

JURANDY MAURO PENITENTE FILHO

**MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA MULTIPLICAÇÃO
GENÉTICA POR PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

P411e
2014 Penitente Filho, Jurandy Mauro, 1985-
Métodos de avaliação da eficiência da multiplicação
genética por produção de embriões bovinos / Jurandy Mauro
Penitente Filho. – Viçosa, MG, 2014.
ix, 45f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Bovino - Reprodução. 2. Fertilização *in vitro*. 3. Redes
neurais artificiais. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-graduação em
Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.20824

JURANDY MAURO PENITENTE FILHO

**MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DA MULTIPLICAÇÃO
GENÉTICA POR PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 24 de julho de 2014.

Giancarlo Magalhães dos Santos

José Domingos Guimarães

Giovanni Ribeiro de Carvalho
(Coorientador)

Carlos Antônio de Carvalho Fernandes
(Coorientador)

Ciro Alexandre Alves Torres
(Orientador)

Dedico esta obra a minha família, minha mãe **Sirley Bongiovani Penitente**, meu pai **Jurandy Mauro Penitente**, minhas irmãs **Scheila Penitente Novelli** e **Shirley Aparecida Penitente**, aos meus sobrinhos **João Victor Penitente Usbert**, **Tainá Novelli** e **Amanda Novelli**.

Aos meus amigos de Viçosa, a minha segunda família.

AMO VOCÊS!

“O comunismo é uma espécie de alfaiate que quando a roupa não fica boa faz alterações no cliente” Millôr Fernandes.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Ser Supremo, que me deu o dom da vida e, estando sempre presente em minha vida, agraciou-me com paciência, força e sabedoria, ajudando-me a superar toda e qualquer dificuldade que se antepôs ao meu caminho durante a realização deste trabalho. Graças a Ele posso afirmar que superei mais uma etapa da minha vida. Obrigado.

Aos meus pais, Jurandy Mauro Penitente e Sirley Bongiovani Penitente, por simplesmente tudo, a vida, a oportunidade de estudar longe de casa, ao apoio financeiro, e principalmente ao apoio moral, nos momentos mais complicados vocês estiveram ao meu lado me dando força e coragem para superar os obstáculos. Obrigado.

Às minhas irmãs, Scheila Penitente Novelli e Shirley Aparecida Penitente, por também estarem sempre ao meu lado nos momentos difíceis. Obrigado.

Aos meus queridos amigos, minha família de Viçosa, Alberto, João, Marcus, Bruna (que já me salvou aqui!), Júlio César, Fabrício. Obrigado por todos os momentos de grande alegria que vocês me proporcionaram, as conversas, as risadas e também os ombros amigos. Obrigado gente.

À Carolina, Erly, Adriana, Juliana, Jovana e Camila pelo auxílio durante o experimento. Obrigado.

Ao meu orientador, Ciro Alexandre Alves Torres, pela paciência, amizade e conselhos durante o mestrado e por acreditar que eu era capaz de assumir a responsabilidade de conduzir um projeto de doutorado num dos melhores programas de pós-graduação do país. Obrigado.

Aos professores José Domingos Guimarães e Carlos Antônio de Carvalho Fernandes, pelos conhecimentos e pela disponibilidade em sempre me ajudar com as minhas dificuldades durante a realização do projeto. Obrigado.

Ao Departamento de Zootecnia. Obrigado.

Aos funcionários do Frigorífico Sabor de Minas – Muriaé/MG. Pela permissão para coleta de ovários. Obrigado.

À República Pommerhauss, minha segunda casa, obrigado por todos os momentos de grande alegria, as conversas, as risadas e também as boas ideias que surgiam em nossas discussões. Obrigado gente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo provimento da bolsa de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo financiamento ao projeto de doutorado.

BIOGRAFIA

Jurandy Mauro Penitente Filho, filho de Jurandy Mauro Penitente e Sirley Bongiovani Penitente, nasceu em Colatina-ES em 09 de setembro de 1985 e residiu em Santa Teresa-ES até seus 17 anos.

Em 2003 ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, graduando-se em janeiro de 2008.

Em agosto de 2008 ingressou no programa de pós-graduação em Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-MG, na área de Reprodução Animal, tendo apresentado sua dissertação de Mestrado em julho de 2010.

Em agosto de 2010 ingressou no curso de Doutorado em Zootecnia UFV, Viçosa-MG, tendo apresentado sua tese de Doutorado em julho de 2014.

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
Introdução Geral:	1
Referências bibliográficas:	9
Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes	17
Introduction:	17
Material and methods:	19
Collection of ovaries:	19
Assessment of ovarian volume and CL diameter:	19
Follicular aspiration, screening and classification of the oocytes:	20
Statistical analysis:	21
Results:	21
Discussion:.....	25
Conclusions:	27
Acknowledgements:	27
References:	27
Statistical methods for prediction of pregnancy in bovine in vitro embryo production	32
Introduction	33
Material and methods	34
Results and Discussion	36
Conclusions	42
Acknowledgments	42
References	43
Conclusões Gerais:.....	45

RESUMO

PENITENTE FILHO, Jurandy Mauro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2014. **Métodos de avaliação da eficiência da multiplicação genética por produção de embriões bovinos.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Coorientadores: Giovani Ribeiro de Carvalho e Carlos Antônio de Carvalho Fernandes.

O objetivo deste trabalho foi avaliar estratégias de incremento da eficiência da produção in vitro de embriões bovinos (PIVE). Dois artigos foram desenvolvidos, o primeiro objetivou avaliar se o volume ovariano, a presença e o diâmetro do corpo lúteo (CL) têm efeito sobre o número e a qualidade de oócitos bovinos recuperados. O segundo artigo teve como objetivo comparar diferentes métodos estatísticos para prever a probabilidade de gestação em um programa comercial de PIVE. Artigo 1: Foram obtidos em abatedouro 110 ovários. Os complexos cumulus-oócitos foram aspirados e avaliados em microscópio estereoscópico. Os oócitos foram contados e classificados de acordo com sua qualidade (grau I, II, III e IV). O volume do ovário foi correlacionado com o número de oócitos de boa qualidade ($r = 0.33$; $P < 0.05$). Os ovários com CL mostraram maior número de oócitos de boa qualidade do que ovários sem CL ($P < 0.05$). Além disso, a presença do CL e o seu diâmetro influenciaram positivamente a probabilidade de recuperação de oócitos de boa qualidade ($P < 0.05$). Em conclusão, o volume ovariano não é um bom parâmetro para prever características ovarianas importantes; além disso, a análise do CL, a sua presença e seu diâmetro, pode ser uma boa ferramenta para melhorar a eficiência em programas de PIVE. Artigo 2: Redes neurais artificiais (RNA) e árvores de decisão têm provado ser bem sucedidas em diferentes áreas de estudo, tais como medicina, genética e produção animal. No entanto, a utilização destas metodologias na área de reprodução bovina ainda é muito escassa. No presente estudo, um conjunto de dados reais foi usado, composto por 9.697 transferências de embriões produzidos in vitro, 6.788 observações foram utilizadas no modelo de treinamento e 2.909 foram utilizadas para validação. O conjunto de dados foi analisado por meio de regressão logística, rede neural feed-forward, multilayer perceptron com uma e com duas camadas ocultas, e uma árvore de decisão baseada no algoritmo ID3. Todas as cinco análises foram comparadas pela curva ROC, capacidade preditiva, teste de Kolmogorov-Smirnov e correlação ponto bisserial. Em conclusão, todas as análises

foram muito semelhantes. No entanto, a análise pela rede neural feed-forward classificou corretamente mais de 70% das gestações positivas. Apesar de ter classificado incorretamente quase 60% das não gestações, este resultado se torna interessante porque não detectar uma gestação positiva é mais prejudicial a um programa comercial que não detectar uma gestação negativa. Ainda assim, são necessários estudos com conjuntos de dados maiores, incluindo não somente variáveis categóricas, mas também variáveis quantitativas para garantir resultados mais precisos.

ABSTRACT

PENITENTE FILHO, Jurandy Mauro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July, 2014. **Methods for evaluating the efficiency of the genetic multiplication by bovine embryo production.** Advisor: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-advisers: Giovani Ribeiro de Carvalho and Carlos Antônio de Carvalho Fernandes.

The objective of the present study was to evaluate some strategies for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production (IVP). Two articles were developed, first one aimed to evaluate whether ovarian volume, presence and diameter of the CL have effect on the number and quality of bovine recovered oocytes. The second article aimed to compare different statistical methods to predict pregnancy in a commercial program of IVP. Article 1: one hundred and ten ovaries were obtained from slaughterhouse. Cumulus oocytes complex were aspirated and evaluated under stereomicroscope. Oocytes were counted and classified according to their quality (Grade I, II, III and IV). Ovarian volume was weakly correlated to the number of good quality oocytes ($P < 0.05$). Ovaries with CL show greater number of good quality oocytes than ovaries without CL ($P < 0.05$). Besides, presence of CL and its diameter positively influenced the probability of recovering good quality oocytes ($P < 0.05$). In conclusion, ovarian volume is not a good parameter itself to predict important ovarian characteristics; moreover, analysis of CL, its presence and diameter, may be a good tool to improve efficiency on IVP programs. Article 2: Artificial neural networks (ANN) and decision trees have proved to be very successful in different fields of study such as medicine, genetics and animal production. However, the use of these methodologies in bovine reproduction is still very scarce. In this study, a real dataset was used, consisting of 9,697 embryo transfers, 6,788 observations were used in training model and 2,909 were used for validation. Dataset was analyzed by logistic regression, feed-forward neural network, multilayer perceptron with one and two hidden layers, and a based on ID3 algorithm decision tree. All analyses were compared by ROC curve, predictive capacity, Kolmogorov-Smirnov test, and point biserial correlation. In conclusion, all analyzes were very similar. Nevertheless, analysis by the feed-forward neural network correctly classified more than 70 % of positive pregnancies. Despite having incorrectly classified almost 60 % of non-pregnancies, this result becomes interesting because not detect a positive pregnancy is more harmful to a commercial program

than not detect a negative pregnancy. Still, studies with larger dataset and more explanatory variables are required, including not only categorical variables, but also quantitative variables to ensure more accurate results.

Introdução Geral:

Apesar dos grandes avanços alcançados na área de biotecnologia da reprodução, a eficiência da produção de embriões derivados de fertilização *in vitro* (FIV) ainda é baixa (De WIT et al., 2000; HAVLICEK et al., 2010). Há fortes indícios de que este fato está mais relacionado com a fonte dos oócitos do que as condições de fertilização e cultivo *in vitro* (BOLS et al., 1997) ou devido ao método de maturação *in vitro* dos oócitos coletados (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987).

Os esforços para encontrar as condições adequadas de maturação *in vitro* não melhoraram esta técnica ao nível da produção de embriões *in vivo* (BRACKETT e ZUELKE, 1993). Além disso, estudos têm sido desenvolvidos para distinguir os complexos cumulus-oócitos competentes (CCOs) dos incompetentes (de WIT et al. 2000). Esses estudos levaram às conclusões: 1) a perda parcial ou total do cumulus reduz as taxas de desenvolvimento (HAWK e WALL, 1994); e 2) que os CCOs de "melhor aparência" (oócitos com cumulus compacto e multicamadas) não necessariamente têm a maior capacidade de desenvolvimento (BLONDIN e SIRARD, 1995).

In vivo, o oócito a ser fertilizado é doado por folículos saudáveis durante uma fase específica do ciclo estral. No entanto, CCOs coletados para a produção *in vitro* de embriões (PIVE) são obtidos a partir de folículos, desconsiderando a fase folicular e do ciclo estral. Como resultado, estes CCOs podem ter sido submetidos a diferentes níveis de estradiol, progesterona, FSH e LH. Tais fatores podem afetar a capacidade de desenvolvimento *in vitro* do CCO (de WIT et al., 2000).

O corpo lúteo (CL) é uma glândula endócrina, formado no ovário após a ovulação e contribui para regulação do ciclo estral e manutenção da gestação. A principal função do CL é a secreção de progesterona durante o ciclo estral e gestação (SCHAMS e BERISHA, 2004).

De acordo com Reis et al. (2002), novilhas Simental têm maior número de oócitos coletados quando o CL está ativo. Além disso, a presença do CL em vacas holandesas foi avaliada como necessária para melhorar os índices da PIVE (REIS et al., 2006) e Manjunatha et al. (2007) encontraram maiores taxas de clivagem e embriões transferíveis de ovários aspirados na presença de um CL. Por outro lado, De Wit et al. (2000) não observaram nenhuma diferença na qualidade e número de oócitos colhidos de ovários nas fases folicular, luteal inicial ou tardia.

