ATUALIDADE E PERSPECTIVAS DA PECUÁRIA PARANAENSE

Orlando Pessuti
Vice-Governador e Secretário da Agricultura do Estado do Paraná

Fábio Peixoto Mezzadri
Médico Veterinário da SEAB/DERAL/DCA

APRESENTAÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial de gado bovino do mundo, com aproximadamente 185 milhões de cabeças. O Estado do Paraná, dentro deste contexto, vem ocupando a 7ª posição no "ranking" da pecuária, com um rebanho de aproximadamente 10.400 milhões de cabeças, representando 6,21% do rebanho nacional. Apresentou no ano de 2003, crescimento em torno de 3,8% em relação ao ano de 2002, quando havia no Estado 10.000 milhões de cabeças.
O rebanho bovino paranaense está dividido em aproximadamente 213.000 propriedades, onde aproximadamente 20% dos animais, pertencem ao rebanho leiteiro, 70% compõem os animais de corte e 10% formam o rebanho misto.

PARANÁ - DISTRIBUIÇÃO DO REBANHO SEGUNDO A APTIDÃO E RAÇAS

DESCRIÇÃO	(%)	NELORE (%)	CRUZAMENTO INDUSTRIAL (%)
REBANHO DE CORTE	70	58	12
REBANHO MISTO	10		
REBANHO LEITEIRO	20		

FONTE: SEAB/DERAL

PERFIL DO ESTADO DO PARANÁ

O Paraná destaca-se por possuir uma pecuária de corte relativamente desenvolvida no aspecto tecnológico, com rebanhos de alto nível genético, onde vários animais destacam-se em importantes exposições nacionais e internacionais. No Estado, é relevante o número de produtores conscientizados em empregar tecnologia e preocupados com a sanidade e rentabilidade do rebanho.
No Sul do Estado predominam temperaturas frias e amenas caracterizando-se por apresentar, em sua maior parte, rebanhos formados por animais de origem européia, mais adaptados a esta região, onde aparecem raças como a Simental, Pardo-Suiço, Aberdeen e Red Angus, Limousin, Charolês, Canchin, Gelbvieh e seus cruzamentos. Nesta região, na entressafra (inverno), onde as constantes geadas e a estiagem reduzem quase a zero as pastagens nativas, os pecuaristas mais profissionalizados, utilizam-se de meios alternativos para a alimentação dos animais, como a produção de silagem, feno e, principalmente, o cultivo de espécies forrageiras de clima temperado, destacando-se como espécies mais cultivadas, a aveia e o azevém.
No Norte e Noroeste, onde as temperaturas são mais elevadas, predominam rebanhos formados por raças zebuínas, em especial a raça nelore, tanto a nível de número de cabeças, quanto em qualidade genética dos animais. Porém, o perfil da pecuária no

Norte vem mudando. Os rebanhos comerciais, que há alguns anos atrás eram formados, quase que somente por animais puros nelore, agora estão sendo compostos também por animais mestiços, zebuínos x europeus, através da técnica chamada de Cruzamento Industrial, seja através de Monta Natural ou Inseminação Artificial, o que vem reforçar ainda mais a idéia, de que os pecuaristas paranaenses passaram a se preocupar com a qualidade dos seus rebanhos e com a sua produtividade.

Brasil e Paraná: efetivo de rebanho, participação percentual e ranking, 2002

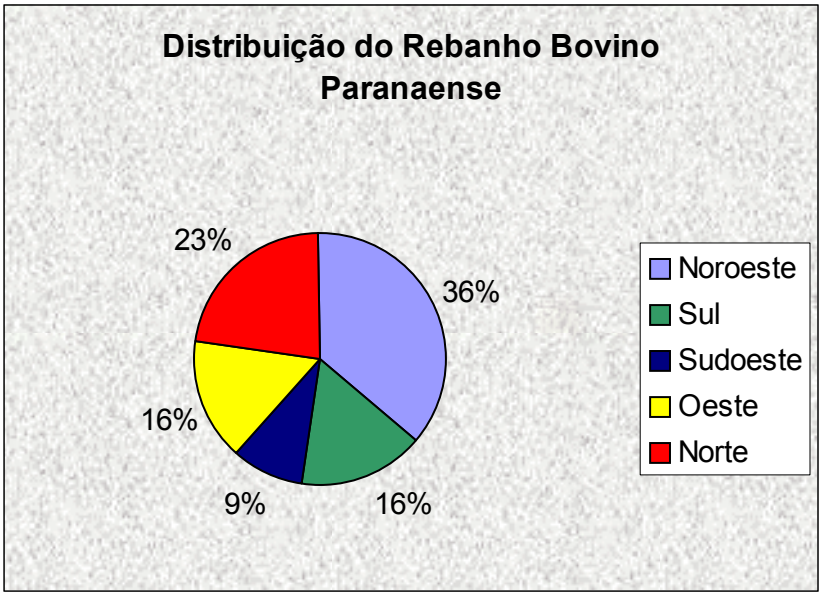
Animais	Rebanho (nº de cabeças)		% PR/BR	Ranking (º)
	Brasil	Paraná		
Bovinos de corte [1])	185,3	10,0	5,4	7
Suínos [1])	32,0	4,3	13,4	3
Frangos de corte [2])	3.618,0	740,0	20,4	1
Galinhas de postura [3])	67,8	6,1	9,0	3
Bovinos de leite [4])	20.000,0	1.427,0	7,1	4

Notas: [1]) em milhões de cabeças (rebanho); [2]) frangos (aves abatidas); [3]) em milhões de cabeças (aves alojadas em produção); [4]) em mil cabeças (vacas ordenhadas)

Fonte: SEAB/DERAL – IBGE – FNP – CNA – ABIPECS – APS – UBA – ABCS – MAPA – FAO

PARANÁ – DISTRIBUIÇÃO DO REBANHO E INDICATIVOS DE PRODUTIVIDADE

O rebanho bovino paranaense divide-se entre várias regiões do Estado, sendo que a maior parte está situado no Norte e Noroeste (59%), e o restante distribui-se pelas demais regiões.



Fonte: SEAB/DERAL - 2004

O Paraná ainda possui alguns indicadores baixos de produtividade, todavia devido, a tecnificação dos produtores, a programas governamentais de apoio à pecuária e principalmente ao intenso trabalho de assistência técnica, através da extensão rural, realizado há anos pela EMATER (Empresa Paranaense de Extensão Rural), os níveis já subiram em muitas propriedades, sendo que algumas regiões, já ultrapassaram os

indicadores que serão expostos a seguir. Sendo responsável pelo fato, também a nova visão empresarial da pecuária por parte dos produtores.

Indicadores de Produtividade

INDICADOR	REFERÊNCIA ATUAL	META
Taxa de natalidade	55%	75%
Mortalidade no 1º ano	3 a 5%	2%
Taxa de lotação de pastagem	1,4 U.A	4,0 U.A
Idade média 1ª cria	48 meses	24 meses
Intervalo entre partos	14,5 meses	12 meses
Produção de carne	75 Kg/Ha/ano	200 Kg/Ha/ano
Idade média de abate	36 a 48 meses	24 a 15 meses
Rendimento de carcaça	52%	> 54%
Peso de carcaça	225 Kg	205 Kg
Taxa de desfrute	18% a 22%	30%

Fonte: SEAB/DERAL – 2003 / PR

MERCADO – PRODUÇÃO DE CARNE E EXPORTAÇÕES

As exportações de carne bovina brasileira tiveram, em 2003, um aumento de 39% na receita, que foi de US$1,509 bilhão, e um incremento de 32% nos volumes, fechando embarques de 1,362 milhão de toneladas (equivalente carcaça).
Com este resultado o Brasil superou a Austrália e tornou-se o maior exportador mundial de carne bovina. Isto apesar de ainda estarem fechados, para a carne "in natura", grandes mercados como o dos Estados Unidos e o do Japão.
Este resultado, também é fruto da consolidação de novos mercados, como Egito e Israel, e das vendas para Rússia, que cresceram 294,2% no mês, para 24,87 mil toneladas. O motivo é que o Brasil está preenchendo cotas de importações que outros países não conseguem cumprir. No corrente ano, até o mês de maio, as exportações do produto cresceram 62,5% em receita e 23% em volume. Em 2003, as exportações somaram 1,3 milhão de toneladas e US$ 1,5 bilhão em receita; as previsões para 2004, são de que as exportações somem 1,5 milhão de toneladas e US$2 bilhões em receita.
O preço da tonelada do produto, em maio do ano passado, estava US$1.647. Neste ano a cotação da tonelada subiu para US$2.249, obtendo-se um incremento de 65%.
Segundo dados do Sindicarne, em 2004, o Brasil de janeiro a maio enviou ao exterior 427.782 toneladas do produto, obtendo faturamento de US$902.120 milhões.
O Paraná, no ano de 2003, produziu em torno de 600 mil toneladas de carne bovina, das quais enviou ao exterior 26.819 toneladas de carne "in natura" e cerca de 436 toneladas de carne industrializada. Este ano entre os meses de janeiro a maio, o Paraná exportou 17.139 toneladas de carne bovina e derivados para 41 países, obtendo receita de US$40.896 milhões.

Brasil e Paraná: Exportações de carnes de bovinos "in natura", 2001 a 2003

Ano	Paraná			Brasil		
	US$ - FOB (1)	Kg (2)	Part.% (2/4)	US$-FOB (3)	Kg (4)	Part.% (1/3)
2001	42.986.234	19.756.408	5,4	738.202.110	367.819.173	5,8
2002	46.553.061	23.606.142	5,5	775.855.179	429.831.387	6,2
2003	61.420.833	26.819.009	5,5	1.153.931.317	619.544.984	5,3

Nota: NCM: 02.01.10.00; 02.01.30.00; 02.03.00.00 - Carne de bovinos "in natura" : frescas ou refrigeradas e congeladas.

Fonte: MDIC/SECEX (Sistema Aliceweb – abr/04)

Brasil e Paraná: Exportações de carnes de bovinos "industrializada", 2001 a 2003

Ano	Paraná			Brasil		
	US$ -FOB	Kg (2)	Part.% (2/4)	US$ FOB	KG (4)	Part.% (1/3)
2001	147.319	151.807	0,11	260.871.646	132.639.405	0,06
2002	235.083	283.659	0,18	310.158.095	160.481.994	0,15
2003	365.404	436.374	0,24	355.224.022	180.402.003	0,10

Nota: NCM: 16.02.50.00; 16.01.00.00 – Enchidos de carne, miudezas, sangue e suas preparações alimentícias, preparações alimentícias e conservas de bovinos.

Fonte: MDIC/SECEX (Sistema Aliceweb – abr/04)

No momento atual, o Paraná, nessa área, passa por significativas mudanças. O mercado, tanto o do leite, quanto o da carne torna-se mais exigente em relação à qualidade e sanidade do produto, refletindo, cada vez mais, a preocupação dos consumidores em adquirir produtos de nível superior e de qualidade assegurada. Sendo assim, os produtores, estando na base da cadeia produtiva da carne, passam por um momento onde a adoção de medidas para a melhoria da tecnologia e aumento da produção tornam-se obrigatórias para aqueles que querem continuar vivos na atividade, crescerem e se tornarem cada vez mais competitivos.

Estas mudanças abrangem todo o processo de criação, desde o nascimento do bezerro de corte ou da bezerra leiteira. Assim, no decorrer da vida do animal são tomados todos os cuidados com a sanidade, alimentação e manejo, para que, no final, o leite ou a carne destes animais sejam de qualidade superior e totalmente livres de agentes que possam ser nocivos à saúde humana.

PARANÁ – AÇÕES E PROGRAMAS GOVERNAMENTAIS

O Estado do Paraná, entendendo esta necessidade de mudança por parte dos produtores e almejando o aumento da produção e qualidade dos produtos, busca alavancar a pecuária e subsidiar seus produtores, através das campanhas, programas e ações, que propiciam ajuda técnica, financeira, sanitária e comercial aos interessados. Entre estas ações, dentro da pecuária, devem ser citados programas como o "Leite das Crianças", que além do objetivo principal, que é reduzir o nível de

desnutrição infantil, controla a qualidade do leite distribuído e ainda contribui em muito para incrementar a pecuária de leite no Estado, devido a demanda freqüente gerada pelo programa.
Outra importante ação na área da pecuária, está sendo o Programa Paranaense de Rastreabilidade de Bovinos e Bubalinos, onde o Paraná é pioneiro no cenário nacional, sendo a Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná, o único órgão público a realizar a rastreabilidade. O processo consiste na identificação e acompanhamento individual dos animais, da fazenda ao mercado, controlando a vida produtiva do animal, desde o seu nascimento até o abate. Ao longo desse processo, deve-se conhecer e monitorar atributos pré-estabelecidos, indispensáveis para a vigilância epidemiológica, na Defesa Sanitária Animal. Esse processo tem continuidade no abate, processamento, armazenagem, transporte, distribuição e comércio em nível de varejo, ao consumidor final, por outras entidades ou órgãos afins. Este processo permitirá identificar a causa do possível problema e corrigi-lo em sua raiz, dando maior segurança aos consumidores e também aos produtores, que terão maiores condições para aprimorar os seus produtos.
Atualmente no Estado, estão registrados no SISBOV (Sistema Brasileiro de Identificação de Bovinos e Bubalinos), cerca de 562 mil animais. O número através da Certificadora da SEAB, encontra-se hoje em torno de 76.000 cabeças rastreadas, porém a previsão é de que este número suba, com o ingresso das associações de raças puras no sistema.
Todos esses fatores mencionados, contribuem para o aumento da qualidade e a garantia da sanidade dos produtos da pecuária paranaense, consequentemente contribuindo para o aumento da produção, das exportações e também da qualidade da carne consumida internamente.

SISTEMAS DE PRODUÇÃO

Os sistemas de produção utilizados pelos pecuaristas estão centrados no uso de pastagens perenes de verão, pastagens de inverno, pequena parcela de pasto nativo e os sistemas de terminação intensivo, como confinamento e semi-confinamento.
Atualmente, a oferta de animais para abate é constante ao longo do ano, sendo que nos períodos de verão e outono a maior oferta ocorre na região Norte do Estado e, nos períodos de inverno e primavera, se concentra na região Sul do Estado.
Nas regiões Noroeste e Norte do Paraná situam-se os maiores confinamentos, com 66% do total de animais confinados. A polarização se dá nos municípios de Umuarama e Paranavaí. Em muitas propriedades os confinamentos são empregados como estratégia de produção, sendo que a utilização neste caso irá depender da época, cotação do boi magro, preço de insumos, disponibilidade de mão-de-obra, áreas disponíveis para o plantio de forrageiras, disponibilidade de capital a ser investido pelo pecuarista e preço da arroba do boi gordo na hora da venda.

PASTAGENS (ALIMENTAÇÃO)

O Estado do Paraná, de acordo com dados do IBGE, conta com uma área de aproximadamente 6,7 milhões de hectares destinados a pastagens. Segundo o Censo Agropecuário de 1995, cerca de 1,4 milhões de hectares são formados por pastagens nativas e 5,3 milhões de hectares por pastagens plantadas.

As pastagens paranaenses cultivadas, dividem-se em espécies de inverno e verão. As variedades tropicais mais encontrados são: as braquiárias, o capim colonião e as hermátrias, localizadas em todo o território estadual. Porém mais ao norte do Estado, espécies como braquiárias e colonião desenvolvem-se melhor, devido ao clima e tipo de solo favorável.

No Sul do estado, devido as constantes baixas temperaturas e a forte incidência de geadas, que ocorrem no inverno e que reduzem quase a zero as variedades de verão e as espécies nativas, os pecuaristas que exploram economicamente sua produção, são praticamente obrigados a utilizarem as forrageiras de inverno na alimentação dos seus rebanhos, ou utilizarem outras estratégias, como a produção de feno, silagem ou rações concentradas. As pastagens de inverno mais utilizadas são a aveia e o azevém, cultivares resistentes ao frio e que possuem altos níveis de proteína, fazendo com que se torne possível a engorda de bovinos, a campo, durante a entressafra. As gramíneas de inverno também se desenvolvem em regiões ao Norte, Oeste e Sudoeste do Estado, sendo que nestas regiões de temperaturas mais elevadas, a aveia desenvolve-se melhor, por ser mais precoce e resistente ao calor. Também ao Sul do Estado é muito comum a presença dos chamados invernistas, produtores que compram bois magros na época de entressafra e engordam em pastagens de inverno, levando ao mercado animais pesados e terminados a pasto, ao fim da estação fria a preços compensatórios, já que nesta época é reduzida a oferta de animais no restante do país.

TÉCNICAS UTILIZADAS NA REPRODUÇÃO

O Estado do Paraná, está entre os mais evoluídos, quando falamos em aspectos reprodutivos e tecnologias usadas no processo de reprodução animal.

Muitos são os criadores, que já há algum tempo, fazem uso de técnicas como a Inseminação Artificial, sendo que o próprio Governo atua nesta área, incentivando o uso dessa técnica através do Programa de Inseminação Artificial (PIA), voltado para o melhoramento genético do rebanho leiteiro. Também órgãos como o SENAR, proporcionam cursos de I.A voltados especialmente a produtores rurais.

A utilização da Inseminação Artificial, no Paraná, já foi consagrada, e os produtores que utilizam a técnica a realizam com grande sucesso. Outras técnicas reprodutivas, embora utilizadas em menor escala, como a Transferência de Embriões, a Fertilização “in vitro” (FIV) e métodos de sincronização do cio, também estão se difundindo no Estado, sendo realizadas por várias empresas especializadas no setor e em propriedades particulares, que buscam aperfeiçoar cada vez mais a genética de seus rebanhos, conseqüentemente aumentando a produtividade e lucratividade do empreendimento.

Vantagens da Inseminação Artificial e da Transferência de Embriões

Vantagens da IA	Vantagens da TE
Elimina a necessidade de touro na propriedade	Difusão rápida de material genético superior
Elimina riscos de contaminação por doenças sexualmente transmissíveis	Máximo aproveitamento da matriz doadora, maximizando o número de descendentes em sua vida produtiva
Difusão rápida de material genético de qualidade	Produção rápida de descendentes de matrizes superiores geneticamente
Maior controle reprodutivo e genético do rebanho	Recuperação relativamente rápida do capital investido
Acesso fácil ao material genético superior de várias partes do mundo	Utilização de receptoras na gestação, poupando a matriz pura do desgaste por prenhezes constantes
Aumento da heterose através do cruzamento entre as mais variadas linhas genéticas	Condições de armazenamento de material genético praticamente pronto

Fonte: SEAB/DERAL/DCA

RAÇAS E CRUZAMENTOS UTILIZADOS

A principal raça bovina de corte criada no Brasil é a nelore (origem indiana), sendo que estes animais correspondem a aproximadamente 70% do rebanho brasileiro. No Estado do Paraná, a raça nelore predomina nas regiões mais quentes como: Norte e Oeste. Na região mais ao Sul do Estado também existem rebanhos de animais da raça nelore, porém em menor quantidade que nas regiões mais quentes já citadas, sendo que nas regiões mais frias do Estado, predominam raças de origem européia como a Charolesa, Aberdeen e Red Angus, Simental, Limousin, e seus produtos provenientes do cruzamento com matrizes nelore, o chamado Cruzamento Industrial.

ASPECTOS SANITÁRIOS

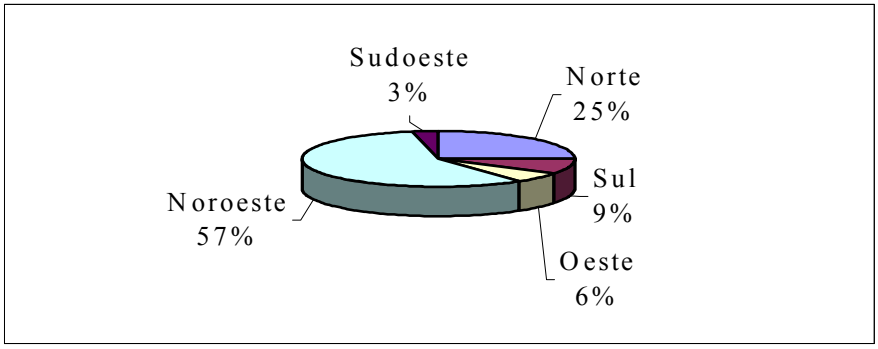
O Estado do Paraná está avançando, no que diz respeito ao controle de doenças e da sanidade de seus produtos de origem animal. Segundo o DEFIS (Departamento de Fiscalização /SEAB-PR), há quase cem meses não são registrados casos ou focos da Febre Aftosa. Graças ao trabalho de fiscalização e das campanhas semestrais de vacinação, o Estado conquistou a posição de área livre de febre aftosa com vacinação, junto ao Ministério da Agricultura e Escritório Internacional de Epizootias – OIE. Na campanha de vacinação realizada no mês de novembro de 2002, foram vacinadas 9.720.000 cabeças. No mesmo mês, do ano de 2003, foram registradas 10.278.876 cabeças vacinadas, o que representa 98,77% do rebanho total. As campanhas de vacinação da febre aftosa, mobilizam, no Estado, aproximadamente 530 funcionários.
A brucelose é outra patologia que tem sido alvo de controle no Estado, sendo que desde janeiro de 2002 a vacinação é obrigatória para bezerras entre 03 a 08 meses de idade, sendo que estas devem ser vacinadas por um Médico Veterinário credenciado pela SEAB. Depois da vacinação, a bezerra vacinada deve receber a marcação “V” seguida do ano da vacinação a ferro na face. Se o exame do animal for positivo, este deve receber a marca “P”, na face, e posteriormente ser encaminhado para abate inspecionado.

Além do controle e vacinação obrigatória, realizada pelos órgãos governamentais competentes, o que se observa no Paraná é uma grande conscientização por parte dos produtores em garantir a saúde dos seus rebanhos, sejam eles pequenos, médios, grandes ou de subsistência, sendo que além do controle das patologias citadas, existe ainda o controle de outras patologias e de parasitas internos (verminoses) e externos.

PARQUE INDUSTRIAL

As maiores "plantas" aproximadamente 21 (vinte e um) encontram-se estratégicamente localizadas, nas regiões noroeste e norte. A capacidade instalada, nas mesmas, que são consideradas de grande porte ou seja entre 500 e 1000/cab/dia, perfazem um total de aproximadamente 6.900 cab/dia.

CARNE BOVINA – PARANÁ – DISTRIBUIÇÃO DAS PLANTAS INDUSTRIAIS – 2001



Fonte: SEAB – DERAL

As pequenas e médias unidades frigoríficas em número de 67 (sessenta e sete) com registro no SIP (Serviço de Inspeção do Paraná), têm a capacidade instalada total/dia de 2.300 cabeças. Desta forma a capacidade instalada total dia é da ordem aproximada de 9200/cab/dia.

PERSPECTIVAS DA BOVINOCULTURA NO ESTADO DO PARANÁ

Como já foi descrito anteriormente a pecuária paranaense passa por um período onde ocorrem diversas mudanças em todos os segmentos da cadeia produtiva. Atualmente cada vez mais os produtores vêm se especializando na atividade e implantando em seus rebanhos novas tecnologias e modernizando aspectos de manejo, nutrição, sanidade e genética. Estas ações nos levam a acreditar na formação de um novo cenário para a bovinocultura paranaense, onde a tendência é de que se diminuam o número de produtores, e que ocorra aumento do número de cabeças devido a maior profissionalização dos pecuaristas que continuarem no setor. Sendo que os pecuaristas que não acompanharem esta evolução, e permanecerem com baixos índices de produtividade, realizando ainda a pecuária tradicional com ciclo ao redor de quatro anos, não conseguirão se sustentar na atividade e serão engolidos pelos mais especializados. A previsão é de que a pecuária evolua em qualidade, tecnologia e quantidade de animais.

BASE GENÉTICA BRASILEIRA PARA SER MULTIPLICADA

Nelson Pineda
Diretor da ABCZ – Vice-presidente internacional do SIC. pineda@terra.com.br

A reprodução consciente e ética do material genético provado que temos à disposição é a responsabilidade dos especialistas em reprodução animal.

INTRODUÇÃO

Grandes transformações aconteceram ao longo dos últimos de cem anos, mudanças tecnológicas e sócio-econômicas que também modificaram a visão do melhoramento animal para este início de milênio. O componente mercado determina novas variáveis que estão sendo definidas para serem incorporadas nas equações clássicas. Métodos para incorporar informação genômica, a clonagem e técnicas baseadas em manipulação de gametas e embriões estão sendo viabilizados comercialmente, porém os conhecimentos gerados pela coleta simples e meticulosa de dados continuam sendo a base do melhoramento animal (Montaldo & Barria, 1998). Neste panorama o Brasil hoje se consolidou como o país com o maior potencial de crescimento em produção de carne bovina e primeiro exportador mundial. Uma análise do passado, da realidade atual e das novas tendências mostra que o Brasil possui os principais componentes de competitividade internacional: baixo custo de produção e domínio tecnológico do processo. Os criadores ao mesmo tempo pressionados por outros paradigmas procuram alternativas para os novos cenários que demandam qualidade, segurança sanitária, rastreabilidade e certificação. É necessário pensar como aproveitar e combinar melhor as variáveis econômicas, as exigências dos consumidores e quais são os critérios que permitem escolher o material genético que deverá ser multiplicado, a fim de aumentar a lucratividade, porém sem esquecer as limitações impostas pelos sistemas de produção e a necessidade de produzir a baixo custo de forma ecologicamente correta carne bovina sempre atendendo as novas exigências e tendências mercadológicas (Pineda, 2000).

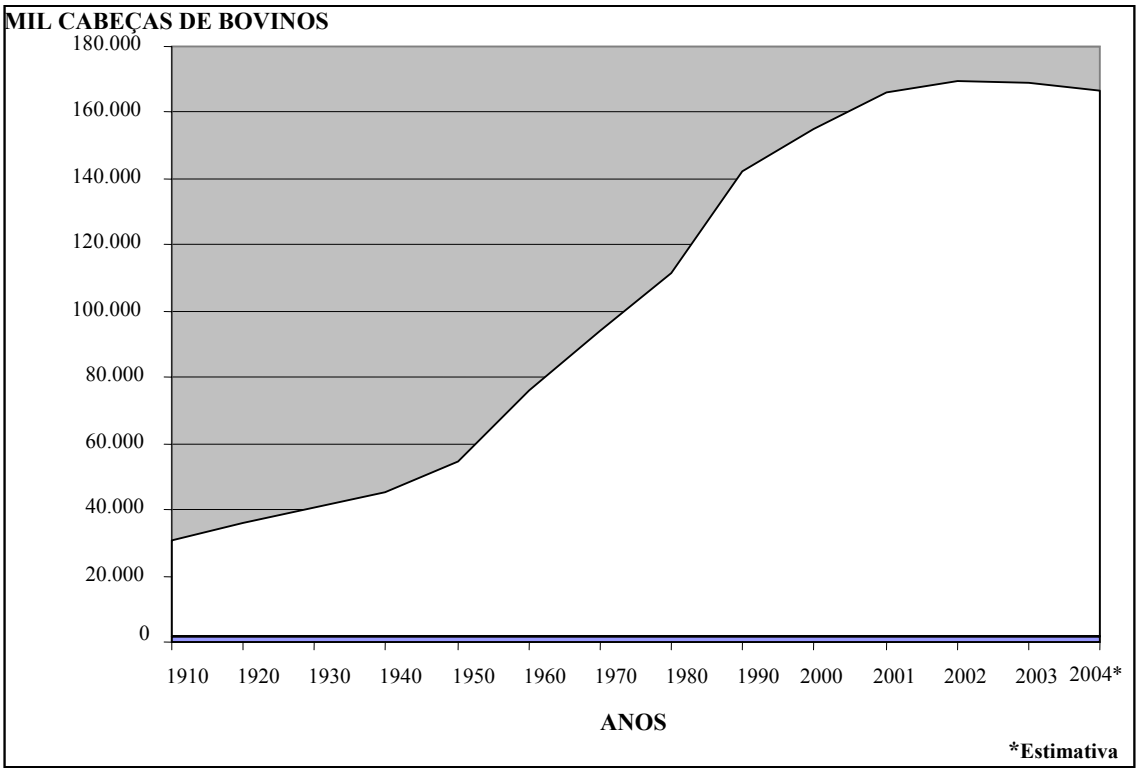
O REBANHO BOVINO BRASILEIRO DE 1904 AO ANO 2004

A produção de carne do país no começo de século passado apoiava-se em animais nativos, descendentes daqueles trazidos por colonizadores, que sofreram o longo processo de adaptação ao meio ambiente, durante o qual adquiriram novas características, constituindo assim novos biótipos. Os reprodutores de raças européias acabaram transformando-se, no suceder de gerações, em exemplares mirrados, de muita cabeça, chifres longos, muita perna e pouco corpo. O gado destinado ao abate tinha pouca musculatura, baixo rendimento de carcaça e era mal conformado. O aumento demográfico do rebanho realizava-se lentamente com características típicas do extrativismo pecuário (Santiago, 1970). Já em 1930, o cruzamento das raças indianas com as raças nativas distinguia-se pelo maior desenvolvimento, resistência às doenças, a capacidade de aproveitamento das pastagens e, sobretudo, um maior rendimento de carcaça.

Das importações de zebuínos realizadas pelos criadores brasileiros, foi a de 1920 que trouxe o maior contingente, num total de 804 cabeças. O governo brasileiro proibiu as importações em 1921. Após esta interdição foram permitidas quatro importações com licença especial e obrigatoriedade de quarentena em 1930, 1952, 1960 e 1962. Entre a década de 60 e até o final do século XX, o rebanho bovino brasileiro tinha crescido

175% com destaque para a região Norte (1367%) e o Centro-oeste (368%) do país (IBGE, 1962; FNP, 2004).
Santiago (1970) reporta que o total de zebuínos importados até o ano de 1970, foi de 6.262 animais em diferentes épocas e que entraram principalmente para os Estados de Rio de Janeiro, Bahia e Minas Gerais. Neste mesmo período a importação de taurinos estava estimada em oitocentas mil cabeças. Hoje, mais de 80% do rebanho nacional tem sangue de Zebu com forte destaque para a raça Nelore, responsável por 80% dos animais oficialmente controlados pela ABCZ (ABCZ/SUT/SDG, 2004).
O gráfico 1 mostra o impacto da importação de zebuínos sobre o crescimento demográfico bovino no Brasil. O rebanho brasileiro estará projetado em aproximadamente 165 milhões de cabeças para o ano 2004; estimando-se que 80% dos animais tenham genes de origem zebuína**,** seriam 132 milhões de cabeças de zebuínos. É um número impressionante que, mesmo sem precisão matemática, demonstra o poder de sobrevivência, crescimento e multiplicação das raças zebuínas nas nossas condições, sobretudo partindo de um núcleo inicial tão pequeno. Se pensarmos em termos de gado Nelore e de reprodução, teríamos o número de 30 a 35 milhões de fêmeas a serem servidas na próxima estação de monta. "Não existe população de gado de corte como a do Nelore; não existe outra população relativamente homogênea de 25 milhões de vacas produzindo em ambientes bastante diversificados e geralmente estressantes." (Fries, 1997).

Gráfico 1- Crescimento da população bovina do Brasil (IBGE, 1969; Santiago, 1970; **FNP,** 1994-2004)



O REBANHO BRASILEIRO NO CONTEXTO MUNDIAL

Outras análises publicadas no *Annuaire OFIVAL,* (2003) apontam que o rebanho mundial bovino não apresentou crescimento significativo. A expansão dos rebanhos chinês (+2%) e brasileiro (+1.5%) foi compensada com a diminuição dos rebanhos

australiano, americano, russo e europeu. A maior retração de rebanho foi sem dúvida na Austrália, em conseqüência da forte seca que assolou este país em 2002. Os rebanhos argentino e uruguaio se mantiveram praticamente estabilizados, com um pequeno aumento da produção de carne da ordem de 4,7% e 1,8% respectivamente. Os preços internacionais, a reconstituição dos rebanhos após os casos de febre aftosa e a melhoria da economia interna tem ajudado no reposicionamento internacional destes países.

O aspecto sanitário no mundo mudou os atores no mercado mundial. O ano 2003 foi marcado pela aparição de casos de EEB no Canadá e nos Estados Unidos, como também os casos de febre aftosa no norte da Argentina. Após a alta sensível registrada nos abate mundial (+2,8%) em 2002, este teve uma retração (-0,4%). Neste cenário o Brasil aumentou sua produção (+3,3%) alavancado pela forte alta dos preços da carne brasileira no exterior. Houve uma elevação dos preços médios pagos pela carne bovina brasileira no mercado internacional, beneficiando a balança comercial do setor. Em abril deste ano, o preço médio pago pela carne bovina *in natura* exportada foi de US$ 2.186,00 a tonelada, 35,8% a mais que o valor de US$ 1.610,00 vigente em abril de 2003. O preço médio da carne industrializada foi de US$ 2.157,00 por tonelada, no mês passado, um aumento de 14,5% na comparação com US$ 1.883,00 que vigorava em abril, enquanto que os preços pagos aos produtores caíram (Tabela 1). Nos últimos quatro anos a oferta de carne brasileira aumentou 12% com crescimento acentuado do gado da raça Nelore no centro-oeste do país. A China teve também no abate um crescimento sensível (+3%), enquanto que a Austrália, Nova Zelândia, USA, Rússia e a União Européia diminuíram suas taxas de abate.

O Brasil aumentou suas exportações ao Oriente Médio ocupando os espaços deixados pelos exportadores europeus. O Egito foi o principal comprador de carne bovina brasileira neste primeiro quadrimestre, com aquisições de US$ 69,16 milhões (119,7% a mais que as importações de US$ 31,5 milhões em igual período do ano passado), em segundo lugar ficou o Chile, responsável por compras de US$ 63,4 milhões de carne bovina brasileira entre janeiro e abril de 2004 (60,4% a mais que os US$ 39,5 milhões no mesmo período do ano passado). Para a Comunidade Européia as exportações também aumentaram, mesmo com altas taxas tarifárias, o mesmo ocorrendo com a Rússia. Porém os mercados americano e do sudoeste asiático continuam fechados para o país por motivos sanitários.

O sistema de produção de carne bovina que domina o cenário brasileiro está baseado no binômio Nelore-Capim, o que permite sem dúvida o mais baixo custo de produção de carne bovina no mundo como mostra a Tabela 1. A maior vantagem competitiva da carne brasileira é seu custo frente aos maiores competidores internacionais e possivelmente a única que permitirá competir com a carne de frango em nível mundial.

TABELA 1- Preços pagos aos produtores dos maiores exportadores mundiais*

	1999	2000	2001	2002	2003	1999/2003
Argentina	1.436	1.582	1400	855	1200	-12,9
Austrália	1.460	1532	1.638	1.580	2.115	+43,8
Brasil	1.230	1.480	1.250	1.100	1.250	+2,4
EU	2.555	2.269	1.873	2.086	2.449	+2,5
USA	2.622	2.764	2.896	2.680	3.407	32,3

Fonte: FAO, *Gordon International Research Institute, 2003. In: Annuaire OFIVAL, 2003.*. *US$/Ton.

O DESAFIO DE CONSOLIDAR A LIDERANÇA

As exportações do complexo carne bovina tiveram um excelente desempenho no ano de 2003, ocupando o segundo lugar no ranking das exportações do agronegócio. De janeiro a setembro do ano passado as receitas do setor, incluindo as vendas externas de couro, alcançaram US$ 4,68 bilhões, com acréscimo de 17,7% sobre o valor exportado de US$ 3,97 bilhões, registrado no mesmo período do ano anterior. As exportações de carne bovina cresceram 33,7%, chegando a US$ 1,04 bilhão, contra US$ 779,1 milhões em vendas externas, em igual período de 2002. (CNA, 10/2003)

O Brasil conseguiu no último ano um resultado bem além das previsões mais otimistas. Sem dúvida a competência do setor frigorífico e da nossa pecuária de maneira geral tiveram um papel importante, no entanto é necessário admitir que, num cenário internacional de retração de consumo, alguns acontecimentos circunstanciais afetaram os nossos maiores concorrentes e várias crises sanitárias ajudaram a configurar um ambiente de oportunidades para a carne brasileira. Hoje, o grande desafio é consolidar estas vantagens competitivas e determinar na própria cadeia produtiva onde queremos chegar na próxima década, o que deve ser feito a partir do cenário atual demarcado pelos diagnósticos disponíveis e pelas tendências que já podem ser identificadas. Este é um exercício difícil, mas que tem o mérito de fixar metas de curto prazo, superando os problemas imediatos que sempre parecem insuperáveis (Farina & Zylbersztajn, 1999). Sem dúvida a competitividade do agronegócio da carne bovina passou a depender fortemente da aplicação da ciência e da tecnologia, assim como da qualidade da informação, da capacidade de transformar os conhecimentos gerados em estratégias de gestão e, sobretudo, na capacidade de coordenação dos processos desde a produção até o consumo interno e acesso aos mercados globais, passando pela industrialização, logística de distribuição, varejo e exportação. Nesse ambiente dinâmico, os preços relativos, os custos, enfim, as vantagens comparativas, constituem informação de extrema importância, mas são insuficientes para traçar estratégias de inserção ativa na competição internacional.

A carne bovina brasileira continuou neste início do ano 2004 sua rota de sucesso no mercado internacional, obteve receita de US$ 666,9 milhões com exportações de carne bovina entre janeiro e abril deste ano, o que representa um crescimento de 54,85% sobre o total de US$ 430,7 milhões registrados em igual período do ano passado. O volume total exportado também cresceu, somando 502,7 mil toneladas exportadas nos primeiros quatro meses deste ano, frente a 420,6 mil toneladas no primeiro quadrimestre de 2003, o que representa aumento de 19,5%. O cálculo leva em conta o conceito de equivalente-carcaça, somando o total de carne bovina *in natura* e industrializada exportada. Somente em abril de 2004, as exportações de carne bovina atingiram 136 mil toneladas, com receitas de US$ 184 milhões, contra 108 mil toneladas que o Brasil exportou em abril do ano passado, rendendo US$ 111,5 milhões (CNA, 05/2004).

Algumas tendências, como a utilização de biotecnologias da reprodução em grande escala, além do crescente papel da informação, já podem ser percebidas: a organização da produção vem sofrendo profundas e rápidas transformações, a concorrência ganhou dimensão global, tudo isso em meio a uma evolução tecnológica sem precedentes. Uma vez identificadas, as formas específicas com que tais tendências aparecem para a cadeia produtiva da carne bovina brasileira, será possível conceber um conjunto de ações que viabilizem o aproveitamento de oportunidades de crescimento ímpares para o Brasil nesta década.

OS ÚLTIMOS CINQÜENTA ANOS DE MELHORAMENTO GENÉTICO

A partir da década dos anos sessenta princípios básicos de melhoramento genético começaram a ser aplicados. Investimentos vindos de outras áreas alicerçaram uma visão diferente da pecuária extensiva. As limitações da seleção fenotípica estavam atingindo o seu auge. Tornava-se imperioso somar as informações de genealogia, dados de produção e desempenho individual. Incentivaram-se provas de ganho de peso, iniciou-se o controle de desenvolvimento ponderal em 1968, surgiram os primeiros testes de progênie e em 1974 foi lançado o Projeto de Melhoramento Genético da Zebuinocultura (PROZEBU) dentro do Programa Nacional de Melhoramento Zootécnico (PRONAMEZO). A cooperação entre criadores e institutos de pesquisa estreitou-se e começou a dar os seus primeiros frutos consistentes em programas de avaliações abrangentes. A partir da década de 80, duas iniciativas se destacaram nesta fase: o lançamento do primeiro sumário nacional de touros avaliados pela metodologia de modelos mistos num convênio EMBRAPA-ABCZ (Rosa et al., 1987) e a primeira avaliação genética na raça Nelore utilizando a metodologia do modelo animal pela USP em Ribeirão Preto (Lôbo, et al., 1993). Neste período surgiram as grandes centrais de inseminação e de transferência de embriões e também se implantaram projetos de seleção maçal. O processo de modernização avançou e em 1994 o PROZEBU deu espaço ao Programa de Melhoramento Genético do Zebu (PMGZ), já na época com mais de quatro milhões de pesagens, constituindo possivelmente o maior programa de avaliação genética do mundo, atualmente com mais de cinco milhões e duzentas mil pesagens e quase um milhão de produtos avaliados (ABCZ/SUT/SMG, 2004) somente na raça Nelore. Dez programas nacionais de avaliação genética da raça Nelore, envolvendo quase um milhão seiscentos mil produtos e 3500 propriedades, mostram hoje a importância deste rebanho. (Tabela 1)
Silva et al. (2002), a partir dos dados da Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ) entre os anos de 1965 a 2001, avaliaram as tendências genéticas de características de crescimento pré e pós desmama na raça nelore. As tendências genéticas foram obtidas regredindo-se os valores médios anuais das DEPs sobre o ano de nascimento dos animais. A análise da regressão permitiu concluir que houve importantes mudanças genéticas ($P<0.01$) não só sobre as características pré e pós desmama, mas também sobre as de eficiência reprodutiva. Foi observado também que a mudança de mérito genético para características pré desmama tiveram um importante componente genético maternal ($P<0.02$). Os coeficientes de regressão expressos em termos de unidades de desvio-padrão das DEPs resultaram em incrementos anuais de 1,1930% para peso a desmama (efeito direto) e –0,1261% para peso a desmama (efeito materno). Para ganho de peso pré desmama as tendências anuais foram de 3.0695% (efeito direto) e de -4,6350% (efeito maternal). Para as demais características peso ao sobre-ano, ganho pós desmama, idade ao primeiro parto, intervalo entre 1º e 2º partos e intervalo entre os demais partos, os incrementos anuais foram de: 1.2007%, 1.8838%, -1.2782%, -2.0086% e -0.5333%, respectivamente. Os pesos médios a desmama e ao sobre-ano foram, respectivamente, 183.73 e 240.76 kg. Os ganhos médios diários de peso pré e pós desmama: 644.61 e 342.13 g/dia. De uma forma geral, esta análise permite concluir que existiram ganhos genéticos positivos para a maioria das características observadas o que indica que o rebanho da raça Nelore no Brasil tem uma base genética de boa qualidade a ser multiplicada através de técnicas de biotecnologia.

