL et al., 2001; LEE et al., 2012).

Quando o embrião foi transferido a fresco, sem prévio congelamento, as receptoras apresentaram superior taxa de concepção aos 45 dias de gestação (27,2 vs. 24,1%, $P = 0,04$; Figura 11 C) e menor taxa de perda gestacional (17,2 vs. 22,3%, $P = 0,02$; Figura 11 C). Resultados semelhantes foram relatados na literatura (SPELL et al., 2001; RODRIGUES et al., 2004a; RODRIGUES et al., 2007c; CHEBEL; DEMÉTRIO; METZGER, 2008). A redução na taxa de concepção e o aumento na perda gestacional após transferência de embriões congelados pode estar relacionado às injúrias causadas durante o processo de congelamento (PEREIRA; MARQUES, 2008).

Figura 11 - Taxa de concepção aos 31 (TC31) e 45 dias (TC45) e perda gestacional de receptoras Holandesa em lactação após transferência de embriões de diferentes qualidades (A), estágios de desenvolvimento (B) e submetidos a criopreservação (fresco ou congelado; C). Dados apresentados porcentagem.

Por fim, receptoras com CL da categoria 1 (maior tamanho), apresentaram maior taxa de concepção aos 31 dias de gestação (Categoria 1 = 37,4%^a, Categoria 2 = 34,1%^b e Categoria 3 = 28,5%^b, $P = 0,02$; Figura 12 A). No entanto, o número de CL no momento da TE não alterou a taxa de concepção aos 31 (1CL = 35,8% vs. ≥ 2 CL = 30,8%; $P = 0,08$) e aos 45 dias de gestação (1CL = 27,8% vs. ≥ 2 CL = 23,5%; $P = 0,10$) e a perda gestacional (1CL = 18,2% vs. ≥ 2 CL = 18,1%; $P = 0,97$, Figura 12 B). Tais resultados são suportados por dados da literatura que demonstraram correlação positiva entre o volume do CL, a concentração de progesterona circulante no momento da TE e taxa de concepção (BARUSELLI et al., 2003; 2010). Ainda, o presente estudo reconfirmou que a avaliação do CL com precisão, previamente a TE, é uma técnica eficiente para seleção de receptoras (YOSHIDA et al., 2012), podendo ser utilizada na rotina dos programas de TE.

Figura 12 - Taxa de concepção aos 31 (TC31) e 45 dias (TC45) e perda gestacional de receptoras Holandesa em lactação após transferência de embriões de acordo com o tamanho (A) e número do corpo lúteo da receptora (B). Dados apresentados como porcentagem.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo não confirmaram a hipótese de que a resposta ao protocolo de superovulação e a produção de embriões são menores em vacas Holandesas em lactação, comparado com novilhas. Porém, foi confirmado que a resposta ao protocolo de superovulação e a produção de embriões são menores durante os meses mais quentes do ano, tanto em vacas lactantes quanto em novilhas Holandesas. Ainda, a hipótese de que o efeito da elevada temperatura ambiental durante os meses quentes do ano afetaria de maneira mais significativa a resposta superovulatória e a produção de embriões em vacas em lactação do que novilhas foi parcialmente confirmada.

As hipóteses de que a taxa de concepção das receptoras é menor quando os embriões são oriundos de doadoras Holandesas em lactação ou produzidos durante os meses quentes do ano não foram confirmadas. Ainda, não foi confirmada a hipótese de que o efeito da elevada temperatura ambiental durante a produção de embriões afeta de maneira mais acentuada a taxa de concepção das receptoras quando os embriões são oriundos de doadoras lactantes.

Portanto, com base nos resultados do presente estudo pode-se concluir que:

- apesar das vacas lactantes apresentarem maior resposta superovulatória, as novilhas apresentaram semelhante número de embriões viáveis, porém maior taxa de embriões viáveis;
- a resposta ao tratamento superovulatório e a produção de embriões foram inferiores durante a época quente do ano;
- a taxa de recuperação foi superior em vacas em lactação do que em novilhas. Ainda, verificaram-se inferiores taxas nas épocas quentes do ano;
- a taxa de fertilização foi inferior em vacas em lactação do que em novilhas. Ainda, verificou-se redução do número de estruturas fertilizadas nas épocas quentes do ano;
- a queda do número e taxa de embriões grau I e II durante os meses quentes do ano foi mais acentuada em vacas em lactação do que novilhas;
- a taxa de estruturas fertilizadas e de embriões viáveis apresentaram relação negativa com a temperatura máxima durante os 15 dias do protocolo de SOV;
- embriões originados de vacas lactantes apresentaram maior taxa de concepção do que embriões oriundos de novilhas;
- apesar da época de produção do embrião não influenciar a taxa de concepção e a perda gestacional, verificou-se relação negativa da temperatura máxima entre o estro e o momento da TE na taxa de concepção.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS

Visto que a dose de FSH utilizada para superovular novilhas é inferior à utilizada para vacas em lactação e o número de embriões viáveis recuperados por coleta é semelhante, os dados do presente estudo sugerem maior eficiência na superovulação de novilhas. No entanto, a taxa de concepção dos embriões oriundos de novilhas parece ser inferior às taxas de embriões de vacas lactantes, minimizando o efeito positivo da produção de embriões de novilhas. Estudos prospectivos adicionais são necessários para confirmar tais informações e os possíveis mecanismos endócrinos e bioquímicos envolvidos (Figura 13).

Os resultados reafirmaram a baixa eficiência dos tratamentos superovulatórios quando realizados durante a época quente do ano, sugerindo melhora nas condições de ambiência (conforto térmico) ou intensificação desses programas nas épocas de temperaturas amenas. No entanto, apesar do reduzido número de embriões viáveis produzidos no período quente do ano, o presente estudo sugere que a época de produção do embrião não interfere no sucesso reprodutivo da receptora. Ou seja, embriões viáveis produzidos durante a época quente do ano, podem resultar em taxas de concepção semelhantes quando comparados aos embriões produzidos durante a época não quente. Dessa forma, estratégias devem ser estabelecidas para melhorar os índices de sobrevivência embrionária durante a primeira semana de desenvolvimento do embrião. No entanto, futuras pesquisas são necessários para avaliar os mecanismos endócrinos, bioquímicos e moleculares envolvidos nesse período (Figura 14).

A taxa de concepção da receptora de embrião não foi influenciada pela época do ano de produção e de transferência do embrião, provavelmente pelas condições climáticas da região na qual o experimento foi desenvolvido, onde elevadas temperaturas são registradas durante todo o ano. No entanto, a temperatura ambiental entre o estro e o momento da TE influenciou negativamente a taxa de concepção das receptoras, indicando a importância do controle do conforto térmico e da ambiência para melhorar a taxa de concepção após a transferência de embriões.

Figura 13 - Modelo hipotético dos possíveis fatores envolvidos na resposta ao protocolo de superovulação e taxa de concepção de embriões produzidos a partir de vacas em lactação e novilhas.