Estudos indicam que a progesterona plasmática afeta a qualidade do oócito (LEIBFRIED-RUTLEDGE et al., 1987; HENDRIKSEN et al., 2004; PFEIFER et al., 2009; PFEIFER et al., 2011), oócitos coletados na fase tardia do diestro são mais competentes do que oócitos coletados no início do diestro ou fase folicular, em que as concentrações de progesterona são mais baixas (MACHATKOVA et al., 1996; MACHATKOVA et al., 2004; PFEIFER et al., 2009). A progesterona favorece a exposição do folículo por um longo período a pulsos de LH de baixa amplitude, obtendo um oócito de melhor qualidade (GREVE et al., 1995; PFEIFER et al., 2009).

Em vacas Nelore, na ausência de CL, mas tratadas com implantes de progesterona durante cinco dias e administração de $PGF_{2\alpha}$ no início do tratamento de sincronização do estro, foi notada uma redução no número total de oócitos aspirados em relação às fêmeas que apresentavam CL e sem tratamento com implantes. Além disso, o número de oócitos aspirados de vacas gestantes foi menor do que o obtido de vacas não gestantes com CL (BARBOSA et al., 2013).

Em vacas mestiças (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) o tratamento com implantes de progesterona aumentou a disponibilidade de folículos para punção folicular, a quantidade de oócitos totais, o número de oócitos de boa qualidade, a taxa de clivagem e produção de blastocistos (PFEIFER et al., 2009). No entanto, Ramos et al. (2010) não encontraram vantagens para produção de embriões na sincronização da onda folicular de novilhas mestiças doadoras com implantes de progesterona associados com a administração de benzoato de estradiol.

É possível que além dos efeitos sobre a pulsatilidade do LH, o CL e a progesterona podem exercer um efeito local sobre o desenvolvimento folicular, o que poderia explicar as diferenças na qualidade dos oócitos coletados entre o ovário com CL e o contralateral (VASSENA et al., 2003).

Um efeito local do CL está relacionado com a alta vascularização do ovário. Após a ovulação, o CL se desenvolve rapidamente a partir da ruptura da parede do folículo, e dentro de poucos dias, aumenta gradualmente a secreção de progesterona (ACOSTA et al., 2002). A intensidade do processo angiogênico do corpo lúteo atinge o pico em dois a três dias após a ovulação (REYNOLDS et al., 2000), o que provoca um aumento no fluxo de sangue (ACOSTA et al., 2003), que, por sua vez, pode propiciar um ambiente hormonal e nutricional adequado para o desenvolvimento dos folículos.

No entanto, a ausência do CL no momento da punção folicular possui aspectos favoráveis, tais como a maior facilidade de localização e punção dos folículos, bem como menor aspiração de sangue (SENEDA et al., 2005).

O desenvolvimento folicular durante o ciclo estral da vaca geralmente ocorre em duas ou três ondas (MATTON et al., 1981; VARISANGA et al., 1998) e para cada onda, um folículo torna-se dominante, enquanto outros folículos na mesma onda sofrem atresia (SAVIO et al., 1990). Assim, o folículo dominante (FD) exerce um efeito inibidor sobre o crescimento e desenvolvimento dos outros folículos, chamados folículos subordinados, em virtude da produção de estradiol e inibina, que diminuem os níveis de FSH, levando os folículos subordinados à atresia (KASTELIC et al., 1990; TURZILLO e FORTUNE, 1993; QUIRK et al., 2004).

A capacidade de desenvolvimento de oócitos oriundos de folículos antrais pequenos de novilhas da raça holandesa não foi afetada pela presença de um FD (SMITH et al., 1996). Além disso, para vacas mestiças, de acordo com Vassena et al. (2003), não houve diferença no número de oócitos saudáveis ou degenerados colhidos a partir do ovário contendo o FD ou do contralateral, embora menos oócitos desnudos terem sido obtidos a partir do ovário contendo o CL que do contralateral. No entanto, Varisanga et al. (1998) verificaram que a presença de um FD tem efeito negativo sobre a PIVE em vacas holandesas.

Alguns estudos sugerem que melhores resultados para PIVE de vacas da raça holandesa vêm da aspiração de oócitos em fase final de crescimento folicular, durante a regressão do FD (MACHATKOVA et al., 2000). No entanto, de acordo com Machatkova et al. (2004), a fase de crescimento inicial foi mais eficaz para a recuperação de oócitos. Além disso, o número de oócitos, de folículos médios e a capacidade de desenvolvimento de oócitos de folículos pequenos diminuíram na fase dominante em vacas da raça holandesa.

A avaliação em relação à compactação, número e aparência das células do cumulus e uniformidade do citoplasma, têm sido usadas como um meio para classificar e selecionar os oócitos qualitativamente (PAVLOK et al., 1992; MORENO et al., 1993). As células do cumulus participam do controle da meiose do oócito e esse controle pode ser exercido por meio de prolongamentos do cumulus que penetram na zona pelúcida e interagem com o oócito via junções comunicantes (De WIT et al., 2000).

O volume ovariano mostra correlação com alguns aspectos importantes do ovário, como o número e a qualidade dos oócitos. Assim, o volume do ovário pode ser usado numa tentativa de estabelecer um parâmetro para o exame clínico dos ovários (palpação retal) e de associá-lo com outras características do ovário (FERNANDES et al., 2001).

Estudos econômicos das variáveis que influenciam os resultados na produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) são pouco frequentes na literatura. A viabilidade dessa atividade depende de índices reprodutivos e é variável em diferentes situações. Projeções iniciais dos resultados econômicos da PIVE facilitam a tomada de decisões, pois proporcionam a antecipação de resultados prováveis e dos custos da gestação. A grande variabilidade na PIVE pelas doadoras (SLENNINGL e WHEELER, 1989; GALLI et al., 2003) e a necessidade de adquirir e sincronizar receptoras antes de saber o número de embriões produzidos complicam a decisão sobre o número de animais que devem ser destinados à sincronização.

A fim de antecipar resultados em atividades que apresentam alto risco, alguns modelos matemáticos foram desenvolvidos (SLENNINGL e WHEELER, 1989; OSTERGAARD et al., 2005) para auxiliar na tomada de decisões em diferentes estágios do sistema de produção bovino. No entanto, poucos modelos foram direcionados para comparar e analisar os aspectos econômicos e biológicos da PIVE (BELTRAME et al., 2009), e nenhum modelo foi desenvolvido a fim de prever a gestação em programas comerciais de PIVE.

Respostas binárias, por exemplo, sucesso ou fracasso, ocorrem em muitos campos de estudo. A análise de regressão logística é frequentemente usada para investigar a relação entre estas respostas e um conjunto de variáveis explicativas (HOSMER e LEMESHOW, 2000; MENARD, 2002). Para modelos de resposta binária, a resposta, Y , de um indivíduo ou de uma unidade experimental pode assumir um dos dois valores possíveis, denotados por conveniência por 1 e 0 (por exemplo, $Y = 1$ se a vaca está gestante, caso contrário, $Y = 0$). Supondo que x é um vetor de variáveis explicativas (x_1, x_2, \dots, x_k), correspondendo aos valores dos atributos que caracterizam uma vaca doadora e $p = P(y = 1 | x) = \pi(x)$ a proporção de receptoras gestantes em função do perfil das doadoras definido e caracterizado pelo vetor x , temos:

$$\pi(x) = \frac{e^{\beta x}}{1 + e^{\beta x}}$$

Pode-se interpretar $\pi(x)$ como a probabilidade de se obter a gestação dado as características representadas pelo vetor x .

Em um modelo de regressão linear assume-se que a variável resposta pode ser expressa como $y = E[y | x] + \varepsilon$. A quantidade ε segue uma distribuição normal com média zero e variância constante. Assim, a distribuição da variável resposta dado x será normal com média $E(y | x)$ e uma variância constante. Isto não ocorre com uma variável resposta dicotômica. Nesta situação pode-se expressar o valor da variável resposta dado x como $y = \pi(x) + \varepsilon$. Aqui a quantidade ε pode assumir um dos dois possíveis valores:

$$\begin{cases} y = 1, & P[\varepsilon = 1 - \pi(x)] = \pi(x) \\ y = 0, & P[\varepsilon = -\pi(x)] = 1 - \pi(x) \end{cases}$$

Então, ε tem uma distribuição Bernoulli com média $\pi(x)$ e variância $\pi(x)[1 - \pi(x)]$. Assim, a distribuição da variável resposta segue uma distribuição Bernoulli com probabilidade dada pela média $\pi(x)$. O passo seguinte é a determinação dos coeficientes do modelo.

Considerando uma amostra de n transferências do par (Y_i, x_i) , $i = 1, 2, \dots, n$, onde Y_i denota o valor da variável resposta dicotômica (0: não gestante, 1: gestante) e x_i é o vetor constituído das k variáveis observadas para a i -ésima transferência, o ajuste de um modelo de regressão logística para um conjunto de dados é necessário estimar os parâmetros β 's desconhecidos. Os parâmetros são normalmente estimados pelo método de máxima verossimilhança (MENDONÇA, 2008).

Uma vez possuindo os valores dos β 's, a probabilidade de ocorrência do evento pode ser calculada:

$$P(Y = 1 | x_i) = \frac{e^{(\sum_{k=0}^k \beta_k x_{ik})}}{1 + e^{(\sum_{k=0}^k \beta_k x_{ik})}}$$

As redes neurais artificiais (RNAs) são modelos de processamento em série, buscando alcançar um bom desempenho pela interconexão de elementos computacionais simples. Os modelos exploram simultaneamente muitas hipóteses

usando regras de aprendizagem que permitem a obtenção de um poder de generalização suficiente para reconhecer padrões e prever cenários. As RNAs têm aplicação potencial na produção animal, quando uma base de dados que permite a compreensão das relações entre o ambiente e a atividade agrícola é necessária (SHAO et al., 1998; FERNANDEZ, 2006; VIEIRA et al., 2010).

As RNAs são modelos computacionais inspirados na estrutura e no funcionamento do cérebro biológico (MENDONÇA, 2008). Consistem de uma camada de nós de entrada, uma ou mais camadas ocultas e uma camada de saída. Cada nó em uma camada tem um nó correspondente na camada seguinte, criando assim o efeito de empilhamento (Figura 1; SHRIVASTAVA e SINGH, 2011).

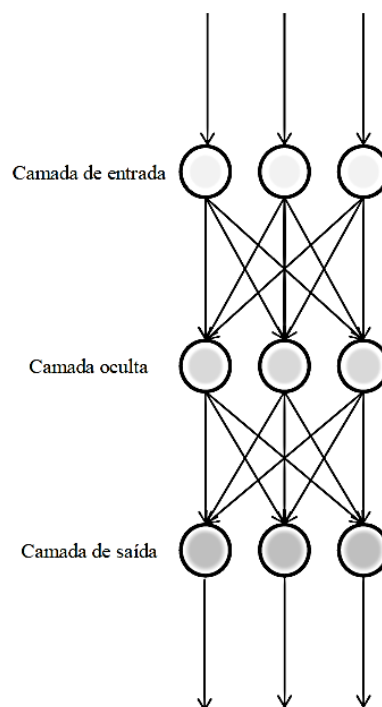


Figura 1 – Esquema de RNA com uma camada oculta.

A principal semelhança entre RNAs e os circuitos formados no cérebro está no extenso processamento paralelo apresentado por ambos e no funcionamento do circuito que não depende de alguns elementos isoladamente, mas sim uma função do conjunto dos elementos (KANDEL, 1991 citado por MENDONÇA, 2008).

As RNAs oferecem uma alternativa interessante porque são métodos de aprendizagem que podem agir como aproximadores universais de funções complexas (ALADOS et al., 2004; BISHOP, 2006). As RNAs podem capturar relações não lineares entre preditores e respostas e aprender de maneira adaptativa, pois uma série

de transformações, chamadas funções de ativação, são movidas por parâmetros (GIANOLA et al., 2011). As RNAs podem ser vistas como um sistema de computador baseado em vários elementos de processamento (neurônios) que operam em paralelo (LAMONTAGNE e MARCHAND, 2006). Uma RNA é determinada pela estrutura da rede, representado pelo número de camadas e de neurônios, pela força das ligações (semelhantes aos coeficientes de regressão não paramétrica) entre as entradas e saídas, os neurônios, e pelo tipo de processamento executado em cada neurônio, representado por uma transformação linear ou não linear: a função de ativação. Além disso, as RNAs têm o potencial de acomodar complexas relações entre as variáveis de entrada e de resposta (GIANOLA et al., 2011).