Tabela 1 - Número de animais da raça Nelore avaliados geneticamente no Brasil, em 2003, de acordo com o programa de melhoramento[1] (Rosa, 2004).

Programa	Touros Avaliados	Matrizes Ativas	Produtos Avaliados	Matriz de Parentesco	N. Re-banhos	Atuali-zação
ABCZ-Embrapa-MAPA	20.456	439.647	958.795	1.445.800	1.441	2003
USP	14.652	90.664	67.579[b]	603.134	298	2004
CFM	1.200	17.000	13.000[b]	420.000	3	2004
Aliança (Gensys)[a]	3.296	146.499	318.612	468.407	206	2003
Embrapa-Geneplus	8.635	121.605	193.515	312.454	109	2003
ATJ- Embrapa	231	24.884	15.671	28.585	84	2003
PAINT (Lagoa)	433	68.715	99.694	337.684	60	2004
Repr. Programada (USP)	232	16.320	12.240[b]	603.134	298	2004
ATJ - Nova Índia (USP)	42	3.264	2.448b	603.134	298	2004
ATJ - Touros do Futuro	30	4.500	1.920	6.450	10	2004
Total	49.207	786.599	1.588.207	4.360.375	2.601	-

[a] inclui todos os animais da base de dados, incluindo 98 rebanhos do Paraguai;

[b] produtos avaliados por ano.

PERSPECTIVAS PARA ESTA DÉCADA

Uma apreciação da evolução da nossa pecuária durante o último século revela um quadro otimista mesmo quando comparado aos nossos grandes concorrentes. O ponto fundamental para continuar neste caminho é manter o bom desempenho no próximo milênio, passando pelo aprofundamento daquilo que já iniciamos. O desempenho da pecuária contribuiu de forma determinante para que o PIB do agronegócio brasileiro fosse o único a crescer de forma substancial em 2003 (5%). Imaginemos o Brasil mergulhado numa economia internacional mais aberta, onde tem pouco a temer e muito a construir, com os passivos econômicos liquidados, com uma população estabilizada em 200 milhões de habitantes vivendo em condições humanas aceitáveis e uma pecuária fora do circuito aftósico, produzindo carne de boa qualidade essencialmente a pasto, com custos de produção 60% mais baixos dos praticados na Austrália, 40% nos EUA, 30% na Argentina e na CEE (McKINSEY & COMPANY, 1999). Possivelmente é o único sistema de produção de carne bovina no mundo capaz de competir, também em preço, com a indústria do frango e está em condições de participar com 20% do PIB, tem um tamanho de rebanho que constitui por si só um forte chamariz, aliado a condições ambientais e uma vocação inata da população rural para a atividade (Fries, 1997). Este panorama promissor e não muito distante deverá passar necessariamente por um programa de coordenação capaz de unir setores, regiões e grupos envolvidos com o objetivo comum de atingir um equilíbrio justo entre competição e cooperação dos elos da cadeia produtiva da carne, através de ações sinérgicas que se reforcem mutuamente. Quantos grupos internacionais não estão hoje interessados em participar da concretização deste panorama? Estas ações deverão partir de alguns princípios:

- Mudança de mentalidade. Desistir dos modismos e de procurar soluções em ambientes de produção completamente diferentes ao Brasil tropical; compreender que investimentos em nutrição estratégica e gerenciamento com níveis de rentabilidade crescente nas fazendas, baseados em melhoria dos sistemas de

produção a pasto, com custos extremamente competitivos, conjuntamente com o uso de genética aditiva e predominantemente nacional trarão benefícios maiores que procurar implantar novas raças baseadas em fortes apelos de marketing.

- Uso de tecnologia própria. Desistir de nacionalizar conhecimentos alheios a nossa realidade e iniciar o processo de geração e transferência de tecnologia através de entidades públicas com forte estrutura científica/acadêmica, com cursos dirigidos para o mercado e programas de educação contínua, não somente para o pecuarista, como também em todos os pontos críticos da cadeia produtiva de carne.
- Utilização da inteligência competitiva para construção de estruturas organizacionais que miniminizem os atritos entre os elos da cadeia produtiva e facilitem os ganhos sistêmicos no processo e levem à satisfação dos consumidores.
- Exploração máxima das vantagens comerciais do setor, sendo acompanhadas e potencializadas pelos avanços tecnológicos que o país tem desenvolvido nos últimos anos.
- Implantação de sistemas de defesa animal, certificação e rastreabilidade, capazes de garantir a bio-segurança dos consumidores.
- Desenvolvimento de campanha de marketing permanente da carne de Zebu com fortes apelos à carne bovina magra, produzida a pasto de forma ecologicamente correta e sustentada.
- Formação de negociadores internacionais competentes, que não sejam simples burocratas, mas que conheçam profundamente o agronegócio e a realidade dos produtores rurais.
- O melhoramento genético deixou de ser na pecuária brasileira um assunto puramente acadêmico para transformar-se em um importante agente de transformações, será necessário criar consciência de que existem ferramentas disponíveis para escolher de forma objetiva o material genético que deve ser multiplicado tendo como objetivo primordial a maximização das produções de carne e leite no país.

Finalmente, todos os que estamos ligados à produção primária no país deveremos nos conscientizar de que a pecuária não é uma simples atividade econômica. A nossa pecuária tem importância estratégica, significa ocupação espacial produtiva de parte de nossas fronteiras, cria condições para o estabelecimento de novas comunidades e propicia diversificadas fontes de trabalho na sua amplitude multifacetária; viabiliza oportunidades para o empreendimento familiar e transforma a produtividade de pequenas e médias propriedades rurais, particularmente quando há uma integração sinérgica com a agricultura, sendo a grande resposta para uma reforma agrária pacífica, modular e socialmente justa dentro da realidade nacional. A reprodução consciente e ética do material genético provado que temos à disposição é a responsabilidade dos especialistas em reprodução animal. É simplesmente isto que o Brasil espera de vocês.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUALPEC**. Anuário da Pecuária Brasileira-FNP**, FNP Consultoria & Comércio. São Paulo. 1994-2004.

CNA - **Confederacão Nacional da Agricultura e Pecuária do Brasil**. www.cna.org.br. 2004.

FRIES, L.A.; Perspectivas da pecuária brasileira dentro do contexto mundial. In: **IV SIMPÓSIO: O NELORE DO SÉCULO XXI**,1997, Uberaba. MG, **Anais...,** 1997, p.188.

I.B.G.E., **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. Recenseamento e Anuários Gerais do Brasil. Rio de Janeiro, 1950-1969.

McKINSEY & COMPANY; Desenvolvimento dos Programas para o "Cluster" da pecuária de corte do Triângulo Mineiro. In: Palestra proferida na ABCZ, 1999.

MONTALDO, H. & BARRÍA, N.; Mejoramiento Genético de Animales. http: // hmontaldo_3.html; hmontald@metz.une.edu.au

PINEDA, N. R. Influencia do zebu na produção de carne no Brasil In: **3^0 SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 2000.** Belo Horizonte – MG.. Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal (SBMA), Escola de Veterinária da UFMG. **Anais...,** 2000. p. 130 -149.

LÔBO, R.B.; BORJAS, A. de los. R.; BEZERRA, L.A.F. **Avaliação genética de touros por modelo animal**. Ribeirão Preto: Departamento de Genética, FMRP-USP, 1993. 20p. Relatório de divulgação interna do PMGRN.

ROSA, A. N.; NOBRE, P.R.C.; EUCLIDES FILHO, K. **Avaliação nacional de touros das raças zebuínas 1975/1986** - Gir, Gir Variedade Mocha, Guzerá, Indubrasil, Nelore, Nelore Variedade Mocha, Tabapuã. Campo Grande, MS, EMBRAPA-CNPGC/ABCZ, 1987. 86p. il. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 35).

ROSA, A.N., http://www.cnpgc.embrapa.br/%7Eanrosa/index.html, 2004.

SANTIAGO, A.A.; **Pecuária de corte no Brasil Central**. Instituto de Zootecnia. Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo. 1970, p.635.

SANTIAGO, A. A.; **Gado Nelore: 100 anos de seleção**. Editora dos Criadores. 1987. p.591.

SILVA, L.O.C.; GONDO, A.; NOBRE, P.R.C.; EUCLIDES FILHO, K.; ROSA, A. N.; JOSAHKIAN, L.A.; FIGUEIREDO, G.R. Genetic Trends in Nellore Breed in Brazil. In: VII World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Montpellier – France, august 19-23, 2002.

FOLLICULOGENESIS IN CATTLE

J.P. Kastelic
Lethbridge Research Centre, Box 3000, Lethbridge, AB, Canada T1J 4B1

PRENATAL FOLLICULAR GROWTH

Development of oocytes and follicles begins in utero. Primordial germ cells proliferate by mitosis to form primary oocytes; the first meiotic prophase starts between Days 75 and 80 of pregnancy (Erickson, 1966). At the diplotene stage of meiosis (approximately Day 170) a primordial follicle forms; the oocyte is surrounded by a single layer of 4–8 pre-granulosa cells. The oocytes of these primordial follicles remain in the resting phase until they are stimulated to grow (Erickson, 1966). Factors regulating formation of primordial follicles are not well known (Fair, 2003).
Primordial, primary and secondary follicles appear in the fetal ovary on Days 90, 140 and 210, respectively (Russe, 1983). Activation of follicle growth is characterized by the acquisition of a complete layer of 11–20 cuboidal granulosa cells around the oocyte, forming the primary follicle (Hulshof et al, 1992). A secondary follicle is characterized by the addition of a second layer of granulosa cells (Driancourt, 1991), the initial deposition of zona pellucida material, formation of cortical granules within the oocyte cytoplasm (Fair et al, 1997a), onset of oocyte RNA synthesis (Fair et al, 1997b), and gonadotrophin responsiveness (Fair, 2003). The transition to the tertiary follicle includes development of the theca interna and externa, the basal lamina and cumulus cells, as well as the formation of a fluid-filled antral cavity (Driancourt, 1991).

POSTNATAL FOLLICULAR GROWTH AND PUBERTY

Follicular growth in prepubertal heifers occurs in waves; each wave is preceded by a peak in serum FSH concentrations (Adams et al, 1992; Adams et al, 1994; Fortune, 2004). Waves are present in heifers at 2 weeks of age (Evans et al, 1994). Numbers of small, medium and large follicles (3–5, 6-8 and (≥9 mm in diameter, respectively) and diameter of the largest follicle all increase from 2 to 14 weeks of age. Between 6 and 24 weeks of age, there is a marked but transient increase in blood concentrations of both LH and FSH (Evans et al, 1992; Evans et al, 1994; Honaramooz et al, 1999). The release of LH is pulsatile; the early increase is attributed to increased LH pulse amplitude. Thereafter, serum concentrations of LH and FSH decrease. However, 30-80 days before the first ovulation (Evans et al, 1994; Melvin et al, 1999), increases in LH pulse frequency result in increases in follicle diameter and serum estradiol concentrations, culminating with the first ovulation. Conversely, serum FSH remains relatively stable (Evans et al, 1994). Heifers usually do not express estrus prior to their first ovulation, the corpus luteum is small, and may be short-lived (Berardinelli et al, 1979). This short cycle is usually followed by estrus and a normal, full-length luteal phase.
Although growth of ovarian follicles in the young calf is apparently stimulated by gonadotropins, mechanisms controlling gonadotropins are not well understood (Rawlings et al, 2003). Early increases in gonadotropins seem to be subsequently suppressed by negative feedback until the heifer is able to successfully reproduce. Although estradiol appears to be the primary negative feedback agent on LH secretion (acting indirectly through other neuronal systems) in the adult, the initial suppression of

the early post-natal increase in LH secretion may not involve estradiol (Moseley et al, 1984; Day and Anderson, 1998), but rather an estrogen-dependent opioidergic mechanism (Wolfe et al, 1991). From 40–80 days prior to the first ovulation, the sensitivity of LH secretion to negative feedback suppression decreases, allowing LH secretion to increase (increased LH pulse frequency) and enhancing antral follicle development and estrogen secretion. Increasing estrogen concentrations eventually cause a preovulatory LH surge.

GROWTH PHASES

Cattle have two stages of ovarian antral follicle development, a 'slow' and a 'fast' growth phase, respectively (Fair, 2003). The first (slow) phase takes >30 days from antrum acquisition (approximately 300 µm) to the 'small' follicle stage (3–5 mm in diameter; Lussier et al, 1987). The second phase usually takes approximately 5–7 days, and includes emergence of a wave of follicles, follicle growth, selection of a dominant follicle, and a variable dominance period, followed by ovulation or regression.

FOLLICULAR WAVES AND DEVIATION

Follicles develop in waves; on average, 7–11 follicles (4 mm in diameter) are present at follicular wave emergence in cattle. Emergence of a new follicular wave is preceded by a rise in FSH, with wave emergence concurrent with the peak (Adams et al, 1992). Suppression of FSH prevents further growth of 3-5 mm follicles (Turzillo and Fortune, 1990), whereas treatment with exogenous FSH stimulates wave emergence (Bergfelt et al, 1994a). Treatment with FSH (without steroids or LH) results in follicles with limited capacity to produce steroids and lack of selection of a dominant follicle (Crowe et al, 2001). The transient FSH rise stimulates all antral follicles that have completed their 'slow' growth phase; they not only respond, but subsequently depend on elevated FSH for continued cell proliferation and enhanced steroidogenesis. Following emergence of a new wave, follicles grow (common-growth phase) for approximately 3 days; the end of the common-growth phase and the beginning of deviation are synonymous. The future dominant follicle emerges 6 h earlier than other follicles in the wave and is larger than the other follicles at the end of the common-growth phase (Ginther et al, 2003a).
The FSH surge peaks, on average, when the largest follicle is about 5 mm; mean concentrations then decrease, with about a 3-day interval between peak concentrations and the beginning of deviation. Deviation is a distinctive change in growth rates between the developing dominant follicle and the remaining follicles (subordinates). Deviation in individual waves is defined as beginning at the examination before the first examination with an apparent change in the differences in diameter between the two largest follicles. Mean diameters of the two largest follicles at the beginning of deviation were 8.5 and 7.7 mm in heifers (Ginther et al, 2003b). Apparently, when the largest follicle reaches a decisive developmental stage, rapid development of the deviation mechanism blocks development of the second-largest follicle before it reaches a similar diameter. Thus, rather than selection of a dominant follicle, selection involves an action against the other follicles in the wave (Ginther et al, 2003a). It is noteworthy that the destiny of the follicles (dominant versus subordinate) must be established, on average, in <8 hours in cattle (equivalent to a diameter difference of 0.5 mm). All follicles of the common-growth phase have the potential for future dominance. A subordinate follicle

remains viable for at least 1 day after deviation starts; it can become the new dominant follicle if the existing dominant follicle fails or is removed.
During the dominance period, antral follicles completing their first 'slow' growth phase are prevented from embarking on their second FSH-dependent growth phase by the dominant follicle. Loss of dominance during the luteal phase or induced atresia of a dominant follicle that was artificially maintained is followed by increased FSH concentrations and emergence of a new wave (Sunderland et al, 1994). It is noteworthy that administration of FSH when a dominant follice is present does not consistently hasten emergence of the next wave (Adams et al, 1993). In this regard, superovulatory responses are suppressed when cattle are given exogenous FSH during dominance (Bungartz and Niemann, 1994).
Between the peak FSH surge and the start of deviation, all follicles of the wave continue to require FSH and more than one follicle contributes to the FSH decrease. In association with the onset of deviation, the FSH/follicle relationship changes; instead of several follicles requiring FSH, only the dominant follicle continues to grow, despite low FSH concentrations. The FSH decline is necessary for the establishment of deviation; increasing endogenous FSH or administering FSH early in a wave induces several follicles to become dominant. With decreasing serum FSH concentrations, follicles begin to undergo changes, including reduced production of estrogens, reduced levels of higher molecular weight (MW) inhibins and increased amounts of lower MW insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins, culminating in granulosa cell apoptosis (Sunderland et al, 1996; Mihm et al, 1997). In this environment, only the dominant follicle is able to continue to grow and produce steroids. FSH stimulates the production of estradiol, activin-A and inhibin-A (Glister et al, 2001). These FSH-stimulated factors have intrafollicular roles in deviation. Both estradiol and inhibin act alone (as well as synergistically) to suppress blood FSH concentrations. Blood estradiol concentrations begin to increase at the beginning of deviation in cattle (Ginther et al, 2003a). Inhibin (probably inhibin-A) is produced by multiple follicles before deviation and by the developing dominant follicle after the start of deviation and suppresses FSH during the entire FSH decline. The largest and the second-largest follicles at similar diameters had similar follicular-fluid estradiol concentrations during the common-growth phase; increasing concentrations were detected beginning at 7.6–7.7 mm in heifers (Ginther et al, 2003). Estradiol began to increase differentially in the largest follicle 4 h before diameter deviation (Ginther et al, 2003). The differential estradiol increase in the future dominant follicle increases blood estradiol concentrations; these increase the expression of genes for aromatase, 3-beta-HSD, and receptors for FSH and LH in granulosa cells (Bao and Garverick, 1998). Furthermore, estradiol increases its synthesis by upregulating thecal synthesis of androgens in vitro (Wrathal and Knight, 1995).
The IGF system is involved in cell growth and differentiation and consists of IGF-1, IGF-2, IGF receptors, and a family of binding proteins (IGFBPs) and IGFBP proteases (Webb et al, 1999; Fortune et al., 2004). The proteases degrade the IGFBPs, liberating IGF from the IGFBP–IGF complex. Intrafollicular concentrations of IGFBP-2 and free IGF-1 and were lower and higher, respectively in the largest compared to the second largest follicle in heifers (Beg et al, 2001). It appears that an FSH-induced increase in pregnancy-associated-plasma protein-A (PAPP-A) is the earliest change detectable in the future dominant follicle (Fortune et al, 2004). PAPP-A is a protease that degrades IGFBP-4 and IGFBP-5, thereby increasing intrafollicular IGF-I concentrations. Iincreased IGF-I acts together with FSH to increase estradiol synthesis, thereby suppressing plasma FSH concentrations and preventing other (subordinate) follicles from acquiring PAPP-A (Fortune et al, 2004). It is noteworthy that estradiol stimulates

the production of IGF-1 and IGF-1 stimulates the production of estradiol (Ginther, 2003). Both estradiol and IGF-1 increase the gonadotropin responsiveness of the follicle; a mutual augmentation system for estradiol and IGF-1 are critical to increased gonadotropin responsiveness and deviation.
Although the mechanisms are not well known, it appears that LH stimulates intrafollicular steroid and growth-factor systems that are involved in selection (Ginther et al, 2003a). In that regard, granulosa cells of the future dominant follicle acquire LH receptors before selection is apparent, suppression of LH in heifers limited maximum follicle diameter to 7-9 mm in heifers, and a transient increase in blood LH occurs around the time of selection (Ginther et al, 2003a). In addition to FSH, LH is essential to stimulate theca cells to produce androgens (as precursors of estradiol). Reductions in plasma LH prior to selection reduced the growth and lifespan of the CL (Ginther et al, 2001); in that regard, LH was regarded as essential for antral follicles to grow beyond 9 mm in diameter (Gong et al, 1996). Following selection, growth, estrogen production and the lifespan of the dominant follicle are all controlled by the LH pulse pattern (Mihm and Bleach, 2003); atresia of the dominant follicle occurs if LH pulse frequency is <1 pulse/2 hours (Mihm and Bleach, 2003). This has important clinical implications. Treatment with progesterone, GnRH or estradiol result in apoptosis and atresia of the dominant follicle (Mihm and Bleach, 2003). Conversely, increased LH pulse frequency (due to low-dose progestin treatment) cause persistent follicles (Savio et al, 1993; Stock and Fortune, 1993).

DETECTION OF DEVIATION

Observed deviation for individuals is determined in retrospect by inspection of the sequential changes in diameters of the dominant and subordinate follicles. When follicles are grouped in diameter ranges with each animal in a separate group, deviation is indicated statistically by the group that precedes the first group with a significant increase in the differences in diameter between the two largest follicles. A segmented linear regression model has been developed to minimize bias and improve precision by calculating the beginning of deviation in individuals (Bergfelt et al, 2003).

EFFECTS OF CO-DOMINANCE

The occurrence of more than one dominant follicle during a follicular wave in animals that normally ovulate only a single follicle can be considered a defect in the deviation mechanism. Double ovulations are usually due to codominance, but occasionally the follicles originate from different waves. The incidence of double ovulation was much higher in dairy cows with high versus low milk production (20 versus 7%, respectively; Fricke and Wiltbank, 1999). Perhaps the normal increase in blood estradiol concentrations and decrease in blood FSH concentrations at deviation is partially suppressed in lactating cows with high milk production (Wiltbank et al, 2000); in that regard, high milk production increases the rate of steroid catabolism due to increased hepatic blood flow. Due to suppressed blood estradiol concentrations, blood FSH is increased long enough for > 1 follicle to become a dominant and ovulate.

FINAL GROWTH AND OVULATION

Dominant follicles continue to grow for a few days after selection. In the absence of an LH surge, the dominant follicle starts to regress and triggers the recruitment of a new wave of growing follicles. Ultrastructural changes in oocytes have been described (Hyttel et al, 1986; Hyttel et al, 1989). If there is an LH surge the dominant follicle continues to grow and the oocyte within undergoes final maturation, culminating in follicle rupture and ovulation. Final maturation includes expansion of the cumulus cover, disruption of the contact between the corona radiata cells and the oocyte membrane and perivitelline space formation. In the oocyte cytoplasm, lipid content increases but the Golgi compartment decreases. The cortical granules are aligned just inside the oocyte membrane, meiosis resumes and the oocyte nucleus membrane breaks down. The chromosomes condense and progress through the final stages of meiosis I and arrest at metaphase of meiosis II (Hyttel et al, 1986 and Hyttel et al, 1989).

TWO VERSUS THREE WAVES OF FOLLICULAR DEVELOPMENT

Lactating Holstein dairy cows described in recent studies tend to have two-wave cycles (Townson et al, 2002), whereas beef and dairy heifers have discrete populations with a majority of cattle having either either two- or three-wave cycles (Ginther et al, 1989). The peak and average plasma concentrations of FSH and inhibin A are lower in the two non-ovulatory waves of a three-wave cycle than in the ovulatory wave, but are similar in two-wave cycles (Parker et al, 2003). Holstein cows which had a three-wave cycle preceding insemination had higher conception rates than those with two waves (Townson et al, 2002), and beef cows with the equivalent of three waves in the cycle following insemination also had a higher conception rate (Ahmad et al, 1997). Higher fertility in three-wave cycles could be due to a shorter interval for development of the ovulatory follicle (Mihm et al, 1994 and Townson et al, 2002) and/or delayed regression of the corpus luteum in nonbred cattle with three versus two waves (Ginther et al, 1989), thereby providing more opportunity for maternal recognition of pregnancy.

OOCYTE RECOVERY FOR IN VITRO FERTILIZATION

Although IVM and IVF of bovine oocytes is highly successful (80%), only about 30% of oocytes develop to the blastocyst stage (Rizos et al, 2002). Oocytes matured in vivo are more competent than those matured in vitro (van de Leemput et al, 1999 and Rizos et al, 2002). Although various chemical approaches have also been used to artificially maintain meiotic arrest in bovine oocytes (Fair, 2003), pre-maturation culture may be more effective (Pavlok et al, 2000). In a recent study (Blondin et al, 2002), a cohort of large follicles was maintained on the ovary (coasting) for 2 days following final FSH treatment, allowing the oocyte cytoplasm to mature. LH was given 6 h before oocyte recovery (by ovum pick up). Up to 80% of oocytes developed to the blastocyst stage in vitro. Physiological methods of artificially maintaining meiotic arrest in bovine oocytes have involved co-culturing oocytes with different follicle constituents in vitro, with variable success (Sirard, 2001). The inhibitory factor(s) are not characterized but are probably from theca cells (Richard and Sirard, 1996).

B. INDICUS VERSUS *B. TAURUS* CATTLE

A comparison of ovarian function in B. indicus versus B. taurus cattle was recently reviewed (Bó et al, 2003). In general, follicular growth and dominance were similar in B. indicus versus B. taurus cattle. However, maximum diameter of the dominant follicle (10–12 mm) and the CL (17–21 mm) seemed smaller in B. indicus cattle seemed smaller than in B. taurus cattle (14–20 mm and 20–30 mm, respectively; Bo). Furthermore, blood progesterone concentrations were lower in B. indicus than in B. taurus cows (Segerson et al, 1984). The progesterone content of the CL was lower in B. indicus versus B. taurus cattle, perhaps due to a lower response to estrogen, smaller preovulatory LH-surge, and other endocrine differences (Randel, 1984).

In a recent study comparing B. indicus and B. taurus cattle (Bó et al, 2003), the mean maximum diameter of the dominant follicle of the third wave and the CL were significantly smaller in B. indicus versus B. taurus cows. Furthermore, there were significantly more four-wave interovulatory intervals in B. indicus versus B. taurus cows (4/25, 16% versus 0/17). Although four-wave interovulatory intervals have been reported in Brahman and Gyr cattle, they are rare in Nelore cattle (Bó et al, 2003). The mean length of the interovulatory interval was positively correlated to the number of follicular waves. Furthermore, the day of emergence of the second follicular wave tended to decrease as the number of waves per cycle increased (Rhodes et al, 1995a; Bó et al, 2003) and the third follicular wave tended to emerge earlier in B. indicus than in B. taurus cows (Bó et al, 2003). There was a significant interaction between season and subspecies in the growth rate of the dominant follicle of the third wave; the growth rate of the dominant follicle in B. indicus cows was slower in the fall than in the spring (1.1 versus 1.5 mm/day, respectively), whereas the dominant follicle in B. taurus cows tended to grow faster during the fall than in the spring (1.6 versus 1.4 mm/day). Although B. indicus cattle are apparently more influenced by photoperiod than B. taurus cattle, the confounding effects of nutrition must also be considered.

There appear to be more follicles < 5 mm in diameter in B. indicus versus B. taurus heifers (Segerson et al, 1984), as well as differences in ovarian insulin and insulin-like growth factor (IGF). In Nelore heifers (Buratini et al, 2000), although treatment with BST increased both plasma IGF-I concentrations and the number of small follicles (<5 mm), the rate of increase in follicle numbers were lower than those reported in B. taurus. Brahman cows had higher plasma IGF-I concentrations (Simpson et al, 1994, Alvarez et al, 2000) but lower FSH concentrations than Angus cows (Alvarez et al, 2000); perhaps these differences contribute to differences in the number of follicles and/or to the high sensitivity of B. indicus cattle to the dose of FSH used in superstimulation regimens (Barros and Nogueira, 2001).

REFERENCES

Adams, GP, Matteri, RL, Kastelic, JP, Ko, JCH and Ginther, OJ, 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. J Reprod Fertil 94:177–188.

Adams, GP, Kot, K, Smith, CA and Ginther, OJ, 1993. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. Anim Reprod Sci 30:259–271.

Adams, GP, Evans, ACO and Rawlings, NC, 1994. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. J Reprod Fertil 100:27–33.

Ahmad, N, Townsend, EC, Dailey, RA and Inskeep, EK, 1997. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. Anim Reprod Sci 49:13–28.

Alvarez, P, Spicer, LJ, Chase Jr, CC, Payton, ME, Hamilton, TD, Stewart, RE, Hammond, AC, Olson, TA and Wetteman, RP, 2000. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. J Anim Sci 78:1291–1302.

Bao, B and Garverick, HA, 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. J Anim Sci 76:1903–1921.

Barros, CM and Nogueira, MFG, 2001. Embryo transfer in Bos indicus cattle. Theriogenology 56:1483–1496.

Beg, MA, Bergfelt, DR, Kot, K, Wiltbank, MC and Ginther, OJ, 2001. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. Biol Reprod 64:432–441.

Berardinelli, JG, Dailey, RA, Butcher, RL and Inskeep, EK, 1979. Source of progesterone prior to puberty in beef heifers. J Anim Sci 49:1276–1280.

Bergfelt, DR, Plata-Madrid, H and Ginther, OJ, 1994. Counteraction of follicular inhibitory effect of follicular fluid by administration of FSH in heifers. Can J Anim Sci 74:633–639.

Bergfelt, DR, Sego, LH, Beg, MA and Ginther, OJ, 2003. Calculated follicle deviation using segmented regression for modeling diameter differences in cattle. Theriogenology 59:1811–1825.

Blondin, P, Bousquet, D, Twagiramungu, H, Barnes, F and Sirard, MA, 2002. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. Biol Reprod 66:38–43.

Bó, GA, Baruselli, PS and Martínez, MF, 2003. Pattern and manipulation of follicular development in Bos indicus cattle. Anim Reprod Sci 78:307-326.

Bungartz, L and Niemann, H, 1994. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. J Reprod Fertil 101:583–591.

Buratini Jr, J, Price, CA, Visintin, JA and Bó, GA, 2000. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in nelore (Bos indicus) heifers. Theriogenology 54:421–431.

Crowe, MA, Kelly, P, Driancourt, MA, Boland, MP and Roche, JF, 2001. Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth, and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin-releasing hormone-immunized heifers. Biol Reprod 64:368–374.

Day, ML and Anderson, LH, 1998. Current concepts on the control of puberty in cattle. J Anim Sci 76 (Suppl 3):1–15.

Driancourt, MA, 1991. Follicular dynamics in sheep and cattle. Theriogenology 35:55–68.

Erickson, BH, 1966. Development and senescence of the post natal bovine ovary. J Anim Sci 25:800–805.

Evans, ACO, Currie, WD and Rawlings, NC, 1992. Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. J Reprod Fertil 96: 847–855.

Evans, ACO, Adams, GP and Rawlings, NC, 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. J Reprod Fertil 102:463–470.

Fair, T, Hulshof, SCJ, Hyttel, P, Boland, M and Greve, T, 1997a. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. Anat Embryol 195:327–336.

Fair, T, Hulshof, SCJ, Hyttel, P, Boland, M and Greve, T, 1997b. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. Mol Reprod Devel 46:208–215.

Fair, T, 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. Anim Reprod Sci 78:203-216.

Fortune, JE, 2004. Ovarian follicular growth and development in mammals. Biol Reprod 50:225-232.

Fortune, JE, Rivera, GM and Yang, MY, 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. Anim Reprod Sci 82-83:109-126.

Fricke, PM and Wiltbank, MC, 1999. Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. Theriogenology 52:1133–1143.

Ginther, OJ, Knopf, L and Kastelic, JP, 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. J Reprod Fertil 87: 223–230.

Ginther, OJ, Bergfelt, DR, Beg, MA and Kot, K, 2001. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. Biol Reprod 64:197–205.

Ginther, OJ, Beg, MA, Donadeu, FX, and Bergfelt, DR, 2003a. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. Anim Reprod Sci 78:239-257.

Ginther, OJ, Beg, MA, Kot, K, Meira, C and Bergfelt, DR, 2003b. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. Biol Reprod 68:524–529.

Glister, C, Tannetta, DS, Groome, NP and Knight, PG, 2001. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. Biol Reprod 65:1020–1028

Gong, JG, Campbell, BK, Bramley, TA, Gutierrez, CG, Peters, AR and Webb, R, 1996. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. Biol Reprod 55:68–74.

Honaramooz, A, Cook, SJ, Beard, AP, Bartlewski, PM and Rawlings, NC, 1999. Nitric oxide regulation of gonadotrophin secretion in prepubertal heifers. J Neuroendocrinol 11:667–676.

Hulshof, SCJ, Bevers, MM, van der Donk, HA, van den Hurk, R, 1992. The isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. In: Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, vol 1, The Hague, pp 336–338.

Hyttel, P, Callesen, H and Greve, T, 1986. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. J Reprod Fertil 76:645–656

Hyttel, P, Greve, T and Callesen, H, 1989. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. J Reprod Fertil 38 (Suppl):35–47.

Lussier, JG, Matton, P and Dufour, JJ, 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. J Reprod Fertil 81:301–307.

Melvin, EJ, Lindsey, BR, Quintal-Franco, J, Zanella, E, Fike, KE, Van Tassell, CP and Kinder, JE, 1999. Circulating concentrations of estradiol, luteinizing hormone, and follicle stimulating hormone during waves of ovarian follicular development in prepubertal cattle. Biol Reprod 60:405–412.

Mihm, M, Bagnisi, A, Boland, MP and Roche, JF, 1994. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. J Reprod Fertil 102:123–130.

Mihm, M, Good, TEM, Ireland, JLH, Ireland, JJ, Knight, PG and Roche, JF, 1997. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. Biol Reprod 57:1328–1337.

Mihm, M and Bleach, ECL, 2003. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. Anim Reprod Sci 78:217-237.

Moseley, WM, Dunn, TG, Kaltenbach, CC, Short, RE and Staigmiller, RB, 1984. Negative feedback control of luteinizing hormone secretion in prepubertal beef heifers at 60 and 200 days of age. J Anim Sci 58:145–150.

Parker, KI, Robertson, DM, Groome, NP and Macmillan, KL, 2003. Plasma concentrations of inhibin A and follicle-stimulating hormone differ between cows with two or three waves of ovarian follicular development in a single estrous cycle. Biol Reprod 68:822–828.

Pavlok, A, Kanka, J, Motlik, J and Vodicka, P, 2000. Culture of bovine oocytes from small antral follicles in meiosis-inhibiting medium with butyrolactone I: RNA synthesis. Anim Reprod Sci 64:1–11.

Randel, RD, 1984. Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). Theriogenology 21:170–185.

Rhodes, FM, De'ath, G and Entwistle, KW, 1995. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. Anim Reprod Sci 38:265–277.

Richard, FJ and Sirard, MA, 1996. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II. Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. Biol Reprod 54:22–28.

Rizos, D, Lonergan, P, Ward, F, Duffy, P and Boland, MP, 2002. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. Mol Reprod Dev 61:234–248.

Russe, I, 1983. Oogenesis in cattle and sheep. Bibl Anat 24:77–92.

Savio, JD, Thatcher, WW, Badinga, L, de la Sota, RL and Wolfenson, D, 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. J Reprod Fertil 97:197–203.

Segerson, EC, Hansen, TR, Libby, DW, Randel, RD and Getz, WR, 1984. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. J Anim Sci 59:1026–1046.

Simpson, RB, Chase Jr, CC, Spicer, LJ, Vernon, RK, Hamond, AC and Rae, DO, 1994. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular estradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. J Reprod Fertil 102:483–492.

Sirard, MA, 2001. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. Theriogenology 55:1241–1254.

Stock, AE and Fortune, JE, 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. Endocrinology 132:1108–1114.

Sunderland, SJ, Crowe, MA, Boland, MP, Roche, JF and Ireland, JJ, 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. J Reprod Fertil 101:547–555.

Sunderland, SJ, Knight, PG, Boland, MP, Roche, JF and Ireland, JJ, 1996. Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular- and luteal-phase dominant follicles in heifers. Biol Reprod 54:453–462

Townson, DH, Tsang, PCW, Butler, WR, Frajblat, M, Griel, LC, Johnson, CJ, Milvae, RA, Niksic, GM and Pate, JL, 2002. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. J Anim Sci 80:1053–1058.

Turzillo, AM and Fortune, JE, 1990. Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. J Reprod Fertil 89:643–653.

Webb, R, Campbell, BK, Garverick, HA, Gong, JG, Gutierrez, CG and Armstrong, DG, 1999. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. J Reprod Fertil 54 (Suppl):33–48.

van de Leemput, EE, Vos, PLAM, Zeinstra, EC, Bevers, MM, van der Weijden, GC and Dieleman, SJ, 1999. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superiovulated with a controlled preovulatory LH surge. Theriogenology 52:335–349.

Webb, R, Gosden, RG, Telfer, EE and Moor, RM, 1999. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. Anim Sci 68:257–284.

Wiltbank, MC, Fricke, PM, Sangsritavong, S, Sartori, R and Ginther, O.J, 2000. Mechanisms that prevent and produce double ovulations in dairy cattle. J Dairy Sci 83:1–10.

Wolfe, MW, Stumpf, TT, Roberson, MS, Kittok, RJ and Kinder, JE, 1991. Opioid and 17-estradiol regulation of LH and FSH secretion during sexual maturation in heifers. Dom Anim Endocrinol 8:491–498.

Wrathal, JHM and Knight, PG, 1995. Effect of inhibin related peptides and estradiol on androstenedione and progesterone secretion by bovine theca cells in vitro. J Endocrinol 145:491–500.

SYNCHRONIZATION OF FOLLICULAR WAVE EMERGENCE AND OVULATION FOR REPRODUCTIVE BIOTECHNOLOGIES

Marcelo F. Martínez, Gabriel A. Bó, Reuben J. Mapletoft
Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Canada, S7N 5B4
Instituto de Reproducción Animal de Córdoba, 5000 Córdoba, Argentina

INTRODUCTION

The expanding knowledge of the roles of the corpus luteum (CL) and follicular waves in the bovine estrous cycle has resulted in renewed interest in the prediction of finely controlled ovulation synchronization. The intention of the following discussion is to provide an overview of the most used treatments to synchronize the emergence of follicular waves, follicular development and induction of ovulation. These protocols were designed for utilization in reproductive biotechnologies, such as artificial insemination (AI) and embryo transfer. A brief introduction about the normal events occurring in the estrous cycle will be given, followed by the discussion to determine how these events impact on the design and effectiveness of a synchronization program. This review is based on the general idea that ovarian response to exogenous stimulation is subjected to the physiologic status of the ovaries at the time of treatments for synchronization of both follicular wave emergence and ovulation.

The endogenous control of the bovine estrous cycle involves the secretion of a number of hormones from the brain, ovaries and uterus. Some of the main hormones are gonadotrophin releasing hormone (GnRH) from the hypothalamus, follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH) from the pituitary gland, estrogen, progesterone and inhibin and other factors from the ovary and prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF) from the uterus. Although there has been a tremendous progress in the last 10 years, details of these endocrine interrelationships remain under investigation. The length of the bovine estrous cycle depends on the CL lifespan. The demise of the CL occurs about Day 17-18 in the normal cycling, nonpregnant bovine female. It is also known that regression of the CL is caused by PGF secreted by the nonpregnant uterus. This process results in a rapid fall in concentrations of circulating progesterone, while blood concentrations of LH and follicular growth is further stimulated. The dominant follicle of the last follicular wave becomes the preovulatory follicle and secretes increasing amounts of estradiol, which causes changes in the oviduct and uterus, behavioural estrus, and a preovulatory release of LH. The preovulatory LH peak results in maturation of the oocyte, ovulation 24-32 h after the onset of estrus and luteinization of the ovulated follicle to form a secreting corpus hemorrhagicum (CH). Growth and development of the CH into a fully functional CL causes progestational changes in the oviduct and uterus. Those changes facilitate embryonic development and pregnancy. If pregnancy is not established, the cycle will begin again.

The identification of individual follicles by ultrasonography has demonstrated that ovarian follicles in cattle grow in waves. A wave of follicular development is represented by the growth of several antral follicles followed by selection of a dominant follicle and regression of all other subordinate follicles. In the absence of luteal regression, the dominant follicle eventually regresses and a new follicle wave begins. Most cows exhibit 2 or 3 waves of follicular development during the estrous cycle. In general, the first wave of follicles begins to grow around time of ovulation. The selection of a dominant follicle becomes evident at the time of follicular deviation, which occurs approximately 3 days after a wave has emerged (Ginther et al., 1996). If a cow has two follicular waves,

the second wave of follicular development begins approximately by Day 10 post-ovulation. The follicle destined to ovulate apparently arose from this cohort in cows with two follicular waves, whereas the ovulatory follicle arose from a third follicular wave that started on Day 16 in cows with three follicular waves.
Historically, control of the estrous cycle has been achieved by lengthening or shortening the luteal phase. However, follicular development had remained uncontrolled. In order to more efficiently manipulate the estrous cycle, the control of both luteal and follicular dynamics is essential. During the last 10 years, there has been a copious amount of studies conducted to evaluate treatments to control follicular waves. The resulting treatments have been incorporated into estrus synchronization programs, which have also been improved with treatments intended to induce a synchronous ovulation facilitating a single fixed-time AI (FTAI).

METHODS OF CONTROL OF THE ESTROUS CYCLE

The bovine estrous cycle can be shortened (long acting estradiol or prostaglandin) or lengthened (progestins). Advances had been slow since the first attempts to control the bovine estrous cycle by progesterone (Christian and Casida, 1948) or estrogens (Wiltbank et al., 1961) or the combination of both (Wiltbank et al., 1965). New approaches to the manipulation of the bovine estrous cycle have been applied without impairment of fertility.