Figura 14 - Modelo hipotético dos possíveis fatores envolvidos na resposta ao protocolo de superovulação e taxa de concepção de embriões produzidos durante a época quente do ano, considerando a categoria da doadora.

Por fim, os dados são indicativos de que o efeito da época de produção do embrião é mais evidente na resposta à superovulação e na produção embrionária do que na taxa de concepção da receptora. Entretanto, apesar da taxa de concepção ser semelhante entre receptoras com embriões produzidos durante diferentes épocas do ano, maior número de fêmeas gestantes é obtido nos programas de SOV desenvolvidos durante a época não quente (1,6 vs. 1,0 gestação por protocolo de SOV), visto que, a produção de embriões viáveis é superior durante esse período.

REFERÊNCIAS

- ADAM, C. L.; GADD, T. S.; FINDLAY, P. A.; WATHES, D. C. IGF-I stimulation of luteinizing hormone secretion, IGF-binding proteins (IGFBPs) and expression of mRNAs for IGFs, IGF receptors and IGFBPs in the ovine pituitary gland **Journal Endocrinology**, v. 166, n. 2, p. 247-254, 2000.
- ADAMS, G. P.; KOT, K.; SMITH, C. A.; GINTHER, O. J. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates. **Canadian Journal Animal Science**, v. 73, n. 1, p. 267-275, 1992a.
- ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992b.
- ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; BO´, G. A.; GARCIA, A.; DEL CAMPO, M. R.; MAPLETOFT, R. J. Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. **Theriogenology**, v. 42, p. 1103-1113, 1994.
- ALBUQUERQUE, J. P.; DIAS, H. P.; BUENO, I. C.; RODRIGUES, A. D. P.; PEREIRA, M. H. C.; CARVALHO, E. R.; OLIVEIRA, W. V. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Use of bovine somatotropin (bST) associated with protocols of timed artificial insemination (TAI) in beef cows. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 500, 2012.
- AL-KATANANI, Y. M.; WEBB, D. W.; HANSEN, P. J. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2611-2616, 1999.
- AL-KATANANI, Y. M.; HANSEN, P. J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryos and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 2, p. 174-180, 2002.
- AL-KATANANI, Y. M.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 2, p. 390-396, 2002b.
- ALFUJAIIRI, M. M.; ALIBRAHIM, R. M.; ELNOUTY, F. D. Seasonal variations in superovulatory responses of Holstein cows treated with pregnant mare serum gonadotrophin in Saudi Arabia. **Journal Reproduction Fertility**, v. 11, p. 75 [abstract], 1993.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE, C. C., JR.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.; STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; WETTEMANN, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal Animal Science**, v. 78, n. 5, p. 1291-1302, 2000.
- AMBROSE, D. J.; GOVINDARAJAN, T.; GOONEWARDENE, L. A. Conception rate and pregnancy loss rate in lactating Holstein cows of a single herd following timed insemination or insemination at detected estrus. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 1, p. 213-214, 2006.

- AMBROSE, J. D.; DROST, M.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; THATCHER, M. J.; KASSA, T.; BINELLI, M.; HANSEN, P. J.; CHENOWETH, P. J.; THATCHER, W. W. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2369-2376, 1999.
- ANDREU-VÁZQUEZ, C.; GARCIA-ISPIERTO, I.; GANAU, S.; FRICKE, P. M.; LÓPEZ-GATIUS, F. Effects of twinning on the subsequent reproductive performance and productive lifespan of high-producing dairy cows. **Theriogenology**, v. 78, n. 9, p. 2061-2070, 2012.
- ARMSTRONG, D. G.; MCEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1624-1632, 2001.
- ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; WEBB, R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological, cellular and molecular mechanisms. **Reproduction**, v. 61, p. 403-414, 2003.
- AX, R. L.; ARMBRUST, S.; TAPPAN, R.; GILBERT, G.; OYARZO, J. N.; BELLIN, M. E.; SELNER, D.; MCCAULEY, T. C. Superovulation and embryo recovery from peripubertal Holstein heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 71-80, 2005.
- BADINGA, L.; COLLIER, R. J.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 78-85, 1985.
- BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; DIAZ, T.; DROST, M.; WOLFENSON, D. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 39, n. 4, p. 797-810, 1993.
- BALOGH, O. G.; FÉBEL, H.; HUSZENICZA, G.; KULCSÁR, M.; ABONYI-TÓTH, Z.; ENDRODI, T.; GÁBOR, G. Seasonal fertility differences In synchronised dairy cows: Ultrasonic, metabolic and endocrine findings. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 60, n. 1, p. 131-143, 2012.
- BARACALDO, M. I.; MARTINEZ, M.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. **Theriogenology**, v. 53, p. 1239-1250, 2000.
- BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; PINHEIRO, O. L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 19, p. 9-12, 1995.
- BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 23, p. 5-9, 2005.
- BARROS, C. M.; BARCELOS, A. C. Z.; GOUVEA, L. M.; MENEGHEL, M.; BARCELOS, D. S.; BARCELOS, L. N.; TRINCA, L. A. Improvement of a superovulatory protocol in Nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. **Reproduction Fertility Development**, p. 152 [Abstract], 2008.

- BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; BERBER, R. C. A.; VALENTIM, R.; CARVALHO FILHO, A. F.; COSTA NETO, W. P. Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo "Ovsynch" para inovulação em tempo fixo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 96-106, 2003.
- BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 77-88, 2006.
- BARUSELLI, P. S.; MARTINS, C. M.; SALES, J. N. S.; FERREIRA, R. M. Recent advances in bovine superovulation. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, p. 433-448, 2008.
- BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; FILHO, M. F. S.; NASSER, L. F. T.; RODRIGUES, C. A.; BÓ, G. A. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 67-74, 2010.
- BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; RODRIGUES, C. A.; BÓ, G. A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1583-1593, 2011.
- BEAM, S. W.; BUTLER, W. R. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in post partum dairy cows. **Journal Reproduction Fertility**, v. 54, p. 411-424, 1999.
- BERGFELT, D. R.; BO', G. A.; MAPLETOFT, R. J.; ADAMS, G. P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 49, n. 1, p. 1-12, 1997.
- BERMAN, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; MAMEN, M.; HERZ, Z.; WOLFENSON, D.; ARIELI, A.; GRABER, Y. Upper critical temperatures and forced ventilation effects for high-yielding dairy cows in a subtropical climate **Journal of Dairy Science**, v. 68, p. 1488-1495, 1985.
- BERMAN, A. Estimates of heat stress relief needs for Holstein dairy cows. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 1377-1384, 2005.
- BLANCHARD, T.; FERGUSON, J.; LOVE, L.; TAKEDA, T.; HENDERSON, B.; HASLER, J.; CHALUPA, W. Effect of dietary crude-protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. **American journal of veterinary research**, v. 51, n. 6, p. 905-908, 1990.
- BLOCK, J.; FISCHER-BROWN, A. E.; RODINA, T. M.; EALY, A. D.; HANSEN, P. J. The effect of in vitro treatment of bovine embryos with IGF-1 on subsequent development in utero to Day 14 of gestation. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 153-161, 2007.
- BÓ, A., G.; BARUSELLI, P. S.; CHESTA, P.; MARTINS, C. M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 89-101, 2006.