O *iterative dichotomiser 3* (ID3) é um algoritmo desenvolvido por Quinlan (1986) utilizado para gerar uma árvore de decisão com um conjunto de dados. O algoritmo ID3 é utilizado por meio do treinamento em um conjunto de dados (S) para produzir uma árvore de decisão, que é armazenada na memória. Esta árvore de decisão é usada para classificar novos casos testes trabalhando de cima para baixo na árvore de decisão usando os valores desse caso teste para se chegar a um nó terminal que nos diz à qual classe este caso teste pertence. O ID3 separa um conjunto de treinamento em subconjuntos para que essas amostras contenham uma única classe. A divisão é feita por um único atributo, que é selecionado a partir de uma propriedade estatística, chamado ganho de informação, que mede o quanto informativo é um atributo.

O ganho de informação (IG) é calculado pela entropia, $H(S)$, como se segue:

$$H(S) = - \sum_{x \in X} p(x) \log_2 p(x)$$

Onde, S é o conjunto de dados em que a entropia que está sendo calculada (muda a cada iteração do algoritmo ID3); X é o conjunto de classes em S; $p(x)$ é a proporção do número de elementos na classe x para o número de elementos no conjunto S. Assim:

$$IG(A) = H(S) - \sum_{t \in T} p(t)H(T)$$

Onde, $IG(A)$ é a diferença de entropia de antes para depois do conjunto S ser dividido no atributo A ; $H(S)$ é a entropia do conjunto S ; T são os subconjuntos criados a partir da divisão do conjunto S pelo atributo A ; $p(t)$ é a proporção do número de elementos de t para o número de elementos no conjunto S ; $H(t)$ é a entropia do subconjunto t .

Para a comparação de modelos é possível utilizar algumas métricas que representam basicamente a capacidade de acerto dos modelos, comparando diferentes modelos de forma imparcial (MENDONÇA, 2008).

A curva ROC (Receiver Operating Characteristic – Característica de operação do receptor) é construída pela variação dos pontos de corte, ao longo da amplitude dos escores fornecidos pelos modelos, a fim de se obter diferentes classificações dos indivíduos e obtendo conseqüentemente os respectivos valores para as medidas de sensibilidade e especificidade para cada ponto de corte estabelecido (MENDONÇA, 2008). A curva ROC pode ser utilizada na escolha do melhor ponto de corte por envolver as medidas de sensibilidade e especificidade. Estas quantidades são dadas pelas probabilidades:

$$\textit{Sensibilidade} = P(\textit{n\~{a}o gestante}|\textit{n\~{a}o gestante})$$

$$\textit{Especificidade} = P(\textit{gestante}|\textit{gestante})$$

Onde a sensibilidade é a probabilidade da observação ser classificada como gestação negativa dado que realmente é negativa e a especificidade é a probabilidade da observação ser classificada como gestação positiva dado que realmente é positiva. Para cada ponto de corte temos uma matriz de confusão e a partir de cada matriz de confusão temos uma medida de sensibilidade e especificidade. Na curva ROC, o eixo x do gráfico é construído a partir dos valores de $(1 - \textit{Especificidade})$ e o eixo y é construído a partir dos valores de *Sensibilidade*.

A estatística de Kolmogorov-Smirnov (KS) tem origem no teste de hipóteses não paramétrico onde se deseja testar se duas funções de distribuições associadas a duas populações são idênticas ou não, a partir de duas amostras retiradas de populações possivelmente distintas (MENDONÇA, 2008). A estatística KS mede o quanto duas funções de distribuição empíricas dos escores dos grupos de vacas gestantes e não gestantes estão separadas. A estatística KS é dada por:

$$KS = \max |F_P(e) - F_N(e)|$$

Onde: $F_P(e)$ e $F_N(e)$ correspondem às proporções de observações positivas e negativas com escore menor ou igual a e , e a estatística KS é obtida pela distância máxima entre essas duas proporções acumuladas ao longo dos escores obtidos pelos modelos. O valor dessa estatística pode variar de 0 a 100 %, onde o valor máximo indica uma separação total dos escores das vacas gestantes e não gestantes e um valor mínimo de 0 % sugere uma sobreposição total das distribuições dos escores dos dois grupos.

O coeficiente de correlação ponto biserial é derivado do coeficiente de correlação linear de Pearson. Esse método é indicado quando uma das variáveis (Y) é dicotômica e a outra (X), contínua (LIRA e NETO, 2006). O estimador do coeficiente de correlação ponto biserial é dado por:

$$r_{pb} = \frac{(\bar{X}_p - \bar{X})}{S_x} \sqrt{\frac{p}{q}}$$

Onde: r_{pb} é o coeficiente de correlação ponto biserial; \bar{X}_p é a média dos valores de X para o grupo superior (grupo cuja variável Y assume valor 1); \bar{X} é a média total de X da amostra; S_x é o desvio padrão total de X da amostra; p é a proporção de casos do grupo superior (grupo cuja variável Y assume valor 1); q é a proporção de casos do grupo inferior (grupo cuja variável Y assume valor 0).

As RNAs e as árvores de decisão têm provado serem bem sucedidas em diferentes áreas de estudo, tais como engenharia, medicina, genética e produção animal. No entanto, a utilização destas metodologias na área de biotecnologias reprodutivas em bovinos é ainda pouco frequente.

Referências bibliográficas:

ACOSTA, T.J.; HAYASHI, K.G.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. **Reproduction**. v.125, p.759-767, 2003.

ACOSTA, T.J.; YOSHIKAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F_{2α} injection in the cow. **Biology of Reproduction**. v.66, p.651-658, 2002.

ALADOS, I.; MELLADO, J.A.; RAMOS, F.; ALADOS-ARBOLEDAS, L. Estimating UV Erythema irradiance by means of neural networks. **Photochemistry and Photobiology**. v.80, p.351-358, 2004.

BARBOSA, C.P.; TONIOLLO, G.H.; GUIMARÃES, E.C. Produção in vitro de embriões de bovinos da raça nelore oriundos de ovócitos de ovários com e sem corpo lúteo. **Ciência Animal Brasileira**. v.14, p.81-90, 2013.

BELTRAME, R.T.; BARIONI, L.G.; QUIRINO, C.R.; DANTAS, O.D. Probability density function of the number of embryos collected from superovulated Nelore breed donors. **Scientia Agricola**. v.66, p.447-450, 2009.

BISHOP, C.M. **Pattern Recognition and Machine Learning**. Springer: Singapore. 2006.

BOLS, P.E.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A.; De KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**. v.47, p.1221-1236, 1997.

BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**. v.41, p.54-62, 1995.

BRACKETT, B.G.; ZUELKE, K.A. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**. v.39, p.43-64, 1993.

De WIT, A.A.; WURTH, Y.A.; KRUIP, T.A. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. **Journal of Animal Science**. v.78, p.1277-1283, 2000.

FERNANDES, C.; DODE, M.A.N.; GODOY, K.; RODOVALHO, N. Efeito estacional sobre características ovarianas e produção de oócitos em vacas *Bos indicus*

no Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.38, p.131-135, 2001.

FERNANDEZ, C. Neural networks for animal science applications: Two case studies. **Expert Systems with Applications**. v.31, p.444-450, 2006.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**. v.59, p.599-616, 2003.

GIANOLA, D.; OKUT, H.; WEIGEL, K.A.; ROSA, G.J.M. Predicting complex quantitative traits with Bayesian neural networks: a case study with Jersey cows and wheat. **BMC Genetics**. v.12, 2011.

GREVE, T.; HYTTEL, P.; ASSEY, R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. **Theriogenology**. v.43, p.41-50, 1995.

HAVLICEK, V.; KUZMANY, A.; CSEH, S.; BREM, G.; BESENFELDER, U. The effect of long-term in vivo culture in bovine oviduct and uterus on the development and cryo-tolerance of in vitro produced bovine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**. v.45, p.832-837, 2010.

HAWK, H.W.; WALL, R.J. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. selection of oocytes and zygotes. **Theriogenology**. v.41, p.1571-1583, 1994.

HENDRIKSEN, P.J.; STEENWEG, W.N.; HARKEMA, J.C.; MERTON, J.S.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L.; DIELEMAN, S.J. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**. v.61, p.909-920, 2004.

HOSMER, D.W.; LEMESHOW, S. **Applied Logistic Regression**. 2^a ed. Wiley: New York. 2000.

KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Suppression of dominant and subordinate ovarian follicles by a proteinaceous fraction of follicular fluid in heifers. **Theriogenology**. v.34, p.499-509, 1990.

LAMONTAGNE, L.; MARCHAND, M. **Advances in Artificial Intelligence**. Springer: Berlin. 2006.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; EYESTONE, W.H.; NORTHEY, D.L.; FIRST, N.L. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**. v.36, p.376-383, 1987.

LIRA, S.A.; NETO, A.C. Coeficientes de correlação para variáveis ordinais e dicotômicas derivados do coeficiente linear de Pearson. **Ciência e Engenharia**, v.15, p.45-53, 2006.

MACHATKOVA, M.; JOKESOVA, E.; PETELIKOVA, J.; DVORACEK, V. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**. v.45, p.801-810, 1996.

MACHATKOVA, M.; JOKESOVÁ, E.; HORKY, F.; KREPELOVÁ, A. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. **Theriogenology**. v.54, p.543-550, 2000.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**. v.61, p.329-335, 2004.

MANJUNATHA, B.M.; GUPTA, P.S.; RAVINDRA, J.P.; DEVARAJ, M.; RAMESH, H.S.; NANDI, S. In vitro developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**. v.68, p.882-888, 2007.

MATTON, P.; ADELAKOUN, V.; COUNTRE, Y.; DUFOUR, J.J. Growth and replacement of the bovine ovarian follicles during the estrous cycle. **Journal of Animal Science**. v.52, p.813-820, 1981.

MENARD, S.W. **Applied Logistic Regression**. 2^a ed. Sage Publications: Thousand Oaks. 2002.

MENDONÇA, T.S. **Modelos de Regressão Logística Clássica, Bayesiana e Redes Neurais para Credit Scoring**. Dissertação (Mestrado em Estatística). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2008.

MORENO, J.F.; FLORES-FOXWORTH, G.; WESTHUSIN, M.; KRAEMER, D.C. Influence of pregnancy and presence of a CL on quantity and quality of bovine oocytes obtained from ovarian follicles aspirated post-mortem. **Theriogenology**. v.39, p.271 (Resumo), 1993.

OSTERGAARD, S.; FRIGGENS, N.C.; CHAGUNDA, M.G.G. Technical and economic effects of an inline progesterone indicator in a dairy herd estimated by stochastic simulation. **Theriogenology**. v.64, p.819-843, 2005.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**. v.31, p.63-67, 1992.

PFEIFER, L.F.M.; CAMPOS, H.; MIGUEL Jr, J.C.; SILVEIRA, L.L.; SCHNEIDER, A.; CORREA, M.N.; RUMPF, R. Aumento da qualidade de ovócitos recuperados por punção folicular de vacas submetidas previamente à superovulação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.35, p.363-367, 2011.

PFEIFER, L.F.M.; SARTORI, R.; PIVATO, I.; RUMPF, R.; NOGUEIRA, G.P.; XAVIER, E.; DIONELLO, N.J.; CORREA, M.N. Effect of circulating progesterone on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Animal Reproduction**. v.6, p.473-478, 2009.

QUINLAN, J.R. Induction of Decision Trees. **Machine Learning**. v.1, p.81-106, 1986.

QUIRK, S.M.; COWAN, R.G.; HARMAN, R.M.; HU, C.L.; PORTER, D.A. Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. **Journal of Animal Science**. v.82, E40-E52, 2004.

RAMOS, A.F.; RUMPF, R.; CÂMARA, J.U.; MOLLO, M.R.; PIVATO, I.; MARQUES, A.P.; SARTORI, R. Effect of follicular wave synchronization on in vitro embryo production in heifers. **Animal Reproduction Science**. v.117, p.201-207, 2010.

REIS, A.; STAINES, M.E.; WATT, R.G.; DOLMAN, D.F.; McEVOY, T.G. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. **Animal Reproduction Science**. v.72, p.137-151, 2002.

REIS, A.; METELO, R.; SANTOS, P.; SILVA, F.M. Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos in vitro. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.43, p.619-636, 2006.

REYNOLDS, L.; GRAZUL-BILSKA, A.; REDMER, D. Angiogenesis in the corpus luteum. **Endocrine**. v.12, p.1-9, 2000.