CONTROL OF LUTEAL FUNCTION

PROSTAGLANDINS

After approximately 14 days of progesterone secretion, the endometrium secretes 6-h pulses of PGF for approximately 36 h and PGF concentrations increased in uterine secretions and uterine vein plasma (Hansel et al., 1975). Responsiveness to PGF has been shown to increase progressively from 6 to 8 days post-estrus and the CL remains responsive for the remainder of diestrus (Momont and Seguin, 1984). After PGF treatment of beef heifers on Days 7 to 20 after estrus, the length of the estrous cycle was significantly reduced and pregnancy rate following estrus detection and AI (72.5%) did not differ from that in controls (73.0%; Roche, 1974).
It has been demonstrated that the length of the interval from PGF treatment to estrus depends upon the stage of development of the dominant follicle present at the time of treatment. The administration of PGF on Days 3 to 10 and 7 to 16 of the estrous cycle resulted in different intervals from treatment to estrus and it was attributed that these varying intervals depended on growth or atresia of large antral follicles, but no conclusions were stated (Macmillan and Henderson, 1984). In a more detailed study involving ultrasonography, the effects of day of PGF treatment were further examined based on the selection and development of the ovulatory follicle (Kastelic et al., 1990a). The interval from PGF treatment to ovulation was shorter in heifers treated on Day 5 after ovulation (growing/early static; 3.0 days) than in those treated on Day 12 (regressing phase of Wave 1 or early growing phase Wave 2, 4.5 days). Treatment on Days 5 or 8 was followed by ovulation of the dominant follicle of Wave 1 (near its maximum diameter at the time of treatment), whereas treatment on Day 12 was followed by ovulation of the dominant follicle of Wave 2. This follicle was small at treatment and required more time to attain ovulatory size. It was concluded that the interval from PGF treatment to estrus depended on the time of growth up to the

ovulatory size. The rationale for synchronization of follicular waves prior to inducing luteal regression in estrus synchronization programs was established in this study.

PROGESTERONE AND PROGESTINS

Progesterone was initially used in 1948 to alter the length of the cycle by serial daily injections starting on the Day 14 of the estrous cycle (Christian and Casida, 1948). Although estrus and ovulation were prevented in heifers treated with 50 mg of progesterone, heifers came into estrus 5 or 6 days later after suspension of treatment. The dose of 25 mg of progesterone was effective in suppressing estrus in all treated heifers, but ovulation was prevented only in 50% of heifers (Christian and Casida, 1948). Thus, when progesterone is given at an appropriate dose, it suppresses estrus, LH surge and ovulation.

Later studies demonstrated that progesterone or progestins given for a term longer than the normal life span of the CL (i.e., >14 days) resulted in synchronous estrus after treatment was discontinued, but fertility was poor (Trimberger and Hansel, 1955). When a progestin treatment was administered, ovulation was prevented; but increased LH pulsatility occurred after the CL regressed (Cooperative Regional Research Project, 1996). The administration of progesterone suppresses LH pulse frequency if given to cattle bearing a CL, which in turn, causes suppression of dominant follicle growth in a dose-dependent fashion (Adams et al., 1992b). However, the dose of progestins used to control the estrous cycle in cattle (melengestrol acetate [MGA] in the feed, or progestin-impregnated devices) has relatively less suppressive effects on LH secretion than progesterone from the CL and following luteal regression, the increased LH pulse frequency leads to development 'persistent' follicles (Custer et al., 1994; Kojima et al., 1995; Savio et al., 1993). These follicles contain aged, infertile oocytes (Custer et al., 1994; Mihm et al., 1999, Revah and Butler, 1996) and insemination following progestin withdrawal results in poor fertility (reviewed in Larson and Ball, 1992 and Odde, 1990).

One of the first developed progesterone-releasing devices was the PRID (progesterone release intravaginal device). Initially, PRIDs were placed by 18 days with plasma progesterone greater than 1 ng/mL with a high retention (90%). The progestin "norgestomet" has been used in regimens of estrus synchronization. Commercially, two implant types have been in the market "hydron" (SMB, Syncro-Mate B 6 mg of norgestomet contains; Merial, Iselin, U.S.A.) and Crestar (contains 3 mg of norgestomet; Intervet International, Boxmeer, Holland). The norgestomet implant SMB has been removed from the market since a long time ago. Therefore, the only commercial norgestomet implant is Crestar. The most used protocol for both consists of implant placement for 9 days plus an intramuscular injection of 5 mg norgestomet and 3 mg EV at the time of insertion. This type of protocols has been extensively used with varied results (Odde, 1990). However, when the standard Crestar protocol was compared with a double dose of prostaglandin, Crestar resulted in greater conception rates to detected estrus (Kastelic et al., 1999).

Other progestin or progesterone-releasing devices have recently been used in synchronization protocols, such as CIDR (controlled internal drug release; Pfizer Animal Health) DIV-B (Syntex, Argentina) that contains 1 g of progesterone (Cutaia et al., 2001; Moreno et al., 2001; Tríbulo et al., 2002; Bó et al., 2003) or similar to this one, the TRIU-B (Elastécnica, distributed by Biogénesis, Argentina) that also contains 1 g of progesterone (Carcedo et al., 2003). Another more recent intravaginal device is the Cue-Mate® (Bioniche Animal Inc. Health, Ontario, Canada) that contains 1.56 g of progesterone (Cavalieri et al., 2004, McDougall et al., 2004).

Melengestrol acetate (MGA) is orally administered progestin in the Canadian market. The most common MGA-based estrus synchronization protocol consisted of 14 days of

MGA feeding followed by an injection of PGF 17-19 days later, with insemination at detected estrus (Lamb et al., 2000). There is a recent trend for the utilization of MGA in short-term protocols for estrus synchronization. However, the risk of persistent follicles and low fertility still remains when there is no attempt to control follicular growth. Short-term MGA programs that included treatment with estradiol or GnRH to synchronize follicular wave emergence have been designed (Kastelic et al., 1996, 1997; Thundathil et al., 1999). Estradiol-17β treatment at the beginning of an MGA protocol in beef cattle resulted in more consistent estrus and pregnancy rates (to AI after detected estrus) than GnRH or Controls (Thundathil et al., 1999). These synchronization systems may be promising if a treatment to synchronize ovulation for FTAI are included.

MANIPULATION OF FOLLICULAR DEVELOPMENT

ESTRADIOL

Originally, treatments with estrogens were given to cause regression of the CL (Wiltbank et al., 1961). Shortly after, estradiol was used to induce luteolysis in short treatments with progestins (Ulberg and Lindley, 1960; Wiltbank et al., 1965; Wiltbank and Kasson, 1968). A dose of 5 mg of estradiol valerate (EV) was administered in the second day of an eight-day treatment with 400 mg/animal/day dihydroxi-progesterone (DHPA) in the ration (Wiltbank and Kasson, 1968). The treatment resulted in 95% of the heifers detected in estrus in a 96-h period, with an acceptable conception rate (54%; Wiltbank and Kasson, 1968). Thereafter, progestin-based protocols were shortened to 9 days with an im injection of EV administered at the beginning of the treatment to induce the luteolysis.

Recently, it was observed that the administration of 5 mg EV along with a norgestomet implant (Syncro-Mate-B, SMB) resulted in regression of antral follicles (Bó et al., 1991), and emergence of a new follicular wave at a relatively predictable time thereafter (Bó et al., 1993). When EV was administered in the late static or regressing phase, emergence of the next follicular wave was attributed to the extended suppression of plasma FSH concentrations (Bó et al., 1993). Therefore, the high estrous response and acceptable pregnancy rate obtained in earlier studies by Wiltbank and Kasson (1968) were not only due to the luteolytic effects of EV, but also to the EV-induced follicle turnover.

Estradiol-17β has been shown to suppress follicular growth when given to progestin-treated cattle regardless of the stage of follicle development at the time of treatment (reviewed in Bó et al., 1995a). Overall, emergence of a new follicular wave occurred 4.3 ± 0.2 days after treatment (range: 3 to 5 days) in 44/47 females (94%; Bó et al., 1995a, 1995b). The intramuscular injection of 5 mg E-17β resulted in increased plasma estradiol concentrations reaching peak concentrations 18 h later and decreased circulating FSH concentrations (Bó et al., 1994). Once estradiol concentrations declined, synchronous FSH release and emergence of a new follicular wave occurred (Bó et al., 1994). These studies were later confirmed by experiments in ovariectomized cows and intact heifers (Martínez et al., 2003a; 2004). In ovariectomized cows that received an intravaginal progesterone-releasing (IVP) device one day before or at the time of treatment, E-17β (5 mg) with or without progesterone (100 mg) caused a significant increase of the plasma LH concentration between 18 and 24 h, with suppression of plasma concentrations of FSH from 6 to 48 h. Once circulating concentrations of estradiol decreased by 60 h, FSH returned to concentrations previous to treatment (Martínez et al., 2003a; 2004). In intact cattle, a follicular wave emerges approximately one day after an FSH surge (Adams et al., 1992a). Therefore, the time of FSH resurgence (after E-17β treatment) in ovariectomized cows corresponds to the

FSH surge previous to wave emergence in intact females. It is also known that progesterone inhibits the growth of the dominant follicle (Adams et al 1992b). Progesterone has also been incorporated with the initial treatment of estradiol for follicular wave synchronization to prevent an estrogen-induced LH surge (Bó et al., 1994). Even though a treatment with E-17β resulted in an initial LH surge in ovariectomized cows, a significant reduction in plasma LH concentrations until 84 h post-treatment was also observed (Martínez et al., 2003a). In intact cattle, these events would cause regression of FSH-dependent follicles (by estradiol) and LH-dependent follicles (by the synergistic action of estradiol and progesterone), followed by emergence of a new follicular wave after FSH resurgence.

The doses of progesterone used in synchronization protocols can be considered marginal because treatment with estradiol-17β in ovariectomized cows, treated with a progesterone-releasing device, induced an LH increase by 16 to 24 h later (Martínez et al., 2003a). In intact cattle, the absence of a CL may be the cause for the lack of response to estradiol treatment in a small number of females (6%; Bó et al., 1995). The lack of response in cattle with low levels of endogenous progesterone was further examined. An experiment was designed to characterize follicular dynamics in beef cows that received a progesterone-releasing device and an im injection of E-17β with or without progesterone between days 16 and 18 of the estrous cycle (Kastelic et al., 2004). Thirteen of 36 cows ovulated during the three following days to treatment (Control, 8.3%, and both treated groups, 50%). Follicular wave emergence was more synchronous in the E-17β group than in the Control and E-17β/progesterone groups. When the progesterone-releasing devices were removed, the diameter of the dominant follicle was larger in the Control group than in the treated groups, three cows that did not ovulate (two in the Control group and one in the E-17β/progesterone group) and 16.6% of cows developed persistent follicles. It was concluded that length of follicular dominance and ovulation time were affected by treatments. Therefore, if an ovulation synchronization protocol is intended for FTAI, fertility may be impaired.

Although E-17β seemed to be highly efficient in synchronizing follicular wave emergence, other estradiol esters have also been investigated. Estradiol benzoate (EB; Caccia and Bó, 1998, Burke et al., 1999), EV (D'Occhio et al., 1996; Colazo et al., 2004) or estradiol cypionate (ECP; Colazo et al., 2003) have been used in combination with different progestin sources in synchronization programs.

In a comparative study, administration of progesterone and different types of estradiol in CIDR-treated, ovariectomized cattle suppressed plasma concentrations of gonadotrophins (Martínez et al., 2004). It was noteworthy that 5 mg of E-17β induced an initial increase in plasma LH concentrations, whereas the same dose of EB or EV did not. Suppression of FSH concentrations was followed by resurgence at an interval that corresponded to the persistence of elevated plasma estradiol concentrations. In that regard, the prolonged suppression of plasma FSH in cows given EB or EV was consistent with reports of delayed and more variable intervals to emergence of a new follicular wave when 5 mg of either of these esters were used (Bó et al., 1993).

The type of estradiol utilized in synchronization protocols has different effect on ovarian dynamics depending on the dose and route of administration. The effects of different doses of E-17β were examined by Bó et al. (1994). When E-17β was given to norgestomet-implanted beef heifers at different doses (2.5, 5.0 or 10.0 mg), the 5.0 mg E-17β dose resulted in the least variable interval from treatment to follicular wave emergence (Bó et al., 1994). Similarly, experiments were carried out using EB given by different route and dose. The im administration of 5 mg EB, 24 hours after the insertion of an IVP device, resulted in a fairly synchronous emergence of a new follicular wave (median = 5 days; range 5 to 7) after treatment while when the same dose was

administered by an intravaginal capsule; there was a greater variability in the response (median = 5.5; range 1 to 7; Bó et al., 1996). When 2.5 mg EB was used by im route in Hereford cows, the interval from treatment to follicular wave emergence (median = 4 days) was shorter and less variable than when a greater dose was used (5 mg; Caccia and Bó, 1998). In another study in Hereford cows, the direct comparison between E-17β and EB favored the use of 5 mg of E-17β or 1 mg of EB (3.7 ± 0.5 and 3.4 ± 0.6 days for 5 mg of E-17β or 1 mg of EB, respectively; Martínez et al., 2004). In IVP-treated beef heifers, a smaller dose of 1 mg EB resulted in similar interval to wave emergence (Martínez et al., 2004). Moreno et al. (2001) demonstrated that the use of 2 mg of EB combined with 50 mg of progesterone in beef cows induced a synchronization of the follicular wave less variable without the need for additional progesterone. This was later confirmed in dairy cattle (McDougall et al., 2004) and field studies in beef cattle (Colazo et al., 2004). In conclusion, appropriate doses of E-17β or EB effectively synchronized follicular wave emergence and ovulation (Martínez et al., 2004); the optimum doses for synchronization of follicular wave emergence in these experiments were 5 mg E-17β (cows and heifers) or 1 mg EB (heifers).

Once optimum doses of estradiol were determined in progestin-based synchronization protocols, the next step was to evaluate the effect of estradiol in PGF-based synchronization programs. Therefore, an experiment was designed to determine the effects of dose of EB and/or progesterone on follicular and luteal dynamics in a two dose PGF-based protocol in beef heifers (Martínez et al., 2005). Beef heifers (n=28; weight=350 to 450 kg) received 500 µg cloprostenol on Day -7. On Day 0, heifers were randomly allocated to 9 treatment groups to receive 0, 1 or 2 mg of EB and 0, 50, or 100 mg of P im in canola oil in a 3x3 factorial design. A second PGF treatment was administered on Day 14. The day of follicular wave at the time of treatment tended to vary among groups (P=0.08), and the diameter of the dominant follicle also differed (P<0.05). That was expected because after a single dose of PGF, there is variation in the interval to ovulation (Kastelic et al., 1990). The interval from treatment to wave emergence was shorter (P<0.05) in heifers that received 2 mg EB (4.6 ± 0.3 d) than in those that did not receive EB (5.9 ± 0.6 d), while the 1 mg EB group (5.1 ± 0.6 d) was intermediate. The interval to wave emergence in the 2 mg EB group was the least variable (P<0.05). There was no effect of EB (P=0.72) on the diameter of the CL at the time of the second PGF, but there was an effect of progesterone treatment (P=0.01). Treatments also influenced the variability of the interval from the second PGF to ovulation. There was an effect of time (P<0.01) and a progesterone-by-time interaction (P=0.06) on plasma progesterone concentrations, while estradiol concentrations were affected by EB dose, time and EB-by-time interaction (all P<0.01). Plasma concentrations of FSH were modified by time (P<0.01) and tended to be affected by EB-by-progesterone interaction (P=0.11). To summarize the effects of treatments, EB administered 7 days after a single injection of PGF affected follicular development, while progesterone treatment at that time appeared to influence CL function. In this study, a second dose of estradiol (i.e., 1 mg EB) given 24 h after the second PGF treatment could have resulted in a higher synchrony of ovulation.

The use of EV to synchronize follicular wave emergence was originally compared with the same dose of E-17β (Mapletoft et al., 1999; Colazo et al., 2004b). An experiment compared the effectiveness of two norgestomet implants (Crestar and Syncro-Mate B; SMB) placed for 9 days (with PGF at the time of removing it implants), and the combination of 5 mg of E-17β and 100 mg of progesterone (EP) or 5 mg of EV and 3 mg of norgestomet (N) im which were administered at the time of implant insertion. There was no effect of implant. Treatment with EV negatively affected the CL diameter. Although follicular wave emergence occurred earlier and was less variable in the EP

group (3.6 ± 0.1 days) that in the N group (5.7 ± 0.2 days), intervals from the removal of implant to estrus and ovulation were shorter in N heifers (45.7 ± 11.7 and 74.3 ± 12.6 h) that in EP heifers (56.4 ± 14.1 and 83.3 ± 17.0 h). Short interval from implant removal to estrus (38/56 cows were detected in estrus by 36 h; the interval in heifers was 48.0±4.4 h) was also observed by Kastelic et al. (1999) in an study in which a protocol consisting of Crestar plus EV was compared to a protocol using two doses of PGF. In addition, luteolytic effect of the EV injection was beneficial because there was no functional CL present in the ovaries at the time of norgestomet implant removal. Later, a second experiment evaluated the effect of different doses of EV on follicles and synchrony of estrus and ovulation in beef cows (n=43). On Day 0, all cows received a progesterone-releasing device plus an injection of 1, 2, 5 mg of EV im and another group did not receive additional treatment (Control). On Day 7, progesterone-releasing devices were removed and PGF was injected. Follicular wave emergence occurred within 7 days in 7/10 (70%) Control cows and 31/32 (97%; P<0.04) cows given EV. The interval from treatment to follicular wave emergence was longer (P<0.03) in cows given 5 mg EV (4.8 ± 1.2 days) that in those that received 1 mg (3.2 ± 0.9 days) or 2 mg (3.4 ± 0.8 days) of EV, whereas in Control cows, the interval was intermediate (3.8 ± 2.0 d). These results suggested that at an appropriate dose, estradiol esters as EB or EV could be used for the synchronization of follicular wave emergence in cattle.

As with EB and EV, attempts to control ovarian follicular dynamics have been carried out. Originally, experiments in heifers treated with 0.5 mg ECP had follicular waves emerging with the same variability as in the non-treated control heifers (Thundathil et al., 1997). The use of ECP for synchronization of follicular waves was further investigated in our laboratory. Several experiments were carried out to investigate the use of ECP for the synchronization of the follicular wave and the ovulation in beef heifers treated with a IVP device (Colazo et al., 2004a). The interval from treatment to follicular wave emergence was longer and more variable in heifers treated with ECP than in those given E-17β (4.1 ± 0.4 days versus 3.3 ± 0.1 days). These results confirm that ECP is not suitable to be used in synchronization of follicular wave emergence.

In summary, although the treatment with progestins and estradiol was used over several years to synchronize estrus (Wiltbank et al., 1965), their effect on follicular dynamics was not known until recently with the advent of the ultrasonography. It was also concluded that treatment with estradiol suppressed the growth of antral follicles, and that suppression was more profound when estradiol was administered with a progestin (Bó et al., 1994). The mechanism involved in the suppression of follicular growth seemed to involve inhibition of FSH through a systemic route (Bó et al., 2000a). Thereafter, FSH surges will occur in a predictable time following the emergence of a new follicular wave (Bó et al., 1994; Martínez et al., 2004). Except ECP, esters of estradiol used in lower doses accurately synchronized follicular wave emergence.

GONADOTROPHIN RELEASING HORMONE OR LUTEINIZING HORMONE

Although GnRH directs the estrous cycle in cattle, there is an endogenous control of its secretion. The use of exogenous GnRH offers the possibility of controlling follicular events during the estrous cycle. GnRH has been commercially available since the 1970's and is used widely (Drost and Thatcher, 1992), predominantly for the treatment of follicular cysts in cattle (Kittok et al., 1973). More recently, the effect of GnRH on follicular dynamics has been investigated. Treatment with GnRH resulted in ovulation of the largest follicle present at the time of treatment, but not in all cattle (Macmillan and Thatcher, 1991). It was concluded that these changes could have altered the normal wave patterns of follicular development. In another study, heifers treated with GnRH 32 h before ovulation had a shortened interval from the LH surge to the emergence of the

first follicular wave (Bodensteiner et al., 1996). After GnRH treatment, the dominant follicle would ovulate and a new follicular wave would emerge within 2 days after treatment (Twagiramungu et al., 1995). However, administration of GnRH at random stages of the estrous cycle has not always resulted in ovulation (Kastelic and Mapletoft, 1998). It was suggested that ovulation depended on the stage of development of the dominant follicle (Twagiramungu et al., 1995). The use of GnRH at different and variable stages of the first follicular wave was investigated in two preliminary studies (Prescott et al., 1992; Silcox et al., 1993), but results were inconclusive. In a more recent study (Martínez et al., 1999), the administration of GnRH or LH to heifers at precise stages of the first follicular wave (Days 3, 6, or 9 after spontaneous ovulation) resulted in ovulation in 56% and 78% of heifers, respectively. Specifically, ovulation occurred within 36 h in 67%, 100% and 67% of heifers treated with pLH and in 89%, 56% and 22% of heifers treated with GnRH on Days 3, 6 or 9, respectively. Follicular wave emergence was only induced within 2 days when ovulation of the dominant follicle occurred (Martínez et al., 1999). The remaining non-ovulated heifers had a new follicular wave emerging spontaneously. These results were similar to a study in which 3 different commercial presentations of GnRH (gonadorelin; Cystorelin®, Merial Canada, Victoriaville, Quebec, Canada; Fertagyl®, Intervet Canada, Whitby, Ontario, Canada; Factrel®, Wyeth-Ayerst Canada, Montreal, Quebec, Canada) were compared in beef heifers (Martínez et al., 2003b). Although gonadorelin diacetate tetrahydrate preparations induced an increased number of ovulations (not statistically significant) compared to gonadorelin hydrochloride, all commercial preparations resulted in similar mean interval to wave emergence (2.0±0.4, 2.2±0.4, and 2.1±0.3 d for Cystorelin, Fertagyl and Factrel, respectively).

FOLLICULAR ABLATION

Physical methods of follicular ablation, such as cautery, have been used to remove antral follicles (Ko et al., 1991; Adams et al., 1992a, 1993a, 1993b). Studies of follicular ablation by electrocautery demonstrated that removal of the dominant follicle hastened the emergence of the next follicular wave (Adams et al., 1992a, 1993a). Based on this, ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration at random stages of the estrous cycle was used to synchronize follicular wave emergence and to improve the synchrony of ovulation after PGF treatment (Bergfelt et al., 1994). An FSH surge occurred after ablation of all follicles ≥5 mm in the ovaries, resulting in emergence of a new follicular wave within 2 days after aspiration. Treatment with PGF 4 days after ablation resulted in synchronous ovulation. A greater synchrony of ovulation was obtained when two doses of PGF were given 12 h apart (at 4.0 and 4.5 days after follicular ablation) and GnRH or pLH was administered 24 h later to induce ovulation (Brogliatti et al., 1998). When ultrasound-guided follicular aspiration was used to synchronize follicular wave emergence in IVP-based estrus synchronization programs, synchronous follicular wave emergence occurred within 1.0 ± 0.1 days after ablation, and ovulation occurred 3.0 to 4.5 days after IVP device removal, with pregnancy rates to AI after estrus detection of 65% (Martínez et al., 2000a). Although follicular ablation offers a great alternative for synchronization of follicular wave emergence and ovulation, this technique may be more appropriate for synchronization of follicular wave emergence in superstimulation protocols; follicle ablation induces a highly synchronized follicular wave emergence but it requires appropriate instrumentation and facilities which makes it less feasible under field conditions. More recently, we have shown that ablation of the two largest follicles in the ovaries were adequate to induce synchronous follicle wave emergence in a superstimulatory program (Baracaldo et al., 2000).

COMPARISON OF WAVE EMERGENCE SYNCHRONIZATION TREATMENTS IN AN ESTRUS SYNCHRONIZATION PROGRAM

Except the original and specific studies on synchronization of follicular wave emergence by Bó et al. (1991; 1993; 1994; 1995b; 2000), most of the protocols that followed have been as part of estrus or ovulation synchronization programs. In an estrus synchronization protocol, Bó et al. (1995a) showed that the combination of estradiol-17β (E-17β) and progesterone synchronized follicular wave emergence in IVP-treated beef cattle, resulting in 75% of heifers ovulating between 72 and 84 h following device removal and PGF administration. This treatment protocol was considered to have great potential in ovulation synchronization programs. Estradiol and progesterone in combination have been used in other progestin-based protocols (Macmillan et al., 2003). An injection of progesterone (100 mg) or an IVP device for 24 h on Day 10 of a 17-day norgestomet protocol in *Bos indicus* heifers synchronized follicular wave emergence and ovulation (Cavalieri et al., 1998). Treatment with 100 mg progesterone provided a shorter interval from implant removal to estrus (38.4 ± 2.6 h) than 200 mg progesterone (61.5 ± 3.9 h; Cavalieri et al., 1998). The use of the combination of 2 mg EB and 200 mg progesterone at the beginning of a progesterone-releasing device treatment induced a better synchrony of follicular wave emergence than progesterone alone (Cavalieri et al., 2003). This demonstrates that progesterone may not be necessary when estradiol is given when a progesterone-releasing device is used. In this case, estradiol caused a higher suppression of plasma LH concentrations, which may have facilitated the suppression of dominant follicles.

In our laboratory, 5 mg of E-17β and 100 mg progesterone have been given on Day 0 of a 7-day MGA program with PGF treatment on the last day of MGA feeding. The synchronized pregnancy rate in heifers without a CL (apparently not cyclic) was higher in the group treated with estradiol and progesterone than that in the non-treated Control group (52% vs 20%, respectively; Kastelic et al., 1997). The low pregnancy rates in the Control group receiving MGA without follicular wave synchronization can be a direct result of the development of persistent follicles that ovulated aged oocytes after MGA withdrawal.

More recently, an experiment was conducted to compare treatments for the synchronization of follicular wave emergence in IVP-treated cattle for synchronization of estrus and ovulation and to determine pregnancy rate following AI at observed estrus (Martínez et al., 2000a, Figure 1). A IVP device was inserted at random stages of the estrous cycle in 67 crossbred beef heifers (Day 0 = beginning of the experiment) that were randomly allocated to receive 1) no further treatment (Control); 2) 5 mg of E-17β plus 100 mg of progesterone (E/P group); 3) 100 µg of GnRH (GnRH group); or 4) transvaginal ultrasound-guided follicular ablation of all follicles ≥5 mm (FA group). The devices were removed on Day 9, 8, 6, or 5 after insertion, in Control, E/P, GnRH, or FA groups, respectively, so the dominant follicle of the induced wave would be exposed to exogenous progesterone for similar intervals in each group. Treatment with PGF was done twice, at device removal and 12 h later. Heifers were inseminated approximately 12 h prior to ovulation. Results are shown in Table 1. The interval from treatment to follicular wave emergence was longest in the E/P and Control groups, while it was the least variable in the E/P and FA groups. The proportion of heifers displaying estrus was higher in the Control than in the FA group (94 vs. 65%, respectively; $P<0.05$) and intermediate in E/P and GnRH groups (87 and 75%, respectively). Pregnancy rates were not significantly different among groups. Results supported the hypothesis that synchronous follicular wave emergence results in synchronous follicle development and, following device removal, synchronous estrus and ovulation with high pregnancy

rates to AI. The synchrony of estrus and ovulation in the E/P, GnRH, and FA groups suggested that these treatments, in combination with a IVP device, could be adapted to FTAI programs.
Later, all designed protocols consisted of a treatment to synchronize follicular wave emergence, with or without a source of progestin followed by PGF at progestin removal, and a treatment to synchronize ovulation for FTAI (Figure 2).

SYNCHRONIZATION OF OVULATION USING ESTRADIOL

High accuracy in the time of ovulation becomes important for fixed-time AI. If a follicular wave is synchronous, it will be possible to predict the day to induce ovulation with estradiol (Lammoglia et al., 1998), LH (Brogliatti et al., 1998) or GnRH (Pursley et al., 1995). Estradiol has been used to synchronize estrus in PGF-based estrus synchronization protocols (Dailey et al., 1983, 1986; Peters et al., 1977; Welch et al., 1975) and induced estrus, LH release and ovulation in CIDR-treated cattle (Lammoglia et al., 1998). The use of estradiol and progesterone in estrus synchronization protocols was based on the hypothesis that treatment will synchronize emergence of a new dominant follicle capable of ovulating after PGF-induced induced luteolysis, with a highly acceptable pregnancy rates following AI.
Estradiol benzoate has been used to induce estrus in PGF-treated cattle (Welch et al., 1975; Peters et al., 1977; Dailey et al., 1983). In IVP-treated cattle, the administration of 0.38 (heifers) or 1.0 mg (cows) of EB 24 to 30 h after device removal resulted in estrus in 86 and 100% of the cattle, respectively. The treatment also resulted in an LH surge between 16 and 20 h later, with higher pregnancy rates than in untreated cattle (Lammoglia et al., 1998). Different intervals from estradiol treatment to ovulation have been investigated. In an experiment designed to explore the timing of EB treatment (0 or 24 h) after IVP device removal, Cutaia et al. (2001) observed and PGF-ovulation interval from 66 to 84 h after treatment with 1 mg EB at 24 h. The administration of 1 mg of either E-17β or EB 24 h after IVP device removal consistently induced synchronous ovulation approximately 52 h later (Martínez et al., 2004). An experiment on the comparison of EB treatment (1 mg im) at 12, 24 or 36 h after IVP removal in beef heifers indicated that EB resulted in a better synchrony of ovulation than in the non-treated Control group. There was not difference in the mean interval to ovulation after treatment at 24 or 26 h; however, EB given at 12 h after IVP removal resulted in a shorter interval (Martínez et al., 2002).
Based on our studies of dosages (please, see previous section of control of follicular wave emergence), several experiments were later conducted. An experiment was designed to compare the effects of E-17β and EB on the interval to emergence of a new follicular wave in heifers treated with a IVP device and on the induction of ovulation following device removal (Martínez et al., 2004). Forty pubertal beef heifers received a IVP device on random days of the estrous cycle (Day 0), and were assigned to four groups in a 2x2 factorial design; half of the heifers received 5 mg of E- 17β plus 100 mg of progesterone and the other half received 1 mg of EB plus 100 mg of progesterone by intramuscular injection. After device removal and PGF treatment on Day 7, each group was randomly subdivided to receive an injection 24 h later (Day 8) of either 1 mg of E-17β or 1 mg of EB to induce LH release and ovulation. There was no effect of estradiol treatment on the mean intervals to wave emergence or ovulation (Table 2). In a second experiment with the same design, the efficacy of the two different estradiol preparations was tested in a IVP-based FTAI program in 84 lactating beef cows at random stages of the estrous cycle (Martínez et al., 2000b). All cattle were inseminated 30 h after the

second injection of estradiol (i.e., 54 h after device removal). Among the four treatment groups, there were no differences in the proportion of animals that displayed behavioral estrus (16/21, 19/21, 17/21, 17/21) or that became pregnant to fixed-time AI (14/21, 67%; 13/21, 62%; 11/21, 52%; and 15/21, 71%), for the E-17β/E-17β, E-17β/EB, EB/E-17β, and EB/EB groups, respectively). Results suggest that E-17β and EB. Each given at an appropriate dose can be used interchangeably in the synchronization of follicular wave emergence and ovulation for fixed-time AI in cattle treated with IVP. The same EB/EB protocol was used in IVP-treated beef heifers resulting in a high pregnancy rate to FTAI (76%) compared to Controls treated with only and inseminated to detected estrus (conception rate, 48%; pregnancy rate 38%; Martínez et al., 2000b). Therefore, this protocol was used thereafter in field situations with a highly acceptable pregnancy rates.

These estradiol-based synchronization programs have the advantage of high fertility after FTAI. However, there is a need for increased animal handling which involves four trips to the chute. These could be reduced if the treatment to induce ovulation were given at the time of IVP device removal by using a long lasting estrogen that allows for the cows to come into estrus and ovulate at an appropriate time for FTAI. In an attempt to compare fertility after FTAI (48 h after progestin removal) after estradiol in a protocol using sponges of medroxiprogesterone in suckled beef cows, it was concluded that EB given 0 or 24 h after the end of a progestin treatment had the same effect on ovulation rate and timing, incidence of short-lived CL, plasma progesterone concentrations and pregnancy rate after FTAI (Ross et al., 2004). This study suggested that EB could be used at the time of progestin removal, but the appointed insemination should be performed earlier than the traditional AI at 52-56 h.

Another alternative, ECP, a slow release and long circulating estradiol ester, the only licensed estradiol in the North American market, and. As mentioned previously, ECP was used in attempts to synchronize follicular wave emergence. More recently, four experiments were designed to study and compare the effects of ECP (with or without injectable progesterone), E-17β, and EB on follicular dynamics, time of ovulation, and pregnancy rate to FTAI in protocols based on the use of a progesterone-releasing device (Colazo et al., 2003). In addition, the duration of progesterone treatment (8 days versus 9 days with a progesterone-releasing device) on the interval from device removal to ovulation was determined. In Experiment 1, heifers (n = 24) received 1 mg ECP or 1 mg ECP plus 50 mg of a commercial progesterone (CP) preparation i.m. on Day 0 (device insertion). Eight or 9 days later, devices were removed, PGF was administered and heifers were allocated to receive 0.5 mg ECP i.m. concurrently (ECP0) or 24 h later (ECP24). There was no effect of treatment on mean day of follicular wave emergence (3.9 ± 0.4 days). Interval from device removal to ovulation was affected only by duration of device treatment (88.3 ± 3.8 h versus 76.4 ± 4.1 h; 8 days versus 9 days, respectively). In Experiment 2, 58 heifers received 100 mg progesterone and either 5 mg E-17β or 1 mg ECP i.m. on Day 0. Seven (E-17β group) or 9 days (ECP group) later, progesterone device were removed, PGF was administered and heifers received ECP (as in the Experiment 1) or 1 mg EB 24 h after device removal, with FTAI 58–60 h after device removal. Follicular wave emergence was later and more variable in heifers given ECP than in those given E-17β (4.1 ± 0.4 days versus 3.3 ± 0.1 days), but pregnancy rate was unaffected (overall, 69%; P = 0.2). In Experiment 3, 30 heifers received a progesterone-releasing device and 5 mg E-17β, with or without 100 mg progesterone (P) i.m. on Day 0. On Day 7, devices were removed and heifers received ECP as described in Experiment 1 or no estradiol (Control). Intervals from device removal to ovulation were shorter in ECP0 (81.6 ± 5.0 h) and ECP24 (86.4 ± 3.5 h) groups than in the Control group (98.4 ± 5.6 h). In Experiment 4, heifers (n = 300)

received a progesterone-releasing device, E-17β, P, and PGF (as in Experiment 3) and after device removal were allocated to three groups (as in Experiment 2), with FTAI 54–56 h (ECP0) or 56–58 h (ECP24 and EB24) after device removal. Pregnancy rate did not differ among groups (overall, 63.6%, P = 0.96). In summary, although 1 mg ECP (with or without progesterone) was less efficacious than 5 mg E-17β plus 100 mg progesterone for synchronizing follicular wave emergence, 0.5 mg ECP (at device removal or 24 h later) induced a synchronous ovulation with an acceptable pregnancy rate to fixed-time AI. These results suggested that although ECP is not effective in synchronizing follicular wave emergence, it could be utilized to synchronize ovulation with success.

DEVELOPMENT OF GnRH-BASED REGIMENS FOR SYNCHRONIZATION OF OVULATION

The first attempts of using GnRH in an estrus synchronization program involved GnRH treatment to synchronize follicular wave emergence, followed by PGF given 6 (Twagiramungu et al., 1992) or 7 days later (Wolfenson et al., 1994) to cause luteolysis of the new-formed and/or old CL. Further, a 10-day estrus synchronization program consisting of a 6-day interval between GnRH and PGF treatments, followed by a second GnRH treatment 48 h after PGF, was proposed for improving the precision of estrus without reducing fertility (Twagiramungu et al., 1995). In another study, an ovulation synchronization program consisting of a first injection of GnRH followed by PGF 7 days later, a second GnRH injection 48 hours after PGF treatment, and AI from 0 to 24 hours later (Pursley et al., 1995). This method improved the precision of estrus, and permitted fixed-time insemination without adversely affecting conception rate. Cows receiving the second GnRH treatment had a higher rate of ovulation than Control cows receiving only saline (97% vs. 77%, respectively). The first injection of GnRH apparently induced LH release and ovulation of the dominant follicle present at that time, resulting in the emergence of a new follicular wave within 2 days after treatment. The administration of PGF 7 days after treatment apparently induced the regression of the original and/or the induced CL. The second GnRH injection was given to induce LH release and synchronous ovulation of the new, GnRH-induced, dominant follicle. This program has been called “Ovsynch” (Seguin, 1997) and has been widely used on dairy farms in North America over the last few years (Wiltbank, 1997). It seems to be especially efficacious in dairy farms in which cows in estrus are not effectively detected (Wiltbank, 1997). GnRH has not resulted in acceptable synchronization estrus and ovulation when used in synchronization protocols in heifers. It has also been suggested and confirmed that the Ovsynch protocol is more efficacious in lactating dairy cows than in heifers (Seguin, 1997). Although, it has not been studied the cause of this inconsistency, it has been attributed to poor synchronization of wave emergence after the first treatment, and by the time PGF treatment was given 6 or 7 days later, the interval to estrus was highly great variable. In dairy cattle, ovulation rate after the first injection of GnRH was 85% in cows and 54% in heifers (Pursley et al., 1995). Furthermore, if spontaneous luteolysis occurred during the period between GnRH and PGF treatment, heifers would express estrus (Roy and Twagiramungu, 1999), since GnRH did not result in ovulation of the dominant follicle. When GnRH treatment was followed by PGF 7 days later, a high number of cattle was observed in estrus over the following 5 days (Thatcher et al., 1993). The use of a second GnRH treatment given at the time of AI (48 h after PGF) in cows seemed to facilitate fixed-time AI (Cosynch; Geary et al., 2001).

As mentioned in the preceding paragraph, although the specific causes of low fertility of an Ovsynch program in heifers has not been elucidated, it has been reported that many heifers were detected in estrus between the first injection of GnRH and PGF. This may be one of many factors responsible for the low pregnancy rates after FTAI. It has been attributed to the lack of response to the first GnRH injection. As described previously, when a GnRH treatment was given to beef heifers on Day 3, 6, or 9 of the first follicular wave, 56% ovulated and therefore, started a new follicular wave within 2 days (Martínez et al., 1999). Therefore, if approximately half of the heifers ovulated and had an induced follicular wave emergence, there will be a high number of unresponsive heifers with a regressing CL that will come into estrus before PGF treatment. One of the hypotheses to overcome this problem was the reduction of the interval from the first GnRH to PGF treatment would reduce the number of heifers detected in estrus during that period of time (i.e., 6 days a instead of 7 days). However, it was found that 9% of heifers showed estrus during a 6-day interval while 12% of heifers were detected in estrus during 7-day interval (Roy and Twagiramungu, 1999). In an experiment performed in lactating beef cows, there was no difference in pregnancy rates between a 6-day (54%) vs. 7-day (53%) Ovsynch program (Martínez et al., 2002).

Another hypothesis to prevent cattle from coming into estrus before or at PGF treatment was based on the utilization of a progesterone source during the interval from the first GnRH and PGF treatment. Furthermore, it was proposed that the increase in circulating progesterone concentrations may cause suppression of the dominant follicle that may have not responded to GnRH. Therefore, the use of a progestin-releasing device or MGA feeding may be a alternative to suppress estrus display during an Ovsynch program for FTAI. An estrus synchronization protocol consisting of a 6-day CIDR insertion with GnRH given at insertion and PGF treatment given and CIDR removal resulted in an acceptable pregnancy rate (65%) to AI after estrus detection (75%; Martínez et al., 2000a). However, the asynchrony of follicular growth at the time of the second GnRH treatment has not been reduced sufficiently to obtain acceptable pregnancy rates to fixed-time AI in heifers.

A series of experiments were conducted to determine the benefits of using a progesterone-releasing device in a GnRH- or pLH-based, Ovsynch-type FTAI program in beef cattle (Martínez et al., 2002b). In the first experiment, Simmental cows (n = 148) and heifers (n = 48) were treated in a 7-day Cosynch program and randomly assigned to receive no further treatment (Group 1) or a progesterone-releasing device concurrent with the first GnRH treatment (Day 0; Group 2). Pregnancy rates were not different (P = 0.79) in cows (Group 1, 45%; n = 71 vs. Group 2, 43%; n = 77). However, pregnancy rates were higher ($P<0.05$) in heifers treated with a progesterone-releasing device (68%; n = 25) than in Cosynch controls (39%; n = 23). Data suggest that although there was no apparent benefit in lactating beef cows, the use of a progesterone-releasing device increased fertility after FTAI in an Ovsynch-type program in heifers.

