Acta Scientiae Veterinariae. 36(3): 249-254, 2008.

ORIGINAL ARTICLE
Pub. 793

ISSN 1678-0345 (Print)
ISSN 1679-9216 (Online)

Recoleta uterina como estratégia para aumentar a taxa de embriões em fêmeas bovinas de corte e leite

Uterine re-flushing as a strategy to improve embryo recovery rate in dairy and beef cattle

Fabiano Buss Cruz[1], Ivens Ortigari Junior[1], Arnaldo Diniz Vieira[1], Renato Pereira da Costa Gerger[2], Eduardo de Souza Ribeiro[1], Marcelo Bertolini[1] & Alceu Mezzalira[1]

RESUMO

A taxa de recuperação embrionária em vacas superovuladas após coleta uterina não-cirúrgica é inferior ao número de ovulações, demonstrando uma relativa ineficiência neste processo de coleta convencional por via cervical. Uma alternativa simples e de fácil execução para melhorar a taxa de recuperação embrionária é a recoleta uterina. Para avaliar o efeito do procedimento de recoleta, bem como a influência da raça e do operador na taxa de recuperação embrionária, 38 fêmeas Nelore e 19 fêmeas Jersey foram estimuladas com FSH e coletadas por via cervical, por um de dois operadores treinados. Ao final da coleta, o cateter era fechado e mantido no corpo do útero, repleto com meio de coleta, enquanto a fêmea era liberada por 30 a 50 min, quando era submetida ao procedimento de recoleta, pelo mesmo operador. Em 57 procedimentos foram recuperadas 599 estruturas, das quais 423 (70,6%) foram obtidas na coleta e 176 (29,4%) na recoleta. Obteve-se uma recuperação média de 7,4 estruturas na coleta e 3,1 na recoleta, totalizando 10,5 estruturas por animal. Em 73,6% (42 de 57) dos procedimentos foram encontradas estruturas no processo de recoleta. Não houve influência da raça em relação ao número médio total de estruturas obtidas, com 10,9 na raça Jersey e 10,3 na Nelore. Da mesma forma, a taxa de recuperação embrionária após a coleta e recoleta não diferiu entre animais da raça Jersey (8,1 e 2,7) e Nelore (7,0 e 3,2) e entre os operadores A (7,5 e 3,3) e B (7,3 e 2,9), respectivamente. Conclui-se que o procedimento de recoleta aumenta a taxa de recuperação embrionária de fêmeas da raça Jersey e/ou Nelore, não sendo verificada influência do operador.

Descritores: coleta de embriões, recoleta, Jersey, Nelore, lavagem uterina.

ABSTRACT

Embryo recovery rate in superovulated cows after uterine flushing is lower than the ovulation rate, which contributes to the relative inefficiency of the conventional cervical recovery procedure. A simple and easy alternative to improve embryo recovery rate is the uterine re-flushing procedure. To evaluate the effect of re-flushing and the influence of breed and operator on bovine embryo recovery rate, 38 Nelore and 19 Jersey females were stimulated using FSH, with embryos being collected by one of two trained operators. At the end of flushing, the catheter was sealed and maintained into the uterine body, filled with flushing medium, while females were released to a paddock for 30 to 50 min, to be submitted to the re-flushing procedure by the same operator. A total of 599 structures were recovered out of 57 procedures, from which 423 (70.6%) were obtained in the first flushing and 176 (29.4%) after re-flushing. Mean recovery rates of 7.4 and 3.1 structures were obtained after the first and second flushing, respectively, for a total of 10.5 structures per cow. Structures were obtained in 73.6% (42 out of 57) of the re-flushing procedures. No breed effect was observed on total ova or embryo recovery, with 10.9 total ova collected from Jersey and 10.3 from Nelore females. Likewise, the embryo recovery rate obtained following uterine flushing or re-flushing did not differ either between Jersey (8.1 and 2.7) and Nelore (7.0 and 3.2) animals, or between operators A (7.5 and 3.3) and B (7.3 and 2.9), respectively. In conclusion, the uterine re-flushing procedure significantly increased the rate of embryo recovery in Jersey and Nelore females, with no operator influence being observed.

Key words: embryo recovery, re-flushing, Jersey, Nelore, flushing.

Received: April 2008 www.ufrgs.br/favet/revista Accepted: July 2008

[1]Laboratório de Reprodução Animal Prof. Assis Roberto de Bem / CAV, UDESC, Lages, SC/Brasil. [2]Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, SP/Brasil. CORRESPONDÊNCIA: A. Mezzalira [mezzalira@cav.udesc.br].