SAVIO, J.D.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy cows. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.88, p.581-591, 1990.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of Corpus Luteum Function in Cattle – an Overview. **Reproduction in Domestic Animals**. v.39, p.241-251, 2004.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; ANDRADE, E.R.; BINELLI, M.; MAX, M.C; OLIVEIRA, J.A.; GARCIA, J.M. Relationship between follicle size after FSH treatment and efficiency of oocyte recovery. **Animal Reproduction**. v.2, p.178-182, 2005.

SHAO, J.; XIN, H.; HARMON, J.D. Comparison of image feature extraction for classification of swine thermal comfort behavior. **Computers and Electronics in Agriculture**. v.19, p.223-232, 1998.

SHRIVASTAVA, S.; SINGH, M.P. Performance evaluation of feed-forward neural network with soft computing techniques for hand written English alphabets. **Applied Soft Computing**. v.11, p.1156-1182, 2011.

SLENNINGL, B.D.; WHEELER, M.B. Risk evaluation for bovine embryo transfer services using computer simulation and economic decision theory. **Theriogenology**. v.31, p.653-673, 1989.

SMITH, L.C.; OLIVERA-ANGEL, M.; GROOME, N.P.; BHATIA, B.; PRICE, C.A. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.106, 193-199, 1996.

TURZILLO, A.M.; FORTUNE, J.E. Effect of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.98, p.113-119. 1993.

VARISANGA, M.D.; SUMANTRI, C.; MURAKAMI, M.; FAHRUDIN, M.; SUZUKI, T. Morphological classification of the ovaries in relation to the Subsequent oocyte quality for IVF-produced bovine embryos. **Theriogenology**. v.50, p.1015-1023, 1998.

VASSENA, R.; MAPLETOFT, R.J.; ALLODI, S.; SINGH, J.; ADAMS, G.P. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**. v.60, p.923-932, 2003.

VIEIRA, F.M.C.; SILVA, I.J.O.; BARBOSA FILHO, J.A.D.; VIEIRA, A.M.C. Productive losses on broiler preslaughter operations: effects of the distance from farms to abattoirs and of lairage time in a climatized holding area. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.39, p.2471-2476, 2010.

Artigo 1

Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes

Artigo aceito para publicação no periódico
Animal Science Journal (ISSN: 1740-0929).
Manuscript ID: ASJ-2014-0022. Submetido
em 23-Jan-2014, aceito em 27-Abr-2014.

Influence of corpus luteum and ovarian volume on the number and quality of bovine oocytes

Jurandy Mauro Penitente-Filho¹; Carolina Rodrigues Jimenez¹; Adriana Moreira Zolini¹; Erly Carrascal¹; Jovana Luiza Azevedo¹; Camila Oliveira Silveira²; Fabrício Albani Oliveira¹; Ciro Alexandre Alves Torres¹

¹ Universidade Federal de Viçosa, Department of Animal Science, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

² Universidade Federal de Viçosa, Department of Veterinary, Viçosa, Minas Gerais, Brazil

Correspondence: Jurandy Mauro Penitente-Filho, Universidade Federal de Viçosa, E-mail: penitentefilho@yahoo.com.br

Abstract

In order to evaluate whether ovarian volume, presence and diameter of the CL have effect on the number and quality of bovine recovered oocytes, 110 ovaries were obtained from slaughterhouse. Cumulus oocytes complex were aspirated and evaluated under stereomicroscope. Oocytes were counted and classified according to their quality (Grade I, II, III and IV). Ovarian volume was weakly correlated to the number of good quality oocytes ($P < 0.05$). Ovaries with CL show greater number of good quality oocytes than ovaries without CL ($P < 0.05$). Besides, presence of CL and its diameter positively influenced the probability of recovering good quality oocytes ($P < 0.05$). In conclusion, ovarian volume is not a good parameter itself to predict important ovarian characteristics; moreover, analysis of CL, its presence and diameter, may be a good tool to improve efficiency on in vitro embryo production programs.

Keywords: bovine reproduction, embryo production, ovary, reproductive efficiency.

Introduction:

Despite the great advances achieved in biotechnology of reproduction, the productive efficiency of transferable embryos, derived from in vitro fertilization (IVF), is still low (de Wit et al. 2000; Havlicek et al. 2010). There are strong indications that this fact is more related to the source of oocytes than to the

conditions of IVF and culture (Bols et al. 1997) or due to the method of in vitro maturation of collected oocytes (Leibfried-Rutledge et al. 1987).

According to Reis et al. (2002), Simmental heifers have a higher number of collected oocytes when the corpus luteum is active. Furthermore, the presence of CL in Holstein cows was reported as required to improve in vitro embryo production (Reis et al. 2006) and Manjunatha et al. (2007) found higher cleavage and transferable embryos rates from ovaries with CL. Conversely, de Wit et al. (2000) showed no difference in the quality and number of oocytes collected from abattoir ovaries in the follicular, early luteal and late luteal phases.

The following studies indicate that plasma progesterone affects oocyte quality (Leibfried-Rutledge et al. 1987; Hendriksen et al. 2004; Pfeifer et al. 2009, 2011), oocytes collected in the late phase of diestrus are more competent than oocytes collected in early diestrus or follicular phase in which progesterone levels are lower (Machatkova et al. 1996; Machatkova et al. 2004; Pfeifer et al. 2009). Progesterone allows the follicle to be exposed for a longer period to LH pulses of low amplitude, getting a better quality oocyte (Greve et al. 1995; Pfeifer et al. 2009).

Ovarian volume shows correlation to some important ovarian aspects, such as number and quality of oocytes. Thus, the ovarian volume may be used in attempting to establish a parameter for clinical examination of the ovaries (rectal palpation) and to associate with others important ovarian characteristics (Fernandes et al. 2001).

The visual evaluation in relation to compaction, number and appearance of the cumulus cells and the uniformity of the cytoplasm, have been used as a way to select and classify the oocytes qualitatively (Moreno et al. 1993; Pavlok et al. 1992). Cumulus cells may control oocyte meiotic arrest and this control may be exerted via the cumulus processes that penetrate the zona pellucidae and interact with the oocyte through the gap junctions (de Wit et al. 2000).

Thus, this study aimed to evaluate whether ovarian volume, and the CL presence and diameter would influence the number and the quality of the recovered bovine oocytes.

Material and methods:

Collection of ovaries:

The experiment was conducted at the Animal Reproduction Laboratory, Department of Animal Science, Universidade Federal de Viçosa/MG.

One hundred and ten ovaries from crossbred females (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) without defined age were collected in the slaughterhouse. The period between slaughter and collection of the ovaries did not exceed 20 min and they were transported to laboratory in thermos flask with saline at 38 °C.

Assessment of ovarian volume and CL diameter:

With a caliper, the diameter of each ovary was measured in three axes (Figure 1). The volume of the ovary (1) was calculated from the formula for the sphere volume and expressed in cm³.

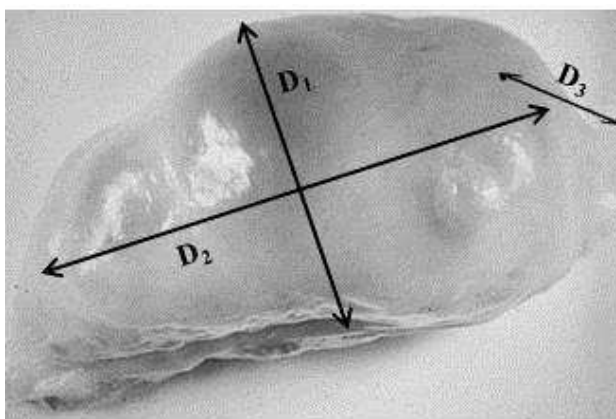


Figure 1 Schematization of measurement of the ovarian volume.

$$\text{Volume of the ovary} = \frac{4}{3} \times \pi \times \left(\frac{D_1}{2}\right) \times \left(\frac{D_2}{2}\right) \times \left(\frac{D_3}{2}\right) \quad (1)$$

The diameters of the CL were also measured with a caliper, taking measurements on two axes (Figure 2). The diameter was obtained by the arithmetic mean of two measurements (D_1 and D_2) and expressed in mm (2).

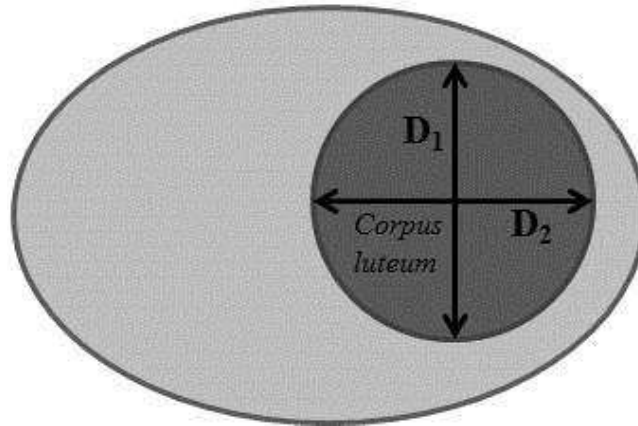


Figure 2 Schematization of measurement of the Corpus luteum diameter.

$$\text{Diameter} = \frac{(D_1 + D_2)}{2} \quad (2)$$

Follicular aspiration, screening and classification of the oocytes:

The cumulus oocyte complexes (COCs) were aspirated from the follicles (2-8 mm diameter) using a 10 mL hypodermic syringe with an 18G needle. Immediately after aspiration, follicular fluid was placed in a Petri dish for screening oocytes under a stereomicroscope at 30X increase. The COCs were counted and classified according to Stringfellow and Givens (2010):

-Grade I: oocytes with compact cumulus and more than three layers of cells. Ooplasm with fine and homogeneous granules, filling the interior of the zona pellucidae, and brown color.

-Grade II: oocytes with less than three layers of cumulus cells. Ooplasm with heterogeneously distributed granules that may be more concentrated in the center and lighter on the periphery, or condensed in one place looking as a dark spot. The ooplasm filled the entire space inside the zona pellucidae.

-Grade III: Oocytes have cumulus, but it was expanded. Ooplasm was contracted, with space between the cell membrane and zona pellucidae, irregularly filling the perivitelline space.

-Grade IV: oocytes without cumulus cells, cytoplasm with abnormal color and granulation or expanded and apoptotic cells.

Statistical analysis:

For data analysis, the Statistical Analysis System (SAS 2002) was used. The ovarian volume and number of Grade I, II, III and IV oocytes with and without CL were compared by analysis of variance (PROC ANOVA). The association between the proportions of Grade I, II, III and IV oocytes and the presence of CL in the ovary was evaluated by chi-square test (PROC FREQ). The correlation among ovarian volume and CL diameter with the number recovered oocytes was performed by Pearson's correlation (PROC CORR), and for better understanding of the relationship between variables, linear regression analysis (PROC REG) was done.

To evaluate the effect of the CL presence and diameter and ovarian volume on the probability of recovering good quality oocytes, a logistic regression was used (PROC LOGISTIC). The significant level was $\alpha = 0.05$.

Results:

As expected, ovaries with CL had great volume compared to those without CL. A total of 975 oocytes were recovered and analyzed, being the average per ovary equal to 8.86 ± 0.71 , and the ovaries with CL showed a greater number of recovered oocytes and higher number of good quality oocytes (Table 1).

There was no association ($P > 0.05$) between CL presence and oocyte quality. Furthermore, proportion of Grade I and II (good) and Grade III and IV (poor) oocytes was not affected by the presence of CL ($P > 0.05$; Table 2).

The CL diameter was not correlated with the number of recovered oocytes; however, ovarian volume showed positive mild correlation with the number of Grade I oocytes (Table 3).

Table 1 Ovarian volume (cm^3) and number of Grade I, II, III and IV oocytes among ovaries with and without CL (Mean \pm standard error of mean)

Variables	Ovaries without CL (n=59)	Ovaries with CL (n=51)	P-value
Ovarian volume	5.73 ± 0.39^b	10.03 ± 0.58^a	<0.0001
Grade I	0.93 ± 0.18^b	1.67 ± 0.24^a	0.0158
Grade II	1.22 ± 0.21^b	1.88 ± 0.27^a	0.0486
Grade III	2.41 ± 0.39^a	3.22 ± 0.46^a	0.1827
Grade IV	2.86 ± 0.36^a	3.76 ± 0.70^a	0.2363
Total	7.42 ± 0.74^b	10.53 ± 1.24^a	0.0283

Grade I + II	2.15 ± 0.36 ^b	3.55 ± 0.43 ^a	0.0144
--------------	--------------------------	--------------------------	--------

Different letters in the same row differ at P < 0.05.