Porcine LH has been also used to synchronize follicular wave emergence (Martínez et al., 1999). Although pLH treatment in beef heifers resulted in a higher number of ovulations of the dominant follicle (78%) than GnRH treatment (56%; Martínez et al., 1999), fertility seemed to be similar in pLH-based Ovsynch-type protocols. Therefore, an experiment was designed to determine whether a progesterone-releasing device would improve pregnancy rates to a single fixed-time insemination in an Ovsynch-type, estrus synchronization program in 49 beef heifers in which porcine luteinizing hormone (pLH) was used in lieu of GnRH (Martínez et al., 2002b). Heifers were randomly assigned to three treatment groups; the first group received 12.5 mg of pLH on Day 0, PGF on Day 7, and 12.5 mg of pLH on Day 9 with AI 12 h later (pLH/ Ovsynch), while the second group (pLH/IVP) was similarly treated, with the addition of a progesterone-

releasing device from Days 0 to 7. Heifers in the third group (EB/IVP) received an injection of 1 mg of EB and 100 mg of progesterone on Day 0 and a IVP device from Day 0 to 7. Heifers were given PGF on Day 7 (at the time of device removal) and 1mg i.m. of EB on Day 8, with AI on Day 9 (52 h after PGF). The proportion of heifers in estrus was significantly greater in the EB/IVP (94%) and pLH/IVP (71%) groups than in the pLH/Ovsynch group (41%), whereas pregnancy rates were significantly higher in the EB/IVP group (75%) than in the pLH/Ovsynch group (38%), with the pLH/IVP group (65%) intermediate. Overall, in a Cosynch fixed-time breeding program in lactating beef cows, the use of a progesterone-releasing device did not influence pregnancy rates. However, the use of a IVP device in a 7-day Cosynch program utilizing GnRH or a 7-day Ovsynch program utilizing pLH significantly improved pregnancy rates in heifers.
It has also been shown that a progesterone-releasing device used in Cosynch protocols applied at different herd locations increased overall pregnancy rates in beef cows in good body condition (58%), compared to Control cows treated only with Cosynch (48%; Lamb et al., 2001). It is noteworthy that progesterone-releasing devices increased pregnancy rates in anestrous cows in that study (Lamb et al., 2001). In another study replicated over multiple sites, Lucy et al. (2001) showed that CIDR devices increased the synchrony of estrus and pregnancy rates in noncycling cattle. However, noncycling cattle had a lower pregnancy rate than their cycling herd-mates. Furthermore, the use of a norgestomet implant increased estrous rates in cows assigned to estrus synchronization programs consisting of an injection of GnRH followed 7 days later by PGF treatment (Stevenson et al., 2000). Treatment with GnRH and a norgestomet implant in lactating beef cows initially induced ovulation of the dominant follicle present at the time of treatment, synchronizing follicular wave emergence, which was later followed by higher concentration of estradiol and progesterone (Thompson et al., 1999). In this study, greater GnRH-induced LH release and pregnancy rates were observed after FTAI when a norgestomet implant was included in an Ovsynch program.

COMBINED TREATMENTS

As we have observed, there are alternative hormones to be used in synchronization programs. In our laboratory, an experiment was designed to compare progestins and methods of synchronizing wave emergence and ovulation in a FTAI program (Martínez et al., 2002c). Angus-cross heifers (n =503) were allocated into two synchronization groups and three treatment groups (2x3 factorial design) at random stages of the estrous cycle (Day 0=beginning of the experiment; Figure 3). At that time, heifers either received IVP devices (n =257) or were started on 0.5 mg animal^{-1} d^{-1} of MGA (; n=246) and given injections of 2 mg of EB plus 50 mg of progesterone, 100 µg of GnRH or 12.5 mg of pLH. The last feeding of MGA was given the morning of Day 6, and on Day 7, devices were removed and all heifers received PGF. Consistent with their treatment on Day 0, heifers were given either 1 mg EB 24 h after PGF and inseminated 28 h later or 100 µg GnRH or 12.5 mg pLH 48 h after PGF and concurrently inseminated. Heifers were exposed to bulls for 17 days, starting approximately 20 Day after fixed-time AI. Although estrus rates differed ($P \leq 0.01$), there was no difference in pregnancy rates among groups ($P<0.3$; Table 4). Overall, results suggest that the oral progestin (MGA) and the progesterone-releasing intravaginal device (CIDR) are equally efficacious, and that in combination with GnRH, pLH or EB, either can be used effectively to synchronize estrus and ovulation for fixed-time AI. The present study is apparently the first published report of a concurrent comparison of these six treatment protocols for fixed-time AI. As pregnancy rates to FTAI were not significantly different among treatments (overall rate,

58.0%), factors other than pregnancy rate (e.g., costs and management conditions) may influence the protocol selected. For example, CIDR devices are more expensive than MGA, but they can be used in both confined cattle and those at pasture. In regard to the latter, it is often difficult to ensure uniform intake of MGA in pastured cattle. In any case, the results of this experiment provide several options for fixed-time AI.

More recently, a large experiment was conducted to determine pregnancy rates following FTAI in heifers: (1) given GnRH or ECP to synchronize follicular wave emergence and ovulation in a IVP-based protocol; and (2) fed diets supplemented with flax or sunflower seeds (Colazo et al., 2003). At two locations, Angus and crossbred Angus heifers (n=983) were examined ultrasonically to confirm reproductive maturity and randomly allocated to six synchronization groups in a 2x3 factorial design (Figure 4). On Day 0 (beginning of treatments), heifers received a progesterone-releasing device and either 100 mg GnRH i.m. (n = 492) or 1 mg ECP plus 50 mg progesterone i.m. (n = 491); in these groups, device removal and PGF treatment were done concurrently on Days 7 and 8.5, respectively. Heifers were rerandomized to receive 0.5 mg ECP i.m. at device removal or 24 h later (with FTAI 58–60 h after device removal in both groups), or 100 mg GnRH i.m. concurrent with FTAI (52–54 h after device removal). The heifers were fed a barley silage-based diet for 50 days (from Day -25 to 25) supplemented with 1 kg/heifer per day of flax seed (n = 321), sunflower seed (n = 324), or no oilseed (n = 338). Following FTAI, heifers were also observed for estrus and reinseminated until 33 ± 1 d after FTAI, when heifers were sent to pasture and exposed to bulls for 57 days. Pregnancy rates to FTAI were not influenced by location (53.4 and 57.9% for Locations A and B, respectively, P=0.20) or by diet (52.1, 57.0, and 57.7% for Control, flax seed and sunflower seed, respectively, combined for both locations; P=0.46). Pregnancy rate was not affected by treatments given at device insertion (Table 5). However, pregnancy rate in heifers given ECP 24 h after device removal (ECP24) was higher (P<0.005) than in those given ECP at device removal (ECP0) or GnRH at FTAI (GnRH52). Overall pregnancy rate for AI (FTAI and reinsemination) was 79.8% (785/983) and fall pregnancy rate was 95.9% (943/983; Table 4). To summarize results, pregnancy rate to FTAI was not significantly affected by treatment, given at insertion of a progesterone-releasing device, to synchronize follicular wave emergence, and 0.5 mg ECP given 24 h after device removal (to synchronize ovulation) resulted in the highest pregnancy rate.

Following the idea of control of follicular wave emergence in a synchronization protocol based on the use of two doses of PGF, an experiment on breeding management was conducted. The objective was to determine reproductive performance following AI in beef heifers given estradiol to synchronize ovarian follicular wave emergence and estradiol or GnRH to synchronize ovulation in a two-dose PGF-based protocol. In Experiment 1, 561 cycling (confirmed by ultrasonography), Angus heifers received 500 mg cloprostenol, i.m. twice, 14 days apart (days 0 and 14) and were equally allocated to four groups in a 2x2 factorial design. On Day 7, heifers received either 2 mg estradiol benzoate (EB) and 50 mg progesterone (P), i.m. in oil (EBP group) or no treatment (NT group). Half the heifers in each group received 1 mg EB, i.m. in oil on Day 15 (24 h after the second PGF treatment) with TAI 28 h later (52 h after PGF), and the other half received 100 mg GnRH, i.m. on Day 17 (72 h after PGF) concurrent with FTAI. All heifers were observed for estrus twice daily from days 13 to 17; those detected in estrus more than 16 h before scheduled appointed AI were inseminated 4–16 h later and considered nonpregnant to FTAI. Overall pregnancy rate (approximately 35 days after AI) was higher in heifers that received EBP than those that did not (61.6% versus 48.2%, respectively; P<0:002); but was lower in heifers that received EB after PGF than those that received GnRH (50.0% versus 59.8%; P<0:02). Although estrus was

detected prior to TAI in 77 of 279 heifers (27.6%) treated with EBP (presumably due to induced luteolysis), they were inseminated and 53.2% became pregnant. Overall pregnancy rates were 51.4, 68.3, 45.0, and 55.0% in the NT/ GnRH, EBP/GnRH, NT/EB, and EBP/EB groups, respectively (P<0:05). A second experiment was designed with the same objectives as the previous study. However, since there were heifers detected in estrus before the appointed AI suggesting that EB/progesterone could have caused it, E-17β was given instead for wave emergence synchronization. Consequently, 401 cycling, Angus heifers were used with an experimental design was identical to the previous one, except that 1.5 mg estradiol-17β (E-17β) plus 50 mg progesterone (E-17βP) and 1 mg E-17β were used in lieu of EBP and EB, respectively. All heifers receiving E-17β 24 h after the second injection of PGF (NT/E-17β and E-17βP/E-17β) were TAI 28 h later without estrus detection, i.e. 52 h after PGF. Heifers in the other two groups received 100 mg GnRH, i.m. 72 h after PGF and were concurrently inseminated; heifers in these two groups that were detected in estrus prior to this time were inseminated 4–12 h later and considered nonpregnant to FTAI. Estrus rate during the first 72 h after the second PGF treatment was higher (P<0.05) in the E-17βP/GnRH group (45.0%; n ¼ 100) than in the NT/GnRH group (16.0%; n = 100), but conception rate following estrus detection and AI was not different (mean, 57.4%; P=0.50). Overall pregnancy rate was not significantly different among groups (mean, 46.9%; P=0.32). In summary for these two studies, the use of EB or E-17β to synchronize follicular wave emergence and estradiol or GnRH to synchronize ovulation in a two-dose, PGF-based protocol resulted in acceptable fertility to FTAI. However, when 2 mg EB was used to synchronize follicular wave emergence, early estrus occurred in approximately 28% of heifers, necessitating additional estrus detection. Therefore, a combination of estrus detection and FTAI in a two-dose PGF protocol resulted in highly acceptable pregnancy rates.

It is clear that in order for artificial insemination (or FTAI) to make an impact on the cattle industry, the necessity of estrus detection must be minimized. Estrus synchronization will reduce the amount of time that is required for estrus detection but it will not eliminate it. In addition, some methods of estrus synchronization have resulted in unacceptable levels of fertility. As with any breeding program, high levels of management are necessary for acceptable pregnancy rates after artificial insemination. All animals must be cycling before the initiation of the program or results can be disappointing.

New knowledge, generated by endocrine analysis combined with the ultrasonographic examination of the reproductive tract of the cow performed on daily basis, has provided new strategies for the control of the estrous cycle in cattle. One of the main findings was the identification of the reason for asynchrony of estrus and ovulation after an injection of PGF, which is the stage of follicle development at the time of treatment. It has also been determined that follicular wave emergence can be manipulated with steroid or peptide hormones. In addition, the same hormones can be used to accurately induce a synchronous ovulation. Obviously, additional studies with large numbers of animals are necessary to improve and confirm the efficacy of the approaches described in this paper.

REFERENCES

Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. 1992a. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. J Reprod Fertil 94: 177-188.

Adams GP, Matteri RL, Ginther OJ. 1992b. The effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. J Reprod Fertil 95: 627-640.

Adams GP, Kot K, Smith CA, Ginther OJ. 1993a. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. Can. J Anim Sci 73: 267-275.

Adams GP, Kot K, Smith CA, Ginther OJ. 1993b. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. Anim Reprod Sci 30: 259-271.

Baracaldo MI, Martinez MF, Adams GP, Mapletoft RJ. 2000. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. Theriogenology 53: 1239-1250.

Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. 1994. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicular ablation in heifers. Theriogenology 42:895-907.

Bó GA, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1991. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Synchro-Mate-B implants. Theriogenology 36: 169-183.

Bó , GA, Adams, GP, Nasser LF, Pierson, RA Mapletoft, RJ. 1993. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. Theriogenology 40: 225-239.

Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Tribulo HE, Caccia M, Mapletoft RJ. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol-17β treatment of heifers with or without a progestogen implant. Theriogenology 41: 1555-1569.

Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1995a. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. Theriogenology 43, 31-40.

Bó GA, Adams GP, Caccia M, Martinez MF, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1995b. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. Anim Reprod Sci 39:193-204.

Bó GA, Bergfelt DR, Brogliatti GM, Pierson RA, Adams GP, Mapletoft RJ. 2000a. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17β on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. Anim Reprod Sci 59: 141-157.

Bó GA, Medina M, Tegli JC, Costamagna A, Brogliatti GM. 2000b. Fixed-time artificial insemination in CIDR-B treated cows induced to ovulate with estradiol benzoate or GnRH. Proc Int Congr Anim Reprod, Stockholm, Sweden. 14: 14. Abstr.

Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in Bos indicus cattle. Anim Reprod Sci 78: 307-326

Bodensteiner KJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. 1996. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. Theriogenology 45: 1115-1128.

Brogliatti GM, Lagomarsino H, Adams GP. 1998. Follicular ablation for ovulation synchronization in cattle. Theriogenology 49: 339. Abstr.

Burke CR, Boland MP, Macmillan KL. 1999. Ovarian responses to progesterone and oestradiol benzoate administered intravaginally during dioestrus in cattle. Anim Reprod Sci 55: 23-33.

Caccia M, Bó GA. 1998. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B-implanted beef cows with estradiol benzoate and progesterone. Theriogenology 49: 34. Abstr.

Cavalieri J, Coleman C, Kinder JE, Fitspatrick LA. 1998. Comparison of three methods of acute administration of progesterone on the timing and synchrony of ovulation in Bos indicus heifers. Theriogenology 49: 1331-1343.

Cavalieri J, Hepworth G, Parker KI, Wright PJ, Macmillan KL. 2003. Effect of treatment with progesterone and oestradiol when starting treatment with an intravaginal progesterone releasing insert on ovarian follicular development and hormonal concentrations in Holstein cows. Anim Reprod Sci 76: 177-193.

Christian RE, Casida LE. 1948. The effect of progesterone in altering the oestrual cycle of the cow. J Anim Sci 7: 540. Abstr.

Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 2003. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. Theriogenology 60: 855–865.

Colazo MG, Kastelic JP, Whittaker PR, Gavaga QA, Wilde R, Mapletoft RJ. 2004. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. Anim Reprod Sci 81: 25-34.

Colazo MG, Kastelic JP, Martinez MF, Whittaker PR, Wilde R, Ambrose JD, Corbett R, Mapletoft RJ. 2004a. Fertility following fixed-time AI in CIDR-treated beef heifers given GnRH or estradiol cypionate and fed diets supplemented with flax seed or sunflower seed. Theriogenology 61: 1115-1124.

Colazo MG, Martínez MF, Kastelic JP, Small JS, Mapletoft RJ. 2004b.

Cooperative Regional Research Project - Ahmad N, Beam SW, Butler WR, Deaver DR, Duby RT, Elder DR, Fortune JE, Griel LC, Jones LS, Milvae RA, Pate JL, Revah I, Schreiber DT, Townson DH, Tsang PCW, Inskeep EK. 1996. Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. J Anim Sci 74: 1943-1952.

Custer EE, Beal WE, Wilson SJ, Meadows AW, Berardinelli JG, Adair R. 1994. Effect of melengestrol acetate (MGA) or progesterone-releasing intravaginal device (PRID) on follicular development, concentrations of estradiol-17β and progesterone and luteinizing hormone release during an artificially lengthened bovine estrous cycle. J Anim Sci 72: 1282-1289.

Cutaia L, Moreno D, Villata L, Bó G. 2001. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 hours later. Theriogenology 55: 224. Abstr.

D'Occhio MJ, Niasari-Naslaji A, O'Niell CJ, Frisch JE, Aspden, Whyte T, Day A. 1996. Oestrous behaviour and fertility after synchronisation treatment using oestradiol-progestogen for ten days or hCG-progestogen for eight days in beef heifers. Proc Int Cong Anim Reprod, (4) 18. Abstr.

Dailey RA, James RE, Inskeep EK, Washburn SP. 1983. Synchronization of estrus in dairy heifers with prostaglandin F2α with or without estradiol benzoate. J Anim Sci 66: 881-886.

Dailey RA, Price JC, Simmons KR, Meisterling EM, Quinn PA, Washburn SP. 1986. Synchronization of estrus in dairy cows with prostaglandin F2α and estradiol benzoate. J Dairy Sci 69: 1110-1114.

Drost M, Thatcher WW. 1992. Application of gonadotrophin releasing hormone as therapeutic agent in animal reproduction. Anim Reprod Sci 28: 11-19.

Ginther OJ, Wiltbank, MC, Fricke PM, Gibbons JR, Kot K. 1996b. Selection of the dominant follicle in cattle. Biol Reprod 55: 1187-1194.

Hansel W, Hixon J, Shemesh M, Tobey D. 1975. Concentrations and activities of prostaglandins of the F series in bovine tissue, blood and milk. J. Dairy Sci 59: 1353-1365.

Kastelic JP, Knopf L, Ginther OJ. 1990a. Effect of day of prostaglandin F2α treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. Anim Reprod Sci 23: 169-180.

Kastelic JP, McCartney DH, Olson WO, Barth AD, Mapletoft RJ. 1997. Melengestrol acetate and estradiol-17β for synchronizing estrus and improving reproductive performance in beef cattle. Can J Anim Sci 77: 683-688.

Kastelic JP, McCartney DH, Olson WO, Barth AD, Mapletoft RJ. 1997. Melengestrol acetate and estradiol-17β for synchronizing estrus and improving reproductive performance in beef cattle. Can J Anim Sci 77: 683-688.

Kastelic JP, Mapletoft RJ. 1998. Follicular responses in dairy cows treated with GnRH and cloprostenol. Can Vet J 39: 107-109.

Kastelic JP, Olson WO, Martinez M, Cook RB, Mapletoft RJ. 1999. Synchronization of estrus in beef cattle with norgestomet and estradiol valerate. Can Vet J 40: 173-178.

Kastelic JP, Colazo MG, Small JA, Ward DR, Mapletoft RJ. 2004. Ovarian follicular dynamics in cows treated with CIDR, estradiol and progesterone late in the estrous cycle. Reprod Fertil Develop 16: 129-130. Abstr.

Kittok RJ, Britt JH, Convey EJ. 1973. Endocrine response after GnRH in luteal phase cows and cows with follicular cysts. J Anim Sci 37: 985-989.

Ko JCH, Kastelic JP, Del Campo MR, Ginther OJ. 1991. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. J Reprod Fertil 91: 511-519.

Kojima FN, Chenault JR, Wehrman ME, Bergfeld EG, Cupp AS, Werth LA, Mariscal V, Sanchez T, Kittok RJ, Kinder JE. 1995. Melengestrol acetate at greater doses than typically used for estrus synchrony in bovine females does not mimic endogenous progesterone in regulation of secretion of luteinizing hormone and 17β-estradiol. Biol Reprod 52 : 455-463.

Lamb GC, Nix DW, Stevenson JS, Corah LR. 2000. Prolonging the MGA-prostaglandin F2α interval from 17 to 19 days in an estrus synchronization system for heifers. Theriogenology 53: 691-698.

Lamb GC, Stevenson JS, Kesler DJ, Garverick HA, Brown DR, Salfen BE. 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus GnRH and prostaglandin F2α for ovulation control in postpartum suckled beef cows. J Anim Sci 79: 2253-2259.

Lammoglia MA, Short RE, Bellows RE, Bellows SE, MacNeill MD, Hafs HD. 1998. Induced and synchronized estrus in cattle: Dose titration of estradiol benzoate in prepubertal heifers and post-partum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F2α. J Anim Sci 76: 1662-1670.

Larson LL, Ball PJH. 1992. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. Theriogenology 38: 255-267.

Lucy MC, Billings HJ, Butler WR, Ehnis LR, Fields MJ, Kesler DJ, Kinder JE, Mattos RC, Short RE, Thatcher WW, Wettemann RP, Yelich JV, Hafs HD. 2003. Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF2alpha for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal beef heifers, and dairy heifers. J Anim Sci 79: 982-995.

Macmillan KL, Henderson HV. 1984. Analyses of the variation in the interval from an injection of prostaglandin F2α to oestrus as a method of studying patterns of follicle development during dioestrus in dairy cows. Anim Reprod Sci 6: 245-254.

Macmillan KL, Taufa VK, Barnes DR, Day AM. 1991. Plasma progesterone concentrations in heifers with a new intravaginal device. Anim. Reprod. Sci.26: 25-40.

Macmillan KL, Thatcher WW. 1991. Effects of an agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone on ovarian follicles in cattle. Biol Reprod 45: 883-889.

Macmillan KL, Segwagwe BWE, Pino CS. 2003. Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. Anim Reprod Sci 78: 327-344.

Martínez M, Bergfelt D, Adams G, Kastelic J, Mapletoft R. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. Anim Reprod Sci 57: 23-33.

Martínez MF, Adams GP, Kastelic JP, Bergfelt D, Mapletoft RJ. 2000. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. Theriogenology 54: 757-769.

Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Mapletoft RJ. 2001. The use of GnRH or estradiol to facilitate fixed-time insemination in an MGA-based synchronization regimen in beef cattle. Anim Reprod Sci 67: 221-229.

Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Cook B, Olson WO, Mapletoft RJ. 2002a. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. Theriogenology 57:1049-1059.

Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Mapletoft RJ. 2002b. The use of a progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengestrol acetate with GnRH, LH, or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. J Anim Sci 80: 1746-1751.

Martínez MF, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 2003a. Effects of estradiol and progesterona on plasma steroid and gonadotropin concentrations in CIDR-treated ovariectomized cows. Theriogenology 59: 224. Abstr.

Martínez MF, Mapletoft RJ, Kastelic JP, Carruthers T. 2003b. The effects of 3 gonadorelin products on luteinizing hormone release, ovulation, and follicular wave emergence in cattle. Can Vet J 44: 125-131.

Martínez MF, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 2004a. The use of estradiol and/or GnRH in a two-dose PGF protocol for breeding management of beef heifers. Theriogenology 62: 363-372.

Martínez MF, Kastelic JP, Bó GA, Caccia M, Mapletoft RJ. 2004b. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. Anim Reprod Sci (Corrected Proof – In press).

Martínez MF, Bó GA, Caccia M, Colazo MG, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 2005. Effects of dose of estradiol benzoate and progesterone on follicular and luteal dynamics in prostaglandin-treated beef heifers. Reprod Fertil Develop. Abstr. (accepted for Annual IETS Meeting).

McDougall S, Compton CWR, Anniss FN. 2004. Effect of exogenous progesterone and oestradiol on plasma progesterone concentrations and follicle wave dynamics in anovulatory anoestrous post-partum dairy cattle. Anim Reprod Sci 84: 303-314.

Mihm M, Curran N, Hyttel P, Knight PG, Boland MP, Roche JF. 1999. Effect of persistence on follicular fluid oestradiol and inhibin and on oocyte maturation in heifers. J Reprod Fertil 116: 293-304.

Momont HW, Seguin BE. 1984. Treatment of unobserved estrus in lactacting dairy cows with prostaglandin F2α products. Proc Symp Comp Cont Edu Pract Vet, p. 28-31.

Moreno D, Cutaia L, Tríbulo H, Tríbulo R, Villata ML, Caccia M, Bó GA. 2002. Effect of time of prostaglandin administration on pregnancy rates in embryo recipients treated with vaginal devices and transferred without estrus detection. Theriogenology 57: 552. Abstr.

Odde KG. 1990. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. J Anim Sci 68: 817-830.

Peters JB, Welch JA, Lauderdale JW, Inskeep EK. 1977. Synchronization of estrus in beef cattle with PGF2α and estradiol benzoate. J Anim Sci, 45: 230-2335.

Prescott RE, Silcox RW, Byerley DJ, Caudle AB, Kiser TE. 1992. Effect of GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef cows. J Anim Sci (Suppl. 1) : 254. Abstr.

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2α, and GnRH. Theriogenology 44: 915-923.

Revah I, Butler WR. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. J Reprod Fertil 106: 39-47.

Roche JF. 1974. Synchronization of oestrus and fertility following artificial insemination in heifers given prostaglandin F2α. J Reprod Fertil 37: 135-138.

Ross PJ, Aller JF, Callejas SS, Butler H, Alberio RH. 2004. Estradiol benzoate given 0 or 24 h after the end of a progestagen treatment in postpartum suckled beef cows. Theriogenology 62:265-273.

Roy GL, Twagiramugu H. 1999. Time interval between GnRH and prostaglandin injections influences the precision of estrus in synchronized cattle. Theriogenology 51: 413. Abstr.

Savio JD, Thatcher WW, Badinga L, de la Sota RL, Wolfenson D. 1993. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrous cycle in cows. J Reprod Fertil 97: 197-203.

Seguin B, 1997. Ovsynch: A method for breeding dairy cows without doing heat detection. The Bovine Practitioner, 31:11-14.

Silcox RW, Powell KL Kiser TE. 1993. Ability of dominant follicles (DF) to respond to exogenous GnRH administration is dependent of their stage of development. J Anim Sci 71, (Suppl. 1): 219. Abstr.

Stevenson JS, Thompson KE, Forbes WL, Lamb GC, Grieger DM, Corah LR. 2000. Synchronizing estrus and(or) ovulation in beef cows after combinations of GnRH, norgestomet, an prostaglandin F2α with or without timed insemination. J Anim Sci 78: 1747-1758.

Thompson KE, Stevenson JS, Lamb GC, Grieger DM, Löest CA. 1999. Follicular, hormonal, and pregnancy responses of early postpartum suckled beef cows to GnRH, norgestomet, and prostaglandin F2α. J Anim Sci 77: 1823-1832.

Thundathil J, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 1997. The effect of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular development and ovulation in dairy cattle. Can J Vet Res 61: 314-316.

Thundathil J, Kastelic JP, Olson WO, Cook RB, Mapletoft RJ. 1999. Melengestrol acetate, estradiol-17β and GnRH for synchronization of estrus in beef cows. Can J Anim Sci 79: 39-43.

Trimberger GW, Hansel W. 1955. Conception rate and ovarian function following estrus control by progesterone injection in dairy cattle. J Anim Sci 14: 224.

Tríbulo H, Moreno D, Cutaia L, Gatti G, Tríbulo R, Caccia M, Bó GA. 2002. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone, vaginal devices, and eCG, and transferred without estrus detection. Theriogenology 57: 563. Abstr.

Twagiramungu H, Guilbault LA, Dufour JJ. 1995. Synchronization of ovarian follicular waves with a Gonadotropin-Releasing Hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. J Anim Sci 73: 3141-3151.

Twagiramungu HL, Guilbault, LA, Proulx J, Dufour, JJ. 1992. Synchronization of estrus in beef cattle with two injections of Buserelin and protaglandin. Theriogenology 38: 1131-1144.

Ulberg LC, Lindley CE. 1960. Use of progesterone and estrogen in the control of reproductive activities in beef cattle. J Anim Sci 19: 1132-1142.

Welch JA, Hackett AJ, Cunningham CJ, Heishman JO, Ford SP, Nadaraja R, Hansel W, Inskeep EK. 1975. Control of estrus in lactating beef cows with prostaglandin F2α and estradiol benzoate. J Anim Sci 41: 1686-1692.

Wiltbank JN, Ingalls JE, Rowden WW. 1961. Effects of various forms of estrogens alone or in combinations with gonadotrophins on the estrous cycle in beef heifers. J Anim Sci 20: 341-346.

Wiltbank JN, Kasson CW. 1968. Synchronization of estrus in catle with an oral progestational agent and an injection of an estrogen. J Anim Sci 27: 113-116.

Wiltbank JN, Zimmerman DR, Ingalls JE, Rowden WW. 1965. Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. J Anim Sci 24: 990-994.

Wiltbank MC. 1997. How information on hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. Proc Annual Meeting Soc for Theriogenology, Montreal, PQ, p. 83-97.

Wolfenson D, Thatcher WW, Savio JD, Badinga L, Lucy MC. 1994. The effect of a GnRH analogue on the dynamics of follicular development and synchronization of estrus in lactating cyclic dairy cows. Theriogenology 42: 633-644.

Table 1. Mean (± SEM) intervals from treatment to follicular wave emergence (WE), to estrus, and to ovulation in heifers given treatments to synchronize WE.

Intervals (Days)	Control	Estradiol-17β + progesterone	GnRH*	Follicular ablation
Treatment to WE	3.5±0.6[a]	3.4±0.1[a]	1.5±0.3[b]	1.0±0.1[b]
Range	(-2 to 8)[x]	(3 to 4)[z]	(-1 to 4)[y]	(0 to 2)[z]
n	18	16	16	17
PGF to estrus	2.3±0.2	2.2±0.2	2.2±0.2	2.5±0.1
Range	(1.5 to 4.5)	(1.5 to 3.0)	(1.5 to 3.5)	(2.0 to 3.5)
n	17	14	13	11
PGF to ovulation	3.6±0.2	3.4±0.1	3.5±0.1	3.8±0.1
Range	(2.5 to 5.5)	(3.0 to 4.5)	(2.5 to 4.5)	(3.0 to 4.5)
n	18	16	16	16**

* Although 8 of 16 heifers ovulated in response to GnRH treatment, data points are based on all 16 heifers in the group

** One outlier excluded for this data point.

[ab] Means, and [xyz] variances within rows with different superscripts are significant (P<0.05).

Table 2. Mean (± SEM) intervals (and their range) from estradiol treatment to follicular wave emergence and from CIDR removal to ovulation in CIDR-treated beef heifers after administration of estradiol-17β or estradiol benzoate to synchronize follicular wave emergence and ovulation (Experiment 2).

	Estradiol-17β	Estradiol benzoate
Induction of follicular wave emergence		
No. of heifers	16	16
Interval (d) from estradiol treatment to		
Wave emergence	3.4±0.5	3.7±0.6
Range	-3 to 5	-5 to 6
Excluding non-responding heifers		
No. of heifers	15	15
Wave emergence (d)	3.9±0.2	4.3±0.2
Range (d)	3 to 5	3 to 6
Induction of ovulation		
Interval (h) from CIDR removal to		
Ovulation	75.8±3.0	77.3±1.9
Range	72 to 120	72 to 96

Table 3. Mean (±S.D.) intervals from treatment with 0, 1, 2 or 5 mg estradiol valerate at progesterone-releasing device insertion to follicular wave emergence (FWE), and from CIDR removal to estrus and ovulation (Experiment 3)

	Dose of estradiol valerate (mg)			
	0	**1**	**2**	**5**
Interval from treatment to FWE (d)				
No. of cows	10	11	10	10
Mean	2.2 a	2.5 a	3.4 a	4.8 b
S.D.	3.3 x	2.3 x	0.8 y	1.2 y
Range	−4 to 6	−4 to 4	2 to 5	3 to 7
Interval from CIDR removal to Estrus (h)				
No. of cows	9	11	10	8
Mean	58.0	53.5	61.2	59.3
S.D.	19.4	11.2	14.1	17.1
Range	36 to 96	36 to 72	48 to 84	48 to 96
Ovulation (h)				
No. of cows	10	11	10	10
Mean	86.4	85.1	91.2	90.0
S.D.	18.6	12.5	14.1	22.1
Range	60 to 120	72 to 108	72 to 120	72 to 132

Within the row with different letters (a, b) differed significantly ($P<0.05$). Standard deviations within the row with different letters (x, y) differed significantly ($P<0.001$).

Table 4. Estrus rates, interval from PG to estrus, and pregnancy rates in beef heifers receiving a CIDR device or fed MGA and given GnRH, pLH or EB for the synchronization of follicular wave emergence and ovulation for fixed-time AI[1]

	CIDR			MGA		
	GnRH	pLH	EB	GnRH	pLH	EB
No. heifers	103	102	52	101	97	48
Estrus %	65.0[a]	60.8[a]	92.3[b]	35.6[c]	33.0[c]	91.7[b]
PG to estrus h						
Mean	47.1	47.8	47.3	48.0	48.8	48.3
Standard deviation[2]	8.2[x]	10.3[x]	3.8[y]	2.9[y]	3.0[y]	1.8[z]
Pregnancy rate to AI %						
Overall	65.0	55.9	61.5	52.5	55.7	60.4
Detected in estrus	67.2	61.3	62.5	61.1	62.5	59.1
Not detected in estrus	61.1	47.5	50.0	47.7	52.3	75.0
Fall pregnancy rate %	75.7	77.4	78.8	73.3	72.2	77.1

[abc] Mean and percentages without a common superscript differ ($P<0.05$)
[xyz] Variances without a common superscript differ ($P<0.05$)
[1] Please refer to Figure 3 for treatment schedule; PG was administered to all heifers on d 7 at CIDR removal (1 d after the end of MGA feeding)
[2] Standard deviation was calculated for simple effects to show differences in variation of the interval from PG to estrus but statistical comparisons were done with variances.

Table 5. Pregnancy rates to fixed-time AI, after rebreeding, and fall pregnancy rates in beef heifers receiving a CIDR and given 100 µg GnRH or 1 mg estradiol cypionate (ECP) and 50 mg Progesterone 5% (to synchronize follicular wave emergence), and subsequently given 0.5 mg ECP at CIDR removal (ECP0) or 24 h later (ECP24), or 100 µg GnRH concurrent with AI (GnRH52) to synchronize ovulation.

	GnRH			ECP		
	ECP0	ECP24	GnRH52	ECP0	ECP24	GnRH52
No. heifers	162	165	165	160	165	166
Fixed-time AI [1]						
No. pregnant	78	109	89	90	107	80
Pregnancy rate (%)	48.1[a]	66.1[b]	53.9[a]	56.2[ab]	64.8[b]	48.2[a]
Rebreeding [1]						
No. pregnant	47	31	40	41	31	42
Pregnancy rate (%)[2]	77.2	84.8	78.2	81.9	83.6	73.5
Fall pregnancy examination [3]						
No. pregnant	152	159	159	158	157	158
Pregnancy rate (%)	93.8	96.4	96.4	98.8	95.2	95.2

[ab] Percentages without a common superscript differ (P<0.001); ECP/ECP0 tended to differ from GnRH/ECP24 (P<0.07) and ECP/ECP24 (P<0.1)
[1] Pregnancy rate based on ultrasonography
[2] Accumulated pregnancy rate after two inseminations; percentages tended to differ (P<0.09).
[3] Pregnancy rate based on rectal palpation

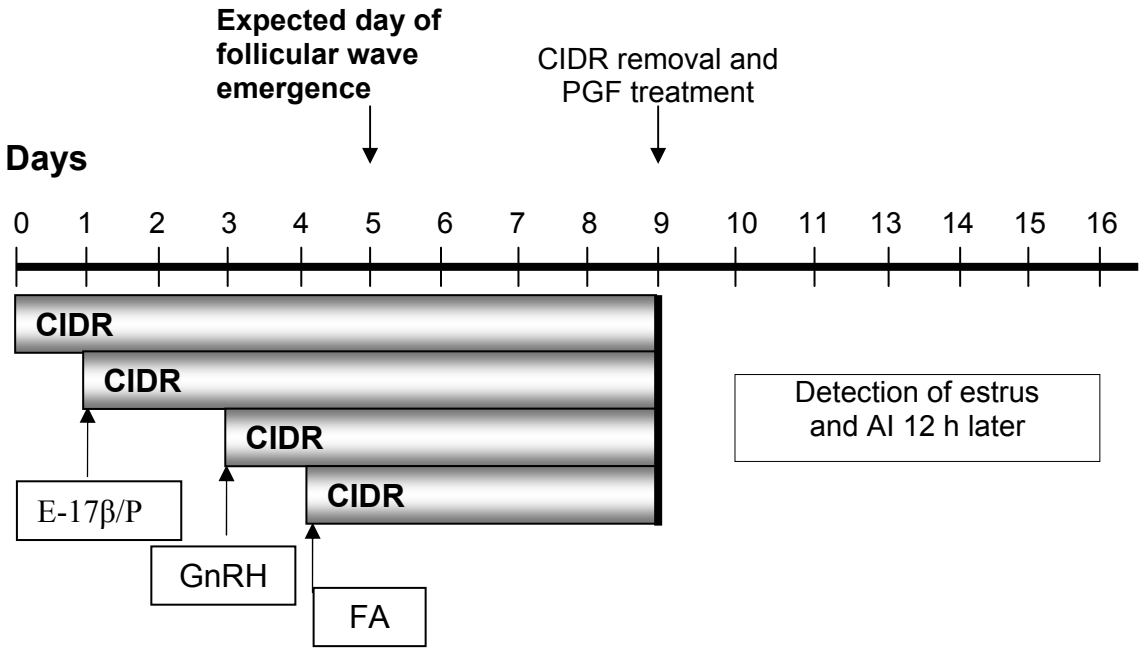


Figure 1. Schedule of synchronization treatments and AI in CIDR-treated beef heifers. Heifers received no further treatment (Control), estradiol-17β/ progesterone (E-17β/P), gonadotrophin releasing hormone (GnRH), or ultrasound-guided follicular ablation (FA) at the time of CIDR insertion in the respective groups.

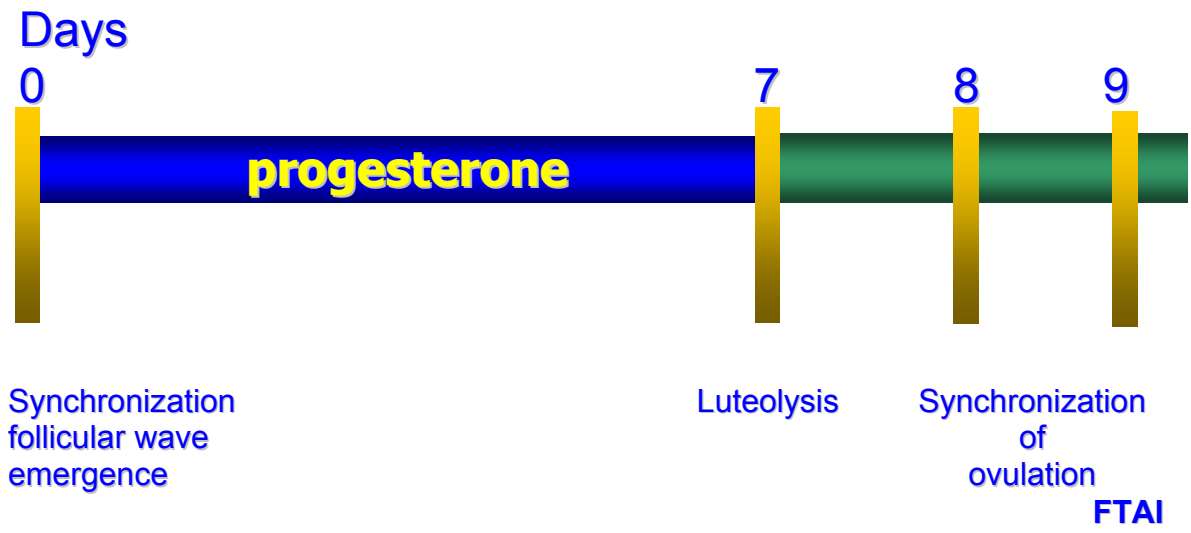


Figure 2. Schedule of an ideal ovulation synchronization protocol for FTAI in cattle. It is based on a short progestin treatment with a treatment to synchronize follicular wave emergence. This allows for the growth of a newly recruited dominant follicle, which will ovulate when a second hormonal treatment is induced after progestin removal and PGF. If estradiol is given for induction of ovulation, the treatment is administered 24 h after PGF, but if GnRH or pLH is given, the treatment can be administered at 48 h and AI could be performed concurrently.

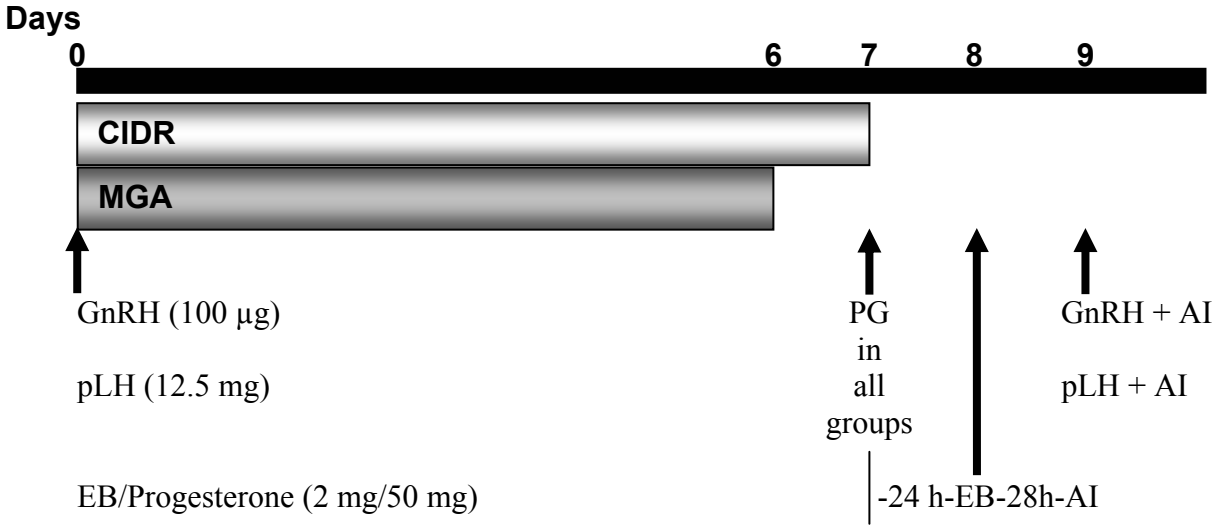


Figure 3. Schematic outline of the experiment (arrows indicate times of administration of treatments). The CIDR devices were removed after 7 Day and MGA was fed once daily from Days 0 to 6. Heifers were treated with GnRH, pLH or estradiol benzoate (EB) and progesterone on Day 0 and all received PG on Day 7. Heifers that received GnRH or pLH received a second injection of the same hormone 48 h after PG (Day 9) and were inseminated concurrently, while those in the EB group received EB 24 h after PG (Day 8) and were inseminated 28 h later (52 h after PG; Day 9).