- BO, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, p. 1555-1569, 1994.
- BO, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 32-40, 1995.
- BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, v. 40, n. 2, p. 225-239, 1993.
- BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of progestogen plus estradiol-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 897-910, 1996.
- BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, 2003.
- BÓ, G. A.; CARBALLO GUERRERO, D.; TRÍBULO, A.; TRÍBULO, H.; TRÍBULO, R.; ROGAN, D.; MAPLETOFT, R. J. New approaches to superovulation in the cow. **Reproduction Fertility Development**, v. 22, p. 106-112, 2010.
- BÓ, G. A.; TRÍBULO, A.; MAPLETOFT, R. J. Actualización sobre la superovulación en bovinos. In: 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2012, Londrina.
- BONCZEK, R. R.; YOUNG, C. W.; WHEATON, J. E.; MILLER, K. P. Responses of somatotropin, insulin, prolactin, and thyroxine to selection for milk yields in Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 71, p. 2470-2479, 1988.
- BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; ROCHA JUNIOR, V. R.; RUAS, J. R. M.; GIOSSO, M. M.; FONSECA, J. F.; CARVALHO, G. R.; MAFFILI, V. V. Follicular dynamic and ovulation time of non-lactating Gir and Nelore cows during two seasons of the year. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 80, n. 5, p. 346-354, 2004.
- BRASIL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. **Balança comercial brasileira**. Brasília, 2012.
- BURATINI JR., J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BÓ, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421-432, 2000.
- BUTLER, W. R.; SMITH, R. D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 767-783, 1989.
- CARTMILL, J. A.; EL-ZARKOUNY, S. Z.; HENSLEY, B. A.; LAMB, G. C.; STEVENSON, J. S. Stage of Cycle, Incidence, and Timing of Ovulation, and Pregnancy Rates in Dairy Cattle after Three Timed Breeding Protocols. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 5, p. 1051-1059, 2001a.

- CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICH, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus*×*Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 167-175, 2008.
- CERRI, R. L. A.; SANTOS, J. E. P.; JUCHEM, S. O.; GALVÃO, K. N.; CHEBEL, R. C. Timed Artificial Insemination with Estradiol Cypionate or Insemination at Estrus in High-Producing Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 11, p. 3704-3715, 2004.
- CHASE JR, C. C.; KIRBY, C. J.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; LUCY, M. C. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 212-219, 1998.
- CHAVES, M. M.; VIEIRA, E. R.; REIS, A. P.; SILVA, R. L.; GERZSTEIN, N. C.; MACHADO, J. A. N. Increase of reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocytizing granulocytes related to age. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 119, p. 1-8, 2000.
- CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P.; REYNOLDS, J. P.; CERRI, R. L. A.; JUCHEM, S. O.; OVERTON, M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 3-4, p. 239-255, 2004.
- CHEBEL, R. C.; DEMÉTRIO, D. G. B.; METZGER, J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 98-106, 2008.
- CLEMENTE, M.; LA FUENTE, J.; FAIR, T.; AL NAIB, A.; GUTIERREZ-ADAN, A.; ROCHE, J. F.; RIZOS, D.; LONERGAN, P. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction**, v. 138, n. 3, p. 507-517, 2009a.
- COLAZO, M. G.; GORDON, M. B.; RAJAMAHENDRAN, R.; MAPLETOFT, R. J.; AMBROSE, D. J. Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 262-270, 2009.
- COLLIER, R. J.; DAHL, G. E.; VANBAALE, M. J. Major advances associated with environmental effects on dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1244-1253, 2006.
- CUSHMAN, R. A.; DESOUZA, J. C.; HEDGPETH, V. S.; BRITT, J. H. Effect of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 55, n. 7, p. 1533-1547, 2001.
- D'OCCHIO, M. J.; JILLELLA, D.; LINDSEY, B. R. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 9-35, 1999.
- DBO. REVISTA DE NEGÓCIOS DA AGROPECUÁRIA. **Anuário DBO**. São Paulo, 2011.

- DE VRIES, M. J.; VEERKAMP, R. F. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 1, p. 62-69, 2000.
- DEMETRIO, D. G. B.; SANTOS, R. M.; DEMETRIO, C. G. B.; VASCONCELOS, J. L. M. Factors Affecting Conception Rates Following Artificial Insemination or Embryo Transfer in Lactating Holstein Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 11, p. 5073-5082, 2007.
- DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and Early Foetal Losses in Cattle and Other Ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 260-267, 2008.
- DOBSON, H.; TEBBLE, J. E.; SMITH, R. F.; WARD, W. R. Is stress really all that important? **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 65-73, 2001.
- DALTON, J.C.; NADIR, S.; BAME, J.H.; SAACKE, R.G. Effect of a deep uterine insemination on spermatozoal accessibility to the ovum in cattle: a competitive insemination study. **Theriogenology**, v. 51, n. 5, p. 883-890, 1999.
- DONALDSON, L. E. Dose of FSH-P as a source of variation in embryo production from superovulated cows. **Theriogenology**, v. 22, n. 2, p. 205-212, 1984.
- DROST, M.; THATCHER, M. J. D.; CANTRESS, C. K.; WOLFSDORF, K. E.; HASLER, J. F.; THATCHER, W. W. Conception rates after artificial insemination or transfer of frozen/thawed embryos to lactating cows during summer. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 380 [Abstract], 1994.
- EALY, A. D.; DROST, M.; HANSEN, P. J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 10, p. 2899-2905, 1993.
- EALY, A. D.; ARÉCHIGA, C. F.; BRAY, D. R.; RISCO, C. A.; HANSEN, P. J. Effectiveness of Short-Term Cooling and Vitamin E for Alleviation of Infertility Induced by Heat Stress in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n. 12, p. 3601-3607, 1994.
- EINSPANIER, R.; MIYAMOTO, A.; SCHAMS, D.; MÜLLER, M.; BREM, G. Tissue concentration, mRNA expression and stimulation of IGF-I in luteal tissue during the oestrous cycle and pregnancy of cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, n. 2, p. 439-445, 1990.
- EL-SHERRY, T. M.; MATSUI, M.; KIDA, K.; MIYAMOTO, A.; MEGAHED, G. A.; SHEHATA, S. H.; MIYAKE, Y. I. Ovarian stimulation with follicle-stimulating hormone under increasing or minimal concentration of progesterone in dairy cows. **Theriogenology**, v. 73, n. 4, p. 488-495, 2010.
- EMBRAPA. EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Produção, Industrialização e Comercialização**. Brasília, 2011.
- EVANS, A. C. O.; WALSH, S. W. The physiology of multifactorial problems limiting the establishment of pregnancy in dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 233, 2012.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 203-216, 2003.

FAO. FOOD AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS. **Food Outlook Global Market Analysis**. Roma, ITA, 2012.

FERGUSON, J. D.; CHALUPA, W. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 72, n. 3, p. 746-766, 1989.

FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M. R.; FERRAZ, M. L.; ARAÚJO, A. B.; RODRIGUES, C. A.; WATANABE, Y. F.; VIREQUE, A. A.; JOAQUIM, D. C.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V.; BARUSELLI, P. S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2383-2392, 2011.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in nelore breed cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C. O.; SPENCER, T. E.; BAZER, F. W.; MCBRIDE, R.; BOLAND, M. P.; O'GAORA, P.; LONERGAN, P.; ROCHE, J. F. Progesterone-Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to Advanced Conceptus Development in Cattle. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 4, p. 784-794, 2009.

FREITAS, B. G.; RODRIGUES, C. A.; SALES, J. N. S.; TEIXEIRA, A. A.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; RANIERI, A. L.; BARUSELLI, P. S. Perda embrionária (entre 30 e 60 dias) à inseminação artificial e à transferência de embrião de vacas holandesas de alta produção. In: XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), 2010, Porto de Galinhas.

GARCÍA-ISPIERTO, F.; LÓPEZ-GATIUS, F.; BECH-SABAT, G.; SANTOLARIA, P.; YÁNIZ, J. L.; NOGAREDA, C.; DE RENSIS, F.; LÓPEZ-BÉJAR, M. Climate factors affecting conception rate of high producing dairy cows in northeastern Spain. **Theriogenology**, v. 67, p. 1379-1385, 2007.

GARVERICK, H. A.; ZOLLERS, W. G.; SMITH, M. F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. **Animal Reproduction Science**, v. 28, n. 1-4, p. 111-124, 1992.

GENDELMAN, M.; ROTH, Z. Seasonal Effect on Germinal Vesicle-Stage Bovine Oocytes Is Further Expressed by Alterations in Transcript Levels in the Developing Embryos Associated with Reduced Developmental Competence. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 1, p. 1-9, 2012.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 7, p. 852-858, 2008.

- GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOFF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Journal of Animal Reproduction Science**, v. 20, n. 3, p. 187-200, 1989a.
- GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOFF, L. Intraovarian relationship among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, v. 32, n. 5, p. 787-795, 1989b.
- GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1187-1194, 1996.
- GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 197-205, 2001.
- GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 239-257, 2003.
- GONG, J. G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 229-241, 2002.
- GRÖHN, Y. T.; RAJALA-SCHULTZ, P. J. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 605-614, 2000.
- GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction**, v. 7, p. 175-189, 2001.
- GUZELLA, T. G.; PEREIRA, M. H. C.; SANCHES, C. P.; VERAS, M. B.; LIMA, F. A.; BORGES, P. T.; RODRIGUES, A. D. P.; TORRES, F. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of recombinant bovine somatotropin associated to superovulation protocol on embryo fertility. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 537, 2012.
- HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. São Paulo: Editora Manole Ltda, 1995, v. 6. 582 p. (Ciclos reprodutivos)
- HANSEN, P. J.; ARÉCHIGA, C. F. Strategies for managing reproduction in the heat-stressed dairy cow. **Journal of Animal Science**, v. 77, n. 2, p. 36-50, 1999.
- HANSEN, P. J.; DROST, M.; RIVERA, R. M.; PAULA-LOPES, F. F.; AL-KATANANIT, Y. M.; KRININGER III, C. E.; CHASE JR., C. C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 91-103, 2001.
- HANSEN, P. J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Philosophical Transaction of the Royal Society of London B Biological Sciences**, v. 364, p. 3341-3350, 2009.
- HANZEN, C.; PIETERSE, M.; SCENCZI, O.; DROST, M. Relative accuracy of the identification of ovarian structures in The cow by ultrasonography and palpation per rectum. **The Veterinary Journal**, v. 159, p. 161-170, 2000.

HASLER, J. F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1401-1415, 2001.

HASLER, J. F. The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. **Theriogenology**, v. 65, p. 4-16, 2006.

HAWK, H.W.; TANABE, T.Y. Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single-ovulating cattle. **Journal of Anim Science**, v. 63, n. 2, p.551-560, 1986.

HUMBLLOT, P. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. **Theriogenology**, v. 56, p. 1417-1433, 2001.

HUSZENICZA, G.; JANOSI, S.; KULESAR, M.; KORODI, P.; DIELEMAN, S. J.; BARTYIK, J.; RUDAS, P.; RIBICZEI-SZABO, P. Gram-negative mastitis in early lactation may interfere with ovarian and certain endocrine functions and metabolism in dairy cows. **Reproduction Domestic Animal**, v. 33, p. 147-153, 1998.

IBGE. INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal 2011**. Brasília, 2012.

IETS. INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY. Statistics and Data Retrieval Committee Report. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 30, n. 4, p. 16-26, 2012.

INSKEEP, E. K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. E, p. 24-39, 2004.

IRELAND, J. J.; MURPHEE, R. L.; COULSON, P. B. Accuracy of Predicting Stages of Bovine Estrous Cycle by Gross Appearance of the Corpus Luteum. **Journal of Dairy Science**, v. 63, n. 1, p. 155-160, 1980.

ISOGAI, T.; SHIMOHIRA, I.; KIMURA, K. Factors affecting embryo production following repeated superovulation treatment in Holstein donors. **Journal of Reproduction and Development**, v. 39, p. 79-84, 1993.

KADOKAWA, H. Seasonal differences in the parameters of luteinizing hormone release to exogenous GnRH in prepubertal Holstein heifers in Sapporo. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, p. 121-125, 2007.

KADZERE, C. T.; MURPHY, M. R.; SILANIKOVE, N.; MALTZ, E. Heat stress in lactating dairy cows: a review. **Livestock Production Science**, v. 77, n. 1, p. 59-91, 2002.

KAFI, M.; MCGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 137-157, 1997.

KAFI, M.; MCGOWAN, M. R. Relationship between different concentrations of the plasma progesterone at the time of FSH-P treatment and the superovulatory response in Holstein dairy heifers. **Reproduction Domestic Animal**, v. 47, n. 5, p. 75-78, 2012.