Table 2 Proportion of Grade I and II oocytes (good quality) and Grade III and IV (poor quality) oocytes in ovaries with and without CL

Oocytes	Ovaries without CL	Ovaries with CL
Grade I + II	29.0% (127/438)	33.7% (181/537)
Grade III + IV	71.0% (311/438)	66.3% (356/537)

P > 0.05.

Table 3 Pearson's correlation of ovarian volume and CL diameter with the number and quality of recovered oocytes

	GI	GII	GIII	GIV	Total	GI+GII
Vol. ov.	0.35*	0.25*	0.36*	0.18 ^{ns}	0.39*	0.33*
Diam. CL	0.16 ^{ns}	0.18 ^{ns}	-0.04 ^{ns}	-0.16 ^{ns}	-0.03 ^{ns}	0.20 ^{ns}

Vol. ov. = Volume of the ovary; Diam. CL = Diameter of the Corpus luteum; GI = Grade I; GII = Grade II; GIII = Grade III; GIV = Grade IV; * P < 0.05; ^{ns} not significant (P > 0.05).

Linear regression analysis was significant between ovarian volume and the number of Grade I oocytes and number of Grade I and II oocytes. The functions that best fit the model were a quadratic function for both (3, Figure 3; 4, Figure 4; respectively).

$$N^{\circ} \text{ GI} = 0.75178 + 0.00678 \times \text{Vol. ov}^2 \quad (3)$$

Where:

GI = Grade I oocytes;

Vol.ov = volume of the ovary (cm³).

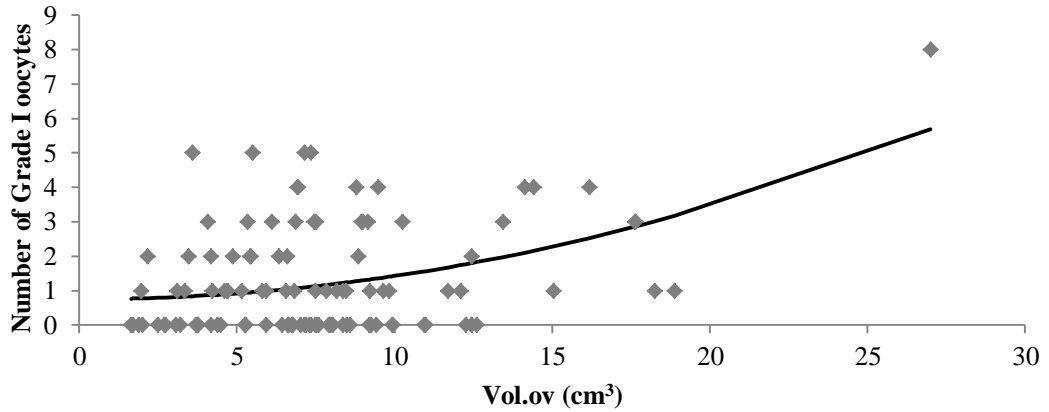


Figure 3 Number of Grade I oocytes according to ovarian volume ($R^2 = 0.16$; $P < 0.05$).

$$N^{\circ} \text{ GI + GII} = 1.90829 + 0.0116 \times \text{Vol. ov}^2$$

(4)

Where:

GI + GII = Grade I and II oocytes;

Vol.ov = volume of the ovary (cm^3).

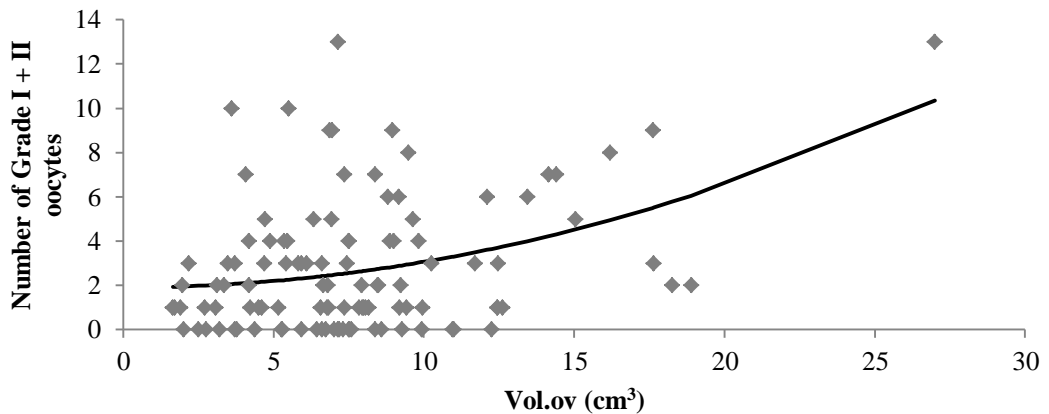


Figure 4 Number of Grade I and II oocytes according to ovarian volume ($R^2 = 0.14$; $P < 0.05$).

The low coefficients of determination ($R^2 = 0.16$ and $R^2 = 0.14$, respectively) make clear that ovarian volume is not by itself a reliable parameter for predicting the number of good quality recovered oocytes. Despite there was no association between presence of CL and proportion of good and poor oocytes by chi-square test, when data were analyzed by logistic regression analysis it is apparent that the presence of CL has a greater influence on the probability to recover good quality oocytes than ovarian volume.

While ovarian volume did not influence the likelihood of recovering good quality oocytes ($P > 0.05$), the presence of CL increased by 2.5 times the chance of getting at least one Grade I oocyte and 2.8 times the chance of getting at least four Grade I or II oocytes (Table 4).

The CL diameter also influenced the probability of obtaining good quality oocytes. The larger the CL diameter, greater the probability of obtaining at least one Grade I oocyte and at least two Grade I or II oocytes ($P < 0.05$, Figs 5 and 6).

Table 4 Probability to obtain Grade I or II oocytes in ovaries with and without CL

Ovaries			
Probability (%) to obtain at least:	With CL	Without CL	P-value
1 Grade I oocyte	59.3	36.4	0.0359
2 Grade I oocytes	30.8	19.1	0.1694
3 Grade I oocytes	13.9	8.5	0.2966
1 Grade I or II oocytes	82.1	65.7	0.0991
2 Grade I or II oocytes	58.3	34.2	0.0264
3 Grade I or II oocytes	49.2	24.1	0.0129
4 Grade I or II oocytes	32.0	14.6	0.0347
5 Grade I or II oocytes	14.0	7.6	0.1983

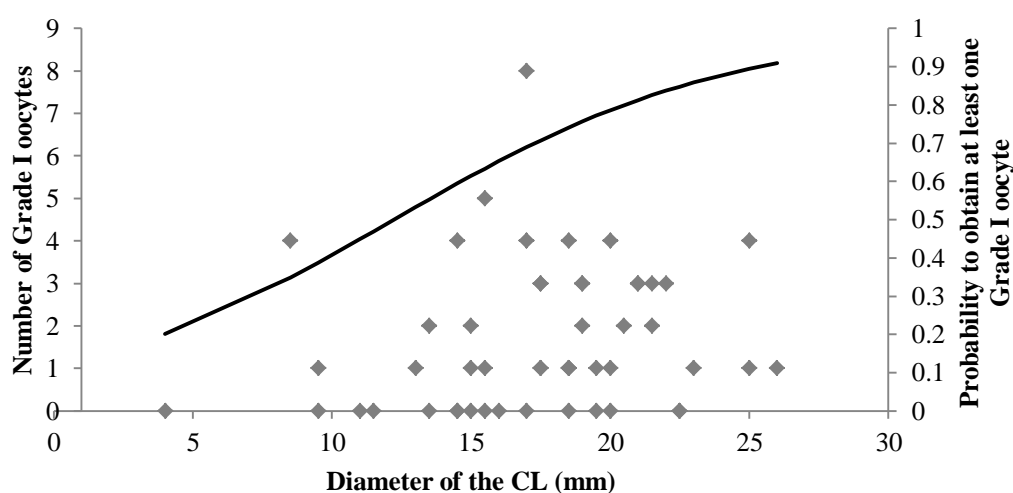


Figure 5 Dark line: probability to obtain at least one Grade I oocyte according to CL diameter. Gray points: number of recovered Grade I oocytes.

$$\text{Probability value} = \frac{e^{(-2.0456) + (0.1673 \times \text{diameter})}}{1 + e^{(-2.0456) + (0.1673 \times \text{diameter})}}$$

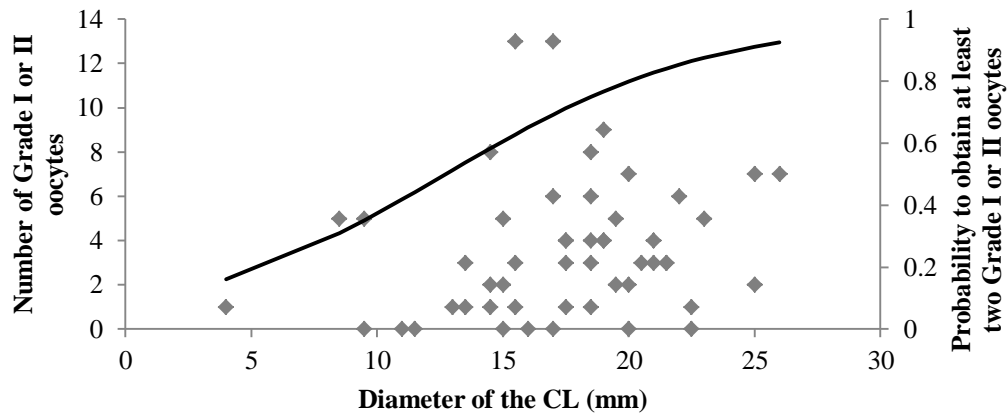


Figure 6 Dark line: probability to obtain at least two Grade I or II oocytes according to CL diameter. Gray points: number of recovered Grade I or II oocytes. Probability value =

$$\frac{e^{(-2.4161)+(0.1897 \times \text{diameter})}}{1+e^{(-2.4161)+(0.1897 \times \text{diameter})}}$$

Discussion:

The use of ovarian volume to estimate the gonadal function is limited, as the follicles are randomly arranged in the ovarian parenchyma and are not always detected by rectal palpation. Furthermore, correlation between ovarian volume and total oocytes in this study were low, indicating a marked influence of other factors. Therefore, other aspects become relevant, as the category or type of ovarian follicle. Most of the follicles in this study were from a heterogeneous population with less than 8 mm. The developmental dynamics of these follicles is dependent on factors such as the presence of a dominant follicle in the ovary (Adams et al. 1993; Varisanga et al. 1998), mitotic index in granulosa cells (Lussier et al. 1987), day of the estrous cycle (Vassena et al. 2003) among others. Moreover, the profile of ovarian activity can affect these correlations, such as variation in the size and growth rate of follicles between follicular waves (Viana et al. 2000). Regarding to the presence of a dominant follicle it was reported that in cattle the developmental competence of oocytes from small antral follicles is not adversely affected by the presence of a dominant follicle (Smith et al. 1996) despite Varisanga et al. (1998) found that the presence of a dominant follicle in either one or both ovaries of a pair has a negative effect on the IVF produced bovine embryos. According to Vassena et al. (2003) no differences were detected in the proportion of either healthy or degenerate oocytes collected from the ovary containing the dominant follicle or from

the contralateral ovary; however, fewer denuded oocytes were collected from the ovary containing the CL than from the contralateral ovary.

Another important factor refers to body condition of the cow, according to Dominguez (1995), the presence of follicles greater than 5 mm and the quality of the oocytes increase with body condition.

The influence of CL on bovine oocyte recovery rate and quality has been reported with variable results.

The CL presence may improve the quality of recovered oocytes due to the progesterone production. Although the progesterone level was not evaluated in this study, several studies have demonstrated the relationship between CL and progesterone serum levels (Baruselli et al. 2001; Bo et al. 2002; Ferreira et al. 2006). Progesterone allows that the follicle be exposed for a longer period to low amplitude LH pulses, getting a better quality oocyte (Greve et al. 1995; Pfeifer et al. 2009, 2011).

Reis et al. (2002) found in Simmental heifers higher number of recovered oocytes when the CL was active in the ovary; besides, Reis et al. (2006) reported that the presence of CL in Holstein Friesian cows is fundamental to improve important characteristics in in vitro embryo production such as number of collected oocytes from both ovaries, percentage of viable oocytes and cleaved zygotes and number of embryos at 7 days after in vitro fertilization.

Ovaries from slaughterhouse, showed a higher rates of cleavage and transferable embryos when had CL (Manjunatha et al.2007). However, in crossbred bovine females, also with ovaries obtained from a slaughterhouse, the presence of CL did not cause significant changes in the number and quality of recovered oocytes (de Wit et al. 2000).