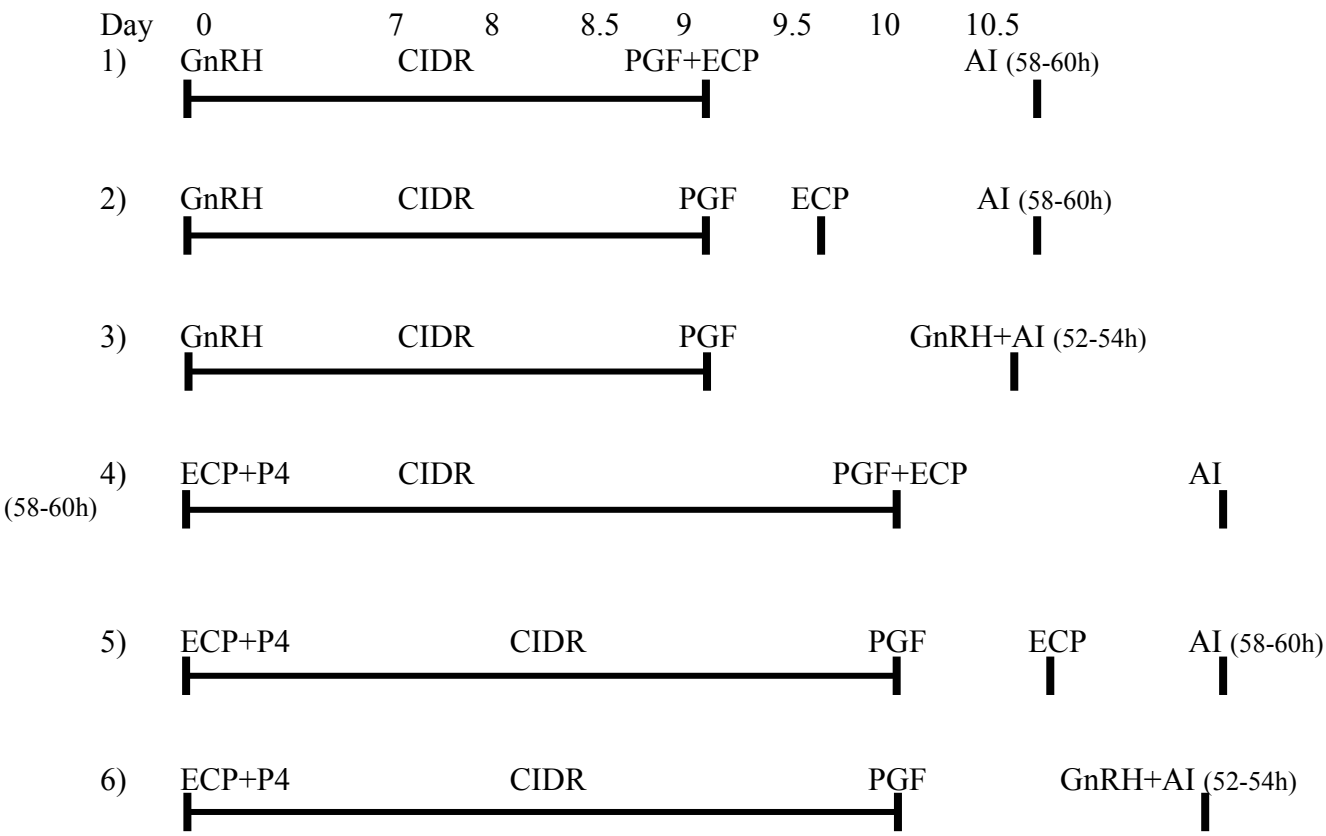


Figure 4. Schematic representation of the timeline of treatments in the six different estrus synchronization protocols. Treatments with ECP (1 mg) and progesterone 5% (P4; 50 mg) or GnRH (100 mg) were given at CIDR insertion to induce a new follicular wave emergence. In all protocols, PGF (25 mg dinoprost) was administered at CIDR removal. For synchronizing ovulation, ECP (0.5 mg) was given at CIDR removal or 24 h later and GnRH (100 mg) was given concurrently with AI 52 h after CIDR removal.

PROGRAMAS DE INSEMINACION ARTIFICIAL Y TRANSFERENCIA DE EMBRIONES A TIEMPO FIJO

G.A. Bo[1], I. Cutaia[1], P.S. Baruselli[2]
[1] Instituto de Reproducción Animal Córdoba, J.L. de Cabrera 106, X5000GVD Córdoba y Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Córdoba, Argentina
[2] Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP - Rua Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brasil
e-mail: gabrielbo@iracbiogen.com.ar

INTRODUCCIÓN

La Inseminación Artificial (IA) y la Transferencia de Embriones (TE) son las técnicas reproductivas de mayor impacto en la producción ganadera. Sin embargo, la necesidad de observar celo dos veces por día sin importar las condiciones climáticas, época del año, feriados o vacaciones y otras actividades que debe hacer el personal en una explotación ganadera, hacen que se pierda eficiencia en esta actividad rutinaria y se comprometa considerablemente la productividad del sistema. La modificación de los ciclos para que todas las hembras presenten celo en un período breve de tiempo es el objetivo que ha estimulado el desarrollo de numerosas líneas de investigación por muchos años. La utilización de la ultrasonografía para estudiar el efecto de distintos tratamientos hormonales sobre la dinámica folicular en el bovino llevó al desarrollo de protocolos que permiten manipular eficientemente el ciclo estral y la ovulación. Existen hoy numerosos protocolos de sincronización de celos y ovulaciones y cada uno de ellos tiene sus ventajas y desventajas. Por esto el médico veterinario debe tener un conocimiento profundo de la fisiología reproductiva del bovino para determinar cuál es el método más adecuado para los distintos ambientes y animales con los que debe trabajar. El presente trabajo tiene por objeto hacer una síntesis de los tratamientos disponibles para sincronizar la ovulación para programas de IA y TE en el ganado bovino.

SINCRONIZACIÓN DE CELOS Y DE LA OVULACIÓN PARA PROGRAMAS DE INSEMINACION ARTIFICIAL

Debido a la dificultad de la detección de celos, muchos grupos de investigación iniciaron estudios con el objetivo de sincronizar la ovulación y desarrollar de esta manera protocolos que permitan realizar la IATF con porcentajes de concepción aceptables. En esta parte presentaremos estos protocolos y los resultados de campo más significativos.

SINCRONIZACIÓN CON PGF

La PGF y sus análogos son ampliamente empleados con la finalidad de sincronizar las manifestaciones de celo del ganado bovino. La PGF causa la regresión del CL a partir del Día 5 del ciclo estral y su efecto luteolítico es máximo entre los Días 12 y 17 [(60)]. Sin embargo, el estadio del folículo dominante en el momento de la aplicación de la PGF va a producir una variación del momento del celo y la ovulación de 2 a 7 d [(44)]. Además, aún cuando se confirma la presencia de un CL al momento del tratamiento, la respuesta estral del ganado *Bos indicus* es aproximadamente un 30% menor que el 90% reportado para ganado *Bos taurus* [(40)]. Estas características fisiológicas, sumadas

a la dificultad de la deteción de celos en el *Bos indicus* explican los variables porcentajes de animales en celo, con índices menores al 50% [28,41,52] y mayores al 70% [46,61]. Teóricamente, las dos aplicaciones de PGF con intervalos de 11 a 14 d son efectivas cuando hay una gran proporción de hembras ciclando, pero cuando hay hembras en anestro, condición bastante común en animales en pastoreo en z1onas tropicales, hay bajos índices de sincronización y tasa de preñez [30, 45, 52].

SINCRONIZACIÓN CON GNRH/PGF/GNRH, TRATAMIENTOS "OVSYNCH"

Hace ya un tiempo, se diseñó en Estados Unidos un protocolo conocido como Ovsynch, cuya meta principal era disminuir la variación entre los animales en el momento de la ovulación luego del tratamiento con PGF [63]. Este protocolo utiliza análogos de GnRH, seguido de la aplicación de PGF luego de 7 d, una segunda GnRH a las 48 h de la PGF y se realiza la IATF a las 15 a 24 h de la segunda GnRH. La primera GnRH causa un pico de LH (2 h después) y esta a su vez provoca la ovulación del folículo dominante presente en el momento del tratamiento, surgiendo una nueva onda de crecimiento folicular 2 a 3 d después [50, 63]. La PGF a los 7 d lisa el CL y la segunda GnRH sincroniza la ovulación [63]. Las tasas de concepción varían entre 26 a 55% en ganado *Bos taurus* [67].

Existen también trabajos que analizaron la respuesta al protocolo Ovsynch en cebuínos [4, 73]. Este protocolo fue probado tanto en vacas lactantes como en no lactantes y las tasas de preñez después de la IATF fueron similares a las informadas para ganado *Bos taurus*, oscilando entre el 42 y 48% [4,73]. También como ocurre en el *Bos taurus,* los resultados de preñez en vaquillonas han sido variables, con porcentajes de preñez que oscilan entre el 21% y el 43% [27,52,73].

Barros y col. [5], diseñaron un protocolo de IATF similar al Ovsynch, pero sustituyendo el segundo tratamiento de GnRH por 1 mg de benzoato de estradiol (EB) que se administra a las 24 h de la PGF. En este caso se realiza la IATF alrededor de 30 a 34 h después del EB. Este protocolo fue probado en 53 vacas Nelore lactantes (60 a 90 d pos parto) que estaban ciclando (confirmado por la presencia de un CL por palpación rectal) y resultó en una tasa de preñez del 43,3% [38]. Sin embargo, las tasas de preñez en vacas en anestro fueron del 14,9% en 67 vacas tratadas con el protocolo Ovsynch y 19,1% en 68 vacas tratadas con el Ovsynch+EB [38]. Por lo tanto, estos tratamientos no son efectivos en animales en anestro y deben ser utilizados solamente con altas tasas de ciclicidad, condiciones no siempre encontradas en establecimientos productores de carne y leche en los trópicos.

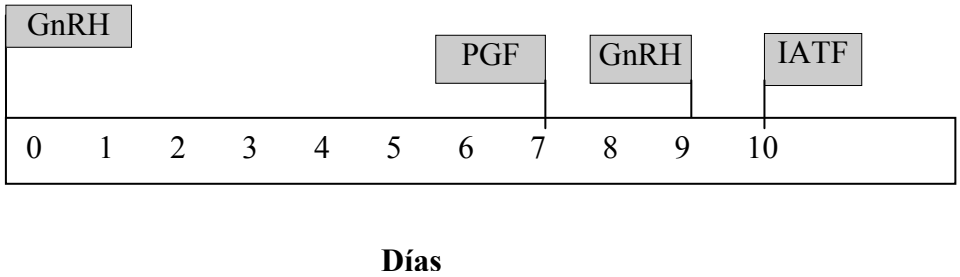


Figura 1 - Esquema de tratamientos del protocolo Ovsynch.

SINCRONIZACIÓN CON PROGESTÁGENOS Y ESTRADIOL

Desde hace más de 40 años se ha tratado de utilizar la P4 para la sincronización de celos en el ganado bovino. Los animales recibían inyecciones diarias del esteroide en dosis variadas por períodos de hasta 20 d. Con el paso del tiempo fueron desarrollados

otros métodos de administración y otros compuestos similares a la P4, dentro de los cuales podemos citar los de administración oral como el acetato de melengestrol (MGA), los implantes subcutáneos de norgestomet y los dispositivos intravaginales con P4.

a. Sincronización con Norgestomet y Valerato de Estradiol

Los implantes de progestágenos que hay actualmente en el mercado (Crestar, Intervet) contienen 3 mg de norgestomet y son colocados en forma subcutánea en la oreja por un período de 9 ó 10 d. Junto con la inserción del implante, se coloca una solución oleosa por vía im que continene 5 mg de valerato de estradiol (EV, un estrógeno de vida media larga) y 3 mg de norgestomet. La solución oleosa será abreviada de aquí en adelante como NEV. El propósito original del NEV era inducir la luteólisis con el EV y obtener altos niveles inmediatos de progestágeno con los 3 mg de norgestomet (74). Luego se descubrió que el EV inducía también, a través de la supresión de los folículos presentes, el desarrollo de una nueva onda folicular 3 a 8 d después [16].

Los trabajos que utilizaron implantes de norgestomet (+NEV) en bovinos demostraron que más del 90% de los animales manifiestan celo después de retirado el implante, con tasas de concepción (a la IA 12 h pos celo o la IATF 48 a 56 h de sacar el implante) del 33 al 68% [52,60]. Las tasas de preñez más bajas estuvieron relacionadas con un alto porcentaje de animales en anestro y una baja condición corporal [43]. En ganado *Bos indicus* se han encontrado resultados satisfatorios en vacas adultas sin cría pero muy variables en vacas con cría y vaquillonas. Se realizó un experimento donde se comparó las tasas de preñez en vaquillonas cruza *Bos indicus* x *Bos taurus* con el empleo del implante de Crestar, asociado a una inyección de NEV o EB+P4 en el Día 0 (8). Las vaquillonas del Grupo 1 recibieron un implante de Crestar y NEV im (Día 0). En el Día 8 se aplicó PGF y se sacaron los implantes en el Día 9. Las vaquillonas del Grupo 2 recibieron un Crestar y una inyección de 2 mg de EB + 50 mg de P4 en lugar del NEV (Día 0). En este caso los implantes fueron retirados en el Día 8, junto con la administración de PGF. Las IATF fueron realizadas alrededor de 54 h después de retirados los implantes en los dos grupos. La tasa de preñez fue superior ($P<0,06$) cuando se empleó el EB (38,9%, 37/95) en lugar del NEV (29,9%, 25/93) en el inicio del tratamiento. Se ha especulado que la baja fertilidad en las vaquillonas tratadas con NEV puede ser causada por los altos y prolongados niveles circulantes de estradiol producidos por el NEV (7 d o más) versus el EB (2,5 a 3 d) que podrían inducir una supresión prolongada del desarrollo folicular (30,16,54). No obstante, esto no se ha observado en todos los rebaños de vaquillonas ni tampoco en vacas adultas. Obviamente, el menor tamaño corporal de algunas vaquillonas pueden hacer que las mismas se comporten diferente a las vacas en respuesta a los 5 mg de EV, por lo que se deberían evaluar dosis menores a 5 mg para algunas vaquillonas *Bos indicus* muy livianas. En trabajos recientes realizados con vaquillonas Bos taurus, la reducción de la dosis de EV a 1 ó 2 mg mejoró la sincronía y adelantó el comienzo de la nueva onda folicular, que en la mayoría de los animales comenzó a los 3 ó 4 d [51]. Por último, la baja fertilidad no ha sido observada cuando se adicionó eCG en el momento de la remoción del implante en vaquillonas cruza *Bos indicus* tratadas con norgestomet+NEV por 9 d [45,53].

UTILIZACIÓN DE EB, ECG O GNRH EN LOS TRATAMIENTOS CON IMPLANTES DE NORGESTOMET

La aplicabilidad de los tratamientos con norgestomet+NEV en ganado *Bos indicus* requiere que se obtengan aceptables índices de preñez en protocolos de IATF. Se han informado resultados aceptables con IATF 48 a 56 h después del tratamiento clásico con el implante, pero también otros bajos [52,60] y se especuló que pueden estar

influenciados por variables intervalos entre la remoción del implante y la ovulación [30]. Para evitar esta variabilidad se podría utilizar una inyección de GnRH a las 30 o 36 h de quitar el implante [71] o 1 mg de EB a las 24 h de la remoción del implante [19]. Se realizaron dos experimentos con vacas con cría y vaquillonas cruza *Bos indicus*, en que todos los animales recibieron un implante Syncro-Mate-B (SMB, Merial) por 9 d y NEV en el Día 0. En el Día 10 la mitad recibió 1 mg de EB y la otra mitad no recibión ningún otro tratamiento (Control) y todos los animales fueron IATF a las 50-52 h pos SMB. El tratamiento con EB resultó en mayores índices de preñez en vacas con cría (56,7% [38/67] vs 39,1% [18/46]; P<0,05), pero los resultados no fueron diferentes a los del Grupo Control en vaquillonas (36,5% [19/52] vs 34,4% [11/32]; P>0,05).

Otra alternativa propuesta para sincronizar la ovulación es el uso de una dosis de eCG al final del tratamiento para estimular el desarrollo folicular [19,30,43]. El efecto de la eCG es distinto que el de la GnRH o el EB debido a que tiene un efecto estimulante del desarrollo folicular [59]. Por lo tanto, estimulará el desarrollo final del folículo dominante y probablemente de esa manera sincroniza un poco la ovulación [30]. Cavalieri y col. [30] informaron intervalos desde la remoción del implante hasta la ovulación de 60,8 a 82,5 h para las vacas tratadas con 400 UI de eCG y de 65,8 a 114,0 h para las no tratadas con eCG. En un experimento se trataron vacas cruza *Bos taurus x Bos indicus* con cría, con Crestar por 10 d y se comparó el uso de 500 UI de eCG en el momento de la remoción del Crestar o 1 mg de EB 24 h más tarde para sincronizar la ovulación [8]. La tasa de preñez, obtenida después de la IATF a las 54 h de la remoción del Crestar, fue mayor en las vacas del Grupo eCG (44,8% [30/67]; P<0,05), mientras que la del Grupo EB sólo fue numéricamente (27,3% [18/66]), pero no significativamente, superior a las del Grupo Control (17,6% [12/68]). Estos resultados son indicativos de que la aplicación de EB no puede sustituir la aplicación de eCG en el tratamiento de sincronización con Crestar en vacas *Bos indicus* con cría al pie, cuando hay generalmente un alto porcentaje de vacas en anestro. Sin embargo, la sincronización de la ovulación con EB o GnRH podría ser útil en animales cíclicos y con buena condición corporal.

Otros trabajos han demostrado que el uso de eCG incrementa los porcentajes de preñez en vacas posparto con baja condición corporal [43,58,65] pero no se han encontrado diferencias en vacas ciclando y con buena condición corporal [21,22]. Con respecto al uso de eCG en vaquillonas *Bos indicus,* se han encontrado diferencias significativas a favor de utilizar eCG y esta probablemente asociado a la presencia de animales prepuberes [53, 45, 65].

También se realizaron dos experimentos con vacas cebuínas para evaluar el efecto de la asociación entre la estimulación del folículo dominante mediante con 400 UI de eCG cuando se quita el implante y la sincronización de la ovulación con 1 mg EB 24 h después [8,19]. Sumados los datos de los dos experimentos, los porcentajes de preñez no fueron diferentes, pero tendieron a ser numéricamente más bajos en los animales tratados con 400 UI de eCG en el momento de la remoción del implante y 1 mg de EB a las 24 h (43,4%, 69/159) que en los tratados sólo con eCG en el momento de la remoción (50,6%, 82/162). En el segundo experimento también se evaluó además la tasa de preñez en vacas tratadas con un Crestar reutilizado y una inyección de 2 mg de EB en lugar de los 5 mg de NEV en el Día 0 y en este caso los resultados favorecieron significativamente a las vacas tratadas con eCG+EB (53,9%, 40/63) que las tratadas sólo con eCG (31,6%, 19/60, P<0,05) [8]. Estos resultados demuestran que la adición de 1 mg de EB a las 24 h del tratamiento con implantes de norgestomet por 9 d, más la inyección de NEV en el Día 0 y eCG a la remoción no aumenta los porcentajes de preñez. En cambio, los resultados son totalmente opuestos cuando se utiliza EB en lugar del NEV al comienzo del tratamiento. Nuevamente aquí se puede especular que la razón por la cual el NEV en el Día 0, más eCG y EB a la remoción del implante

puede producir niveles exageradamente altos de estrógenos y afectar la fertilización. Por el contrario, esto no ocurriría al asociar EB en el momento de la inserción del Crestar, que tiene una vida media mucho más corta que el EV y por lo tanto ya estaría totalmente metabolizado en el Día 9 y 10, cuando se administra la eCG y la segunda aplicación de EB. Alternativamente, se puede utilizar GnRH en lugar de EB para sincronizar la ovulación en vacas tratadas con NEV+eCG y evitar los efectos adversos de las altas concentraciones de estradiol en el momento de la IATF. En una prueba de campo se trataron 106 vacas con Crestar+NEV+eCG+GnRH y se obtuvo un 58,5% de preñez (62/106), mientras que de 49 vacas IATF con eCG pero sin GnRH resultaron preñadas 25 (51,0 %) [21]. Estos resultados fueron confirmados recientemente en otro experimento donde las vacas tratadas con GnRH tuvieron una tasa de preñez del 48,0% (142/296), mientras que las no tratadas con GnRH tuvieron una tasa de preñez del 37,6% (114/303; P<0,05; 66).
En uno de los experimentos descriptos anteriormente [8] se evaluaron también las tasas de preñez en relación al biotipo animal, no encontrándose diferencias significativas entre las Nelore puras (63/137, 45,9%) y las Nelore x Simmental o Nelore x Angus (50/107, 46,7%). Por último este experimento tuvo también en cuenta la condición corporal de las vacas y se encontraron menores tasas preñez en las vacas con condición ≤ 3 (13/45, 28,8%) que las que tenían 3,5 (65/139, 46,7%) y las de ≥ 4 (35/60, 58,3%) y evidencian que si bien la eCG es especialmente útil en rodeos donde el porcentaje de anestro es alto, si la condición corporal es muy crítica los resultados son bajos [43]. Estos datos también concuerdan con otros resultados de campo, donde hemos obtenido porcentajes de preñez del 28,7 % en vacas Braford con cría, 60-90 d pos parto y pobre condición corporal (≤ 2, escala del 1 al 5) y generalmente más de un 50 % de preñez en vacas con una condición corporal ≥ 2,5 [21]. En casos de rodeos con baja condición corporal el destete temporario (desde la remoción del implante hasta la IATF) es fundamental para aumentar el porcentaje de preñez y es aparentemente tan importante como la adición de eCG al retirar el implante [65].

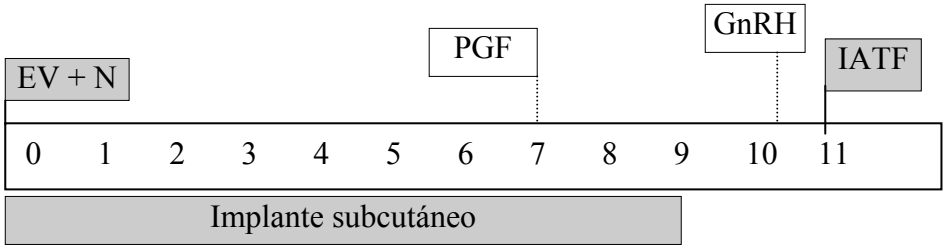


Figura 2 - Esquema de tratamientos con implantes con norgestomet (N). El tratamiento básico consiste en la inserción del implante por 9 d y se coloca 5 mg de valerato de estradiol (EV) y 3 mg de N en el momento de la inserción. Se realiza IATF a las 48 h de la remoción del implante en vaquillonas y a las 56 h en vacas. Variantes del tratamiento (indicadas con ....) incluyen la administración de PGF en el Día 7 o la sincronización de la ovulación con GnRH en el Día 10,5.

b. Sincronización con Progesterona, Benzoato de Estradiol y PGF
Existen actualmente en el mercado productos eficientes que liberan P4 y son colocados en la vagina por un período de 7 u 8 d [19,48]. El tratamiento más utilizado en ganado

Bos indicus es igual al que se utiliza en ganado *Bos taurus* y consiste en administrar 2 mg de EB por vía im junto con la inserción del dispositivo (Día 0, para sincronizar el desarrollo folicular), remover el dispositivo y administrar PGF en el Día 7 (para inducir la luteólisis), y administrar 1 mg de EB en el Día 9 (para sincronizar la ovulación) [47]. Se realiza la IATF entre las 52 y 56 h después de la remoción del dispositivo [32]. Es necesario enfatizar que es fundamental la aplicación de estrógenos en el inicio del tratamiento para provocar la atresia de los folículos existentes e impedir de esta manera la formación de folículos persistentes que interfieren negativamente en la fertilidad [15]. Como la atresia es seguida por el comienzo de una nueva onda folicular a los 4 d [15] se asegura de esta manera la presencia de un folículo nuevo y viable en el momento de retirar el dispositivo [18]. Originalmente, el dispositivo era colocado en la vagina junto con una cápsula con 10 mg de EB, para inducir la regresión luteal y sincronizar el desarrollo folicular [48,64]. Sin embargo desde el año 1996 se utiliza 2 mg de EB por vía im porque se demostró que la cápsula de EB no es efectiva para sincronizar el desarrollo folicular [17] y es menos eficaz que la PGF para inducir la luteólisis. Por último, la segunda administración de EB es fundamental para sincronizar la ovulación y obtener buenos índices de preñez a la IATF [23,34,32, 36].

Se han evaluado varios protocolos de sincronización con dispositivos con P4 en vacas y vaquillonas *Bos indicus*. En un experimento [32] se trataron vaquillonas cruza *Bos taurus x Bos indicus* con CIDR-B (1,9 g de P4, Pfizer Salud Animal) y 2 mg de EB más 50 mg de P4 en el Día 0. Se retiraron los CIDR-B en el Día 7 o Día 8 y todas las vaquillonas recibieron PGF cuando se sacaron los CIDR-B. Se administró 1 mg de EB a las 24 h de sacar el CIDR-B y se realizó la IATF entre las 52-54 h de retirado el CIDR-B. El porcentaje de preñez tendió ($P<0,08$) a ser superior en el tratamiento de 8 d (54,1%, 40/74) que en el de 7 d (39,4%, 28/71) y sugieren que el tratamiento de 8 d podría ser más aconsejable que el de 7 d para vaquillonas *Bos indicus.* Otros experimentos (31) han dado diferencias numéricas en favor del tratamiento de 8 d (52,7% [77/146] vs 46,6 [71/146]). Sin embargo no se han encontrado diferencias significativas entre los 7 y 8 d en vaquillonas *Bos taurus* [32,19].

En teoría, la ventaja de un tratamiento de 8 d versus un tratamiento de 7 d es que en el tratamiento largo permitimos un mayor crecimiento del folículo dominante. Burke et al. [25] observaron en vacas *Bos taurus* en anestro que el folículo dominante debe tener más de 3 d desde su emergencia a la remoción del dispositivo con P4 ($\geq$ 9 mm de diámetro) para ovular y formar un CL. Sin embargo, los autores observaron que en vaquillonas el folículo dominante puede tener un crecimiento compensatorio y llegar a ovular aunque sea más pequeño [25]. Esto podría explicar por qué no hemos encontrado diferencias entre los tratamientos de 7 u 8 d en vaquillonas *Bos taurus*, pero también es posible que las vaquillonas *Bos indicus* se comporten como las vacas *Bos taurus* en anestro. En la práctica, nosotros creemos que es fundamental respetar los horarios, sobre todo el intervalo entre la inserción del dispositivo con P4 y la remoción del mismo. Si por diversas causas los tratamientos se terminan a la tarde del Día 0 y retiramos el dispositivo a la mañana temprano del Día 7, en realidad estamos retirando los dispositivos a los 6,5 d, lo cual puede afectar la fertilidad debido a que tendremos un folículo muy pequeño, sobre todo si estamos trabajando con vacas con cría. Por lo tanto, cuando tratamos un grupo grande de animales, el hecho de retirar el CIDR-B a los 8 d nos puede ayudar a que todas las vacas o vaquillonas estén en el Día 7,5 como mínimo y que tengan un folículo dominante desarrollado y con capacidad de ovular, lo que resultará en un mayor porcentaje de preñez. McGowan [52] tuvo también resultados satisfactorios (44,8%, 22/49) con vaquillonas *Bos indicus* en Australia que fueron tratadas con un CIDR-B por 8 d pero en este caso se sincronizó la ovulación con GnRH en el momento de la IATF. En un experimento reciente no encontramos

diferencias significativas en las tasas de preñez en 447 vaquillonas y 394 vacas *Bos indicus* tratadas por 7 (53,6%), 8 (44,4%) ó 9 d (51,3%; P=0,34; 2).

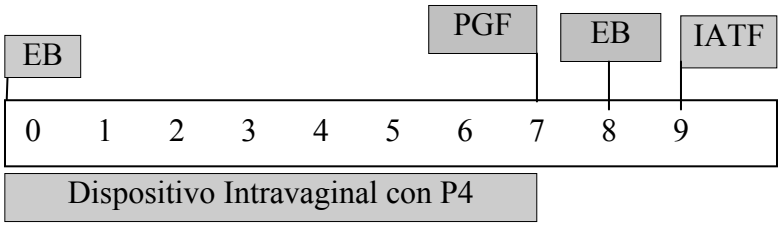
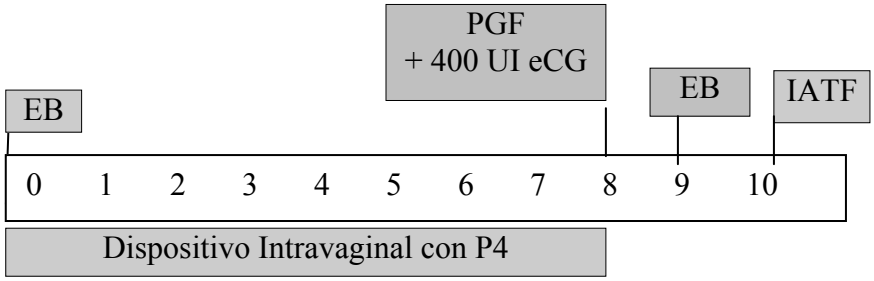


Figura 3 - Esquema de tratamientos con dispositivos intravaginales con progesterona (P4). El tratamiento básico consiste en la inserción del dispositivo y la administración de 2 mg de benzoato de estradiol (EB; Día 0). En el Día 7 se aplica PGF y se quita el dispositivo y en el Día 8 se aplica 1 mg de EB. Se realiza IATF a las 54 h de la remoción del dispositivo.

COMBINACIÓN DE DISPOSITIVOS CON P4 CON ECG

Aparte de los problemas asociados a la detección de celos, la vaca con cría manejada en condiciones pastoriles en las regiones subtropicales y tropicales tiene problemas nutricionales que prolongan el anestro posparto y producen importantes pérdidas económicas. La utilización de eCG al momento de la remoción de dispositivos con P4 es una alternativa para sincronizar el celo de animales en anestro [48, 47]. En general, la adición de eCG aumentó el porcentaje de ciclicidad y los porcentajes de preñez en vacas con estrés nutricional [48], pero hasta ahora no había trabajos que hayan evaluado el uso de la eCG en protocolos de IATF estrictos, realizados con dispositivos intravaginales con P4 en vacas *Bos indicus*. Recientemente realizamos una serie de trabajos con el objetivo de evaluar el porcentaje de preñez en vacas tratadas con un dispositivo con P4 más eCG en el momento de retirar el dispositivo y EB 24 h más tarde. En dos experimentos [19,35], realizados con vacas Braford (3/8 Brahman x 5/8 Hereford), el porcentaje de preñez del grupo tratado con eCG (30,6%, 37/121) fue menor (P<0,05) que el obtenido con los animales tratados con EB (47,1%, 65/138)(19). Se especuló que la causa de esta diferencia podría estar en que el tratamiento con EB produciría una mayor sincronía de las ovulaciones que el eCG y esto resultó en un mayor porcentaje de preñez en las vacas tratadas con EB. En los otros experimentos (9, 35, 20) también se evaluó el efecto de la combinación de eCG a la remoción del dispositivo (para estimular el desarrollo folicular) y EB a las 24 h (para sincronizar la ovulación) en los porcentajes de preñez en vacas con cría. Las vacas eran Braford, cruza Nelore y Nelore puras y tenían 60 a 90 días posparto y con una CC de 1,5 a 2,5 (escala de 1 a 5) y había sólo un 30% (181/606) de vacas ciclando. La tasa final de preñez fue más alta en vacas tratadas con eCG que en las controles, debido al aumento del porcentaje de preñez en vacas en anestro (vacas con folículos medianos [50,9% vs 31,3%, n=291] o pequeños [54,2% vs 30,6%, n=134] a principios del experimento, mientras que las diferencias no fueron significativas en las vacas cíclicas (59,6% vs 52,7%, n=181).



Días

Figura 4. Esquema de tratamientos con dispositivos intravaginales con progesterona (P4) y eCG. El tratamiento consiste en la inserción del dispositivo y la administración de 2 mg de benzoato de estradiol (EB; Día 0). En el Día 8 se aplica PGF más 400 UI de eCG y se quita el dispositivo. En el Día 9 se aplica 1 mg de EB. Se realiza IATF a las 54 h de la remoción del dispositivo.

DESTETE TEMPORARIO, ENLATADO Y ECG EN VACAS CON CRÍA

Realizamos un experimento con el objetivo de evaluar el efecto de un destete temporario y la aplicación de eCG en vacas cruza cebú con cría y en pobre condición corporal (37). Se utilizaron 393 vacas con cría al pie (60 a 80 días pos parto) y con una CC de entre 2 y 2,5 (escala 1 a 5). Las vacas fueron asignadas a uno de 4 grupos, en un diseño 2 x 2 factorial. Todas las vacas recibieron, en el Día 0, un DIB (Syntex, Argentina) nuevo o reutilizado, asignados en forma equitativa en cada uno de los grupos de tratamiento. En el momento de colocado el DIB se inyectaron 2 mg de EB im (Día 0), en el Día 8 se aplicó una dosis de 150 μg de D (+)Cloprostenol im (Ciclase, Syntex) y la mitad de las vacas recibieron 400 UI de eCG im (Novormón 5000, Syntex). A su vez, cada grupo fue subdividido en dos subgrupos, en uno se mantuvieron los terneros con sus madres mientras que en el otro subgrupo se realizó un destete temporario de los terneros desde el momento de retirado el DIB hasta el momento de la IATF. Los terneros fueron separados de sus madres por una distancia de aproximadamente 1000 m para evitar cualquier tipo de contacto visual, auditivo u olfativo entre vacas y terneros. Todas las vacas recibieron 1 mg de EB im 24 h luego de retirado el DIB y fueron IATF entre las 52 y 56 h de retirado el mismo. Se realizó diagnóstico precoz de preñez por medio de ultrasonografía a los 42 días de la IATF. No se encontraron diferencias (P=0,1) entre los dispositivos nuevos (85/204; 41,6%) y reutilizados (87/195; 44,5%) por lo que los datos fueron combinados para su análisis. Como puede observarse en la Tabla 1, el uso de eCG incrementó (P=0,07) la tasa de preñez. Sin embargo, no hubo diferencias (P=0,3) en los porcentajes de preñez entre las vacas a las cuales se les realizó destete temporario y las que estuvieron con sus terneros, tal vez debido a que las vacas no mejoraron sustancialmente su condición corporal durante el período de servicio.

Tabla 1. Porcentajes de preñez en vacas con cría tratadas con dispositivos con P4 y EB con o sin 400 UI de eCG en el momento de retirar el dispositivo (Día 8) y destete temporario desde la remoción del dispositivo con P4 hasta la IATF.

	ECG	No eCG	Total
Destete	45/94 (47,9%)	41/97 (42,3%)	86/191 (45,0%)[c]
Sin Destete	49/98 (50,0%)	38/104 (36,5%)	87/202 (43,1%)[c]
Total	94/192 (49,0%)[a]	79/201 (39,3%)[b]	

[a b] Valores totales en la misma fila que tienden a ser diferentes (P=0,07).
[c] Valores totales en la misma columna que no difieren (P=0,3).

En el segundo experimento realizado en Brasil, se evaluó el efecto de la eCG y el destete temporario sobre los porcentajes de preñez en 457 vacas Nelore con cría [(62)]. En este experimento las vacas utilizadas tenían un período posparto de 67,3±15,2 d y una CC promedio de 3,0±0,3 (escala de 1 a 5). Los animales fueron distribuidos según edad, CC y días posparto en uno de cuatro tratamientos en un diseño 2 x 2 factorial. En el día de inicio del tratamiento (Día 0), a todos los animales se les aplicó un implante subcutáneo Crestar (Intervet), 3 mg de norgestomet y 5 mg de valerato de estradiol im. En el Día 9 se les retiró el implante y la mitad de las vacas recibieron 400 UI de eCG im (Folligón, Intervet). A su vez, cada uno de los grupos fue subdividido en dos subgrupos, a uno de ellos se mantuvieron los terneros con sus madres mientras que en el otro subgrupo se realizó un destete temporario de los terneros desde el momento de retirado el implante hasta el momento de la IATF (54 h). Como se ve en la Tabla 2, el tratamiento con eCG incrementó (P<0,05) la tasa de preñez y en este experimento el efecto del destete también fue significativo (P<0,05).

Tabla 2. Porcentajes de preñez en vacas con cría tratadas con implantes de norgestomet y valerato de estradiol, con o sin 400 UI de eCG en el momento de retirar el implante (Día 9) y destete temporario desde la remoción del implante hasta la IATF.

	eCG	No eCG	Total
Destete	66/113 (58,4%)	54/114 (47,4%)	120/227 (52,9%)[c]
Sin Destete	59/112 (52,7%)	44/118 (37,3%)	103/230 (44,8%)[d]
Total	125/225 (55,6%)[a]	98/232 (42,2%)[b]	

[a b] Valores totales en la misma fila con diferentes superíndices difieren (P<0,05).
[c d] Valores totales en la misma columna con diferentes superíndices difieren (P<0,05).

Estos trabajos indican que la utilización de un destete temporario y la eCG, siempre y cuando sea asociado a un tratamiento hormonal con dispositivos con P4 o implantes de Norgestomet y estradiol, son herramientas muy valiosas para mejorar la preñez en vacas cebuínas con cría.

Finalmente, realizamos otro experimento con el objetivo de evaluar el efecto de la aplicación de la placa nasal en los terneros (enlatado) y eCG sobre la tasa de preñez [(3)]. Se utilizaron 399 vacas de carne de segundo servicio, con cría al pie (60 a 80 días pos parto) y con una CC de entre 2 y 2,5 (escala 1 a 5). Las vacas fueron asignadas a cuatro grupos de tratamiento, en un diseño 2 x 2 factorial. Todas las vacas recibieron un DIB nuevo o reutilizado distribuidos en forma equitativa en cada uno de los grupos de tratamiento. En el momento de colocado el DIB se inyectaron 2 mg de EB im (Día 0), en el Día 8 se aplicó una dosis de PGF y la mitad de las vacas recibieron 400 UI de eCG im

(Novormón 5000, Syntex). A su vez, cada uno de los grupos fue subdividido en dos subgrupos, en uno se realizó enlatado de los terneros desde el momento de iniciado el tratamiento hasta el momento de la IATF y en el otro subgrupo no se realizó enlatado de los terneros. Todas las vacas recibieron 1 mg de EB 24 h luego de retirado el DIB y fueron IATF entre las 52 y 56 h de retirado el mismo. Se realizó diagnóstico de preñez por medio de ultrasonografía a los 60 días de la IATF. No se encontraron diferencias significativas (P=0,1) entre los dispositivos nuevos (87/195; 44,5%) y reutilizados (86/196; 43,9%) por lo que los datos fueron combinados para su análisis. Como puede observarse en la Tabla 3, la restricción del amamantamiento incrementó (P=0,03) los porcentajes de preñez. Mientras tanto, no se encontraron diferencias (P=0,82) en los porcentajes de preñez entre las vacas tratadas o no con eCG.

Tabla 3. Porcentajes de preñez en vacas con cría tratadas con dispositivos con P4 y EB, con o sin 400 UI de eCG en el momento de la remoción del dispositivo con P4 y colocación de placas nasales (enlatado) en los terneros desde la inserción del dispositivo hasta la IATF.

	eCG	No eCG	Total
Terneros con placa	38/89 (42,3%)	53/106 (50,0%)	91/195 (46,6%)[b]
Terneros sin placa	44/103 (43,7%)	37/101 (36,6%)	81/204 (39,7%)[c]
Total	82/192 (42,7%)[a]	90/207 (43,4%)[a]	

[a] Valores totales en la misma fila no difieren (P=0,82).
[b c] Valores totales en la misma columna con diferentes superíndices difieren (P=0,03).

Concluimos que el enlatado de los terneros por un período de 10 días puede mejorar las tasas de preñez en vacas primíparas tratadas con dispositivos con P4 e IATF. Sin embargo, este tratamiento afectó (P=0,001) el peso al destete de los terneros, que fueron 10 kg más livianos que los terneros que no fueron enlatados (190,1±1,9 kg y 200,4±2,1 kg para los terneros enlatados o no enlatados, respectivamente). Esta disminución de peso debe tomarse en cuenta cuando se realiza el análisis económico del uso del enlatado para aumentar la tasa de preñez.