INTRODUÇÃO

A transferência de embriões é utilizada comercialmente desde os anos 70, quando o procedimento ainda era cirúrgico [11]. A possibilidade da lavagem uterina por via transcervical [6,7,22] permitiu executar a técnica no campo, determinando sua rápida difusão em todo o mundo. Desde então, avanços significativos foram obtidos com equipamentos, meios de cultivo, protocolos superovulatórios, técnicas de congelamento [26] e com o entendimento da dinâmica folicular [8], permitindo programar os horários das distintas atividades [19]. No entanto, a baixa eficiência na recuperação observada nos trabalhos iniciais [9,20] ainda é comum nos dias de hoje, com a obtenção de um número de embriões bastante inferior (20 a 80%) ao número de corpos lúteos, o que atesta a relativa ineficiência no processo de coleta convencional [13,16,23], que sofreu poucas alterações desde seu desenvolvimento inicial.

Recentemente, foi desenvolvida a técnica da recoleta [3], onde uma segunda lavagem uterina é realizada após um período de espera, no qual o útero fica repleto com o meio da coleta, resultando em um incremento de aproximadamente 30% de embriões recuperados de fêmeas de corte. Em trabalho preliminar [4], a taxa adicional de 40% de embriões, obtida após a recoleta de vacas Jersey, sugere que nesta raça a retenção de embriões subseqüente à primeira lavagem uterina seja superior. A escassez de estudos com esta técnica alternativa, especialmente com gado leiteiro, justifica a realização deste trabalho, que teve como objetivo avaliar o método da recoleta na recuperação adicional de estruturas em fêmeas superovuladas, avaliando-se a influência da raça (Jersey e Nelore) e do operador no número total de estruturas e embriões recuperados em cada etapa do processo.

MATERIAIS E MÉTODOS

Doadoras

Como doadoras foram utilizadas 38 fêmeas da raça Nelore (*Bos indicus*) e 19 da raça Jersey (*Bos taurus*) com idade entre 2 a 10 anos. Os animais eram provenientes de diferentes criatórios de Santa Catarina, sendo todas as coletas realizadas com propósito comercial, o que impossibilitou que cada animal fosse utilizado pelos dois operadores.

As fêmeas da raça Nelore foram mantidas em regime de pastagem, recebendo apenas suplemen-tação mineral. Já as doadoras da raça Jersey foram mantidas em sistema de pastagens cultivadas, além de receberem suplementação concentrada e minera-lização. Foram selecionadas apenas fêmeas que não apresentavam alterações reprodutivas após avaliação ginecológica, realizada através de palpação retal, vaginoscopia e ultrasonografia.

Protocolo de superovulação

Todas as doadoras foram submetidas ao mesmo protocolo de superovulação, onde em dia aleatório do ciclo estral (denominado dia D0), foi inserido um dispositivo intravaginal contendo Progesterona (DIB®) e administrado 2 mg de Benzoato de Estradiol (Estrogin®) por via IM. No D5 era iniciado o tratamento superovulatório, com a aplicação de 8 doses decrescentes de FSH (Pluset®), em intervalos de 12h, com dose total de 200 a 300 UI para doadoras Nelore e 250 a 450 UI para doadoras Jersey. As aplicações foram realizadas às 07h e 19h, diariamente. Juntamente com a sexta aplicação de FSH, no D7, foi administrada uma dose de prostaglandina (Ciosin®) e no D8, às 19h, foi removido o dispositivo intra-vaginal, juntamente com a aplicação da última dose de FSH. No D9, às 07h, foi aplicado 12,5 mg de LH (Lutropin®), com as doadoras sendo inseminadas em tempo fixo 12 e 24h após.

Coleta e recoleta dos embriões

As coletas foram realizadas em diferentes localidades do Estado de Santa Catarina, por dois técnicos experientes. No sétimo dia após a inseminação era procedida a coleta por lavagem uterina. Para tal, após a contenção do animal, procedia-se a avaliação da resposta ovariana por palpação retal, quando eram descartadas as fêmeas com menos de três corpos lúteos. A seguir, era realizada a anestesia epidural baixa, com aplicação de 4 ml de lidocaína a 2% e a higienização da região perineal do animal.