Extrapolation of the results found in this study for conditions of an IVF program should be done cautiously. Nevertheless, it is possible to hypothesize that the use of exogenous progesterone or maintenance of a functional CL in bovine female may provide efficient gains in the embryo production, including the commercial programs.

Conclusions:

Since the results reported by other authors do not allow definitive conclusions about the effect of the presence of CL on the number and quality of recovered oocytes, as well on the efficiency of in vitro embryo production, it is possible to say that the question regarding the effects of the CL presence on follicular development, oocyte recovery and efficiency of in vitro embryo production, still deserves attention, requiring more research.

Acknowledgements:

The authors thank to FAPEMIG and CNPq for financial support.

References:

- Adams GP, Kot K, Smith CA, Ginther OJ. 1993. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifer. *Animal Reproduction Science* **30**, 259-271.
- Baruselli PS, Marques MO, Madureira EH, Costa Neto WP, Grandinetti RR, Bo GA. 2001. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices and eCG. *Theriogenology* **55**, 157 (abstract).
- Bo GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* **57**, 53-72.
- Bols PE, Ysebaert MT, Van Soom A, de Kruif A. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* **47**, 1221-1236.
- de Wit AA, Wurth YA, Kruip TA. 2000. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte complex. *Journal of Animal Science* **78**, 1277-1283.
- Dominguez MM. 1995. Effects of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. *Theriogenology* **43**, 1405-1418.
- Fernandes C, Dode MAN, Godoy K, Rodovalho N. 2001. Seasonality of ovarian characteristics and oocytes production in *Bos indicus* cattle in Mato Grosso do Sul

(In Portuguese). *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* **38**, Abstract. Available from URL: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1413-95962001000300007&script=sci_arttext

Ferreira RM, Rodrigues CA, Ayres H, Mancilha RF, Franceschini PH, Esper CR, Baruselli PS. 2006. Effect of synchronizing ovulation in cattle administered a norgestomet ear implant in association with eCG and estradiol treatments on pregnancy rate after fixed-time embryo transfer. *Animal Reproduction* **3**, 370-375.

Greve T, Hyttel P, Assey R. 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. *Theriogenology* **43** 41-50.

Havlicek V, Kuzmany A, Cseh S, Brem G, Besenfelder U. 2010. The effect of long-term in vivo culture in bovine oviduct and uterus on the development and cryo-tolerance of in vitro produced bovine embryos. *Reproduction in Domestic Animals* **45**, 832-837.

Hendriksen PJ, Steenweg WN, Harkema JC, Merton JS, Bevers MM, Vos PL, Dieleman SJ. 2004. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology* **61**, 909-920.

Leibfried-Rutledge ML, Critser ES, Eyestone WH, Northey DL, First NL. 1987. Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction* **36**, 376-383.

Lussier JG, Matton P, Dufour JJ. 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *Journal Reproduction and Fertility* **81**, 301-307.

Machatkova M, Jokesova E, Petelikova J, Dvoracek V. 1996. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* **45**, 801-810.

Machatkova M, Krausova K, Jokesova E, Tomanek M. 2004. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. *Theriogenology* **61**, 329-335.

Manjunatha BM, Gupta PS, Ravindra JP, Devaraj M, Ramesh HS, Nandi S. 2007. In vitro developmental competence of buffalo oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology* **68**, 882-888.

Moreno JF, Flores-Foxworth G, Westhusin M, Kraemer DC. 1993. Influence of pregnancy and presence of a CL on quantity and quality of bovine oocytes obtained from ovarian follicles aspirated post-mortem. *Theriogenology* **39**, 271 (abstract).

Pavlok A, Lucas-Hahn A, Nemann H. 1992. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction and Development* **31**, 63-67.

Pfeifer LFM, Campos H, Miguel Jr JC, Silveira LL, Schneider A, Correa MN, Rumpf R. 2011. Increasing of oocytes quality retrieved by ovum pick-up from cows previously superovulated (In Portuguese). *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **35**, Abstract. Available from URL: <http://www.cbpa.org.br/pages/publicacoes/rbra/v35n3/pag363.pdf>

Pfeifer LFM, Sartori R, Pivato I, Rumpf R, Nogueira GP, Xavier E, Dionello NJ, Correa MN. 2009. Effect of circulating progesterone on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Animal Reproduction* **6**, 473-478.

Reis A, Staines ME, Watt RG, Dolman DF, McEvoy TG. 2002. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. *Animal Reproduction Science* **72**, 137-151.

Reis A, Metelo R, Santos P, Silva FM. 2006. Efeito da estrutura ovárica e da idade de bovinos da raça Holstein Friesian na quantidade e qualidade de ovócitos e de embriões produzidos in vitro. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* **43**, Abstract. Available from URL: <http://www.revistas.usp.br/bjvras/article/view/26571/28354>

SAS Institute Inc. 2002. *SAS/STAT[®] 9.0 User's guide*. SAS Institute Inc, Cary, NC.

Smith LC, Olivera-Angel M, Groome NP, Bhatia B, Price CA. 1996. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* **106**, 193-199.

Stringfellow DA, Givens MD. 2010. Manual of the International Embryo Transfer Society 4th edn. International Embryo Transfer Society, Champaign, IL.

Varisanga MD, Sumantri C, Murakami M, Fahrudin M, Suzuki T. 1998. Morphological classification of the ovaries in relation to the Subsequent oocyte quality for IVF-produced bovine embryos. *Theriogenology* **50**, 1015-1023.

Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J, Adams GP. 2003. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology* **60**, 923-932.

Viana JHM, Ferreira AM, Sá WF, Camargo LSA. 2000. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **35**, 2501-2509.

Artigo 2

Statistical methods for prediction of pregnancy in bovine in vitro embryo production

Artigo submetido para publicação no
periódico *Animal Reproduction Science*
(ISSN: 0378-4320).

Statistical methods for prediction of pregnancy in bovine in vitro embryo production

Jurandy Mauro Penitente-Filho ^{a,*}, Adriana Moreira Zolini ^a, Carolina Rodriguez Jimenez ^a, Erly Carrascal ^a, Fabrício Albani Oliveira ^a, Ciro Alexandre Alves Torres ^a

^aDepartment of Animal Science, Universidade Federal de Viçosa, MG, Brazil.

* Corresponding author. Laboratory of Animal Reproduction, Department of Animal Science, Universidade Federal de Viçosa, Peter Henry Rolfs Avenue, University campus, Viçosa, MG, 36570-900, Brazil. Phone: +553138991403, email: penitentefilho@yahoo.com.br

Abstract: Artificial neural networks and decision trees have proved to be successful in different fields of study such as medicine, genetics and animal production. However, the use of these methodologies in bovine in vitro embryo production (IVP) is still scarce. Thus, this study aimed to compare different methods to predict pregnancy in commercial IVP. A real dataset was used, consisting of 9,697 embryo transfers, 6,788 observations were used for training and 2,909 were used for validation. Dataset was analyzed by using logistic regression; feed-forward multilayer perceptron neural network (MLP) with a hidden layer, without momentum constant and learning rate; two MLPs with momentum (0.8) and learning rate (0.2) with one and two hidden layers; and a decision tree by ID3 algorithm. All analyses were compared by ROC curve, predictive capacity, Kolmogorov-Smirnov test, and point biserial correlation. Analysis by MLP without momentum and learning rate correctly classified more than 70% of positive pregnancies; but, incorrectly classified almost 60% of non-pregnancies. In IVP, not detect a positive pregnancy is more harmful than not detect a negative pregnancy; however, this network has become more unstable with lack of momentum and learning rate. The ID3 algorithm was unable to design a suitable decision tree, but it was able to indicate the variables with higher impact on final response. In general, all analyzes were very similar, which may be explained by use of categorical explanatory variables. Use of quantitative variables as well momentum and learning rate should be considered for sequential studies.

Keywords: ANNs, cattle, logistic regression, decision trees, in vitro fertilization, reproductive efficiency.

Introduction

Viability of bovine in vitro embryo production (IVP) is closely related to reproductive indices that are variable in different situations. The great variability by donor cows for embryo production, and the need to purchase and synchronize recipients before knowing the number of produced embryos, complicate the decision about the number of females that must be intended for synchronization (Slenningl and Wheeler, 1989; Galli et al., 2003).

In order to anticipate results in high risk activities, some mathematical models have been developed to assist in decision making at different stages of cattle production (Slenningl and Wheeler, 1989; Ostergaard et al., 2005).

Most mathematical models applied to bovine embryo production use average value of the number of produced embryos (Cardoso et al, 1999). However, these deterministic simulations may cause biased results; thus, some models have included stochastic patterns, which arise from random events, to the number of produced embryos (Beltrame et al, 2007).

Nevertheless, few models were directed to analyze the economic and biologic aspects of IVP (Beltrame et al., 2009) and no model has been developed in order to predict pregnancy in IVP programs.

Binary responses arise in many fields of study. Logistic regression analysis is often used to investigate the relationship between these discrete responses and a set of explanatory variables (Hosmer and Lemeshow, 2000).

Artificial neural networks (ANN) can be viewed as a computer based system composed of many processing elements (neurons) operating in parallel (Lamontagne and Marchand, 2006). An ANN is determined by the network structure, represented by the number of layers and neurons, by the strength of the connections (akin to non-parametric regression coefficients) between inputs, and by the type of processing performed at each neuron, represented by a linear or non-linear transformation: the activation function. Neural networks have potential of accommodating complex relationships between input and response variables (Gianola et al., 2011). The ANNs have potential application in animal production when a database that allows the understanding of the relationship between the environment and agricultural activity is required (Shao et al., 1998; Fernandez, 2006; Vieira et al., 2010).

The Iterative Dichotomiser 3 (ID3) is an algorithm used by training on a dataset (S) to produce a decision tree. At runtime, this decision tree is used to classify

new unseen test cases by working down the decision tree using the values of this test case to arrive at a terminal node that tells us what class this test case belongs to. The ID3 separates a training set into subsets so that these samples contain a single class. The division is performed through a single attribute, the information gain, which measures how much informative is an attribute (Quinlan, 1986).

The ANNs and decision trees have proved to be very successful in different fields of study such as engineering, medicine, genetics and animal production. However, the use of these methodologies in bovine reproduction field is still very scarce. Thus, this study has as aim to compare different methods to predict pregnancy in commercial program of bovine embryo production.

Material and methods

For data analysis, a real dataset was used. This dataset consisted of 9,697 embryo transfer from a commercial central of bovine embryo production, situated in Sete Lagoas, Minas Gerais, Brazil. Embryo transfer occurred from January, 2010 to June, 2012. The variables in the dataset are described in table 1, 6,788 observations were used in training model and 2,909 were used for validation.

Dataset was analyzed by using logistic regression, three types of ANNs and a decision tree. For logistic regression, the Logistic Procedure on SAS (SAS, 2002) was used. Initially, for adjustment, data were submitted to univariate analysis and those ones that were significant were used in multivariate adjustment. Sequentially, variables still significant were used for final model, which was applied on validation data.

For analysis in feed-forward multilayer perceptron/backpropagation neural network (MLP) with one hidden layer without addition of momentum constant or learning rate, the nnet package was used, in R environment (R Core Team, 2013).

Other two MLPs were analyzed, also based on perceptron/backpropagation, one with a hidden layer and another with two hidden layers by using Weka software (Hall et al. 2013). For both ANNs, a momentum constant (0.8) and learning rate (0.2) were added to analysis. For all ANN analyses, the learning method used was supervised learning; and a sigmoidal logistic activation function was used.

Table 1. Description of the variables in dataset:

Variable	Description
Method	Method of embryo transfer, if fresh embryo (1) or frozen/thawed embryo (2).
OPUperiod	Season when ovum pick up (OPU) was performed, if during rainy season (1; October to March) or during dry season (0; April to September)
ETperiod	Season when embryo transfer (ET) was performed, if during rainy season (1; October to March) or during dry season (0; April to September)
DBreed	Donor breed: Brahman (1), Gir (2), Crossbreed (3), Guzerá (4), Holstein (5), Jersey (6), Nelore (7).
BBreed	Bull breed: Brahman (1), Gir (2), Crossbreed (3), Guzerá (4), Holstein (5), Jersey (6), Nelore (7), Tabapuã (8), Aberdeen Angus (9).
Semen	Type of semen used in in vitro fertilization: Sexed (0) or non-sexed (1).
Stage	Developmental stage of the embryo at ET: Early blastocyst (5), Blastocyst (6), Expanded blastocyst (7), Hatched blastocyst (8).
Pregnancy	Response variable. Evaluated in the recipient female 53 days after ET, if recipient is pregnant (1) or not pregnant (0).