EVALUACIÓN DE DIFERENTES FACTORES QUE AFECTAN LOS PORCENTAJES DE PREÑEZ EN IATF

La vaca con cría presenta en nuestra región problemas nutricionales debido a las condiciones extensivas de pastoreo que prolongan el anestro posparto y se traducen en importantes pérdidas económicas para el sector de producción de carne. Es conocida la importante relación que existe entre el nivel nutricional de las hembras y su fertilidad. La condición corporal de un animal se relaciona con la cantidad de tejido de reserva que el animal dispone. En vacas de cría adultas toda pérdida o ganancia de peso se reflejará en una variación del estado corporal. Este estado corporal tiene una influencia directa sobre la fertilidad ya que la partición de nutrientes se orienta primero a mantener la vida de la vaca y luego a la propagación de la especie. Los ciclos estrales generalmente pueden ser mantenidos si la condición corporal es de 2 (escala 1-5) o más, aunque esto podría diferir según otros factores, como la raza y si el animal está en un plano de aumento o disminución de peso.
Se analizaron por medio de regresión logística datos de las IATF realizadas por nuestro grupo de trabajo entre diciembre de 2000 y diciembre de 2003, teniendo en cuenta diferentes factores como la condición corporal, el estadio fisiológico del vientre, el

biotipo y el grado de ciclicidad del rodeo. Los datos fueron recogidos de 9609 IATF realizadas en vacas con cría, vacas secas y vaquillonas, cruza cebú y británicas. Se obtuvo un 52,9% de preñez general, con un mínimo de 28,7 % (vacas con cría con una CC de 2) y un máximo de 75 % (vaquillonas con una CC de 3). Como bien puede observarse en el Gráfico 1, la CC es un factor determinante en los resultados de preñez a IATF. Los resultados presentados aquí y en otros trabajos sugieren que los animales deben tener una condición corporal mínima de 2,5 (escala 1 al 5) o idealmente 3 para obtener buenos resultados de preñez. Se obtuvo una correlación R2=0,9 entre el porcentaje de preñez y la condición corporal (Figura 5).

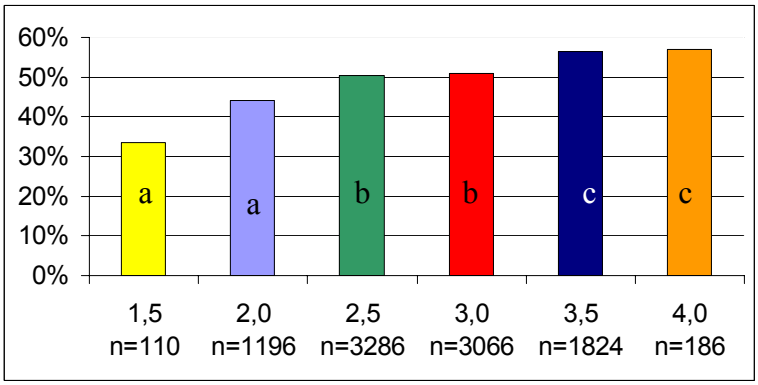


Figura 5. Porcentajes de preñez en función de la condición corporal. [abc] Columnas con distintas letras difieren significativamente (P<0,0001).

Con respecto al estadio fisiológico de los animales, en la Figura 6 puede observarse que se obtuvo un menor porcentaje de preñez en las vacas secas con respecto a las vacas con cría y vaquillonas.

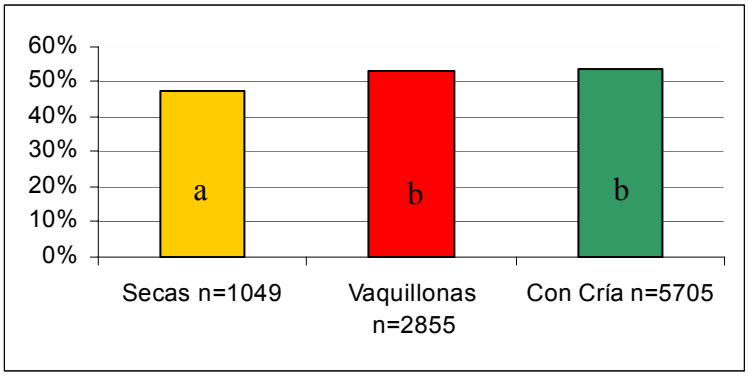


Figura 6. Porcentaje de preñez en función del estadio fisiológico de los animales. [ab]Columnas con letras diferentes difieren (P=0,0002).

Esta diferencia entre los porcentajes de preñez de vacas secas con las vacas con cría y vaquillonas podría deberse al hecho de que el rodeo de vacas secas está compuesto por vacas que están secas por haber quedado vacías en la temporada de servicio anterior. Por lo tanto algunas de estas vacas pudieron haber quedado vacías por problemas nutricionales mientras que otras podrían haber quedado vacías por ser de baja fertilidad.

Se evaluó también el impacto del porcentaje de ciclicidad del rodeo sobre los porcentajes de preñez. Se determinó ciclicidad como la presencia de un CL a la palpación rectal o signos de celo al momento de iniciado el tratamiento y anestro

cuando sólo tenían folículos. En la Figura 7 se observa un mayor porcentaje de preñez en vacas cíclicas con respecto a las vacas en anestro.

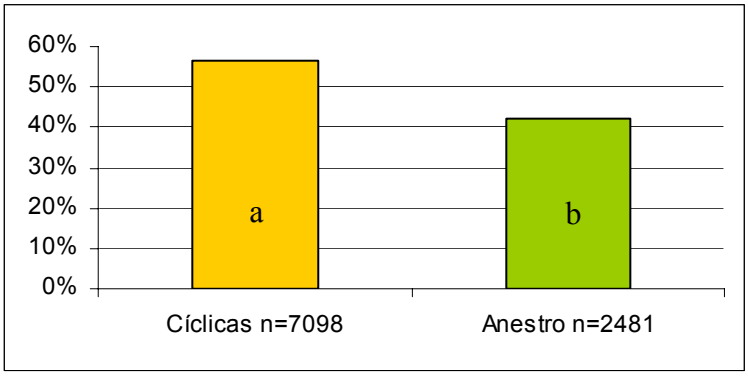


Figura 7. Porcentaje de preñez en función del porcentaje de ciclicidad del rodeo (los porcentajes difieren, P=0,0001).

Otro factor que influye sobre los porcentajes de preñez es el biotipo de los animales con que se trabaja. Se encontró un menor porcentaje de preñez (P=0,05) en IATF realizadas en rodeos de animales cruza índicas que en los rodeos de británicas (Figura 8).

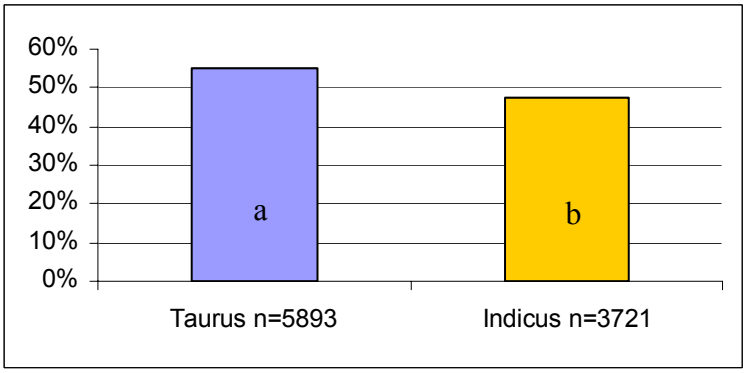


Figura 8. Porcentaje de preñez en función del biotipo (los porcentajes difieren, P=0,007).

El menor porcentaje de preñez en las vacas *Bos indicus* podría ser debido a una suma de factores entre los que se encuentra su temperamento, fisiología reproductiva y a las condiciones ecológicas a las cuales están expuestas [13]. Esto es debido a que en la mayoría de los casos este tipo de animales se encuentra en zonas subtropicales (sub-húmedas y húmedas) o semiáridas y las complicaciones relacionadas con la sub-nutrición y deficiencias minerales son más comunes en animales que se encuentran en condiciones de pastoreo en estas zonas. No obstante, tampoco debe descartarse el hecho de que estos animales no se adaptan tanto como el *Bos taurus* a un manejo de manga frecuente que puede desencadenar situaciones de estrés que resulten en una alteración o inhibición del pico preovulatorio de LH y la ovulación.

SINCRONIZACIÓN DE CELOS Y DE LA OVULACIÓN PARA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

SINCRONIZACIÓN CON PROSTAGLANDINA $F_2\alpha$ (PGF)

En programas de TE, generalmente se utilizan tratamientos con dos dosis de PGF con 11 a 14 días de intervalo y detección por 5-7 días después de la segunda aplicación de PGF [24,49,60]. Teóricamente, estas dos aplicaciones de PGF son efectivas cuando hay una gran proporción de hembras ciclando y un 80% de ellas deberían ser observadas en celo. Pero los problemas de detección de celos hace que el porcentaje real de receptoras que son seleccionadas para recibir un embrión raramente supere el 50% [14]. Esta situación puede ser más grave aún cuando se trabaja con receptoras cebú o cruza-cebú en condiciones de campo. Como puede observarse en la Tabla 4, en un trabajo en el que se utilizó el protocolo de doble dosis de PGF en distintos establecimientos de Sudamérica se observó una baja eficiencia en la detección de los celos, que llevó a un bajo porcentaje de receptoras preñadas [26].

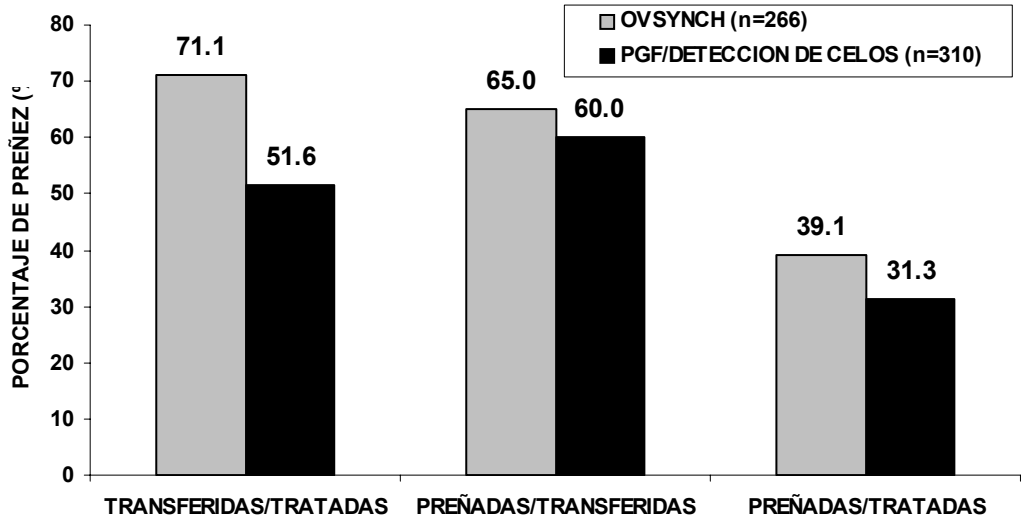
Tabla 4. Número de vacas en celo, seleccionadas para recibir un embrión (transferidas) y porcentajes de preñez en receptoras de embriones sincronizadas con PGF (Burry E., comunicación personal; [26]).

	Tratadas	En celo/ Tratadas	Transferidas/ Tratadas	Preñadas/ Transferidas	Preñadas/ Tratadas
Matto Grosso (Brasil, 2000)	854	384/854 (45,0%)	226/854 (26,5%)	89/226 (39,4%)	89/854 (10,4%)
Santa Cruz (Bolivia, 2001)	700	479/700 (68,4%)	223/700 (31,9%)	111/223 (49,8%)	111/700 (15,9%)
Total	1554	863/1554 (55,5%)	449/1554 (28,9%)	200/449 (44,5%)	**200/1554 (12,9%)**

Estos resultados demuestran que la utilización de PGF para la sincronización de celos en receptoras de embriones resulta en una muy baja tasa de aprovechamiento de receptoras que afectan considerablemente los porcentajes de preñez general.

SINCRONIZACIÓN UTILIZANDO EL PROTOCOLO OVSYNCH.

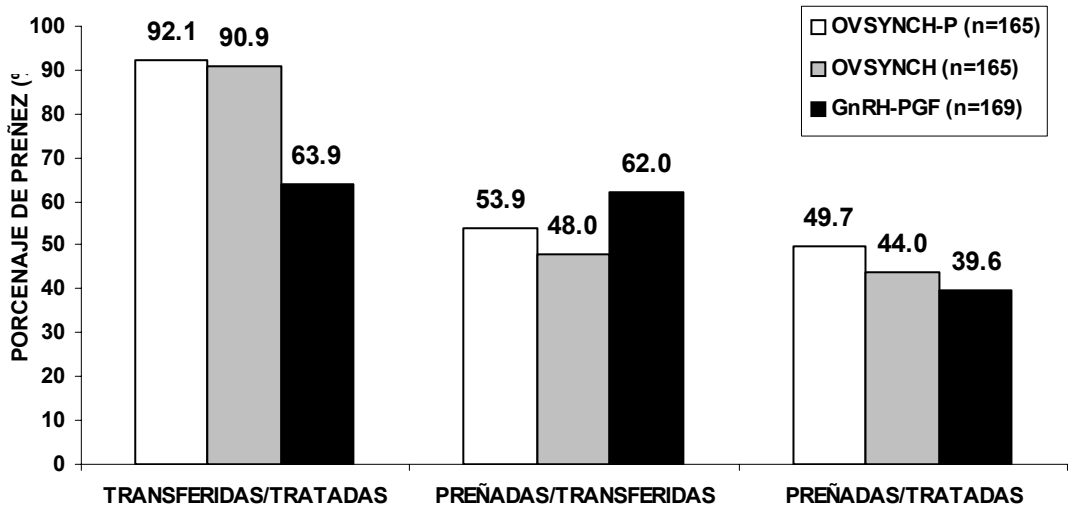
Los protocolos Ovsynch también han sido utilizados para sincronizar la ovulación en receptoras que recibieron embriones producidos *in vivo* (6,42,75) o *in vitro* [1]. En dos estudios realizados con vaquillonas [6,75] o con vacas cruza cebú [75], la mitad de los animales recibieron una dosis simple de PGF y se detectó celo por 5 días y la otra mitad, se sincronizaron con un protocolo Ovsynch sin detección de celos. En este experimento, 7 días después del celo (Grupo PGF) o después de la segunda GnRH (Grupo Ovsynch), las receptoras con un CL detectado por US [6] o por palpación rectal (75), fueron seleccionadas para recibir un embrión por transferencia directa. Como puede observarse en la Figura 9, la tasa final de preñez fue mayor en las receptoras tratadas con el protocolo Ovsynch y se debió principalmente a que un mayor número de receptoras en este grupo recibió embriones debido a que el protocolo Ovsynch no dependió de la detección de celos. Es de destacar que en uno de los estudios [6], el 53,7% de las vaquillonas tratadas con PGF fueron observadas en celo, reflejando la dificultad de la detección de celo en el ganado bovino cruza cebú [29,13].



* Proporciones difieren significativamente (P<0.05)

Figura 9. Porcentajes de preñez en receptoras de embriones tratadas con una dosis de PGF y transferidas a los 7 días de detectado el celo o receptoras que recibieron un tratamiento Ovsynch sin detección de celos y fueron trasferidos a los 7 días de la segunda GnRH. Adaptado de Baruselli y col., 2000 [6] y Zanenga y col. 2000 [75].

En otro estudio [10,42], 499 vacas *Bos taurus* lactando (28 a 92 días posparto) fueron asignadas a 3 tratamientos. Las vacas en el Grupo Control fueron tratadas con GnRH en el Día 0 y PGF en el Día 7 (Grupo GnRH+PGF). Las vacas en los otros 2 grupos fueron tratadas con un protocolo Ovsynch solo (Grupo Ovsynch) o un protocolo Ovsynch más un implante de norgestomet (Syncro-Mate-B, USA) que fue colocado entre el Día 0 y 7 (Grupo Ovsynch+P). A los 6 a 8 días después del celo en el Grupo GnRH+PGF o a los 7 días después de la segunda GnRH en el los grupo Ovsynch y Ovsynch+P, se examinaron las vacas por palpación rectal y aquellas con un CL recibieron embriones por trasferencia directa. A pesar de que la tasa de preñez (preñadas/transferidas) tendió a ser mayor en las vacas del Grupo GnRH+PGF (P<0,07), el porcentaje de preñez general no fue significativamente diferente entre los grupos, principalmente debido a que hubo mayor número de receptoras seleccionadas en los grupos Ovsynch y Ovsynch+P (Figura 10).



* Proporciones difieren entre el grupo GnRH+PGF y los grupos Ovsynch y Ovsynch+P (P<0.01).
** Proporciones difieren entre el grupo GnRH+PGF y los grupos Ovsynch y Ovsynch+P (P<0.07).

Figura 10. Porcentajes de preñez en receptoras de embriones tratadas con GnRH+PGF y transferidas a los 6 a 8 días de detectadas en celo y las que recibieron el protocolo Ovsynch o un Ovsynch más un implante de progestágeno (Ovsynch-P) y fueron transferidas 7 días después de la segunda inyección de GnRH, sin detección de celos. Adaptado de Beal, 1999 [10] y Hinshaw, 1999 [42].

Los mismos investigadores también realizaron nuevos tratamientos involucrando 1.637 receptoras tratadas con Ovsynch más un implante de Syncro Mate-B o con CIDR-B y que fueron trasferidas sin detección de celos y obtuvieron una tasa de preñez final de 59,9% (11). En resumen, los resultados de estos estudios indican que se puede obtener una aceptable tasa de preñez cuando se transfieren embriones a receptoras que recibieron un tratamiento para sincronizar la ovulación sin la necesidad de detectar el celo.

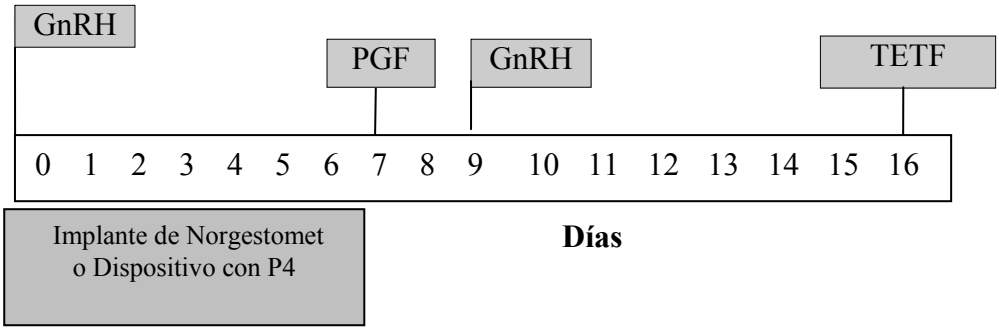
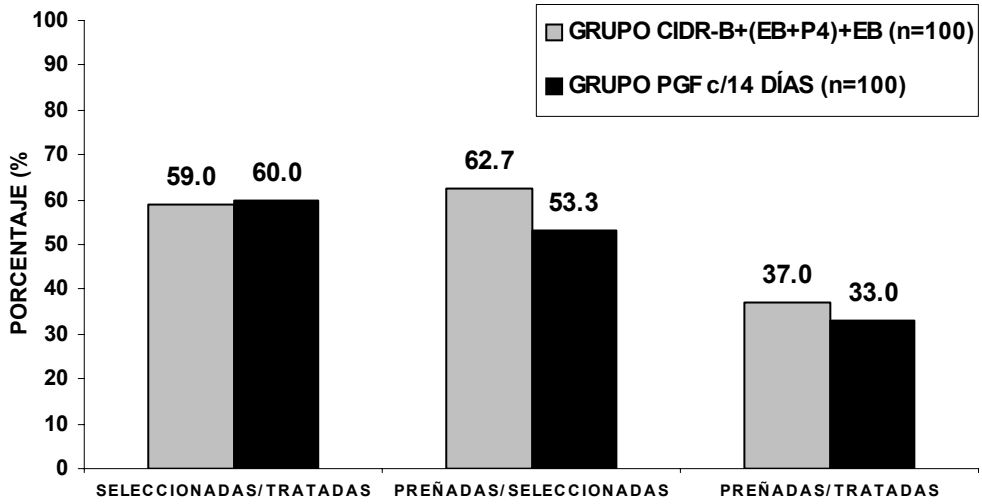


Figura 11. Protocolo Ovsynch o Ovsynch asociado a un dispositivo con progestágeno/progesterona (Ovsynch+P4) para TETF e receptoras. El protocolo Ovsynch consiste en la aplicación de GnRH en el Día 0, seguido por la administración de PGF en el Día 7 y una segunda aplicación de GnRH en el Día 9. En el tratamiento Ovsynch+P4, se coloca un implante de norgestomet o u dispositivo con P4 en el Día 0 y se lo quita en el Día 7. No se efectúa detección de celos y se transfieren los embriones en el Día 16 (receptoras con un CL).

SINCRONIZACIÓN CON PROGESTÁGENOS Y ESTRADIOL

Se desarrolló una serie de trabajos con el objetivo de evaluar si era posible adaptar los esquemas de sincronización de la ovulación utilizados en los programas de IATF en la TETF realizó un experimento preliminar con el objetivo de comparar las tasas de preñez en receptoras de embriones tratadas con CIDR-B y transferidas a tiempo fijo con vacas tratadas con dos dosis de PGF cada 14 días y transferidas 7 días después de detectado el celo (69). Se utilizaron 200 vacas cruza Brahman (1/4 a 3/4 Brahman) que fueron divididas al azar en dos grupos. Las vacas en el Grupo Control fueron sincronizadas con dos dosis de PGF (0,15 mg D(+)cloprostenol, Preloban, Intervet) cada 14 días y observadas por síntomas de celo por 5 días después de la segunda PGF. Las vacas en el otro grupo, recibieron un CIDR-B combinado con 2 mg de BE y 50 mg de P4 en el día 0, PGF en el momento de la remoción del CIDR-B (día 7) y 1 mg de BE a las 24 h de retirado el dispositivo (Grupo CIDR-B). En este grupo no se observó celo y se consideró arbitrariamente al día 9 como el día de celo. Todas las vacas recibieron embriones congelados excelentes y buenos (Grado 1, IETS) a los 7 días del celo en el Grupo Control o en el día 16 en el Grupo CIDR-B. La proporción de vacas utilizadas como receptoras y el porcentaje de preñez obtenido están resumidos en la Figura 12.



Los porcentajes no difieren (P>0,6).

Figura 12. Porcentajes de preñez en receptoras de embriones tratadas con CIDR-B y transferidas a tiempo fijo y receptoras sincronizadas con PGF y transferidas a los 7 días de observado el celo. Adaptado de Tríbulo y col., 2000 [(69)].

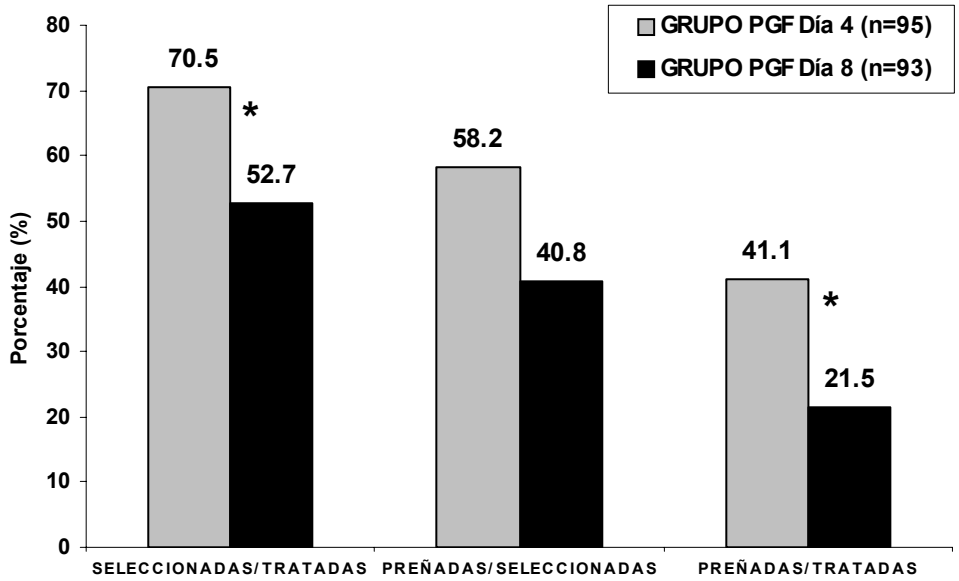
Estos resultados demostraron que los dispositivos intravaginales con P4, combinados con BE+P4 al momento de la colocación del dispositivo y BE 24 h después de su retiro, pueden ser utilizados para sincronizar la ovulación, eliminando la necesidad de la detección de celos en grupos de receptoras de embriones.

Resultados de otros experimentos confirmaron los anteriores en protocolos con CIDR-B de 7 u 8 días [(12)]. Sin embargo, en todos los estudios el porcentaje de vacas con un CL detectado por palpación rectal en el momento de la transferencia fue bastante bajo (<60 %) y los índices de preñez finales (preñadas/tratadas) no superaban el 40%, lo que representa un alto costo en tratamientos y receptoras no utilizadas. Se especuló que el bajo porcentaje de receptoras seleccionadas en los experimentos anteriores podría estar relacionado con los altos niveles circulantes de P4 de las receptoras durante el tratamiento de sincronización. La razón de esta hipótesis es que, como en

estos experimentos se utilizaron solamente animales cíclicos (con CL funcional) y la administración de PGF fue realizada en el momento del retiro del dispositivo, la mayoría de las vacas habrían tenido niveles altos de P4 (del CL y del dispositivo) durante el tratamiento. Los altos niveles de P4 habrían disminuido la frecuencia de pulsos de LH y consecuentemente el desarrollo folicular [68]. Se ha demostrado que el crecimiento y persistencia de un folículo dominante depende principalmente de la secreción pulsátil de LH [68]. Consecuentemente, si un folículo crece en condiciones de baja P4, el tamaño del folículo ovulatorio y del CL que se forma después de la ovulación podrían ser mayores que los de vacas en las cuales el CL esta presente durante el tratamiento. Un trabajo publicado recientemente ha sugerido que el tamaño del folículo ovulatorio está relacionado con el tamaño del CL que forma y los índices de preñez resultantes [72].

Por lo tanto, se diseñaron dos experimentos para evaluar si el momento de la aplicación de PGF en el tratamiento de sincronización de la ovulación con dispositivos con P4 y BE podría resultar en un aumento del número de receptoras transferidas [56,57]. En el primer experimento se evaluó el desarrollo folicular realizando ultrasonografías diarias [57] y se observó que adelantar la aplicación de la PGF del día 8 al día 4, resultó en un folículo preovulatorio de mayor tamaño en el día 9 (13,2±0,2 mm vs. 11,5±0,2 mm; P<0,05), una ovulación más temprana y sincrónica (66,6±0,4 h vs 70,8±2,3 h; P<0,01) y una mayor concentración plasmática de P4 en el día de la transferencia de embriones (6,9±0,8 ng/ml vs 5,2±0,6 ng/ml; P=0,08).

En el segundo experimento se utilizaron 188 vacas de carne ciclando que recibieron en el día 0 un dispositivo DIV-B más 2 mg de BE y 50 mg de P4 [56]. En el día 4 (día de comienzo de la onda folicular) los animales fueron divididos al azar en dos grupos: la mitad de las vacas recibieron una dosis de 500 μg de cloprostenol im en el día 4, mientras que la otra mitad de las vacas recibieron cloprostenol en el día 8. En ambos grupos los DIV-B fueron retirados en el día 8 y se inyectó 1 mg de BE im en el día 9. No se realizó detección de celo y se determinó arbitrariamente al día 10 como el día de celo. El día anterior a la transferencia de embriones (día 16) se examinaron todos los animales por medio de ultrasonografía con el objetivo de determinar el tamaño del CL y las vacas con un CL >10 mm de diámetro fueron seleccionadas y recibieron en el día 17, embriones Grado 1 (Excelentes y buenos, n=65), Grado 2 (Regulares, n=33) y Grado 3 (Malos, n=18) asignados equitativamente a ambos grupos. Se determinó la tasa de preñez por ultrasonografía a los 23 días después de la transferencia (30 días de gestación). A pesar de que no se encontraron diferencias significativas en el diámetro del CL (Día 4: 16,5±0,5 mm vs Día 8: 16,4±0,5 mm; P>0,5), las proporciones de receptoras seleccionadas y preñadas fueron mayores (P<0,02) en el grupo que recibió PGF en el día 4 (Figura 13).



* Porcentajes difieren P < 0,02

Figura 13. Efecto del momento de la aplicación de PGF sobre el porcentaje de vacas seleccionadas como receptoras de embriones y porcentaje de preñez en vacas tratadas con dispositivos DIV-B y EB. Adaptado de Moreno y col. 2002 [56].

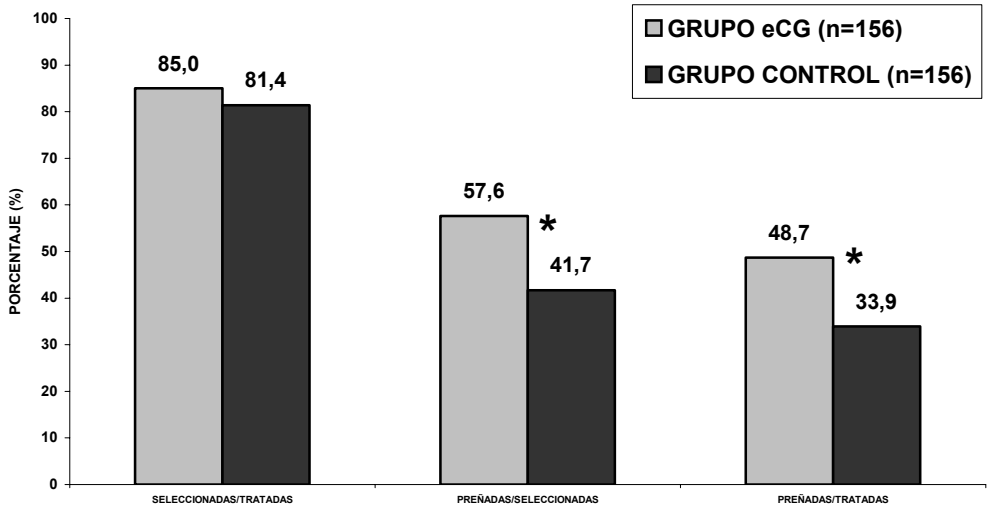
UTILIZACIÓN DE ECG EN EL TRATAMIENTO DE SINCRONIZACIÓN DE RECEPTORAS CON DISPOSITIVOS CON PROGESTERONA

Otra alternativa para incrementar los niveles circulantes de P4 en receptoras de embriones es la inducción de ovulaciones múltiples mediante la utilización de gonadotrofina coriónica equina (eCG) durante el tratamiento de sincronización de la receptora. Fuentes y de la Fuente (39) reportaron datos de un experimento en el que se utilizaron vaquillonas Holstein que fueron divididas en cuatro grupos. El primer grupo fue formado por vaquillonas a las que se les observó un celo natural (CN; n=52) y fueron transferidos 7 días luego de la detección del celo (Control). El resto de los animales fueron sincronizados. Las vaquillonas del Grupo PGF (n=58) recibieron una dosis única de 500 μg de cloprostenol im (Estrumate, Schering- Plough). Las vaquillonas del Grupo PRID (n=54) recibieron en el día 0 un PRID (CEVA, 1,55 g de P4) y una cápsula con 10 mg de BE y cloprostenol cuando se retiró el dispositivo en el día 10. Las vaquillonas del Grupo PRID+eCG (n=29), recibieron un PRID (sin la cápsula) junto con 5 mg de estradiol-17β y 100 mg de P4 im en el día 0, 1.000 UI de eCG im en el día 4, cloprostenol en el día 6 por la mañana y se retiraron los dispositivos en el día 7 por la tarde. En este experimento se detectó celo en todos los grupos y las vaquillonas fueron transferidas a los 7 días de la observación de los celos. Como puede observarse en la Tabla 5, el tratamiento con PRID+eCG produjo un incremento en el número de receptoras transferidas y aumentó el porcentaje final de preñez (preñadas/tratadas).

Tabla 5. Porcentajes de vaquillonas seleccionadas como receptoras de embriones y porcentaje de preñez utilizando receptoras de embriones transferidas a los 7 días de la observación de celos naturales o inducidos por diferentes tratamientos de sincronización. Adaptado de Fuentes y de la Fuente, 1997 [39].

	Control	PGF	PRID	PRID+eCG	Valor P
Transferidas/tratadas	26/52 (50,0%)[a]	26/58 (44,8%)[a]	26/54 (48,9%)[a]	26/29 (89,7%)[b]	0,0001
Preñadas/transferidas	15/26 (57,7%)	11/26 (42,3%)	12/26 (46,1%)	17/26 (65,3%)	0,1
Preñadas/tratadas	15/52 (28,8%)[a]	11/58 (18,9%)[a]	12/54 (22,2%)[a]	17/29 (58,6%)[b]	0,008

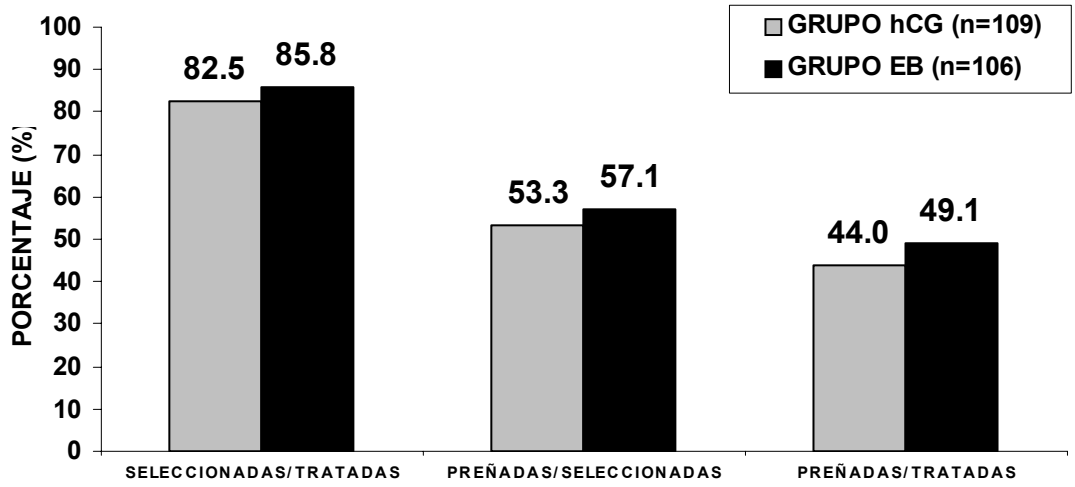
En este experimento también se observó que el tratamiento con eCG aumentó significativamente el número de CL en los ovarios de las vaquillonas que presentaron entre 2 y 5 CL en cada ovario en el momento de la transferencia. Estos resultados fueron corroborados en otro experimento realizado en Brasil, donde se utilizaron vaquillonas cruza cebú que fueron tratadas con un CIDR-B por 7 días más 800 UI de eCG en el día 5 y fueron TETF [7]. No se observó una disminución de preñez por la superovulación de las receptoras. No obstante, nosotros realizamos una serie de trabajos para evaluar la utilización de una dosis más reducida, de 400 UI de eCG, para determinar si se podía mantener el efecto positivo sobre la preñez y disminuir un poco los costos del tratamiento (70). Para este experimento se utilizaron 312 vacas de carne secas (cruza cebú) de 3 a 5 años de edad y con una condición corporal de 2,5 a 3,5 (Escala 1-5). En el día 0, todas las vacas recibieron un DIV-B, conjuntamente con 2 mg de BE y 50 mg de P4 im. En el día 5 (un día después del comienzo estimado de la onda folicular), todas las vacas recibieron 500 µg de cloprostenol im y la mitad de las receptoras (Grupo eCG) recibió 400 UI de eCG im, mientras que la otra mitad (Grupo Control) recibió una inyección de 1,5 ml de solución fisiológica im. En ambos grupos los DIV-B fueron retirados en el día 8 y se inyectó 1 mg de BE im en el día 9. No se realizó detección de celo y se determinó arbitrariamente al día 10 como el día del celo y al día 11 como el día de la ovulación. Como en el experimento anterior, el día anterior a la transferencia de embriones (día 16) se examinaron todos los animales por medio de ultrasonografía transrectal con el objetivo de determinar el tamaño del CL y las vacas con un CL $\geq$10 mm de diámetro fueron seleccionadas y recibieron en el día 17 embriones congelados (Grado 1, n=206, Grado 2, n=49 y Grado 3, n=4) asignados equitativamente a ambos grupos. A pesar de que el tratamiento con eCG no resultó en muchas ovulaciones múltiples (3/156, 2% de las vacas tuvieron 2 CL), el tamaño promedio de los CL fue mayor ($P<0.05$) en las vacas tratadas con eCG (18,5$\pm$0,4 mm) que en las no tratadas con eCG (17,7$\pm$0,4 mm). Además, las proporciones de receptoras preñadas fueron mayores ($P<0,02$) en el grupo que recibió eCG en el día 5 (Figura 14).



* Porcentajes difieren P < 0,02

Figura 14. Porcentajes de receptoras transferidas y porcentaje de preñez utilizando DIV-B y una dosis de 400 UI de eCG administrada en el Día 5 del tratamiento. Adaptado de Tríbulo y col., 2002 [(70)].

Se realizó otro experimento con el objetivo de evaluar otra hormona disponible en el mercado para sincronizar la ovulación como la hCG (Gonadotrofina Coriónica Humana). En este experimento se comparó la tasa de preñez en receptoras de embriones tratadas con dispositivos intravaginales con P4 y BE o hCG para inducir la ovulación (55). El experimento fue realizado en tres réplicas (Réplica 1 n=59; Réplica 2 n=72 y Réplica 3 n=84), en vacas secas, cruza cebú y con una condición corporal de 2,5 a 3,5 (Escala de 1 a 5). Todas las vacas recibieron un dispositivo DIB y 2 mg de BE con 50 mg de P4 im en el día 0, 400 UI de eCG im y 500 μg de cloprostenol en el día 5 y los dispositivos DIB fueron retirados en el día 8. Los animales fueron distribuidos al azar en dos grupos para recibir 1 mg BE im en el día 9 o 1.500 UI de hCG (Ovusyn, Syntex, Argentina) en el día 10. No se realizó detección de celo y se consideró arbitrariamente el día 10 como el día del celo. En el día 17, todas las receptoras fueron examinadas por ultrasonografía y aquellas con un CL ≥ 10 mm de diámetro fueron seleccionadas y recibieron embriones frescos en la Réplica 1 y frescos o congelados en las Réplicas 2 y 3. Se determinó la tasa de preñez por ultrasonografía a los 53 días después de la transferencia (60 días de gestación). No se encontraron efectos debido a réplica (P=0,6), embriones frescos vs. congelados (P=0,4), calidad de los embriones (P=0,5) o técnico que realizó la transferencia en los porcentajes de preñez (P=0,2). Tampoco se observaron diferencias en el diámetro de los CL (BE: 21,1±0,6 mm y eCG: 21,3±0,5 mm) y como se ve en la Figura 15, no hubo diferencias en los porcentajes de preñez.



Las proporciones no difieren (P>0,9).

Figura 15. Porcentaje de preñez en receptoras de embriones tratadas con dispositivos con P4, EB+P4 y eCG y cuya ovulación fue inducida con 1 mg de EB en el Día 9 o con 1500 UI de hCG en el Día 10. Adaptado de Moreno y col., 2003 [55].

Los resultados demostraron que los dos tratamientos evaluados fueron eficaces para sincronizar la ovulación en receptoras de embriones y confirman los estudios previos que han demostrado que los tratamientos con dispositivos con P4 combinados con BE pueden ser utilizados en TETF sin la necesidad de la detección de celos. Tomando datos comerciales de receptoras sincronizadas con este esquema, sobre 842 receptoras tratadas, 709 (84,2%) recibieron un embrión congelado producido in vivo y 392 (46,6%) resultaron preñadas. Con 5445 embriones producidos in vitro que fueron transferidos frescos se obtuvo una tasa de preñez del 48,2% (L.F. Nasser 2004, comunicación personal).