Todas as coletas foram realizadas pelo método transcervical, que consiste na passagem de um cateter de 2 vias, tipo Folley, pela cervix e sua fixação no corpo do útero. A fixação foi realizada pela insuflação do balão com o próprio meio de coleta, com volume variando de 4 a 7 ml. Após a fixação, o cateter era acoplado a um sistema de mangueiras conectadas a um conector tipo Y, onde uma extremidade era ligada ao recipiente contendo

o meio de coleta e a outra a um filtro coletor de embriões (Encon®). Utilizou-se aproximadamente 1 litro de PBS (Solução Salina Tamponada com Fosfato), previamente aquecido a 37°C, na coleta de cada animal, em sucessivas lavagens. Na última infusão, o útero era preenchido com uma quantidade variando de 60 a 100 ml de PBS, com o cateter sendo lacrado com uma presilha. Após este procedimento, o animal era liberado por um período de 30 a 50min, quando era submetido a uma segunda sessão de lavagens uterinas (recoleta). A recoleta era realizada pelo mesmo operador, utilizando um novo filtro e um volume adicional de aproximadamente 500 ml de meio.

Pesquisa dos embriões

O conteúdo de cada filtro era depositado em placas de Petry quadriculadas (85 x 15 mm), sendo o filtro lavado com jatos de PBS com auxílio de uma seringa acoplada a agulha, até a sua completa limpeza. A busca das estruturas era realizada sob estereomicroscópio, com pelo menos duas procuras em cada placa. As estruturas encontradas nas placas de coleta e recoleta eram mantidas em meio de manutenção, em placas diferentes, até serem contadas e catalogadas nos distintos grupos do experimento.

Análise estatística

Os dados foram analisados através de um modelo linear generalizado, com distribuição de Poisson, utilizando-se o pacote estatístico SAS [24], para um nível de significância de 5%. Foram avaliados os efeitos da raça e do operador sobre o número de estruturas e embriões totais ou obtidos na coleta ou recoleta.

RESULTADOS

Foram realizadas 57 coletas, sendo 38 em fêmeas Nelore e 19 em fêmeas Jersey, totalizando 599 estruturas, das quais 423 (70,6%) foram recuperadas na coleta e 176 (29,4%) na recoleta. Obteve-se uma média de 7,4 estruturas na coleta e 3,1 estruturas na recoleta, totalizando 10,5 estruturas por procedimento. Em 42 dos 57 (73,6%) procedimentos foram encontrados estruturas no processo de recoleta. Em dois animais não foram recuperadas estruturas na coleta, sendo, entretanto, obtidas respectivamente, uma e cinco estruturas na recoleta. Em um procedimento, apesar de haver um número razoável de corpos lúteos nos ovários da doadora, não foi recuperada qualquer estrutura, tanto na coleta, quanto na recoleta.

Não houve influência da raça em relação ao número médio total de estruturas obtidas, com 10,9 ± 6,6 para a raça Jersey e 10,3 ± 7,1 para a raça Nelore (Tabela 1). No procedimento de coleta, obteve-se média de 8,1 ± 5,9 estruturas coletadas de fêmeas da raça Jersey e 7,0 ± 5,1 coletadas de fêmeas da raça Nelore, não diferindo estatisticamente. Da mesma forma, a taxa média de recuperação no processo de recoleta foi semelhante entre as fêmeas da raça Jersey e Nelore, com 2,7 ± 2,7 e 3,2 ± 2,9 estruturas recuperadas, respectivamente. Não foram observados efeitos dos operadores A e B em relação ao número médio total de estruturas coletadas (10,9 ± 8,5 e 10,2 ± 5,7, respectivamente), bem como em relação ao número médio de estruturas obtidas na coleta ou recoleta, estruturas obtidas pelo operador A (7,5 ± 6,8 ou 3,3 ± 3,5), em relação ao operador B (7,3 ± 4,3 ou 2,9 ± 2,4), respectivamente.

Tabela 1. Número médio de estruturas obtidas de fêmeas das raças Jersey ou Nelore, em procedimentos de coleta e recoleta, executados por dois operadores.

Grupos	Coletas n	Estruturas recuperadas		Total médio
		Coleta	*Recoleta*	
Jersey	19	8,1 ± 5,9	2,7 ± 2,7	10,9 ± 6,6
Nelore	38	7,0 ± 5,1	3,2 ± 2,9	10,3 ± 7,1
Operador A	22	7,5 ± 6,8	3,3 ± 3,5	10,9 ± 8,5
Operador B	35	7,3 ± 4,3	2,9 ± 2,4	10,2 ± 5,7

As médias nas diferentes colunas não diferiram estatisticamente (P > 0,05).