For decision tree, ID3 algorithm was used, using Weka software (Hall et al. 2013).

Decision trees and ANNs do not use significant level; thus, only variables that were significant in logistic regression were used for training and validation.

All analyses were compared by ROC curve, and predictive capacity including total correctly classified instances, positive correctly classified instances and negative correctly classified instances. Kolmogorov-Smirnov (KS) test was used for comparison between probability levels of presence (1) and absence (0) of pregnancy. The pregnancy presence/absence was correlated with the probabilities calculated by different analyses by point biserial correlation (r_{pb}). Significant level adopted was $\alpha = 0.05$.

Results and Discussion

One univariate logistic regression model was fit for each of the available variables and the significance was assessed according to the Wald test, the obtained settings can be seen in Table 2. Variables that were not significant ($P > 0.05$) were removed for multivariate adjustment. Sequentially, categorical variables were converted to dummy variables. By using Selection Backward of the Logistic Procedure, only variables that were significant in the multivariate adjustment were kept in the final model (Table 3).

After the final model was obtained, it was applied to validation data. To define the cut-point, it was observed the probability level which maximizes both sensitivity and specificity (Figure 1). Then, total concordant, correct pregnancy, correct non-pregnancy, KS statistics, ROC curve (Figure 7) and r_{pb} were assessed (Table 4).

Table 2. Maximum likelihood estimation for univariate adjustment:

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald Square	Chi-Pr > Chisq
Intercept	1	-0.4164	0.0386	116.2036	<.0001
Method	1	0.2925	0.0386	57.3474	<.0001
Intercept	1	-0.1714	0.0248	47.6923	<.0001
OPUperiod	1	-0.0478	0.0248	3.7056	0.0542
Intercept	1	-0.1916	0.0244	61.5347	<.0001
ETperiod	1	-0.0679	0.0244	7.7276	0.0054
Intercept	1	-0.2279	0.0595	14.6762	0.0001
DBreed 1	1	0.1329	0.0678	3.8443	0.0499
DBreed 2	1	-0.0434	0.0800	0.2947	0.5873
DBreed 3	1	-0.1867	0.0835	4.9966	0.0254
DBreed 4	1	0.1694	0.0831	4.1538	0.0415
DBreed 5	1	-0.2610	0.1109	5.5332	0.0187
DBreed 6	1	0.1707	0.2989	0.3263	0.5678
DBreed 7	1	0.0219	0.0982	0.0499	0.8232
Intercept	1	-1.7908	26.8222	0.0045	0.9468
BBreed 1	1	1.6523	26.8222	0.0038	0.9509

BBreed 2	1	1.3871	26.8222	0.0027	0.9588
BBreed 3	1	1.4723	26.8237	0.0030	0.9562
BBreed 4	1	1.4984	26.8223	0.0031	0.9555
BBreed 5	1	1.4478	26.8222	0.0029	0.9570
BBreed 6	1	1.6084	26.8248	0.0036	0.9522
BBreed 7	1	1.5031	26.8224	0.0031	0.9553
BBreed 8	1	1.8708	26.8245	0.0049	0.9444
<hr/>					
Intercept	1	-0.2271	0.0253	80.3034	<.0001
Semen	1	-0.1420	0.0253	31.4275	<.0001
<hr/>					
Intercept	1	-0.3714	0.0738	25.3596	<.0001
Stage 5	1	-0.3939	0.2051	3.6880	0.0548
Stage 6	1	-0.0530	0.0988	0.2880	0.5915
Stage 7	1	0.2007	0.0764	6.8921	0.0087

Table 3. Maximum likelihood estimation for multivariate adjustment:

Parameter	DF	Estimate	Standard Error	Wald Square	Chi-Pr > Chisq
Intercept	1	0.0321	0.1261	0.0646	0.7994
Method	1	-0.6049	0.0804	56.5931	<.0001
Semen	1	0.2139	0.0535	15.9927	<.0001
Stage 7	1	0.3711	0.0934	15.7776	<.0001
Stage 8	1	0.2771	0.1117	6.1557	0.0131

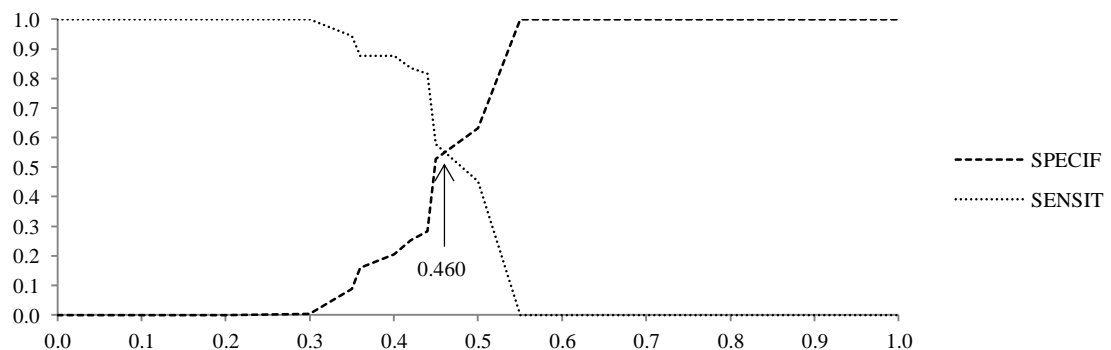


Figure 1. Specificity and sensitivity by logistic regression. Limit = 0.460

By using the nnet package in the R environment, the MLP without momentum and learning rate was performed. Since the ANNs have not significance tests for explanatory variables, the same significant variables used in logistic regression were presented to ANN. The number of iterations was 50, and the error was 0.01. The MLP with best fit showed 10 neurons in hidden layer and 65 synaptic weights. To define the cut-point, it was also observed the probability level which maximizes both sensitivity and specificity (Figure 2). Then, total concordant, correct pregnancy, correct non-pregnancy, KS statistics, ROC curve (Figure 7) and r_{pb} were assessed (Table 4).

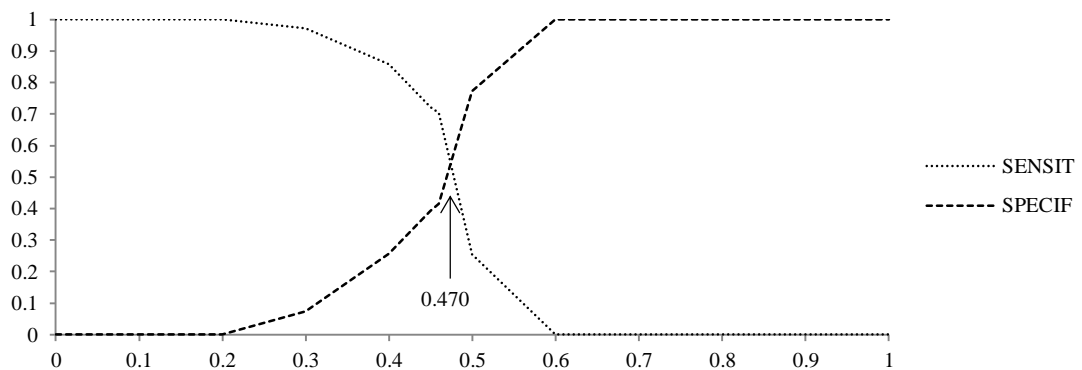


Figure 2. Specificity and sensitivity by feed-forward multilayer perceptron with a hidden layer and without momentum and learning rate. Limit = 0.470.

For MLPs with addition of momentum and learning rate with a hidden layer, the ANN with best fit showed seven neurons in the hidden layer and 51 synaptic weights. For two hidden layers, the ANN with best fit showed six neurons in first hidden layer and seven in the second layer, with 107 synaptic weights. For both ANNs, 150 iterations, momentum = 0.8 and learning rate = 0.2 were used.

To define the cut-point, it was also observed the probability level which maximizes both sensitivity and specificity for one and two hidden layers (Figure 3 and 4, respectively). Then, total concordant, correct pregnancy, correct non-pregnancy, KS statistics, ROC curve (Figure 7) and r_{pb} were assessed (Table 4).

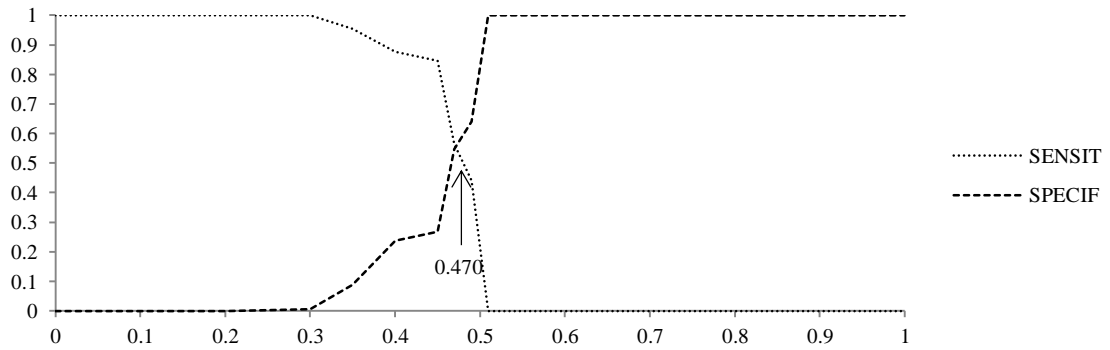


Figure 3. Specificity and sensitivity by feed-forward multilayer perceptron with a hidden layer, with momentum (0.8) and learning rate (0.2). Limit = 0.470.

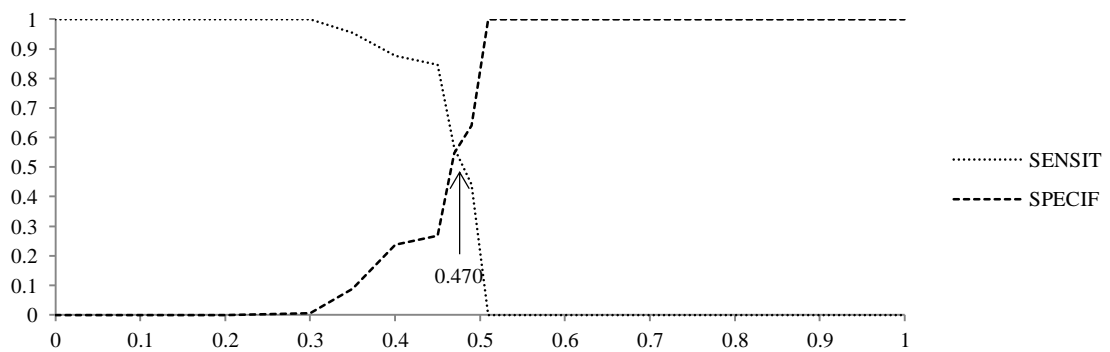


Figure 4. Specificity and sensitivity by feed-forward multilayer perceptron with two hidden layers, with momentum (0.8) and learning rate (0.2). Limit = 0.470.

In present study dataset was composed only by categorical variables; thus an analysis by ID3 algorithm has become interesting since it could design a useful decision tree, which is showed in Figure 5. Nevertheless, the practical use of this decision tree is limited due to its classification method, by information gain, which caused an excessive generalization, leading i.e. the improper conclusion that all cryopreserved embryos would fail to get pregnancy. However, ID3 algorithm was able to indicate what variables showed higher influence on final response (pregnancy); in decreasing order, cryopreserved or fresh embryos (method), sexed or non-sexed semen (semen), expanded blastocyst (Stage 7), and hatched blastocyst (Stage 8).

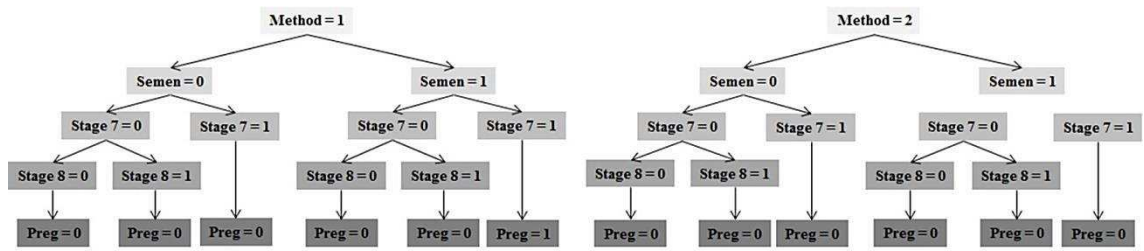


Figure 5. Decision tree generated by ID3 algorithm.