- KAWASHIMA, C.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; KIDA, K.; MIYAMOTO, A. Nutritional factors that regulate ovulation of the dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. **Journal Reproduction Development**, v. 58, n. 1, p. 10-16, 2012.
- KOHRAM, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J.; GUILBAULT, L. A. Alteration of follicular dynamics and superovulatory responses by gonadotropin releasing hormone and follicular puncture in cattle. **Theriogenology**, v. 49, p. 1165-1174, 1998a.
- KOHRAM, H.; TWAGIRAMUNGU, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J.; GUILBAULT, L. A. Ovarian superstimulation after follicular wave synchronization with GnRH at two different stages of the estrous cycle in cattle. **Theriogenology**, v. 49, p. 1175-1186, 1998b.
- KONIG, S.; BOSSELMANN, F.; BORSTEL, U. U.; SIMIANER, H. Genetic Analysis of Traits Affecting the Success of Embryo Transfer in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 3945-3954, 2007.
- KRININGER, C. E.; STEPHENS, S. H.; HANSEN, P. J. Developmental changes in inhibitory effects of arsenic and heat shock on growth of pre-implantation bovine embryos. **Molecular Reproduction Development**, v. 63, n. 3, p. 335-340, 2002.
- LABEN, R. L.; SHANKS, R.; BERGER, P. J.; FREEMAN, A. E. Factors affecting milk yield and reproductive performance. **Journal of Dairy Science**, v. 65, n. 6, p. 1004-1015, 1982.
- LAMMING, G. E.; ROYAL, M. D.; . Ovarian hormone patterns and subfertility in dairy cows. . In: *Fertility in the High-Yielding Dairy Cow*, 1999, Galway, Ireland, p. 105-118.
- LAY, D. C.; WILSON, M. E. **Physiological indicators os stress in domestic livestock**: <http://www.fass.org/fass01/pdfs/Lay.pdf>.>, 2001.
- LEE, W.; SONG, K.; LIM, K.; LEE, S.; LEE, B.; JANG, G. Influence of Factors during Superovulation on Embryo Production in Korean Holstein Cattle. **Theriogenology**, v. 74, n. 2, p. 167-174, 2012.
- LENZ, R. W.; BALL, G. D.; LEIBFRIED, M. L.; AX, R. L.; FIRST, N. L. In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. **Biology Reproduction**, v. 29, p. 173-179, 1983.
- LERNER, S. P.; THAYNE, W. V.; BAKER, R. D.; HENSCHEN, T.; MEREDITH, S.; INSKEEP, E. K.; DAILEY, R. A.; LEWIS, P. E.; BUTCHER, R. L. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. **Journal of Animal Science**, v. 63, n. 1, p. 176-183, 1986.
- LEROY, J.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced Fertility in High-yielding Dairy Cows: Are the Oocyte and Embryo in Danger? Part:Mechanisms Linking Nutrition and Reduced Oocyte and Embryo Quality in High-yielding Dairy Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 5, p. 623-632, 2008.

- LEROY, J. L. M. R.; OPSOMER, G.; DE VliegHER, S.; VANHOLDER, T.; GOOSSENS, L.; GELDHOF, A.; BOLLS, P. E. J.; KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Comparison of embryo quality in high-yielding dairy cows, in dairy heifers and in beef cows. **Theriogenology**, v. 64, p. 2022-2036, 2005.
- LEWIS, I. Programming donors and recipients. In: Embryo transfer and pregnancy diagnosis, 1992, University of Sydney, p. 69-88.
- LICHT, P.; BONA GALLO, A.; AGARWAL, B. B.; FARMER, S. W.; CASTELLINO, J. B.; PAPKOFF, H. Biological and binding activities of equine pituitary gonadotrophins and pregnant mare serum gonadotrophin. **Journal Endocrinology**, v. 83, p. 311-322, 1979.
- LINDQUIST, S. The heat-shock response. Annual Review of Biochemistry, v. 55, n., p. 1151-1191, 1986.
- LINDSELL, C. E.; MURPHY, B. D.; MAPLETOFT, R. J. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 26, p. 209-219, 1986.
- LIU, X.; ANDOH, K.; YOKOTA, H.; KOBAYASHI, J.; ABE, Y.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicles from immature female mice. **Endocrinology**, v. 139, p. 2342-2347, 1998.
- LOHUIS, M. M. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. **Theriogenology**, v. 43, p. 51-80, 1995.
- LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1594-1601, 2011.
- LOONEY, C. R.; BOUTLE, B. W.; ARCHIBALD, L. F.; GODKE, R. A. Comparison of once daily FSH and twice daily FSH injections for superovulation in beef cattle. **Theriogenology**, v. 15, p. 13-22, 1981.
- LOPES, A. S.; BUTLER, S. T.; GILBERT, R. O.; BUTLER, W. R. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 99, n. 1-2, p. 34-43, 2007.
- LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 3-4, p. 209-223, 2004b.
- LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 6, p. 1277-1293, 2001.
- LUCY, M. C. Fertility in high-producing dairy cows: reasons for decline and corrective strategies for sustainable improvement. **Soc Reproduction Fertility Suppl**, v. 64, p. 237-254, 2007.

- MAILLO, V.; RIZOS, D.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; KELLY, A. K.; GARRETT, M.; LONERGAN, P. Influence of lactation on metabolic characteristics and embryo development in postpartum Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3865-3876, 2012.
- MANN, G.; LAMMING, G. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 175-180, 2001.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. **Reproduction Domestic Animal**, v. 34, p. 269-274, 1999.
- MANN, G. E.; LAMMING, G. E. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. **Animal Reproduction Science**, v. 64, n. 3, p. 171-180, 2000.
- MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, n. 6, p. 601-611, 2002.
- MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A. The evolution of improved and simplified superovulation protocols in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 278, 2012.
- MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 57, n. 1-2, p. 23-33, 1999.
- MARTINS, C. M. Adequação do protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus*. **Dissertação de mestrado**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2005.
- MARTINS, C. M.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Resposta superovulatória e produção de embriões de doadoras Nelore (*Bos indicus*) submetidas à indução da ovulação com GnRH ou LH para inseminação em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae** v. 34, p. 227, 2006a.
- MARTINS, C. M.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; SOUSA, M. G.; BARUSELLI, P. S. Superovulação com eCG ou FSH em doadoras Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 227, 2006b.
- MARTINS, C. M.; OLIVEIRA, L. G.; CREPALDI, G. A.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Efeito de diferentes doses de eCG na resposta superovulatória de doadoras Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, p. 1237, 2007.
- MARTINS, C. M.; SANTOS, I. C. C.; VALENTIM, R.; SALES, J. N. S.; REIS, P. O.; CREPALDI, G. A.; BARUSELLI, P. S.; D'OCCHIO, M. J. Efeito da redução do número de administrações de fsh na resposta superovulatória e na produção de embriões de doadoras nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, 2008.