DISCUSSÃO

A transferência de embriões, embora consolidada como uma biotécnica que contribui significativamente para o melhoramento animal, ainda apresenta uma grande variação nas taxas de recuperação dos embriões. Nos últimos anos, muitos trabalhos buscaram otimizar o processo de superovulação [14], a qualidade embrionária [18], bem como a formulação de protocolos com horários pré-fixados [1,19]. No entanto, outras práticas que são rotineiras, como o procedimento de coleta, receberam pouca atenção da comunidade científica para a efetivação de melhorias. Atualmente, as formas mais comuns de lavagem uterina consistem no emprego de um circuito fechado, onde o líquido é introduzido e recolhido do útero por gravidade e, eventualmente, com um circuito aberto, onde o líquido é introduzido e retirado do útero através de uma seringa [21]. Independente da forma de coleta, diferentes estudos [9,10,12,13, 15,16,20,21] demonstram que a taxa de recuperação de estruturas obtidas com a lavagem dos cornos uterinos é inferior ao número de ovulações, com oscilações entre 20% a 80%, o que também é demonstrado neste experimento, onde em 42 dos 57 animais coletados (73,6%) obtiveram-se estruturas adicionais. Estes dados demonstram uma relativa ineficiência no processo de coleta convencional. Mesmo com esta constatação, o processo de coleta por via cervical tem permanecido praticamente inalterado desde sua implantação em meados dos anos 70 [6,7,22].

Com o propósito de quantificar e reduzir a retenção de embriões na coleta, diferentes estudos foram desenvolvidos. O local de fixação do balão no corno uterino da fêmea, durante a lavagem, exerce influência na taxa de recuperação embrionária. Em estudo prévio, a fixação logo após a bifurcação uterina, embora demande o dobro do volume do meio de coleta, proporcionou um aumento significativo na quantidade de estruturas coletadas (69,3%), em relação à fixação mais próxima da junção útero-tubárica (37,4%) [23]. A realização da lavagem individual de cada corno uterino proporcionou a recuperação de 40% dos presumíveis embriões, contra 31% da lavagem simultânea dos mesmos pelo corpo uterino, valores que, todavia, não diferiram estatisticamente [12].

Perfusões adicionais, realizadas algumas horas após a coleta [25], ou após o abate dos animais [9], proporcionaram um adicional de 9% a 10% de estruturas. Em nossa experiência (dados não publicados), a realização de uma segunda lavagem uterina 2 a 12h após uma reduzida taxa de coleta, geralmente resulta em poucas, ou nenhuma estrutura adicional. Nestas condições, a falha é geralmente atribuída à falha de captação dos óvulos pelo infundíbulo, à perda dos embriões através do oviduto ou mesmo à degeneração e absorção de estruturas, fato também verificado em estudo retrospectivo com centenas de recoletas [25]. Segundo o autor, a menos que existam problemas técnicos na primeira lavagem, a taxa de recuperação na segunda lavagem é baixa, principalmente quando a primeira coleta foi ineficiente. Neste experimento, observamos que duas fêmeas, mesmo com um número razoável de corpos lúteos, não proporcionaram qualquer estrutura na coleta e apenas um embrião na recoleta de uma delas, reforçando esta teoria. Entretanto, é possível a existência de exceções, como o caso da fêmea em que se obteve cinco estruturas na recoleta, enquanto a coleta não proporcionou nenhuma estrutura, também observado neste estudo.

Aparentemente, o sucesso da recoleta reside na manutenção do líquido de coleta no interior do útero por um período de tempo, enquanto o animal se movimenta. Após sucessivas infusões, o útero tende a expandir-se, principalmente em animais mais velhos [25]. Alguns técnicos enfatizam a necessidade de massagear os cornos uterinos para liberar os embriões das pregas endometriais, enquanto outros enfatizam a necessidade de expandir o útero para desfazerem-se as pregas [25]. Embora não seja conhecido o exato mecanismo que possibilita a recuperação de estruturas adicionais na recoleta, é possível que o relaxamento da parede uterina, e a presença de líquido no seu interior, associados ao movimento do animal, contribuam para desfazer possíveis dobras, bem como dissolvam secreções mucosas, liberando, assim, estruturas que ficariam retidas durante o procedimento convencional.