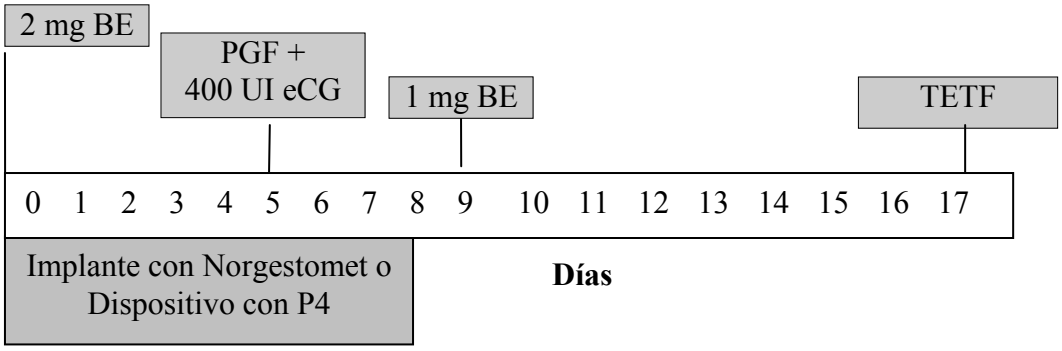


Figura 16. Protocolo para TETF utilizando progestágenos/progesterona, estradiol y eCG. El tratamiento consiste en la inserción de un implante de norgestomet o un dispositivo con P4 y la inyección de 2 mg EB im. En el Día 5 se adminsitra 400 UI de eCG y una dosis de PGF. Se quitan los dispositivos en el Día 8 y se inyecta 1 mg de EB en el Día 9. Todas las recepetoras con un CL reciben embriones en el Día 17.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los resultados indican que es posible obtener buenos resultados con la IATF o TETF y obviar de esta manera el inconveniente de la detección de celos. Los tratamientos disponibles en la actualidad se pueden dividir en los que utilizan GnRH más PGF y una segunda GnRH (Ovsynch) y los protocolos a base de progestágenos y estradiol. El uso de los protocolos Ovsynch, resultan en aceptables índices de preñez en vacas que están ciclando, pero los resultados son bajos cuando se tratan vacas en anestro o vaquillonas. Los tratamientos a base de progestágenos son efectivos para sincronizar el celo en vaquillonas y vacas con cría y sus resultados en vacas en anestro dependen en gran medida de la condición nutricional de los animales tratados. La utilización de eCG puede ser una alternativa para incrementar los porcentajes de preñez en ganado con alto porcentaje de anestro o vaquillonas peri-púberes, pero la condición corporal no debe ser demasiado baja. En recpetoras de embriones, la inducción de una luteólisis prematura mediante la administración de PGF en el día 4 o 5 del tratamiento y la estimulación del desarrollo folicular mediante 400 UI de eCG en el día 5 del tratamiento aumentan el número de receptoras seleccionadas para ser transferidas y los índices de preñez final se acercan al 50 %, disminuyendo de esta manera los costos de manutención de las receptoras hasta que quedan preñadas.
Finalmente, la selección del programa más adecuado dependerá de otros factores no fisiológicos como la eficiencia de la detección de celos, destreza del veterinario en la palpación rectal, dinero disponible por hembra para gastar en tratamientos, costo de la dosis de semen o del embrión, disponibilidad de mano de obra calificada, instalaciones disponibles y fundamentalmente de los objetivos del programa de mejoramiento genético del establecimiento.

REFERENCIAS

1. Ambrose, J.D., Drost, R.L, Monson, RL, Rutledge, J.J., Leibfried-Rutledge, M.L., Thatcher, M.J., Kassa, T., Binelli M., Hansen, P.J., Chenoweth, P.J., Thatcher, W.W. 1999. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen in vitro produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. J Dairy Sci; 82:2369-2376.

2. Balla, E., Cledou, G., Nosetti, L., Maraña Peña, D., Bó, G.A. 2004. Efecto del tratamiento con TRIU-B por 7, 8 ó 9 días en programas de inseminación a tiempo fijo (IATF) en vacas y vaquillonas cruza cebú. Acta Scientiae Veterinariae 32 (suplemento): 224 abstr.

3. Balla, E., Cutaia L., Rizzi, C., Peres, L., Bo, G.A. 2005. Effect of suckling restriction and ecg treatment on pregnancy rates in postpartum bos indicus crossbred cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate. Reprod Fertil. Dev. (en prensa) abstr.

4. Barros, C.M. 2000. Sincronización del estro y ovulación en cebuínos. Quinto Congreso Argentino de Reproducción Animal, CABIA, Rosario, Argentina, CD.

5. Barros, C.M., Moreira, M.B.B., Figueiredo, R.A., Teixeira, A.B., Trinca, L.A. 2000. Synchronization of ovulation in beef cows (Bos indicus), using GnRH, PGF2a and Estradiol Benzoate. Theriogenology, 53:1121-34.

6. Baruselli PS, Marques MO, Carvalho NAT, Valentim R, Berber RCA, Carvalho Filho AF, Madureira EH, Costa Neto WP. 2000. Ovsynch protocol with fixed-time embryo transfer increasing pregnancy rates in bovine recipients. Arq Fac Vet UFRGS, Porto Alegre, Brazil,; 28 (Suppl): 205 abstr.

7. 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 abstr.

8. Baruselli, P.S., Madureira, E.H., Marques, M.O. 2001. Programas de IA a tiempo fijo en Bos indicus. Resúmenes. Cuarto Simposio Internacional de Reproducción Animal, Huerta Grande, Córdoba, Argentina, 95-116.

9. Baruselli, P.S., Marques M.O., Nasser, L.F., Reis, E.L., Bo, G.A. 2003. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with CIDR-B devices for timed artificial insemination. Theriogenology 59, 214 (abstract).

10. Beal WB. 1999. Streamlining embryo transfer. 18th Annual Convention AETA, Colorado Springs, CO, USA; 78-85.

11. Beal WE, Hinshaw RH. 2001. Synchronization of estrus and ovulation in bovine embryo transfer recipients. Proceedings of the Advanced Embryo Transfer Seminar 12. Annual Meeting of the American Association of Bovine Practitioners, Vancouver, BC, Canada.

12. Bo GA, Tribulo H, Caccia M, Tribulo R. 2001. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and transferred without estrus detection. Theriogenology; 55:357 abstr.

13. Bó, G.A. y Baruselli, P.S. 2002. Programas de Inseminación Artificial a Tiempo Fijo en el Ganado Bovino en Regiones Subtropicales y Tropicales. Capítulo XXXI. En: Avances en la Gandería doble propósito, C. Gonzalez-Stagnaro, Eleazar Soto Belloso y Lílido Ramírez Iglesia (Editores); Fundación Girarz, Maracaibo, Venezuela; 499-514.

14. Bó, G.A., Baruselli, P.S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H., Mapletoft, R.J. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. Theriogenology; 57:53-72.

15. Bó, G.A., Adams, G.P., Caccia, M., Martínez, M., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J. 1995. Ovarian follicular wave emergence after estradiol and progestogen treatment in cattle. Anim Reprod Sci, 39:193-204.

16. Bó, G.A., Adams, G.P., Nasser, L.F., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J. 1993. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. Theriogenology, 40:225-239.

17. Bó, G.A., Caccia, M., Martínez, M., Mapletoft, R.J. 1996. Follicular wave emergence after treatment with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices in beef cattle. Proc. 13 th International Congress on Animal Reproduction, Sydney, Australia, 2:P7-22 abstr.

18. Bó, G.A., Caccia, M., Tríbulo, H., Adams, G.P., Pierson, R.A., Mapletoft, R.J. 1994. Synchronous ovulation in heifers treated with E-17ß and CIDR-B vaginal devices. Proc Can Society Anim Sci, Regina, SK,1994, 284 abstr.

19. Bó, G.A., Cutaia, L., Brogliatti, G.M., Medina, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H. 2001. Programas de inseminacion artificial a tiempo fijo en ganado bovino utilizando progestágenos y estradiol. Resúmenes Cuarto Simposio Internacional de Reproducción Animal , Huerta Grande, Córdoba, Argentina, 117-136.

20. Bó, G.A., Cutaia, L., Chesta, P., Moreno, D. 2004. The use of eCG to increase pregnancy rates in postpartum beef cows following treatment with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate and fixed-time AI. Reprod. Fertil. Dev. 16:127 (abstract).

21. Bó, G.A., Cutaia, L., Tribulo, R. 2002b. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Primera Parte. Taurus 14, 10-21.

22. Bó, G.A., Cutaia, L., Tribulo, R. 2002c. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Segunda Parte. Taurus 15, 17-32.

23. Bo G.A., Cutaia L., Balla, E., Moreno D., Aviles, M. Bertero, F. 2004. Follcular wave emergence and ovulation in beef cattle treated with prostaglandin F2α at device insertion and removal of a new or used progesterone vaginal device. Proc. 15 th International Congress of Animal Reproduction, August 8-12, 2004, Porto Seguro, BA, Brazil, 1:110 abstr.

24. Broadbent PJ, Stewart M, Dolmal DF. 1991. Recipient management and embryo transfer. Theriogenology; 35:125-140.

25. Burke, C.R., Mussard, M.L., Grum, D.E., Day, M.L. 2001. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of estrus and ovulation in cattle with estradiol benzoate. Anim Reprod Sci, 66:151-160.

26. Burry E. 2002. Comunicación Personal.

27. Carcedo, J., Alonso, N., Menajovsky, J., Alvarez, C. Comparación de dos métodos de sincronización de celos e inseminación artificial a tiempo fijo en vaquillonas cruza cebú. Resúmenes Tercer Simposio Internacional de Reproducción Animal, Carlos Paz, Argentina, 189 abstr.

28. Castilho, C., Dayan, A., Barros, C.M. 1997. Responsiveness of Nelore cows corpus luteum to $PGF_2\alpha$, administered intramusculary or via submucosa vulvar. Arq. Fac. Vet. UFRGS, 25: 205 abstr.

29. Cavalieri J, Fitzpatrick LA. 1995. Oestrus detection techniques and insemination strategies in Bos indicus heifers synchronized with norgestomet-oestradiol. Aust Vet J; 72:177-182.

30. Cavalieri, J., Rubio, I., Kinder, J.E., Entwistle, K.W., Fitzpatrick, L.A. 1997. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in Bos indicus cows. Theriogenology, 47: 801-814.

31. Chesta, P., Cutaia, L., Bó, G.A. 2003. Efecto del tratamiento con un DIB por 7 u 8 días sobre los porcentajes de preñez en vaquillonas cruza índicas inseminadas a tiempo fijo. V° Simposio Internacional de Reproducción Animal. Huerta Grande, Córdoba: 387 abstr.

32. Colazo, M.G., Bó, G.A., Illuminanti, H., Meglia, G., Schmidt, E.E., Bartolomé, J. 1999. Fixed-time artificial insemination in beef cattle using CIDR-B devices, progesterone and estradiol benzoate. Theriogenology, 51:404 abstr.

33. Cutaia, L.; Veneranda, G; Tribulo, R.; Baruselli, P.S.; Bó, G.A. 2003. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en rodeos de cría: factores que lo afectan y resultados productivos. Proceedings 5 Simposio Internacional de Reproducción Animal, June 27-29, Córdoba, Argentina, 119-132.

34. Cutaia, L., Moreno, D., Villata, M.L., Bó, G.A. 2001. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 hours later. Theriogenology, 55:408 abstr.

35. Cutaia, L., Tríbulo, R., Moreno, D., Bo, G.A. 2003. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). Theriogenology 59, 216 abstr.

36. Cutaia, L. Chesta P., Moreno, D., Aviles M., Bertero F., Bo, G.A. 2004. Effect of time of prostaglandin F2α and estradiol benzoate administration on follicular wave emergence and ovulation in beef cattle treated with progesterone vaginal devices. Proc. 15 th International Congress of Animal Reproduction, August 8-12, 2004, Porto Seguro, BA, Brazil, 1:111 abstr.

37. Cutaia, L., Balla, E., Rizzi, C., Peres, L., Bo, G.A. 2005. Effect of temporary weaning and eCG treatment on pregnancy rates in postpartum bos indicus cows following treatment with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate. Reprod. Fertil. Dev. (en prensa) abstr.

38. Fernandes, P., Teixeria, A.B., Crocci, A.J., Barros, C.M. 2001. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF2alpha and estradiol benzoate (EB). Theriogenology, 55:1521-1532.

39. Fuentes S, De la Fuente J. 1997. Different synchronization treatments for direct embryo transfer to recipients heifers. Proc XIII Annual Meeting AETE, Lyon, France; 148 abstr.

40. Galina, C.S., Orihuela, A., Duchateau, A. 1987. Reproductive physiology in Zebu cattle. Vet Clin Nth Amer: Food Anim Practice, 3:619-632.

41. Gambini, A.L.G., Moreira, M.B.P., Castilho, C., Barros, C.M. 1997. Follicular dynamics and synchronization of ovulation in Girolando cows. Biol Reprod, 56:195 abstr.

42. Hinshaw RH. Formulating ET contracts. Annual Meeting Soc for Theriogenology, Nashville, USA, 1999; 399-404.

43. Humblot, P., Grimard, B., Mialot, J.P. 1996. Sources of variation of post-partum cyclicity, ovulation and pregnancy rates in suckled beef cows treated with progestagen and PMSG. Proc Soc Theriogenology Meeting, Kansas City, 36-45.

44. Kastelic, J.P., Ginther, O.J. 1991. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. Anim Reprod Sci, 26:13-24.

45. Kerr, D.R., McGowan, M.R., Carroll, C.L., Baldock, F.C. 1991. Evaluation of three estrus synchronization regimens for use in extensively managed bos-indicus and Bos indicus/taurus heifers is northern Australia. Theriogenology, 36:129-138.

46. Lopez-Barbella, S., Martinez, L.A., Gavaldon, L.L. 1981. Synchronization of estrous with norgestomet and prostaglandin $F_2\alpha$ in beef cattle. Trop Anim Prod, 6: 101-104.

47. Macmillan, K.L., Burke, C.R.1996. Effects of oestrus cycle control on reproductive efficiency. Anim Reprod Sci, 42:307-320.

48. Macmillan, K.L., Peterson, A.J. 1993. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for estrus synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of postpartum anestrus. Anim Reprod Sci, 33:1-25.

49. Mapletoft RJ, Bo GA, Adams GP. 2000. Advances in the manipulation of donor cow and recipient estrus cycles in bovine embryo transfer programs. Arq Fac Vet UFRGS, Porto Alegre; 28:23-48.

50. Martínez, M.F., Adams, G.P., Bergfelt, D.R., Kastelic, J.P., Mapletoft, R.J. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. Anim Reprod Sci, 57:24-33.

51. Mapletoft, R.J., Colazo, M.G., Small, J.A., Ward, D.R., Kastelic, J.P. 2004. Effect of dose of estradiol valerate on ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cows. Reprod Fert Dev, 16:130 (abstract).

52. McGowan, M.R. 1999. Sincronización de celos y programas de inseminación artificial a tiempo fijo en ganado bos-indicus y cruza Bos indicus. Resúmenes Tercer Simposio Internacional de Reproducción Animal, Carlos Paz, Córdoba, Argentina, 71-82.

53. McGowan, M.R., Carroll, C.L., Davies, F.J. 1992. Fixed-time insemination of bos-indicus heifers following the use of Syncro-Mate-B (SMB) to synchronize estrus. Theriogenology, 37:1293-1300.

54. Mikeska, J.C., Willians, G.L. 1988 Timing of preovulatory endocrine events, estrus and ovulation in Brahman x Hereford females synchronized with norgestomet and estradiol valerate. J Anim Sci, 66:939-946.

55. Moreno D, Cutaia L, Tribulo R, Caccia M, Tribulo H, Chesta P, Villata ML, Bo GA. 2003. Fixed-Time embryo transfer in cows treated with progesterone vaginal devices and induced to ovulate with estradiol benzoate or hCG. Theriogenology; 59:307 abstr.

56. Moreno D, Cutaia L, Villata ML, Caccia M, Gatti G, Tribulo R, Tribulo H, Bo GA. 2002. Effect of the time of prostaglandin administration on pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and transferred without estrus detection. Theriogenology; 57:552 abstr.

57. Moreno D, Cutaia L, Villata ML, Chesta, P, Videla Dorna I, Aba MA y Bo GA. 2002 Efecto del momento de la aplicación de PGF sobre el diámetro del folículo preovulatorio y la concentración de progesterona en vacas receptoras tratadas con dispositivos con progesterona. Rev. Arg. Prod. Anim; 22:279-280. abstr.

58. Mulvehill, P., Sreenan, J. 1977. Improvement of fertility in postpartum beef cows by treatment with PMSG and progestagen. J Reprod Fertil, 50: 323-325.

59. Murphy, B.D., Martinuk, D. 1991. Equine Chrorionic Gonadotropin. Endocrine Reviews, 12:27-44.

60. Odde, K.G. 1990. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. J Anim Sci; 68:817-830.

61. Oyedipe, E.O., Voh, A.A., Marire, B.N. 1986. Plasma progesterone concentrations during the oestrus cycle and following fertile and non-fertile inseminations of zebu heifers. Br Vet J, 142:41-46.

62. Penteado, L., Ayres, H., Reis, E.L., Madureira, E.H., Baruselli, P.S. Efeito do eCG e do desmame temporário na taxa de prenhez de vacas nelore lactantes inseminadas en tempo fixo. Acta Scientiae Veterinaire 32 (suplemento): 223 abstr.

63. Pursley, J.R., Mee, M.O., Wiltbank, M.C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2α and GnRH. Theriogenology, 44:915-923.

64. Roche, J.F. 1974. Synchronization of estrus in heifers with implants of progesterone. J Reprod Fertil, 41:337-334.

65. Scena, C. 1998. Uso de implantes progestágenos subcutáneos para inducir y sincronizar celos en rodeos de cría. Cuartas Jornadas Nacionales CABIA y Primeras del Mercosur, Buenos Aires, Argentina, 59-68.

66. Silva, R.C.P., Rodrigues, C.A., Marques, M.O., Ayres, H., Reis, E.L., Nichi, M., Madureira, E.H., Baruselli, P.S. 2004. Efeito do eCG e do GnRH na taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo. Acta Scientiae Veterinariae 32 (suplemento): 221 abstr.

67. Stevenson, J. 2000. Sincronización de celos y de ovulaciones en ganado bovino de carne y de leche. Quinto Congreso Argentino de Reproducción Animal, CABIA, Rosario, Argentina, CD.

68. Stock AE, Fortune JE. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. Endocrinology; 132:1108-1114.

69. Tribulo H, Bo GA, Gatti G, Tegli JC, Cutaia L, Moreno D, Brito M, Tribulo R. 2000. Pregnancy rates in embryo recipients treated with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices to eliminate the need for estrus detection. 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Sweden; 2:115 abstr.

70. Tribulo H, Moreno D, Cutaia L, Gatti G, Tríbulo R, Caccia M, Bó GA. 2002. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and eCG and transferred without estrus detection. Theriogenology; 57:563 abstr.

71. Vasconcellos, J.L.M., Pursley, J.R., Wiltbank, M.C. 1994. Effects of Syncro-Mate-B combined with GnRH on follicular dynamics and time of ovulation. J Anim Sci, 72 (Suppl 1): 174 abstr.

72. Vasconcelos, J.L., Silcox, M.R.W., Pursley, J.R., Wiltbank, M.C. 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. Theriogenology 52, 1067-1078.

73. Williams, S.W., Stanko, R.L., Amstalden, M., Williams, G.L. 2002. Comparison of three approaches for synchronization of ovulation for timed artificial insemination in *Bos indicus*-influenced cattle managed on the Texas gulf coast. J. Anim. Sci. 80, 1173–1178.

74. Wiltbank, J.N., Zimmerman, D.R., Ingalls, J.E., Rowden, W.W. 1965. Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. J Anim Sci, 24: 990-994.

75. Zanenga CA, Pedroso MS, Lima GS, Santos ICC. 2000. Embryo transfer without estrus observation. Arq Fac Vet UFRGS, Porto Alegre, Brazil; 28(Suppl): 337 abstr.

INDUCTION OF OVULATION *BOS INDICUS* AND *BOS TAURUS* CATTLE FOLLOWING SYNCHRONIZATION OF OESTROUS CYCLES WITH EMPHASIS ON AUSTRALIAN STUDIES

John Cavalieri
ProBreed RMS Pty Ltd, PO Box 241, Werribee, VIC, 3030 Australia

1 INTRODUCTION

Synchronisation of oestrous cycles has been used extensively within the cattle industry to facilitate the use of artificial insemination (AI) and reduce the labour and time required for the detection of oestrus. The timing of onset of oestrus and ovulation is affected by the maturity of preovulatory follicles at the time that luteolysis and a decline in peripheral concentrations of progesterone occurs (Austin et al., 1999). Cows with follicles in a more advanced stage of development enter oestrus earlier than cows with more immature follicles at the time of luteolysis. Maturity of preovulatory follicles at this time is in turn proportional to the interval between wave emergence and the time when a reduction in plasma concentrations of progesterone to basal concentrations occurs (Cavalieri et al., 2004a).
Oestrous synchronisation systems that synchronise the emergence of preovulatory follicles can reduce the variation in follicle maturity at the time of luteolysis and improve the synchrony of onset of oestrus, but intervals to oestrus and ovulation can still vary over 2 to 5 days. This can reduce fertility when set-time insemination strategies are used (Cavalieri and Fitzpatrick 1995ab) and in prepubertal or anoestrous animals ovulation may still not occur (Fike et al., 1997; Rasby et al., 1998). Induction of ovulation following synchronisation of oestrous cycles enables the development of greater precision in the timing of ovulation and has improved fertility in animals that may be peripubertal or not undergoing oestrous cycles (anoestrous) at the time when treatments to synchronise oestrus are started. This report focuses on a review of studies that have been undertaken to synchronise ovulation in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle with an emphasis on studies that have been conducted in Australia. Attention is focused on the most common pharmacological agents that have been used for inducing ovulation (gonadotrophin releasing hormone, GnRH, and oestradiol benzoate, ODB) and on some of the factors that can affect the responses to treatment.

2 OVULATION INDUCTION AGENTS AND INTERVALS TO INSEMINATION

2.1 HORMONAL AGENTS USED TO INDUCE OVULATION

The most commonly used hormonal agents to induce ovulation in cattle include GnRH, GnRH agonists and agonist implants, porcine luteinising hormone (pLH), equine chorionic gonadotrophin (eCG), human chorionic gonadotrophin (hCG), ODB and oestradiol cypionate (OCP). Oestradiol benzoate at the molecular level consists of esterification of 17β-oestradiol at the C_3OH-position to benzoate. With OCP, 17β-oestradiol is bound with cyclopentylpropionate at the C_{17}OH-position (Vynckier et al., 1990). These esterified forms of oestradiol-17β increase the half life oestradiol in plasma with values being longer for the OCP compared with ODB. In Australia ODB is the most economical and widely used ovulation induction agent although the use of GnRH is increasing. Use of eCG as an agent for facilitating the induction of ovulation has largely been superceded by the use of ODB due to better fertility following

treatment in some studies (Cutaia et al., 2003), lower cost and reduced probability of multiple conceptions following treatment (Mulvehill and Sreenan 1977; Duffy et al., 2004).

Timing of ovulation in relation to oestrus has been determined in a number of studies in both *Bos indicus* (Plasse et al., 1970; Vaca et al., 1985; Cavalieri et al., 1997) and *Bos taurus* cattle (Schams et al., 1977; Walker et al., 1996; Lopez et al., 2002). Bo et al., (2003) recently reviewed the timing of ovulation in *Bos indicus* cattle and concluded that the interval from oestrus to ovulation was about 27 h and that this appeared to be similar between *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. Expected times of inducing oestrus, a preovulatory LH surge and ovulation for different ovulation induction agents used in cattle are outlined in Table 1. Results reported in different studies could vary with methods used to synchronise oestrous cycles, doses of hormones used, routes of administration, and frequency of monitoring onset of oestrus, ovulation and circulating concentrations of hormones that were examined in individual studies.

2.2 INSEMINATION STRATEGIES

The optimum time for insemination following the onset of oestrus was determined as early as 1948 when Trimberger (1948) reported that maximum pregnancy rates were obtained in *Bos taurus* cattle when cattle were inseminated 13 to 18 h before ovulation. More recently, Dransfield et al., (1998) reported that conception rates of lactating dairy cows were highest when cows were inseminated 4 to 14 h following the first standing event that was recorded with radiotelemetry. Maatje et al., (1997) estimated that the optimum time for insemination was 11.8 h after the onset of oestrus that was predicted using pedometers and visual signs for the detection of oestrus Saacke et al., (2000) recovered embryos from cows that were inseminated at 0, 12 and 24 h after the onset of oestrus. Embryos were recovered 6 days after AI and assessed for fertilisations status and quality. Early insemination in relation to oestrus resulted in low fertilisation rates but good embryo quality, while late insemination resulted in high fertilisation rates but poor embryo quality. The results suggested that conception rates following insemination at the start of oestrus were limited by the lifespan of spermatozoa within the female reproductive tract and that when insemination occurred relatively late after the onset of oestrus that aging of ova may have reduced pregnancy rates. Insemination at the mid-point between 0 and 24 h after the onset of oestrus was suggested as the best compromise between maximising both fertilisation rates and embryo quality. These studies provide collective support for an optimum time of insemination of between 4 to 14 h after the onset of oestrus in *Bos taurus* cattle as suggested by Dransfield et al., (1998). Studies are needed to determine the optimum timing of insemination in relation to oestrus in *Bos indicus* cattle, although results are not expected to be dissimilar to results reported for *Bos taurus* cattle.

Results from studies conducted in *Bos indicus* (Cavalieri et al., 1997) and *Bos taurus* (Rajamahendran and Taylor 1991, Evans et al., 2003) cattle suggest that the timing of onset of oestrus provides a reliable indicator of when ovulation will occur and so expected patterns of onset of oestrus can be used to design insemination strategies. Similarly, where the time in peak concentration of LH or LH-like activity is known the timing of ovulation can be predicted and an insemination strategy planned. Insemination strategies that have been used in association with different ovulation induction agents are presented in Table 1.

3 INDUCTION OF OVULATION WITH OESTRADIOL FOLLOWING SYNCHRONISATION OF OESTROUS CYCLES WITH PROSTAGLANDIN

Injection of ODB following the induction of pro-oestrus with a luteolytic dose of prostaglandin (PG) $F_{2\alpha}$ has shortened the time interval to oestrus and improved the synchrony of oestrus (Nancarrow and Radford, 1975; Welch et al., 1975) without compromising fertility in some studies (Peters et al., 1977). Pregnancy rates of heifers that were inseminated at a fixed time (80 h) after administration of $PGF_{2\alpha}$ were also greater in heifers that were treated with ODB at a synchronised pro-oestrus (53% vs 39%, $P < 0.05$; Dailey et al., 1983). These results may suggest that routine use of ODB could follow the induction of luteolysis with PG to improve the synchrony of oestrus without compromising fertility. However, results from more recent and larger studies conducted in dairy cows (Macmillan et al., 1997) and heifers (Cavalieri et al., 2004b) in Australia suggest that administering ODB to animals not in oestrus 48 h after the last dose of $PGF_{2\alpha}$ shortened the interval to oestrus but reduced both conception and pregnancy rates to AI. In the study of Macmillan et al., (1997) luteolysis was induced in 236 dairy cows between days 7 to 16 of the oestrous cycle. Forty-eight hours after administering $PGF_{2\alpha}$ cows not in oestrus were treated with ODB (1 mg). The proportion of cows detected in oestrus was significantly greater at 96 h after PG (91% vs 60%) but conception rates to first AI (50% vs 67%) and pregnancy rates 9 days after treatment (47% vs 58%) with PG were less in the cows treated with ODB. Cavalieri et al., (2004b) treated dairy heifers in two herds with two doses of $PGF_{2\alpha}$ administered 12 days apart. Heifers not detected in oestrus 48 h after PG were treated with ODB (0.75 mg). Treatment with ODB increased the proportion of heifers that were detected in oestrus within 96 h of PG (84.9%, 124/146 vs 74.1%, 109/147; $P = 0.025$) but within 5 days of PG conception rates of heifers inseminated (47.6%, 60/126 vs 64.3, 74/115; $P = 0.006$) and pregnancy rates of all of the heifers (41.1%, 60/146 vs 50.3%, 74/147p $P = 0.068$) were less after treatment with ODB. Immaturity of some preovulatory follicles following induction of ovulation with ODB in these studies is the most likely reason why fertility was reduced (see section 7).

Table 1. Mean intervals to oestrus, a preovulatory LH surge and ovulation in cows and reported insemination strategies in which ovulation induction agents have been administered during a synchronised pro-oestrus.

Hormone	Treatment to oestrus (h)	Oestrus to ovulation (h)	Treatment to LH peak (h)	Treatment to ovulation (h)	Treatment to AI	References
ECG	41.9	25.4 ± 2.3	41.6	67.3	1. AI twice daily from 24 to 72 h with timed AI of remaining cows at 72 h. 2. Timed AI 48 h.	Cavalieri et al., (1997). Cavalieri and Fitzpatrick (1995ab)
Oestradiol cypionate	29.0 ± 1.8 h	27.5 ± 1.1	-	55.4 ± 2.7 h	AI 24 h, remaining at 48 h (HeatSynch)	Pancarci et al., (2002)
Oestradiol benzoate	28 - 30	30 – 34	20 - 30	40 – 60	1. Set timed 25 to 32 h 2. At 24 h, 36 h, remaining at 48 h. 3. 28 h, remaining at 48 h 4. 24 h, remaining at 36 h.	Lammoglia et al. (1998) Lemaster et al., (1999) Cavalieri and Macmillan (2002). Cavalieri et al., (2002) Evans et al., (2003)
GnRH PLH HCG	- 	- 	2 – 3 - -	24 – 34	1. Set timed at 0 h, (Co-Synch) 2. Set timed at 16 – 24 h (Ovsynch).	Irvin et al., (1981) McDougall et al., (1995) Rajamahendran et al., (1998). Martinez et al., (1999) Thatcher et al., (2001) De Rensis et al., (2002) Acosta et al., (2003).

4 INDUCTION OF OVULATION WITH OESTRADIOL FOLLOWING SYNCHRONISATION OF OESTROUS CYCLES WITH PROGESTERONE

4.1 OESTROUS DETECTION RATES AND TIMING OF ONSET OF OESTRUS

Administration of oestradiol during a synchronised pro-oestrus, following the synchronisation of oestrous cycles with progesterone has been shown to improve reproductive performance by increasing submission rates, improving the synchrony of the induced oestrus and inducing oestrus and ovulation in prepubertal and anoestrous cattle (Hanlon et al., 1996; Fike et al., 1997; Ryan et al., 1999). Timing of onset of oestrus after synchronising oestrous cycles with an IVP4 varies with the timing of treatment in relation to removal of inserts and the induction of luteolysis. Figure 1 displays the expected pattern of onset of oestrus following administration of ODB (1 mg) to *Bos indicus* heifers either at the time of removal of an IVP4 or 24 h later. Figure 2 illustrates the pattern of onset of oestrus in dairy cows that were treated with an IVP4 for 7 or 8 days, ODB (1.5 mg) at the time of insertion and again, either 24 or 48 h after removal of inserts (1 mg), respectively.

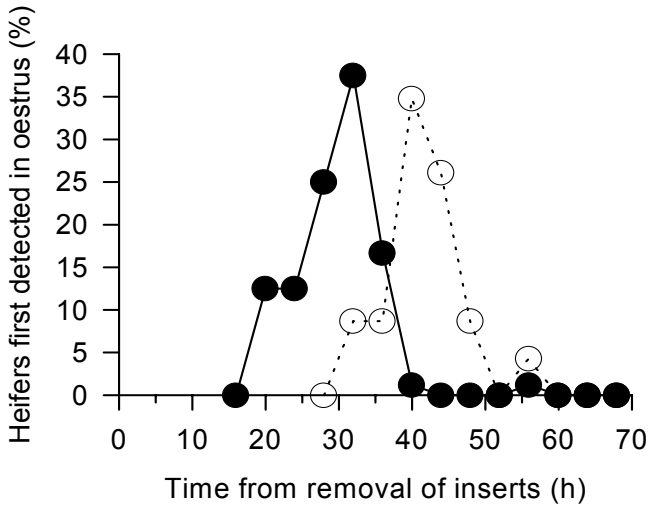


Figure 1. Proportion of heifers that were first detected in oestrus after synchronisation of oestrous cycles with an IVP4 with ODB administered at the start of treatment and at the time of removal of inserts (—●—) or 24 h later (···○···; Cavalieri et al., 2002).

The proportion of cows detected in oestrus after treatment with an IVP4 and ODB in studies in Australia have averaged over 90% (Table 2). A reduction in the proportion of cows detected in oestrus has been detected with cows that were classified as anoestrous before treatment was started. In one study the depth of anoestrous may have affected the proportion of cows that were detected in oestrus with the proportion of anovulatory anoestrous cows that were detected in oestrus being 15% less than cows classified as ovulatory anoestrous (Table 2; P = 0.20). Recently, the author also investigated a case of reduced submission rates in a Holstein herd that had synchronised oestrous cycles with an IVP4, ODB and PG. Two groups of non-pregnant cows were treated with an IVP4 for 7 days with ODB administered at the time of device insertion (2 mg) and 24 to 36 h later (1 mg). All cows at the start of treatment had been calved at least 70 days. The proportion of cows submitted for AI within 4 days of

removing inserts in the two groups of cows was 71% (65/91) and 76% (41/54). Previously the owner had obtained submission rates in excess of 90% using the same oestrous synchronisation protocol. Potential causes of lower than expected oestrous detection rates of non-pregnant cows that have been treated with an IVP4 and ODB to synchronise oestrus and induce ovulation include underdosing cows with the required dose of hormones (PG or ODB), failure to carry out the treatment program as directed, reduced efficiency of detection of oestrus, high loss rates of inserts anovulatory anoestrous, or systemic illness.

Examination of cows revealed that they were in good body condition (BCS 2.75/5), in a good state of health and were fed pasture and supplements in amounts that were compatible with nutrient requirements for their stage of lactation. Personnel and systems used for the detection of oestrus had remained unchanged. On examination of the injection gun that was used to administer both PG and ODB, the dose being administered was inadequate and at least 50% less than the required dose. Injection of a suboptimal or variable dose of PG and ODB during the treatment had the potential to lead to a variable time in the onset of luteolysis, induce variation in the pattern of follicular development and the pattern of onset of oestrus, and was the most likely cause of the reduced oestrous detection rates that were obtained within this herd.

Characteristics of oestrus in non-lactating Holstein cows following synchronisation of consecutive oestrous cycles with an IVP4 and ODB have been reported (Cavalieri et al., 2003a). Using continuous visual observation in this study the number of mounts received by cows in oestrus averaged 42.5 and ranged from 0 to 255. Duration of oestrus averaged 14.4 h and varied from 5.4 h to 33.9 h. Due to the concentrated pattern of onset of oestrus observed when administering ODB during a synchronised pro-oestrus herd owners that synchronise large numbers of cows should be warned of the potential for pasture damage, while caution should be exercised with using this method of inducing oestrus with cows that are maintained on concrete as excessive wearing of hooves with cows on concrete could occur.

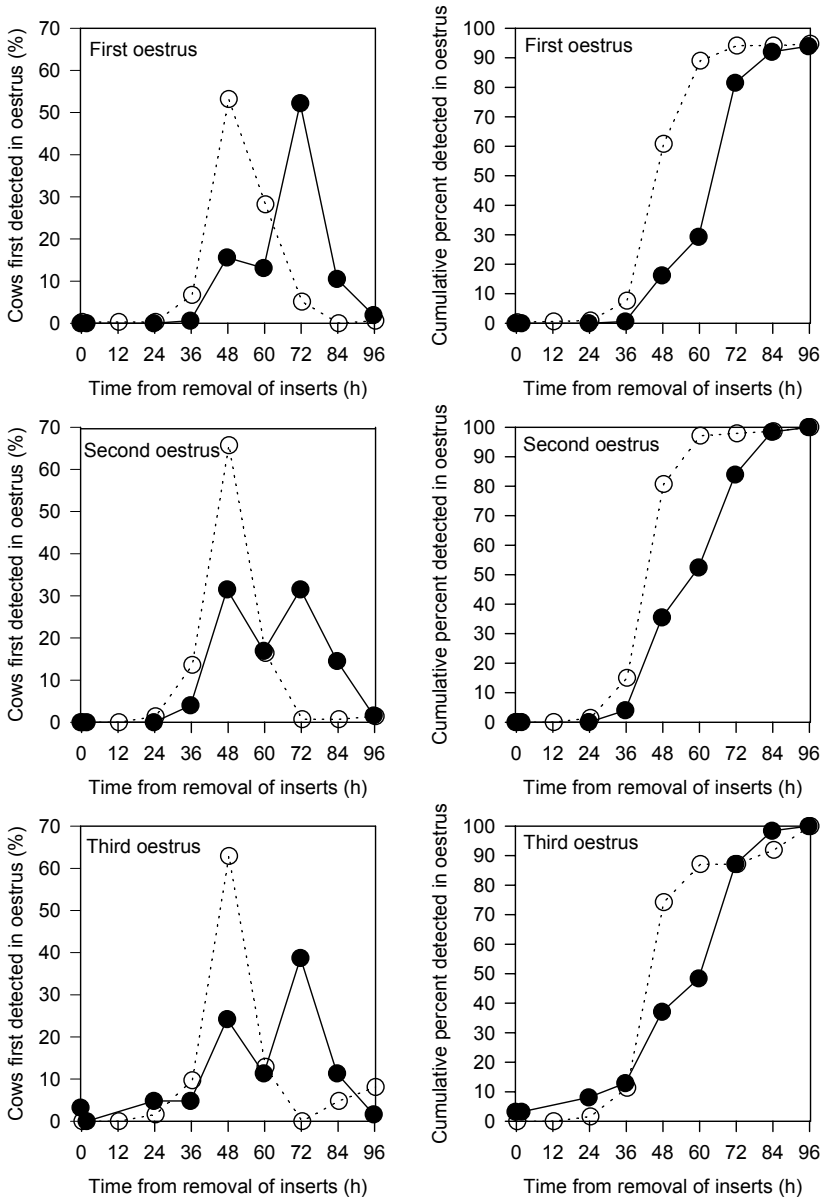


Figure 2. Percentage of cows first detected in oestrus and the cumulative percentage of cows detected in oestrus at each of three consecutive oestrous cycles after treatment with an IVP4 for 7 (—●—) or 8 (···○···) days with injections of ODB at the start of treatment with the IVP4 and 9 days later (Cavalieri et al., 2004c).

Table 2. Proportion of cows detected in oestrus following treatment with an IVP4 and synchronisation of pro-oestrus with ODB.[a]

Breed	Proportion detected in oestrus	Cycling status[b]	Reference
Brahman	99.1% (317/320)	Not determined	Cavalieri et al., 2002
Holstein	92.9% (3452/3717)	Not determined	Cavalieri et al., (2000)
Holstein	97.5 (236/242)	Not determined	Cavalieri and Macmillan 2002
Holstein	97.2% (843/867)	Not determined	Cavalieri et al., (2003b)
Holstein and Holstein-Jersey cross	96.6[c] (421/436)	Cycling	Cavalieri et al., 2004c
	89.5[d] (170/190)	Anoestrous	
Holstein	95.0[c] (19/20)	Cycling	Cavalieri unpublished
	85.0 (17/20)	Ovulatory anoestrous	
	70.5[d] (43/61)	Anovulatory anoestrous	

[a]All cows were treated with an IVP4 for 7 or 8 days, ODB (1 – 2 mg) at the time of insertion and 0 to 48 h after removal and $PG_{F2\alpha}$ at the time of removal.
[b]Cows were monitored for oestrus for 28 days prior to the start of treatment. Cows not detected in oestrus were classified as anoestrous. If manual rectal examination of these cows revealed the presence of a corpus luteum, or a corpus luteum was not detected they were classified as ovulatory and anovulatory anoestrous, respectively. Where ovarian examination was not conducted cows not detected in oestrus were classified as anoestrous.
[c vs d] Proportions within studies differ ($P < 0.05$).

4.2 REPRODUCTIVE PERFORMANCE

Reproductive performance is variable and is determined to a large extent by herd and animal factors (Buckley et al., 2003; www.incalf.com.au). Results from one study that assessed reproductive performance in 3717 dairy cows located in 11 herds that had three consecutive oestrous cycles synchronised with an IVP4 and ODB ("controlled breeding programs") are summarised in Table 3 (Cavalieri et al., 2000). In these programs cows were treated with an IVP4 for 8 days (treatment start date, Day = 0) with ODB inserted at the start of treatment (2 mg) and 24 h (1 mg) after removal. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ was administered at the time of device removal. All cows were subsequently inseminated on detection of oestrus for 4 days after removal of inserts. Oestrous cycles were then resynchronised for a second oestrus after reinserting IVP4s on average 13 days after the first induced oestrus (Day 23) and removing them 8 days later. Oestradiol benzoate was administered at the time of device insertion (1 mg) and 24 h after removal (Day 32). Cows were then inseminated on detection of oestrus for 4 days. Cows inseminated at the second induced oestrus were then resynchronised for a third oestrus using the same treatment sequence with treatment starting on Day 46.

Table 3. Cumulative pregnancy rates and conception rates of cows over three consecutive oestrous cycles that were synchronised with IVP4 and ODB (Cavalieri et al., 2000).

Variable	First oestrus	Range	Second oestrus	Range	Third oestrus	Range
Cumulative pregnancy rate (%)	41.6 (1569/3717)	31.3 – 52.2	63.3 (2354/3717)	54.3 - 68.8	71.5 (2659/3717)	63.9 - 78.7
Conception rate (%)	42.7 (1473/3452)	34.7 – 52.7	45.9 (737/1607)	37.5 – 54.7	42.4 (257/609)	30.3 – 60.0

5 INDUCTION OF OVULATION WITH OESTRADIOL FOLLOWING SELECTIVE SYNCHRONISATION OF OESTROUS CYCLES WITH PROGESTERONE RELEASING INSERTS.