- MARTINS, C. M.; RODRIGUES, C. A.; VIEIRA, L. M.; MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. The effect of timing of the induction of ovulation on embryo production in superstimulated lactating Holstein cows undergoing fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 78, p. 974-980, 2012.
- MATTOS, M. C. C.; BASTOS, M. R.; GUARDIEIRO, M. M.; CARVALHO, J. O.; FRANCO, M. M.; MOURÃO, G. B.; BARROS, C. M.; SARTORI, R. Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. **Animal Reproduction Science**, v. 125, n. 1-4, p. 119-123, 2011.
- MCARDLE, C. A.; KOHL, C.; RIEGER, K.; GRÖNER, I.; WEHRENBURG, U. Effects of gonadotropins, insulin and insulin-like growth factor I on ovarian oxytocin and progesterone production. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 78, n. 3, p. 211-220, 1991.
- MCMILLAN, W. H. Statistical models predicting embryo survival to term in cattle after embryo transfer. **Theriogenology**, v. 50, n. 7, p. 1053-1070, 1998.
- MCNEILL, R. E.; DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M.; MORRIS, D. G. Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. **Theriogenology**, v. 65, p. 1435-1441, 2006.
- MEE, J.; ROSS, E.; DILLON, P. Is Irish dairy herd fertility declining?. In: 23rd World Buiatrics congress, 2004, Quebec.
- MIES FILHO, A. Reprodução dos Animais e Inseminação Artificial. Porto Alegre, RS: Ed. Sulina, v. 1, n. 4, p. 359, 1977.
- MISRA, A. K.; KASIRAJ, R.; RAO, M. M.; RANGAREDDY, N. S.; JAISWAL, R. S.; PANT, H. C. Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 50, n. 4, p. 637-649, 1998.
- MIZUTA, K. Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*). **98f**, Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- MOGHADDAM, A.; KARIMI, I.; POOYANMEHR, M. Effects of short-term cooling on pregnancy rate of dairy heifers under summer heat stress. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 6, p. 567-575, 2009.
- MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v. 19, p. 55-81, 1983.
- MONTY, D. E.; WOLFF, L. K. Summer heat stress and reduced fertility in Holstein- Friesian cows in Arizona. **Am J Vet Res**, v. 35, n. 12, p. 1495-1500, 1974.

- MORALES-ROURA, J. S.; ZARCO, L.; HERNÁNDEZ-CERÓN, J.; RODRÍGUEZ, G. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeat-breeding dairy cows. **Theriogenology**, v. 55, p. 1831-1841, 2001.
- MOREIRA, F.; DE LA SOTA, R. L.; DIAZ, T.; THATCHER, W. W. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses in dairy heifers. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 6, p. 1568-1576, 2000.
- MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C. A.; MATTOS, R.; LOPES, F.; THATCHER, W. W. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a time artificial insemination protocol in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1646-1659, 2001.
- MOREIRA, F.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J.; BADINGA, L.; THATCHER, W. W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 2, p. 895-907, 2002a.
- MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W. W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v. 57, n. 4, p. 1371-1387, 2002b.
- MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 27-44, 1991.
- NASSER, L.; ADAMS, G. P.; BO', G. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v. 40, p. 713-724, 1993.
- NASSER, L. F.; SÁ FILHO, M. F.; REIS, E. L.; REZENDE, C. R.; MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, v. 76, n. 2, p. 320-327, 2011.
- NEBEL, R. L.; MCGILLIARD, M. L. Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 10, p. 3257-3268, 1993.
- NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P-36 protocol. **Acta Scientiae Veterinariae** v. 31, p. 509 [Abstract], 2003.
- NRC. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. Washington, DC., 2001 (7th rev. Natl. Acad. Sci.).
- PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat Shock-Induced Apoptosis in Preimplantation Bovine Embryos Is a Developmentally Regulated Phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1169-1177, 2002.

- PEIPPO, J.; VARTIA, K.; KANANEN-ANTTILA, K.; RÄTY, M.; KORHONEN, K.; HURME, T.; MYLLYMÄKI, H.; SAIRANEN, A.; MÄKI-TANILA, A. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. **Animal Reproduction Science**, v. 111, n. 1, p. 80-92, 2009.
- PEIPPO, J.; RÄTY, M.; KORHONEN, K.; ERONEN, M.; KANANEN, K.; HURME, T.; HALMEKYTÖ, M.; MÄKI-TANILA, A. Impact of in vitro fertilization of bovine oocytes with sex-sorted frozen-thawed spermatozoa on developmental kinetics, quality and sex ratio of developing embryos. **Zygote**, v. 18, n. 03, p. 185-194, 2010.
- PEREIRA, R. M.; MARQUES, C. C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Banking**, v. 9, p. 267-277, 2008.
- PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonograph of bovine ovary. **Theriogenology**, v. 21, n. 3, p. 495-504, 1984.
- PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Follicular populations during the estrous cycle in heifers. I. Influence of day. **Animal Reproduction Science**, v. 14, p. 165-176, 1987.
- PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Follicular population during the estrous cycle in heifers: III. Time of selection of the ovulatory follicle. **Journal of Animal Reproduction Science**, v. 16, n. 2, p. 81-95, 1988.
- PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.
- PUTNEY, D. G.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. **Theriogenology**, v. 31, n. 4, p. 765-778, 1989.
- PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between Days 1 to 7 post insemination. **Theriogenology**, v. 30, n. 2, p. 195-209, 1988.
- PUTNEY, D. J.; MULLINS, S.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; GROSS, T. S. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 19, n. 1-2, p. 37-51, 1989.
- RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonally, cyclical, and left-right variations. **Acta Endocrinology**, v. 34, p. 7-68, 1960.
- RANI, P. J. A.; PANNEERSELVAM, C. Carnitine as a free radical scavenger in aging. **Exp Geront**, v. 36, p. 1713-1726, 2001.

REANO, I.; CARBALLO, D.; TRÍBULO, A.; TRÍBULO, P.; BALLA, E.; BO', G. A. Efecto de la adición de eCG a los tratamientos superovulatorios con Follitropin-V en la producción de embriones de donantes de embriones. **In: VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal – IRAC 2009, Córdoba, p. 54 [Abstract].**

RENSIS, F. D.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. **Theriogenology**, v. 60, n. 6, p. 1139-1151, 2003.

RHODES, F. M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 4, p. 265-277, 1995.

RICHTER, K.; HASLBECK, M.; BUCHNER, J. The heat shock response: life on the verge of death. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 253-266, 2010.

RIGOGLIO, N. N.; FÁTIMA, L. A.; HANASSAKA, J. Y.; PINTO, G. L.; MACHADO, A. S. D.; GIMENES, L. U.; BARUSELLI, P. S.; RENNO, F. P.; MOURA, C. E. B.; WATANABE, I.; PAPA, P. C. Equine chorionic gonadotropin alters luteal cell morphologic features related to progesterone synthesis. **Theriogenology**, p. 1-7, 2012.

RIVERA, F. A.; MENDONÇA, L. G. D.; LOPES, G.; SANTOS, J. E. P.; PEREZ, R. V.; AMSTALDEN, M.; CORREA-CALDERON, A.; CHEBEL, R. C. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. **Reproduction**, v. 141, n. 3, p. 333-342, 2011.

RIVERA, G. M.; FORTUNE, J. E. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone-dependent insulin-like growth factor binding protein-4 protease. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 1, p. 112-118, 2001.

RIVERA, G. M.; CHANDRASEKHER, Y. A.; EVANS, A. C.; GIUDICE, L. C.; FORTUNE, J. E. A potential role for insulin-like growth factor binding protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 1, p. 102-111, 2001.

RIVERA, R. M.; HANSEN, P. J. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. **Reproduction**, v. 121, p. 107-115, 2001b.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction Development**, v. 61, p. 234-248, 2002.

ROBERTSON, I.; NELSON, R. E. **In: Stringfellow, D.A., Seidel, S.M. (Eds.), Certification and Identification of the Embryo.** Urbana, IL, 1998 (Manual of the International Embryo Transfer Society)

RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; REIS, E. L.; NICHI, M.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Taxa de concepção de embriões frescos e criopreservados transferidos em vacas holandesas de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 159, 2004a.

- RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; REIS, E. L.; NICHI, M.; BO, G. A.; BARUSELLI, P. S. Taxa de concepção à inseminação artificial e à transferência de embriões em vacas holandesas de alta produção e repetidoras de serviço. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p., 2004b.
- RODRIGUES, C. A.; MANCILHA, R. F.; REIS, E. L.; AYRES, H.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F. Efeito do número de implantes de norgestomet e do momento da administração do indutor de ovulação em vacas holandesas superovuladas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 229, 2005.
- RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TEIXEIRA, A. A.; MANCILHA, R. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Taxa de concepção à inseminação artificial e à transferência de embriões em vacas em Holandesas de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 1254, 2007a.
- RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TEIXEIRA, A. A.; MANCILHA, R. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Comparação entre a taxa de concepção após inseminação artificial ou a transferência de embriões em vacas holandesas de alta produção repetidoras de serviço. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 1255, 2007b.
- RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TEIXEIRA, A. A.; MANCILHA, R. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Efeito da sincronia entre a doadora e a receptora na taxa de concepção após transferência de embriões frescos e criopreservados em vacas holandesas de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 1257, 2007c.
- RODRIGUES, C. A.; TEIXEIRA, A. A.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; MANCILHA, R. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2-4, p. 110-117, 2010.
- RODRIGUES, C. A.; MENDANHA, M. F.; VIEIRA, L. M.; GUERREIRO, B. M.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Risk factors for a Holstein cow becoming a repeat breeder. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 489 [Abstract], 2012.
- ROTH, Z.; MEIDAN, R.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. **Reproduction**, v. 121, p. 745-751, 2001.
- ROYAL, M.; MANN, G. E.; FLINT, A. P. E. Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. **Veterinarian Journal**, v. 160, p. 53-60, 2000b.
- ROYAL, M. D.; DARWASH, A. O.; FLINT, A. P. F.; WEBB, R.; WOOLLIAMS, J. A.; LAMMING, G. E. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. **Animal Science**, v. 70, p. 487-501, 2000a.
- RUTLEDGE, J. J. Use of embryo transfer and IVF to bypass effects of heat stress. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 105-111, 2001.

SAACKE, R.G.; DEJARNETTE, J.M.; BAME, J.H.; KARABINUS, D.S.; WHITMAN, S.S. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? **Theriogenology**, v.50, n.1, p. 117-128, 1998.

SÁ FILHO, M. F.; BALDRIGHI, J. M.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; CARVALHO, J. B. P.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 129, n. 3–4, p. 132-139, 2011.

SALES, J. N.; DIAS, L. M.; VIVEIROS, A. T.; PEREIRA, M. N.; SOUZA, J. C. Embryo production and quality of Holstein heifers and cows supplemented with beta-carotene and tocopherol. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 1-2, p. 77-89, 2008.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; WILTBANK, M. C. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 2831-2842, 2002.

SANTOS, J. E. P.; BARTOLOME, J. A.; CERRI, R. L. A.; JUCHEM, S. O.; HERNANDEZ, O.; TRIGG, T.; THATCHER, W. W. Effect of a deslorelin implant in a timed artificial insemination protocol on follicle development, luteal function and reproductive performance of lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 421-435, 2004a.

SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in Bovine Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, 2001.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2803-2812, 2002.

SARTORI, R.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Ovarian Structures and Circulating Steroids in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2813-2822, 2002.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 905-920, 2004.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S.A.; GUENTHER, J.N.; PARRISH, J.J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter. **Journal Dairy Science**, v. 85, p. 2803–2812, 2002.

SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; WILTBANK, M. C. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. **Reproduction Fertility Development**, v. 22 n. 1, p. 151-158, 2010.

SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; ERENO, R. L.; BARROS, C. M. Physiological differences and implications to reproductive management of

Bos taurus and Bos indicus cattle in a tropical environment. **Society for Reproduction and Fertility Suppl**, v. 67, p. 357-375, 2010.

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in Bos indicus cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, p. 244-250, 2011a.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, R. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, n. 2, p. 111-119, 1988.

SAVIO, J. D.; BONGERS, H.; DROST, M.; LUCY, M. C.; THATCHER, W. W. Follicular dynamics and superovulatory response in Holstein cows treated with FSH-P in different endocrine states. **Theriogenology**, v. 35, n. 5, p. 915-929, 1991.

SENEDA, M. M.; MARINHO, L. R. S. Fatores que interferem na população folicular e produção de oócitos em bovinos. **In: 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 2012, Londrina, p. 185-187.

SHAW, D. W.; FARIN, P. W.; WASHBURN, S. P.; BRITT, J. H. Effect of retinol palmitate on ovulation rate and embryo quality in superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 44, p. 51-58, 1995.

SHIMIZU, T.; OHSHIMA, I.; OZAWA, M.; TAKAHASHI, S.; TAJIMA, A.; SHIOTA, M.; MIYAZAKI, H.; KANAI, Y. Heat stress diminishes gonadotropin receptor expression and enhances susceptibility to apoptosis of rat granulosa cells. **Reproduction**, v. 129, n. 4, p. 463-472, 2005.

SHIMIZU, T.; MURAYAMA, C.; SUDO, N.; KAWASHIMA, C.; TETSUKA, M.; MIYAMOTO, A. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 1-2, p. 143-152, 2008.

SILVA, R. G. **Introdução à bioclimatologia animal**. São Paulo: Nobel, 2000. 286 p.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988.

SIROTKIN, A. V.; MAKAREVICH, A. V. GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein kinase A system. **Journal Endocrinology**, v. 163, p. 317-327, 1999.

SON, D.-S.; CHOE, C.-Y.; CHO, S.-R.; CHOI, S.-H.; KIM, H.-J.; KIM, I.-H. The effect of reduced dose and number of treatments os FSH on superovulatory response in CIDR-treated Korean native cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 6, p. 1300-1303, 2007.

SPELL, A. R.; BEAL, W. E.; CORAH, L. R.; LAMB, G. C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 2, p. 287-297, 2001.