Neste estudo, a fixação do cateter no corpo do útero possibilitou perfundir a totalidade do lúmen dos dois cornos uterinos, exigindo um volume adicional significativo de meio que, todavia, tem um custo relativamente baixo, sendo também observado em outros estudos [23]. Entretanto, esta metodologia possibilita o emprego de sondas mais curtas, do tipo Folley, que tem um custo até 100 vezes menor do que algumas sondas específicas e necessárias para a coleta no

corno uterino de vacas de grande porte e/ou com tratos genitais grandes. O fato de se realizar a lavagem dos dois cornos uterinos simultaneamente, permite a utilização de apenas um cateter por animal e por procedimento, em contraste com a lavagem individual de cada corno, que requer a substituição do cateter, aumentando o tempo e os custos do trabalho. Ainda, em relação ao aspecto econômico, o emprego da recoleta é ainda mais promissor, já que o incremento médio de aproximadamente 30%, obtido na recuperação embrionária, pode gerar uma receita adicional que cobre todos os custos do programa.

Neste estudo, o emprego da técnica da recoleta possibilitou um incremento médio de 2,7 (8,1 para 10,9) embriões por coleta nas fêmeas Jersey e de 3,3 (7,0 para 10,3) embriões por coleta nas fêmeas Nelore, dados semelhantes aos observados na raça Limosin (8,3 para 12,7), Guzerá (7,9 para 11,5) [3] e Nelore e suas cruzas (8,3 para 11,4) [17]. Em 73,6% (42 de 57) dos procedimentos foram encontradas estruturas no processo de recoleta, resultado muito próximo dos 80% (24 de 30) observados com animais da raça Nelore e cruzas Nelore *vs.* Simental [17].

Embora diferentes trabalhos [2,5] tenham evidenciado que a raça da doadora seja uma importante fonte de variação nos resultados da transferência de embriões, neste estudo não foi verificado efeito da raça no total de estruturas obtidas por coleta, com 10,9 para fêmeas da raça Jersey e 10,3 para fêmeas da raça Nelore. Da mesma forma, não foram observadas diferenças entre as taxas obtidas na coleta (8,1 *vs.* 7,0) ou recoleta (2,7 *vs.* 3,2) para fêmeas da raça Jersey e Nelore, respectivamente. A taxa média de recoleta de 3,1 estruturas observada neste experimento é bastante próxima à observada com animais da raça Guzerá (3,6) [3] e da raça Nelore e suas cruzas (3,1) [17]. Em nosso experimento não foi constatado efeito dos operadores em relação ao número médio total de embriões coletados (10,9 e 10,2), e ao número médio de embriões obtidos na coleta (7,5 e 7,3) ou recoleta (3,3 e 2,9). O incremento obtido na taxa de recuperação embrionária com o procedimento da recoleta é semelhante aos descritos por outros autores [3,4,17], demonstrando a efetividade da técnica para fêmeas de corte ou leite, sejam de origem indiana ou européia.

CONCLUSÕES

O procedimento de coleta de embriões bovinos por via cervical apresenta deficiências que podem ser contornadas, ao menos em parte, com a utilização do processo de recoleta que, em função da manutenção do cateter no corpo do útero após a coleta, é um procedimento muito simples e rápido, podendo ser executado com apenas um pequeno tempo adicional.

A significativa taxa de recuperação embrionária obtida neste processo, convalidada por resultados semelhantes descritos por outros autores, demonstra que a técnica é efetiva para fêmeas de corte ou leite, sejam de origem indiana ou européia. Adicionalmente, foi demonstrado que o operador, quando experiente, não exerce influência nas taxas de coleta, recoleta, bem como no número total de embriões obtidos, nas condições deste estudo.

REFERÊNCIAS

1 **Bo G.A., Adams G.P., Caccia M., Martinez M., Pierson R.A. & Mapletoft R.J. 1995** Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*. 39: 193-204.

2 **Breuel K.F., Baker R.D., Butcher R.L., Townsend E.C., Inskeep E.K., Dailey R.A. & Lerner S.P. 1991.** Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. *Theriogenology*. 36: 241-245.

3 **Castro Neto A.S., Sanches B.V., Binelli M., Seneda M.M., Perri S.H. & Garcia J.F. 2005.** Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology*. 63: 1249-1255.

4 **Cruz F.B., Ortigari Junior I., Bunn S., Mezzalira J.C., Wentz K.C. & Mezzalira A. 2006.** Recoleta melhora a recuperação embrionária em vacas Jersey superovuladas. In.: *Anais do XII Ciclo de atualização em Medicina Veterinária* (Lages, SC/ Brasil). p. 135.