Analyses regarding to the cut-point (Figure 6), total concordant, correct pregnancy, correct non-pregnancy, KS statistics, r_{pb} (Table 4) and ROC curve (Figure 7), were performed as described for the previous analyses.

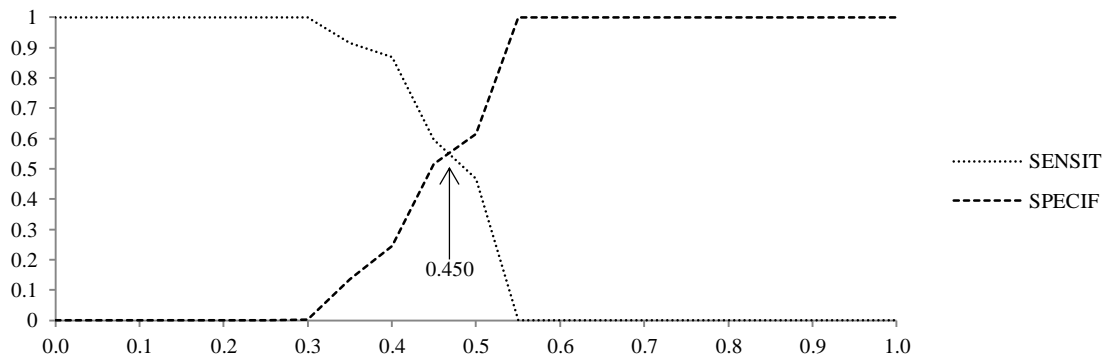


Figure 6. Specificity and sensitivity by ID3 algorithm. Limit = 0.450.

Table 4. Total concordant (%), correct classified pregnancy (%), correct classified non-pregnancy (%), KS statistics (%), point biserial coefficient correlation (r_{pb}) and area under ROC curve for each analysis:

Analysis	Total concordant	Correct pregnancy	Correct non-pregnancy	KS	r_{pb}	ROC curve
Logistic regression	55.06	59.52	51.54	11.73	0.1466	0.5725
MLP 1 hidden layer, without momentum and learning rate	54.28	70.37	41.49	11.86	0.1460	0.5653
MLP 1 hidden layer, momentum = 0.8 and learning rate = 0.2	55.38	56.35	54.62	11.86	0.1471	0.5730
MLP 2 hidden layers, momentum = 0.8 and learning rate = 0.2	55.38	56.35	54.62	11.34	0.1434	0.5730
ID3 algorithm	55.06	59.52	51.54	11.73	0.1493	0.5714

MLP = feed-forward multilayer perceptron; KS = Kolmogorov-Smirnov test.

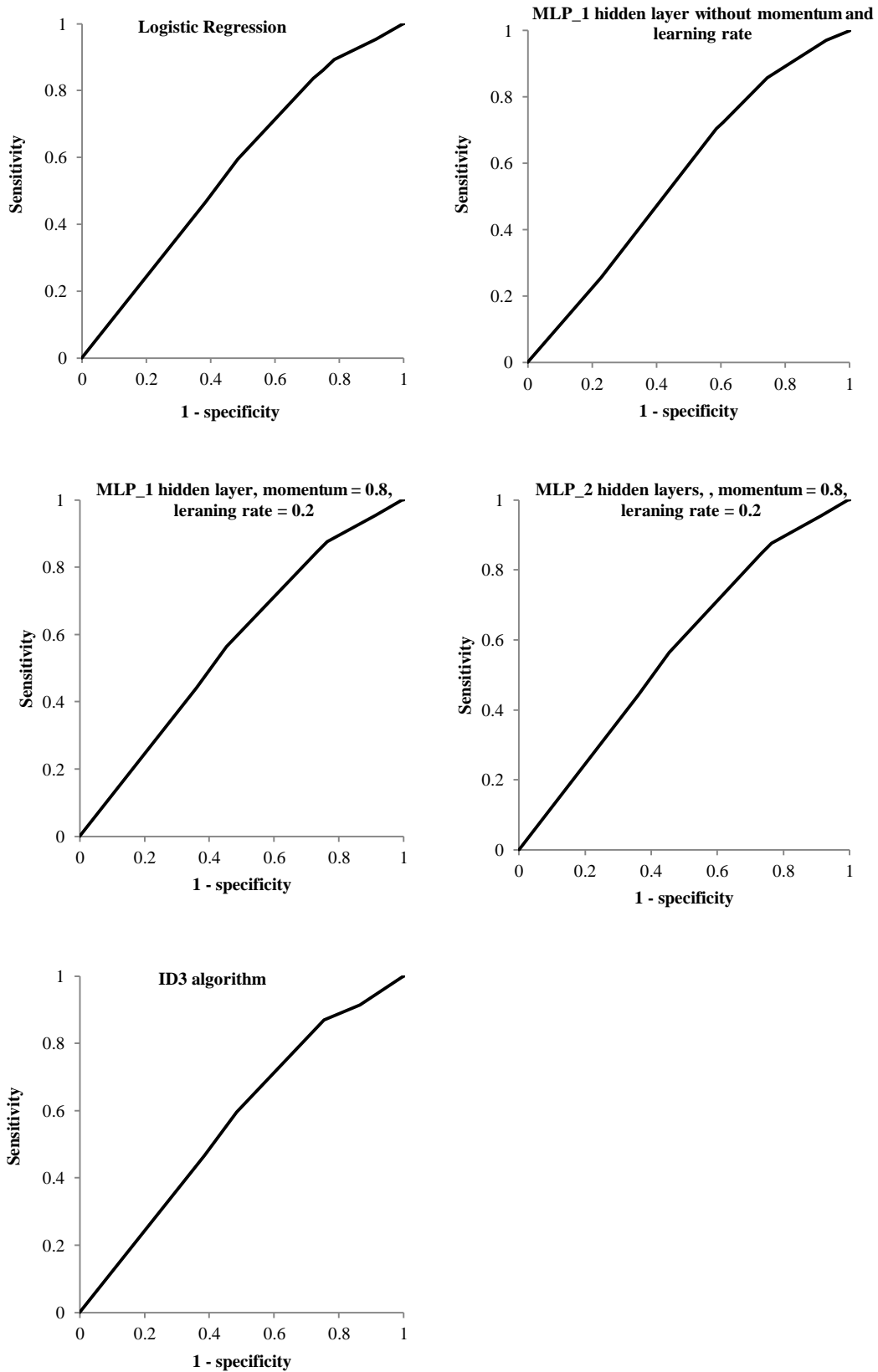


Figure 7. ROC curves for logistic regression, ANNs and ID3 algorithm.

Comparison of adjusted models (Table 4) shows that all models had a very similar behavior with regard to total correctly classified instances, with MLP without momentum and learning rate being slightly lower. Total correctly classified pregnancy was also very similar among models, except for MLP without momentum and learning rate in which correct pregnancy was higher; however, the opposite was observed for correct non-pregnancy.

The KS statistics was also very similar among models and slightly inferior in MLP with two hidden layers. By r_{pb} coefficient correlation ID3 algorithm showed the best adjust for probability levels; nevertheless, all models were very similar. The area under ROC curve also was similar among analyses, being slightly lower for MLP without momentum and learning rate.

Analysis by the MLP without momentum and learning rate correctly classified more than 70% of positive pregnancies; but, incorrectly classified almost 60% of non-pregnancies. Nevertheless, this result becomes interesting because not detect a positive pregnancy is more harmful to a program to produce embryos than not detect a negative pregnancy. From this point of view, this analysis was superior to the others. However, other aspects should be considered; it is possible to note that the network has become more unstable with lack of momentum constant and learning rate.

Conclusions

In general, all analyzes were very similar. This may be explained by the use of categorical explanatory variables. The use of quantitative variables may be helpful for a better fit of the models. Besides, the use of momentum constant and learning rate should be considered for sequential studies. Moreover, despite have been able to indicate the variables with high impact on final response, ID3 algorithm was unable to design a suitable decision tree.

Acknowledgments

Authors thank to D.Sc. Bruno Portela Brasileiro for contributions in data analyses, and CNPq and Fapemig for financial support.

References

- Beltrame, R.T., Barioni, L.G., Maestri, B.D., Quirino, C.R., 2007. Economic optimization of the number of recipients in bovine embryo transfer programs. *Scientia Agricola*. 64, 221-226.
- Beltrame, R.T., Barioni, L.G., Quirino, C.R., Dantas, O.D., 2009. Probability density function of the number of embryos collected from superovulated Nelore breed donors. *Scientia Agricola*. 66, 447-450.
- Cardoso, V.L., Nogueira, J.R., Arendonk, J.A.M.V., 1999. Optimal Replacement and insemination policies for Holstein cattle in the southeastern region of Brazil: The effect of selling animals for production. *J. Dairy Sci.* 82, 1449-1458.
- Fernandez, C., 2006. Neural networks for animal science applications: Two case studies. *Expert. Syst. Appl.* 31, 444-450.
- Gianola, D., Okut, H., Weigel, K.A., Rosa, G.J.M., 2011. Predicting complex quantitative traits with Bayesian neural networks: a case study with Jersey cows and wheat. *BMC Genetics*. 12, 87 doi:10.1186/1471-2156-12-87.
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., 2003. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*. 59, 599-616.
- Hall, M., Frank, E., Holmes, G., Pfahringer, B., Reutemann, P., Witten, I.H., 2009. The WEKA Data Mining Software: An Update. *SIGKDD Explorations*. 11, 1. Available from URL: <http://www.sigkdd.org/sites/default/files/issues/11-1-2009-07/p2V11n1.pdf>
- Hosmer, D.W., Lemeshow, S., 2000. *Applied Logistic Regression*, second ed. Wiley, New York.
- Lamontagne, L., Marchand, M., 2006. *Advances in Artificial Intelligence*. Springer, Berlin.
- Ostergaard, S., Friggens, N.C., Chagunda, M.G.G., 2005. Technical and economic effects of an inline progesterone indicator in a dairy herd estimated by stochastic simulation. *Theriogenology*. 64, 819-843.
- Quinlan, J.R., 1986. Induction of Decision Trees. *Machine Learning*. 1, 81-106.

R Core Team R., 2013. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

SAS Institute Inc. 2002 SAS/STAT[®] 9.0 User's guide. Cary, NC, SAS Institute Inc.

Shao, J., Xin, H., Harmon, J.D., 1998. Comparison of image feature extraction for classification of swine thermal comfort behavior. *Comput. Electron. Agr.* 19, 223-232.

Slenningl, B.D., Wheeler, M.B., 1989. Risk evaluation for bovine embryo transfer services using computer simulation and economic decision theory. *Theriogenology*. 31, 653-673.

Vieira, F.M.C., Silva, I.J.O., Barbosa Filho, J.A.D., Vieira, A.M.C., 2010. Productive losses on broiler preslaughter operations: effects of the distance from farms to abattoirs and of lairage time in a climatized holding area. *Rev. Bras. Zootec.* 39, 2471-2476. Available from URL: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-35982010001100021&script=sci_arttext

Conclusões Gerais:

A extrapolação dos resultados encontrados neste estudo para as condições de um programa comercial de PIVE deve ser feita com cautela. No entanto, é possível levantar a hipótese de que a utilização de progesterona exógena ou a manutenção de um CL funcional na fêmea bovina pode proporcionar ganhos de eficiência na produção de embriões.

Além disso, visto que os resultados relatados por outros autores e pelo presente estudo não permitem conclusões definitivas sobre o efeito da presença de CL sobre o número e a qualidade dos oócitos recuperados, bem como sobre a eficiência da produção in vitro de embriões, é possível dizer que a questão referente aos efeitos da presença de um CL no desenvolvimento folicular, recuperação de oócitos e eficiência da produção in vitro de embriões, ainda merece atenção.

Em geral, todos os métodos estatísticos avaliados neste estudo foram semelhantes. Contudo, a análise pela rede neural feed-forward MLP sem constante momentum e taxa de aprendizagem classificou corretamente mais de 70 % das gestações positivas. Apesar de ter classificado incorretamente quase 60 % das não gestações, este resultado se torna interessante porque não detectar uma gestação positiva é mais prejudicial a um programa de produção de embriões que não detectar uma gestação negativa. Deste ponto de vista, esta RNA foi superior às outras, entretanto, foi mais instável.

A análise contínua, com conjuntos de dados maiores e maior número de variáveis explicativas, incluindo não somente variáveis categóricas, mas também variáveis quantitativas, pode melhorar os modelos para garantir resultados mais precisos.