- SPICER, L. J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S. E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 5, p. 1232-1241, 1993.
- SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 12, p. 223-245, 1995.
- STEWART, F.; ALLEN, W. R.; MOOR, R. M. Pregnant mare serum gonadotropin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. **Journal Endocrinology**, v. 71, p. 471-482, 1976.
- STEWART, B. M.; BLOCK, J.; MORELLI, P.; NAVARETTE, A. E.; AMSTALDEN, M.; BONILLA, L.; HANSEN, P. J.; BILBY, T. R. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3437-3445, 2011.
- STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 1108-1114, 1993.
- STRONGE, A. J.; SREENAN, J. M.; DISKIN, M. G.; MEE, J. F.; KENNY, D. A. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, v. 64, p. 1212-1224, 2005.
- STRICKLAND, J. M.; MARTINS, J. P. N.; NEUDER, L. M.; PURSLEY, J. R. Effect of 14/11 Presynch/Ovsynch on 1st service conception rates of lactating dairy cows compared to AI following a detected estrus. **In**: 2010 American Association of Bovine Practitioners Meeting, 2010, Albuquerque, New Mexico, EUA.
- THATCHER, W. W.; GWAZDAUSKAS, F. C.; WILCOX, C. J.; TOMS, J.; HEAD, H. H.; BUFFINGTON, D. E.; FREDRICKSSON, W. B. Milking Performance and Reproductive Efficiency of Dairy Cows in an Environmentally Controlled Structure. **Journal of Dairy Science**, v. 57, n. 3, p. 304-307, 1974.
- THATCHER, W. W.; TERQUI, M.; THIMONIER, J.; MAULEON, P. Effect of estradiol-17 beta on peripheral plasma concentration of 15-keto-13,14-dihydro PGF2 alpha and luteolysis in cyclic cattle. **Prostaglandins**, v. 31, n. 4, p. 745-756, 1986.
- THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1435-1450, 2001.
- THOMPSON, I. M.; OZAWA, M.; BUBOLZ, J. W.; YANG, Q.; DAHL, G. E. Bovine luteal prolactin receptor expression: potential involvement in regulation of progesterone during the estrous cycle and pregnancy. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 5, p. 1338-1346, 2011.

- TIEZZI, F.; MALTECCA, C.; PENASA, M.; CECCHINATO, A.; CHANG, Y. M.; BITTANTE, G. Genetic analysis of fertility in the Italian Brown Swiss population using different models and trait definitions. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 12, p. 6162-6172, 2011.
- TORRES-JÚNIOR, J. R. D. S.; PIRES, M. D. F. A.; DE SÁ, W. F.; FERREIRA, A. D. M.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; RAMOS, A. A.; FOLHADELLA, I. M.; POLISSENI, J.; DE FREITAS, C.; CLEMENTE, C. A. A.; DE SÁ FILHO, M. F.; PAULA-LOPES, F. F.; BARUSELLI, P. S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 155-166, 2008.
- TRÍBULO, A.; D., R.; TRIBULO, H.; TRIBULO, R.; ALASINO, R. V.; BELTRAMO, D.; BIANCO, I.; MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A. Superstimulation in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. **Animal Reproduction Science**, v. 129, p. 7-13, 2011a.
- TRÍBULO, A.; ROGAN, D.; TRIBULO, H.; TRIBULO, R.; MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A. Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Folltropin-V in two different concentrations of hyaluronan. **Theriogenology**, v. 77, p. 1679-1685, 2011b.
- UDOMPRASERT, P.; WILLIAMSON, N. B. Seasonal influences on conception efficiency in Minnesota dairy herds. **Theriogenology**, v. 28, n. 3, p. 323-336, 1987.
- VACA, L. A.; GALINA, C. S.; FERNANDEZ-BACA, S.; ESCOBAR, F. J.; RAMÍREZ, B. Oestrous cycles, oestrus and ovulation of the Zebu in the Mexican tropics. **The Veterinary Record**, v. 117, n. 26, p. 434-437, 1985.
- VASCONCELOS, J. L. M.; SANGSRITAVONG, S.; TSAI, S. J.; WILTBANK, M. C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. **Theriogenology**, v. 60, p. 795-807, 2003.
- VASCONCELOS, J. L. M.; DEMÉTRIO, D. G. B.; SANTOS, R. M.; CHIARI, J. R.; RODRIGUES, C. A.; FILHO, O. G. S. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 192-200, 2006.
- VASCONCELOS, J. L. M.; JARDINA, D. T. G.; SÁ FILHO, O. G.; ARAGON, F. L.; VERAS, M. B. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin-releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 75, n. 6, p. 1153-1160, 2011b.
- VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; TEIXEIRA, A. A.; RANIERI, A. L.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; SALES, J. N.; BARUSELLI, P. S.; BARROS, C. M. The effect of ecg in multiple ovulation protocols for holstein Heifers embryo donors. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, n. 2, p. 714, 2010.
- VRIES, A.; STEENHOLDT, C.; RISCO, C. A. Pregnancy Rates and Milk Production in Natural Service and Artificially Inseminated Dairy Herds in Florida and Georgia. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 948-956, 2005.

- WALSH, S. W.; WILLIAMS, E. J.; EVANS, A. C. O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3-4, p. 127-138, 2011.
- WANDJI, S.-A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M.-A. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled insulin-like growth factor-I, 125I-labeled follicle-stimulating hormone, and 125I-labeled human chorionic gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biology Reproduction**, v. 47, p. 814-822, 1992.
- WASHBURN, S. P.; SILVIA, W. J.; BROWN, C. H.; MCDANIEL, B. T.; MCALLISTER, A. J. Trends in reproductive performance in Southeastern Holstein and Jersey DHI herds. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 1, p. 244-251, 2002.
- WATHES, D. C.; TAYLOR, V. J.; CHENG, Z.; MANN, G. E. Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in the post partum cow. **Reproduction**, v. 61, p. 219-237, 2003.
- WEBB, R.; GARNSWORTHY, P. C.; GONG, J. G.; ARMSTRONG, D. G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. . **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. E, p. 63-74, 2004.
- WILSON, S. J.; KIRBY, C. J.; KOENIGSFELD, A. T.; KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 8, p. 2132-2138, 1998.
- WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 17-29, 2006.
- WILTBANK, M. C.; SARTORI, R.; HERLIHY, M. M.; VASCONCELOS, J. L. M.; NASCIMENTO, A. B.; SOUZA, A. H.; AYRES, H.; CUNHA, A. P.; KESKIN, A.; GUENTHER, J. N.; GUMEN, A. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1568-1582, 2011.
- WOLFENSON, D.; THATCHER, W. W.; BADINGA, L.; SAVIO, J. D.; MEIDAN, R.; LEW, B. J.; BRAW-TAL, R.; BERMAN, A. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. **Biology Reproduction**, v. 52, p. 106-113, 1995.
- WOLFENSON, D.; LEW, B. J.; THATCHER, W. W.; GRABER, Y.; MEIDAN, R. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. **Animal Reproduction Science**, v. 47, n. 1-2, p. 9-19, 1997.
- WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 535-547, 2000.
- WOLFENSON, D.; INBAR, G.; ROTH, Z.; KAIM, M.; BLOCH, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 1042-1055, 2004.

YONEZAWA, T.; MOGI, K.; LI, J. Y.; SAKO, R.; YAMANOUCHI, K.; NISHIHARA, M. Modulation of growth hormone pulsatility by sex steroids in female goats. **Endocrinology**, v. 146, p. 2736-2743, 2005.

YOSHIDA, T.; SEKI, M.; WATANABE, N.; FURUTA, H.; YOSHIMURA, I.; OSADA, M.; CHIBA, K.; OKADA, K.; KAWASUMI, K.; USHIJIMA, H. Relation of reproductive performances and rectal palpation for luteum function of heifers 7 days after estrus. **Animal Science Journal**, v. 83, p. 207-212, 2012.