5 **Donaldson L.E. 1984.** Cattle breed as a source of variation in embryo transfer. *Theriogenology*. 21: 1013-1018.

6 **Drost M., Brand A. & Aarts M.H. 1976.** A device for nonsurgical recovery of bovine embryos. *Theriogenology*. 6: 503-507.

7 **Elsden R.P., Hasler J.F. & Seidel Jr. G.E. 1976.** Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*. 6: 523-532.

8 **Ginther O.J., Kastelic J.P. & Knopf L. 1989**. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. *Journal Reproduction and Fertility*. 87: 223-230.

9 **Greve T., Lehn-Jensen H. & Rasbech N.O. 1977.** Non-surgical recovery of bovine embryos. *Theriogenology*. 7: 239-250.

10 **Hackett J., Durnford R., Mapletoft R.J. & Marcus G.J. 1993.** Location and status of embryos in the genital tract of superovulated cows 4 to 6 days after insemination. *Theriogenology*. 40: 1147-1153.

11 **Hasler J.F. 2003**. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Theriogenology*. 79: 245-264.

12 **Hay J.H., Phelps D.A., Hanks D. R. & Foote W.D. 1990.** Sequential uterine horn versus simultaneous total uterine flush to recover bovine embryos nonsurgically. *Theriogenology*. 33: 563-567.

13 **Kim I.H., Son D.S., Yeon S.H., Choi S.W., Park S.B. & Ryu I.S. 2001.** Effect of dominant follicle removal before superstimulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. *Theriogenology*. 55: 937-945.

14 **Lima W.M., Vieira A.D., Thaler Neto A., Mezzalira A., Matos R.C. & Gregory R.M**. **2007.** Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. *Animal Reproduction Science*. 100: 364-370.

15 **Menino Junior A.R. & Wright Jr. R.W. 1978.** The influence of ovulation number and ovarian dimensions on embryo production in superovulated cattle. *Theriogenology*. 9: 259-265.

16 **Mitchell B.R., Martinez M., Bentley D.M. & Mapletoft R.J. 1998.** A comparison of estradiol 17-beta and GnRH in synchronizing follicle wave emergence on superovulatory response in Holstein cows. *Theriogenology*. 49: 380.

17 **Mollo M.R., Ramos A.F., Pivato I., Guimarães Neto A.G., Franco M.M., Rumpf R. & Sartori R. 2006.** Aumento de recuperação embrionária usando lavagem uterina dupla em bovinos, corroborando dados de um estudo anterior. In: *XX Reunião Anual da SBTE* (Araxá, Brasil). *Acta Scientiae Veterinariae*. 34: 517.

18 **Moreira F., Badinga L., Burnley C. & Thatcher W.W. 2002.** Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*. 57: 1371-1387.

19 **Nogueira M.F.G., Fragniyo P.S., Trinca L.A. & Barros C.M. 2007.** The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-time AI in a progestin-based superstimulatory protocol in Nelore cattle. *Theriogenology*. 67: 655-660.

20 **Ozil J.P., Heyman Y. & Renard J.P. 1979.** An instrument for transcervical recovery of embryos from heifers. *Theriogenology*. 11: 173-183.

21 **Palma G.A. 2008.** Recolección de los embriones bovinos. In: Palma G.A. (Ed). *Biotecnologia de la Reproducción*. 2.ed. Córdoba: Pugliese y Siena, pp. 221-236.

22 **Rowe R.F., Del Campo M.R., Eilts C.L., French L.R., Winch R.P. & Ginther O.J. 1976.** A single cannula technique for nonsurgical collection of ova from cattle. *Theriogenology*. 6: 471-483.

23 **Sartori R., Suarez-Fernandez C.A., Monson R.L., Guenther J.N., Rosa G.J.M. & Wiltbank M.C. 2003.** Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology*. 60: 1319-1330.

24 **SAS Institute. 1999.** SAS/STAT. *User's Guide: Statistics Version 6.4*. Cary: SAS Institute Inc., 258p.

25 **Seidel Junior G.E. 1991.** Recovery of embryos. In: Seidel Jr G.E. & Seidel S.M. *Training manual for embryo transfer in cattle*. Rome: FAO, s/p. Disponível em: <http:// www.fao.org/DOCREP/004/T0117E/T0117E05.htm>.

26 **Wilmut I. & Rowson L.E.A. 1973.** Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Veterinary Record*. 92: 686-690.