In an attempt to reduce the costs associated with whole herd synchrony programs while still maintaining high rates of oestrous detection in the first and fourth week of the breeding season the author has developed an alternative treatment strategy. This strategy involves selective treatment of anoestrous cows with IVP4s and synchronisation of oestrous cycles in cows classified as cycling without the use of these inserts. The treatment strategy that has been used by the author is outlined in Figure 3. Tail-paint is applied to cows 7 days (Day -24) before administering a dose of $PGF_{2\alpha}$ (Day -17). At the time of administering $PGF_{2\alpha}$ cows with over 50% of tail-paint still remaining are repainted while other cows are left unpainted. On Day –7 any cow with over 50% of tail-paint remaining is classified as anoestrous while other cows are classified as cycling. Anoestrous cows are then treated with an IVP4 while every cow (cycling and anoestrous) is treated with ODB (1 to 2 mg). $PGF_{2\alpha}$ is administered to all cows that have not been inseminated on Day 0 to induce luteolysis. Cows not detected in oestrus within 48 h of removing inserts are treated with ODB (1 mg). Cows are inseminated at detection of oestrus from Days -2 to 4. Oestrous cycles are then resynchronised for a second oestrus by reinserting an IVP4 for 7 days in cows that were classified as anoestrous. Reinsertion of inserts occurs on Day 16 and ODB (1 mg) is administered to all cows on that day. Nine days later, 48 h after removal of inserts any cow not yet detected in oestrus is treated with ODB (1 mg). The percentage of cows within a herd detected in oestrus following application of this treatment program is depicted in Figure 4. Reproductive performance in 3 herds treated with the selective synchronisation program is summarised in Table 4.

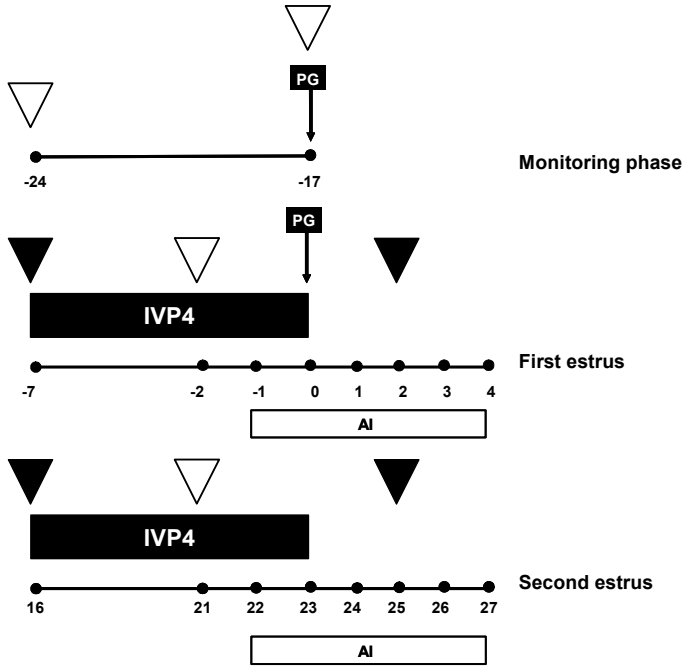


Figure 3. Outline of selective synchronisation program where cows classified as anoestrous are treated with an IVP4 and ODB to synchronise cows for a first insemination and resynchronise them for a second insemination. Cows classified as cycling are given an identical treatment but are not treated with an IVP4. (Δ depicts days when tail-paint is applied, ▼depicts days ODB is administered; PG = $PGF_{2\alpha}$; AI = days of detection of oestrus and artificial insemination).

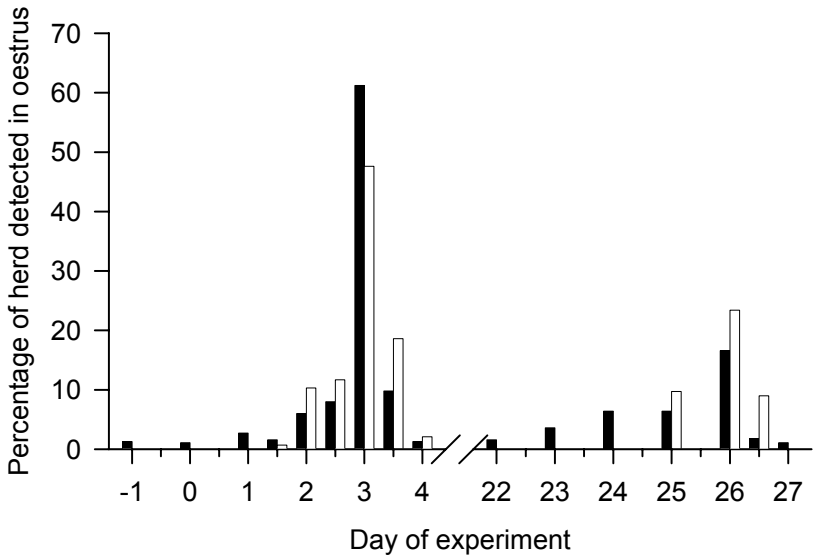


Figure 4. Percentage of cows in one herd detected in oestrus during days -1 to 4 and 22 to 27 following treatment with a selective oestrous synchronisation program (■ = cows classified as cycling, □ = cows classified as anoestrous).

Table 4. Cumulative pregnancy rates after the start of mating in dairy cows selectively treated with PG, ODB, and with or without an IVP4 to synchronise and resynchronise oestrous cycles.

Herd	Cumulative pregnancy rate (%)		Cycling status	Interval between 1st PG and ODB (days)	Dose of ODB administered on Day -7
	1-week	4-week			
A	57.3 (47/82)	70.7 (58/82)	Not determined	12	2
B	52.4 (66/126)	71.4 (90/126)	Cycling	10	1
	46.3 (19/41)	68.3 (28/41)	Anoestrous		
C	48.6 (267/549)	63.9 (351/549)	Cycling	10	1 or 2[a]
	35.4 (52/147)	51.0 (75/147)	Anoestrous		

[a] Pregnancy rates at 1 and 4 weeks after the start of mating did not differ (P > 0.05).

6 INDUCTION OF OESTRUS AND OVULATION WITH GnRH

6.1 OESTROUS DETECTION RATES

A number of studies have reported that the proportion of cows that show behavioural signs of oestrus after administration of GnRH during pro-oestrus is reduced compared to if cows were allowed to enter oestrus spontaneously (Stevenson et al., 1999) or induced with ODB (Cavalieri and Macmillan 2002; Martinez et al., 2002). The mechanism is thought to relate to luteinisation of ovarian follicles as a result of the GnRH-induced LH surge and rapid decline in ovarian synthesis of oestradiol. As a result in a high proportion of cows plasma concentrations of oestradiol will not reach sufficiently high concentrations to induce oestrous behaviour. Those cows that display behavioural signs of oestrus following administration of GnRH are likely to have had mature preovulatory follicles at the time of administration and were producing sufficient oestradiol to induce oestrous behaviour before ovarian synthesis of oestradiol was curtailed by a preovulatory LH surge.

In one study the probability of detecting cows in oestrus following administration of GnRH at a synchronised pro-oestrus was positively associated with calving to mating interval (Cavalieri and Macmillan 2002). The proportion of cows detected in oestrus within 4 days of removing inserts was much greater for the cows treated with ODB than for those treated with GnRH (97.5%, 236/242 vs 36.2%, 55/152, respectively). It is possible that cows with longer post partum intervals at the time of treatment with GnRH could have had larger diameter, more oestrogen-active dominant follicles which secreted more oestradiol earlier in pro-oestrus. As a result this may have increased the proportion of cows with longer postpartum to treatment intervals being detected in oestrus.

6.2 REPRODUCTIVE PERFORMANCE

GnRH has been widely used to synchronise ovulation in conjunction with the use of the Ovsynch protocol in studies conducted throughout the world. In studies conducted in Australia, comparative results with PG based programs have failed to demonstrate significant improvements in reproductive performance. In 8 out of 9 herds studied by Jemmeson (2000) first service conception rates (65.9%, 203/308 vs 38.1%, 119/312; P < 0.05) and pregnancy rates after 30 days of mating (72.4%, 223/308 vs 64.1%, 200/312; P < 0.05) were greater in the cows treated with two doses of $PGF_{2\alpha}$, administered 14 days apart and inseminated on detection of oestrus compared with

cows treated with Ovsynch and timed AI 16 to 20 h after the last dose of GnRH, respectively. Pregnancy rates 56 days after the start of mating in all 9 herds studied were similar between the PG and Ovsynch treatment groups (84.1%, 354/421 vs 79.8%, 332/416, respectively; P > 0.05). In a more recent study Lean et al., (2003) compared the reproductive performance of lactating dairy cows that were treated with two doses of $PGF_{2\alpha}$ or the Ovsynch protocol. With the PG treatment protocol cows were inseminated on detection of oestrus between 24 and 72 h after the last dose of $PGF_{2\alpha}$, or time inseminated at 72 and 96 h if not in oestrus by 72 h. Cows treated with Ovsynch were inseminated 24 h after the last dose of GnRH. Using survival analysis the proportion of cows that conceived over a 150 day breeding period did not differ significantly between the two treatments. Recent results from studies conducted in Germany (Tenhagen et al., 2004) could suggest that economic benefits of the use of Ovsynch may be better in herds with poor oestrous detection and so the failure of Australian studies to show a positive benefit from the use of timed AI strategies could be that the oestrus detection efficiency was not limiting reproductive performance sufficiently to offset potential benefits from timed AI.

To date one of the largest studies that have documented results associated with an Ovsynch program in cows that were classified as cycling or anoestrous at the start of treatment has been completed (Shephard 2004). The study consisted of 3559 lactating dairy cows, of which 1517 were located in herds in Australia and 2042 were located in herds in New Zealand. The proportion of cows that were classified as anoestrous prior to the start of mating in Australia and New Zealand herds, respectively were 31.9% and 28.9%. Cows were treated with a standard Ovsynch protocol and set-time inseminated at 8 to 24 h after the last dose of GnRH. Artificial insemination based on detection of oestrus continued in all herds for at least 45 days after the first timed AI. Cumulative pregnancy rates during a 45-day breeding program for herds in both countries are shown in Figure 5. Pregnancy rates to the timed AI for all cows were similar between Australian and New Zealand herds and averaged 36.5%. Pregnancy rates in anoestrous cows were about 7% lower than cycling cows in Australia but were similar to cycling cows in New Zealand.

Cumulative pregnancy rates after 45 days of mating were almost 20% higher in New Zealand herds compared to Australian herds. Differences in reproductive performance between the herds in the two countries was associated with,

a) Lower reproductive performance in the anoestrous cows in Australia. The cumulative pregnancy rates of the anoestrous cows in Australia by Day 45 were 11.4% less than their contemporary cycling herd mates, while in New Zealand these two classifications of cows differed by less than 1% in their cumulative pregnancy rates at that time.
b) Lower second service conception rates in Australian herds. Conception rate to the second service after the first timed AI averaged 44.6% in Australian herds (Cycling:46.7%, Anoestrous: 40.1%) and 66.3% in New Zealand herds (Cycling:65.2%, Anoestrous:69.0%).
c) Lower 24-day return rate of non-pregnant cows. The percentage of cows classified as not pregnant to the first timed AI that returned to oestrus within 24 days of the first AI in Australia averaged 59.0% (Cycling:63.5%, Anoestrous: 50.3%) and New Zealand it averaged 71.0% (Cycling: 74.9%, Anoestrous: 63.4%).

These results would suggest that the Ovsynch treatment program with timed AI in pasture based seasonally calving dairy herds is effective in enabling about one third of anoestrous and cycling cows to conceive in the first week of the breeding season. Differences in fertility between Australian and New Zealand populations of dairy cows are apparent which could be due to genetic and/or environmental differences.

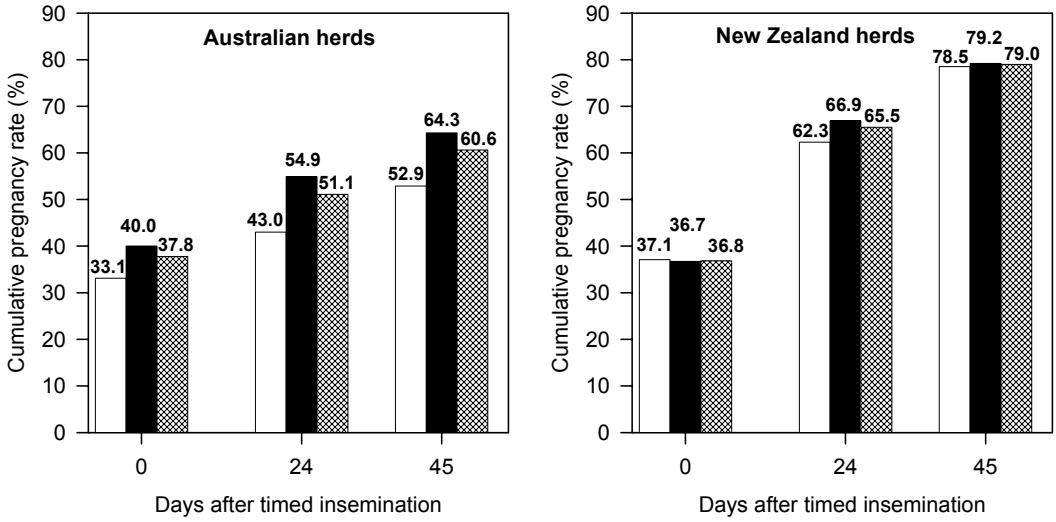


Figure 5. Cumulative pregnancy rates of dairy cows treated with Ovsynch and timed AI in dairy cows located in Australia and New Zealand that were classified as anoestrous (□) or cycling (■) or the combination of anoestrous and cycling cows (▩) at the start of breeding (adapted from Shephard 2004).

7 FACTORS AFFECTING RESPONSES TO OVULATION INDUCTION AGENTS

Normal processes that lead to oestrus and ovulation in the cow involve a progressive maturation of preovulatory follicles. During this maturation process follicles acquire the ability to ovulate in the presence of an endogenous surge of LH. This is at least in part related to a progressive acquisition of LH receptors. There are therefore a number of potential points at which exogenous treatment with agents that induce ovulation may lead to reduced fertility. A failure of treatment could theoretically occur if an LH surge of sufficient magnitude is not induced or if follicles fail to ovulate in response to an endogenous surge of LH. If follicles prematurely ovulate reduced fertility could occur due to reduced fertility of the ovulating oocyte or due to the formation of an inadequate corpus luteum. Variations in the responses to treatment have been investigated in a number of studies. These studies have examined the effects of altering the dose and timing of administration of ovulation induction agents, and effects associated with injecting these agents at various stages of follicle development.

7.1 DOSE OF ODB AND GNRH

Lammoglia et al., (1998) investigated the effects of various doses of ODB on responses of a small number of peripubertal heifers and postpartum cows following treatment with an intravaginal progesterone releasing insert. Cows and heifers were treated with an IVP4 for 7 days with $PGF_{2\alpha}$ injected 24 h before removal of devices. Oestradiol benzoate was injected in doses ranging from 0 to 0.75 mg in heifers and 0 to 1.0 mg in cows, 24 to 30 h after removal of devices. A linear increase in the proportion of animals that were detected in oestrus, peak plasma concentrations of oestradiol, peak concentrations of LH, the proportion of cattle detected with a preovulatory rise in concentrations of LH, and a reduced interval from removal of inserts to the peak

concentration of LH were observed with increasing doses of ODB. Pregnancy rates in cows were also improved with increasing dose of ODB (8, 23, 21 and 67% for 0, 0.25, 0.5 and 1 mg of ODB, respectively, $P < 0.01$). These authors concluded that in general the optimum dose for inducing oestrus following treatment with an IVP4 was 0.4 mg in heifers and 1.0 mg in cows.

Effects on reproductive performance of using two doses of ODB to resynchronise oestrous cycles in dairy cows were investigated by Cavalieri et al., (2003b). Cows were initially inseminated at a synchronised first oestrus and then resynchronised with an IVP4 for 8 days starting about 13 ± 1 days after the first AI. Oestradiol benzoate (1.0 mg) was administered at the time of insertion of an IVP4 and 0.5 or 1.0 mg of ODB was administered 24 h after removal. Reproductive performance was found to be similar between cows treated with either dose of ODB.

Reduced doses of GnRH have been used in some studies to induce ovulation and control ovarian follicular development with doses as low as 50 µg of gonadorelin reported to be as effective as 100 µg of gonadorelin (Fricke et al., 1998). However, results from all studies have not been consistent. In one study conducted in post-partum beef cows that involved the use of an Ovsynch protocol and timed insemination it was reported that a significant reduction in conception rates occurred following the use of 50 µg of gonadorelin (32%, 76/239) compared to 100 µg of gonadorelin (42%, 106/255; Funk and Anderson 2000). Macmillan et al., (2003) recently reviewed the use of GnRH to induce ovulation and suggested that doses of gonadorelin less than 250 µg were less effective at inducing ovulation during dioestrus but that lower doses of 50 to 100 µg may be as effective as higher doses when administered after treatment with $PGF_{2\alpha}$ of an Ovsynch program. In the same review Macmillan et al., (2003) cited evidence for a high frequency of short oestrous cycles following induction of ovulation with low doses of GnRH (≤ 100 µg) with 51% of second insemination occurring within 18 days of the first AI in one study (Cordoba and Fricke, 2002), and 31.8% of cows in a second study being inseminated within 17 days of a first insemination (Shephard 2002). Taponen et al., (2002) also showed that injection of $PGF_{2\alpha}$ 8 days after oestrus, followed by injection of GnRH (100 µg) 24 h later in dairy cows can cause short oestrous cycles due to premature decline in peripheral concentrations of progesterone. These studies indicate that abnormal CL function can be associated with the use of doses of GnRH ≤ 100 µg, however possible interactions between dose and the stage of follicular development at the time of administration during pro-oestrus require further investigation.

7.2 TYPE OF FORMULATION

Differences in responses between natural GnRH products and agonists have been reported. Chenault et al., (1990) found that the GnRH agonist buserelin was 40 to 100 times more potent that gonadorelin and that a 10 µg dose of buserelin induced the release of more LH and FSH than 500 µg of gonadorelin. Martínez et al., (2003) compared secretion of LH and follicular dynamics after treatment of Holstein cows or beef heifers with three formulations of gonadorelin that are available in Canada (gonadorelin diacetate tetrahydrate: Cystorelin, Merial Canada Inc., Fertagyl, Intervet Canada Ltd; gonadorelin hydrochloride: Factrel, Wyeth-Ayerst Canada). A 100 µg dose was administered in each study. Mean and peak concentrations of LH were found to be significantly higher in cows and heifers treated with Cystorelin than those treated with Fertagyl or Factrel. The proportion of dominant follicles that ovulated was higher ($P < 0.02$) in Holstein cows that were treated with Cystorelin than in those treated with Fertagyl or Factrel (18/19, 11/19, 4/7, respectively) but no significant differences were observed in similarly treated beef heifers (6/10, 6/10, 4/10, respectively). Intervals from treatment to follicle emergence were similar among products used. The authors concluded that treatment with Cystorelin resulted in greater release of LH after treatment and increased ovulation rates in cows but not in heifers compared with the other GnRH products tested.

7.3 TIMING OF TREATMENT

Studies conducted with both GnRH and ODB have indicated that the timing of treatments that precede ovulation can affect fertility. Using the Ovsynch protocol, Peters and Pursley (2003) tested the effects on fertility of dairy cows of administering GnRH at different times (0 h to 36 h) after inducing luteolysis with $PGF_{2\alpha}$. A significant, positive linear trend was found between the diameter of ovulatory follicles and pregnancy rate and the interval from $PGF_{2\alpha}$ to the final injection of GnRH. Reduced fertility occurred with shorter intervals from $PGF_{2\alpha}$ to the final injection of GnRH and were associated with a higher frequency of short luteal phases following treatment. They recommended that the final injection of GnRH administered as part of the Ovsynch protocol should be administered at least 36 h after the final injection of $PGF_{2\alpha}$.

The effect of the timing of administration of ODB during pro-oestrus following synchronisation of oestrous cycles with an IVP4, ODB and $PGF_{2\alpha}$ has been studied in both *Bos indicus* heifers and *Bos taurus* cows with variable results being obtained in some studies. Treatment with ODB at the time of removing IVP4s compared to 24 h later shortened the mean time interval to oestrus (29.8 ± 1.5 h vs 43.1 ± 1.2 h, $P < 0.001$) and ovulation (56.8 ± 1.9 h vs 74.4 ± 1.7 h; $P < 0.001$) in *Bos indicus* heifers but reduced pregnancy rates (33.3%,53/159 vs 43.5%, 70/161; $P < 0.05$) at the synchronised oestrus (Cavalieri et al., 2002). Colazo et al., (2002) synchronised oestrous cycles in heifers with a combination of an IVP4 and with either OCP (1 mg) and progesterone (50 mg) or GnRH (100 µg) at the time of insertion, $PGF_{2\alpha}$ at the time of removal 7 days later, and either OCP (0.5 mg) at the time of removal or 24 h later. Pregnancy rates were found to be greater in heifers that were treated with OCP 24 h after removal of IVP4s than at the time of removal (65%, 216/331; vs 51%, 169/328, respectively; $P < 0.05$). There was no difference ($P = 0.90$) in pregnancy rates between heifers treated with GnRH (56%, 276/491) or OCP and progesterone (57%, 277/488) at the start of treatment. Ross et al., (2004) working with anoestrous beef cows reported that administration of ODB (0.7 mg) 0 or 24 h after synchronising oestrous cycles with progestogen (medroyprogesterone acetate) resulted in similar ovulation rates, interval to ovulation, and diameter of the ovulatory follicle. Subsequent to ovulation similar plasma concentrations of progesterone, CL area and the proportion of cows with short-

lived corpora lutea were also similar. Pregnancy rates in multiparous and primiparous cows that were set time inseminated 48 h after treatment were similar, differing by less than 3%.

In three of four studies where cows and heifers were treated with an IVP4 for 7 (IVP4-7) or 8 (IVP4-8) days, ODB at the time of insertion and again 9 days later (48 or 24 h after removal of inserts for the IVP4-7 and IVP4-8 treatments, respectively) treatment had no significant effect on pregnancy rates at a synchronised oestrus (Table 5). The synchrony of oestrus was however, improved when ODB was injected 24 compared to 48 h after removal of inserts. In one of those studies, the mean time to the onset of oestrus after removal of inserts for cows treated 24 and 48 h after removing an IVP4 was 52.2 ± 0.8 h vs 67.6 ± 0.8 h, respectively ($P < 0.001$; Cavalieri et al., 2004c). A similar pattern of returns to oestrus were also observed in that study when cows were again resynchronised for a second and then a third oestrus with an IVP4 for 7 or 8 days with ODB administered at the start of treatment and 24 or 48 h after removal of inserts, respectively (Figure 2). Reproductive performance following resynchronisation of oestrus also did not differ significantly between cows given the two different treatments in that study.

Table 5. Pregnancy rates of cows treated with an IVP4 for 7 or 8 days with ODB administered at the start of treatment and again 9 days later to induce oestrus.

Type of female	Treatment[a]		
	IVP4-7	IVP4-8	Reference
Heifer	64.2 (188/293)	61.7 (182/295)	Taufa et al., 1998
Lactating dairy cows	45.2 (225/498)	47.4 (243/513)	Macmillan et al., 1999
Lactating dairy cows	60.9[b] (67/110)	45.6[c] (52/114)	Cavalieri et al., 2003b
Lactating dairy cows	45.2 (142/314)	43.9 (137/312)	Cavalieri et al., 2004c

[a]Females were treated with an IVP4 for 7 or 8 days, ODB at the start of treatment and ODB 24 (IVP4-8) or 48 h (IVP4-7) after removal of devices.
[bc]$P < 0.05$.

7.4 MATURITY OF POTENTIAL PREOVULATORY FOLLICLES AT THE TIME OF TREATMENT

As preovulatory follicles mature they progressively acquire LH receptors and the capacity to ovulate in the presence of an endogenous surge of LH (Spicer and Echternkamp, 1986). This would suggest that not all potential ovulatory follicles will ovulate following administration of ODB during pro-oestrus. Burke et al., (2001) investigated the effects of treatment with ODB to induce oestrus and ovulation when prepubertal heifers were treated with potential preovulatory follicles at different stage of maturity. Heifers were treated with an IVP4 and 1 mg of ODB IM/500 kg body weight. The IVP4 was removed when emerging dominant follicles were either young (1.3 ± 0.1 days after emergence, n = 15) or mature (4.2 ± 0.1 days after emergence, n = 16) and ODB (0.75 mg/500 kg) was either injected (n = 16) or not injected (n = 15) 24 h later. A total of 15/16 that received the second injection of ODB was detected in oestrus while 12/16 ovulated. None of the heifers that did not receive the second injection of ODB were detected in oestrus (0/16) while 1/16 ovulated. In the same study the same initial dose of ODB (1 mg/500 kg) was injected into heifers that were undergoing oestrous cycles on day 6 of the oestrous cycle. Luteolysis was then induced when emerging dominant follicles were either young (1.1 ± 0.1 days after emergence, n = 16) or mature (4 days after emergence, n = 16). Again ODB was or was not injected 24 h later.

Treatment with ODB reduced the time interval from $PGF_{2\alpha}$ to oestrus and ovulation regardless of the stage of maturity of the dominant follicle at the time of treatment.
In a third experiment anoestrous suckled beef cows were treated with an IVP4 and ODB (1 mg/500 kg) at the start of treatment. Devices were removed 1 or 4 days after an emerging follicular wave and ODB (0.75 mg/500 kg) was injected 24 h later. A total of 9/9 and 8/9 cows with a young or mature dominant follicle, respectively at the time of removing the IVP4 were detected in oestrus following treatment. The proportion ovulating emerging dominant follicles was 4/9 and 9/9 for the same cows, respectively. Concentrations of progesterone in plasma and the average area of corpora lutea were also greater in cows that ovulated a mature dominant follicle compared to cows that ovulated a young dominant follicle at specific times following oestrus.
Evans et al., (2003) investigated the effects of the maturity of the potential ovulatory follicle after administering ODB during pro-oestrus in heifers. Prostaglandin $F_{2\alpha}$ was injected into heifers either at emergence or dominance of a second follicular wave after oestrus. Results are summarised in Table 6. Treatment with ODB shortened the interval to oestrus and ovulation although the effect was greater when treatment was administered at emergence rather than at dominance. The temporal relationship between oestrus, LH surge and ovulation was not altered by treatment. Treatment also had no significant effects on the length of the subsequent oestrous cycle or size of the CL.

Table 6. Effect of ODB given after PG at two stages of follicle wave development on the timing of onset of oestrus and ovulation and factors associated with the growth of preovulatory follicles in heifers (Evans et al., 2003).

Variable	Stage of follicle growth			
	Emergence		Dominance	
	Control	ODB	Control	ODB
Diameter of ovulatory follicle (mm)	13.1 ± 0.1^{a}	11.7 ± 1.2^{b}	13.6 ± 0.4	12.7 ± 0.3
Interval to oestrus (h)	88.0 ± 9.6^{a}	52.0 ± 2.3^{b}	65.7 ± 4.5	53.3 ± 2.7
Interval to LH surge (h)	89.1 ± 6.5^{a}	53.3 ± 3.5^{b}	70.9 ± 4.8^{a}	54.0 ± 3.1^{b}
Interval to ovulation (h)	129.6 ± 9.6^{a}	96.0 ± 0.0^{b}	110.4 ± 4.8	96.0 ± 0.0

[ab]Values for Control and Treatment groups within rows for a given stage of follicle growth differ $P < 0.05$.

Taken together the results of these experiments suggest that the stage of maturity of emerging dominant follicles does not affect the proportion of prepubertal or oestrous cycling heifers or anoestrous cows induced to enter oestrus following treatment with an IVP4 and ODB during pro-oestrus. While treatment with ODB appeared to induce ovulation of dominant follicles that were either young or mature at the time of treatment in heifers, in anoestrous cows the presence of young dominant follicles at the time of treatment with ODB could reduce the proportion of cows that ovulate and compromise luteal function.

7.5 EFFECTS OF SYNCHRONISING PRO-OESTRUS ON CONCENTRATIONS OF PROGESTERONE

Reduced concentrations of progesterone have been recorded in *Bos indicus* heifers (Cavalieri et al., 2002) and non-lactating Holstein cows (Cavalieri et al., 2004a) that were induced to ovulate following induction of oestrus and ovulation with ODB. The effects of diameter of ovulatory follicles on concentrations of progesterone recorded 11 days after removal of IVP4 following induction of oestrus and ovulation with ODB in *Bos indicus* heifers are shown in Figure 7. The diameter of corpora lutea and plasma concentrations of progesterone in cows that ovulated ovarian follicles < 10 mm in

diameter or ≥ 10 mm in diameter after treatment with an IVP4 and ODB during pro-oestrus are shown in Figure 8. Similar effects of follicle diameter have also been demonstrated in cattle induced to ovulate with GnRH (Vasconcelos et al., 2001) or LH (Sartori et al., 1998) and in ewes in which ovulation was prematurely induced with GnRH (Murdoch and Van Kirk, 1998). These results suggest that premature induction of ovulation with ODB, GnRH or LH has the potential to reduce circulating concentrations of progesterone which could have a detrimental impact on fertility of both artificial insemination and embryo transfer programs.

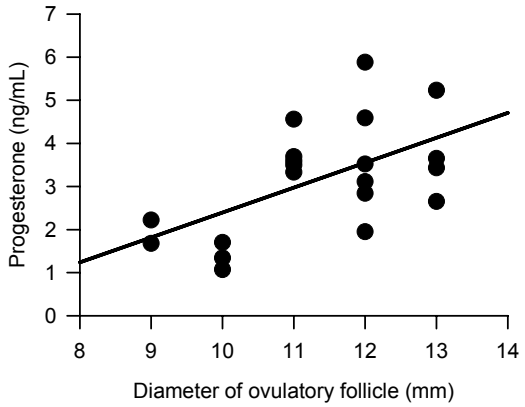


Figure 7. Concentrations of progesterone in plasma 11 days after removal of intravaginal progesterone releasing devices and induction of pro-oestrus with ODB in *Bos indicus* heifers (Cavalieri et al., 2002).

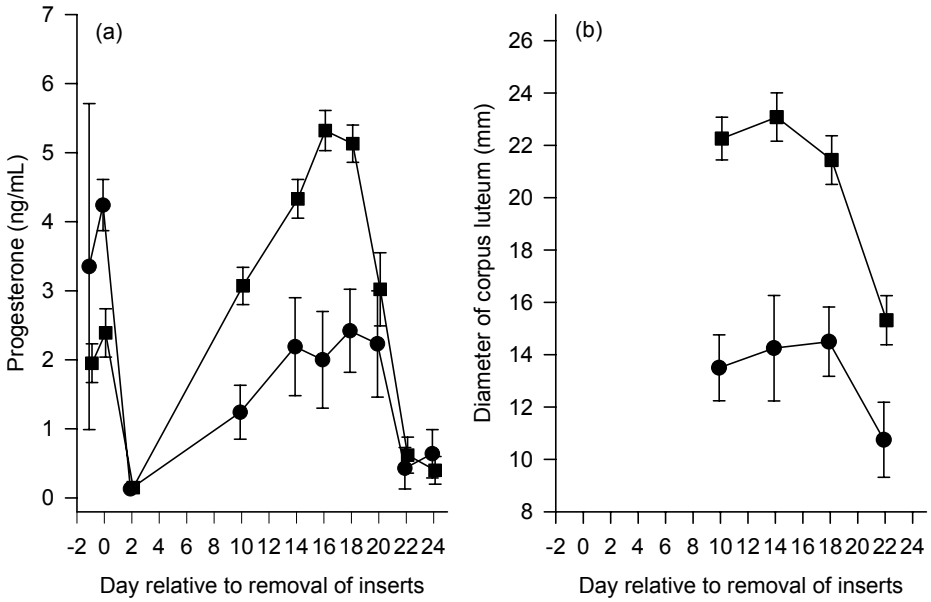


Figure 8. (a) Concentrations of progesterone from one day prior to 24 days after removal of inserts in cows that ovulated ovarian follicles <10 mm (□) or ≥ 10 mm (□) in diameter. Cows were treated with an IVP4 for 5 to 9 days with ODB (2 mg) administered on the day of insertion and 24 h (1 mg) after removal of inserts. (b) Diameter of the CL in cows that ovulated ovarian follicles <10 mm (□) or ≥ 10 mm (□) in diameter (Cavalieri et al., 2004a).

7.6 ANOVULATORY OESTRUS

Anovulatory oestrus (oestrus unaccompanied by ovulation or "false oestrus") has been recorded in studies that have involved the administration of ODB during pro-oestrus (Cavalieri et al., 2002; 2003c). A total of 34% (16/47) of *Bos indicus* heifers treated with ODB either at the time of removal of an IVP4 or 24 h later did not ovulate as determined by a plasma concentration of progesterone after removal of inserts, while 85.5% (14/16) of the these heifers were detected in oestrus (Cavalieri et al., 2002). None of the anovulatory heifers were classified as pregnant to AI at the synchronised oestrus while 51.6% (16/31) of the ovulating heifers were classified as pregnant. Failure to ovulate was associated with smaller follicles at the time of removal of inserts and at the time of expected LH surge in the anovulatory heifers compared to the ovulatory heifers. The results suggest that the size of potential preovulatory follicles at the time when ovulation is induced with ODB can affect both the ability of follicles to ovulate and concentrations of progesterone and fertility following treatment.

In a separate study cows were administered four different treatments to synchronise oestrus that involved treatment with an IVP4 for 7 days, with or without injections of ODB and progesterone at the start of treatment (Cavalieri et al., 2003c). Oestradiol benzoate was administered to all cows 24 h after removal of inserts and resulted in 97.1% (33/34) of cows being detected in oestrus and 64.7% (22/34) ovulating within 96 h of removal. Anovulatory oestrus was associated with smaller diameter and slower growth rates of follicles between days 7 and 9 of the study, greater concentrations of FSH, similar concentrations of LH and lesser concentrations of oestradiol in plasma between days 4 to 10 of the study. This would suggest that anovulation was associated with immaturity of potential preovulatory follicles when ODB was administered to induce ovulation. The results of these studies suggest that factors that affect the emergence and growth of potential ovulatory follicles and their maturity at the time when ovulation is induced during pro-oestrus can affect the ovulatory potential of follicles and fertility at a synchronised oestrus.

8 CONCLUSION

Induction of oestrus and ovulation in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle can shorten intervals to oestrus and improve the synchrony of oestrus and ovulation, and facilitate the use of timed insemination strategies. It can also increase the proportion of prepubertal heifers and anoestrous cows that show behavioural signs of oestrus and/or ovulate after application of treatments that synchronise oestrus. It can therefore be a useful therapeutic tool for improving reproductive performance and aiding anoestrous animals to conceive early in the breeding season.

Responses (oestrous and ovulatory) to treatment can be affected by the type of ovulation induction agent that is used, the timing of treatments relative to luteolysis and wave emergence, dose and type of formulation, the maturity of potential ovulatory follicles at the time of treatment and the cycling status of cattle prior to treatment. Follicles that are immature at the time of treatment may ovulate, fail to ovulate or produce a smaller CL that secretes less progesterone. Oestrous synchronisation treatments that employ ovulation induction agents need to achieve a balance between ensuring that follicles are sufficiently mature to enable normal fertility following induction of ovulation without causing the ovulation of follicles that are, perhaps too old which could result in a reduction in fertility (Austin et al., 1999), or have follicles fail to emerge or emerge too late during the course of treatment which could lead to anovulation or lower concentrations of progesterone following ovulation.

REFERENCES

Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. Reproduction 2003;125:759-767.

Austin EJ, Mihm M, Ryan MP, Williams DH, Roche JF. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. J. Anim. Sci. 1999;77: 2219-2226.

Bó GA, Baruselli PS, Martínez MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. Anim. Reprod. Sci. 2003;78:307-326.

Buckley F, O'Sullivan K, Mee JF, Evans RD, Dillon P. Relationships among milk yield, body condition, cow weight, and reproduction in spring-calved Holstein-Friesians. J. Dairy Sci. 2003;86:2308-2319.

Burke CR, Mussard ML, Grum DE, Day ML. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. Anim. Reprod. Sci. 2001;66:161-174.

Cavalieri J, Fitzpatrick LA. Oestrus detection techniques and insemination strategies in *Bos indicus* heifers synchronised with norgestomet-oestradiol Aust. Vet. J. 1995a;72:177-182.

Cavalieri J, Fitzpatrick LA Artificial insemination of *Bos indicus* heifers: The effects of body weight, condition score, ovarian cyclic status and insemination regimen on pregnancy rate. Aust. Vet. J. 1995b;72:441-447.

Cavalieri J, Rubio I, Kinder JE, Entwistle KW, Fitzpatrick LA. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in *Bos indicus* cows. Theriogenology 1997;47:801-814.

Cavalieri J, Macmillan KL. Synchronisation of oestrus and reproductive performance of dairy cows following administration of oestradiol benzoate or GnRH during a synchronised pro-oestrus. Aust Vet J 2002;80:486-493.

Cavalieri J, Eagles VE, Ryan M, Macmillan KL. Patterns of onset of oestrus and reproductive performance of dairy cows enrolled in controlled breeding programs. In: Proc. Aust. and NZ Comb. Dairy Vet. Conf. 15-19 May, 2000. Le Lagon Resort, Port Vila, Vanuatu. Massey University Palmerston North, New Zealand. pp 161-182.

Cavalieri J, Coleman C, Rodrigues H, Macmillan KL, Fitzpatrick LA. The effect of timing of administration of oestradiol benzoate on characteristics of oestrus, timing of ovulation and fertility in *Bos indicus* heifers synchronised with a progesterone releasing intravaginal insert. Aust. Vet. J. 2002;80:217-223.

Cavalieri J, Flinker LR, Anderson GA, Macmillan KL. Characteristics of oestrus measured using visual observation and radiotelemetry. Anim. Reprod. Sci. 2003a;76:1-12.

Cavalieri J, Hepworth G, Eagles VE, Macmillan KL. Comparison of two doses of oestradiol benzoate administered at a resynchronised oestrus on reproductive performance of dairy cows. Aust.Vet. J. 2003b;81:348-354.

Cavalieri J, Hepworth G, Parker KI, Wright PJ, Macmillan KL. Effect of treatment with progesterone and oestradiol when starting treatment with an intravaginal progesterone releasing insert on ovarian follicular development and hormonal concentrations in Holstein cows. Anim. Reprod. Sci. 2003c;76:177-193.

Cavalieri J, Hepworth G, Macmillan KL. Ovarian follicular development in Holstein cows following synchronisation of oestrus with oestradiol benzoate and an intravaginal progesterone releasing insert for 5 to 9 days and duration of the oestrous cycle and concentrations of progesterone following ovulation. Anim. Reprod. Sci. 2004a;81:177-193.

Cavalieri J, Hepworth G, Fitzpatrick LA. Synchronising oestrus with oestradiol benzoate after using a two-dose prostaglandin treatment to synchronise luteolysis in dairy heifers. Aust. Vet. J. 2004b (In Press).

Cavalieri J, Hepworth G, Fitzpatrick LA. Comparison of two estrus synchronization and resynchronization treatments in lactating dairy cows. Theriogenology 2004c;64:729-747.

Chenault JR, Kratzer DD, Rzepkowski RA, Goodwin MC. LH and FSH response of Holstein heifers to fertirelin acetate, gonadorelin and buserelin. Theriogenology 1990;32:81-98.

Colazo MG, Martinez MF, Whittaker PR, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Estradiol cypionate (ECP) in CIDR-B based programs for fixed-time AI in beef heifers. Theriogenology 2002;57:371.

Cordoba MC, Fricke PM. 2002. Initiation of the breeding season in a grazing-based dairy by synchronization of ovulation. J. Dairy Sci. 85:1752-1763.

Cutaia L, Tribulo R, Moreno D, Bo GA. Effect of eCG treatment in postpartum beef cows synchronized with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate and inseminated at a fixed-time. Theriogenology 2003;59:216.

Dailey RA, James RE, Inskeep EK, Washburn SP. Synchronization of estrus in dairy heifers with prostaglandin F2α with or without estradiol benzoate. J Dairy Sci. 1983;66:881-886.

De Rensis F, Marconi P, Capelli T, Gatti F, Facciolongo F, Franzini S, Scaramuzzi RJ. Fertility in postpartum dairy cows in winter or summer following estrus synchronization and fixed time AI after the induction of an LH surge with GnRH or hCG. Theriogenology 2002;58:1675-1687.

Dransfield MBG, Nebel RL, Pearson RE, Warnick LD. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. J. Dairy Sci. 1998;81:1874-1882.

Duffy P, Crowe MA, Austin EJ, Mihm M, Boland MP, Roche JF. The effect of eCG or estradiol at or after norgestomet removal on follicular dynamics, estrus and ovulation in early post-partum beef cows nursing calves. Theriogenology 2004;61:725-734.

Evans ACO, O'Keeffe P, Mihm M, Roche JF, Macmillan KL, Boland MP. Effect of oestradiol benzoate given after prostaglandin at two stages of follicle wave development on oestrus synchronisation, the LH surge and ovulation in heifers. Anim. Reprod. Sci. 2003;76:13-23.

Fike KE, Day ML, Inskeep K, Kinder JE, Lewis PE, Short RE, Hafs HD. Estrus and luteal function in suckled beef cows that were anestrous when treated with an intravaginal device containing progesterone with or without a subsequent injection of estradiol benzoate. J Anim. Sci. 1997;75:2009-2015.

Fricke PM, Guenther JN, Wiltbank MC, Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. Theriogenology 1998;50:1275-1284.

Fullenwider JK, Kempfer JR, Barnett CL, Portillo GE, Barthle CR, Yelich JV. An estrous synchronization field study comparing estradiol benzoate (EB) and GnRH in combination with an intravaginal progesterone insert (CIDR) for timed AI in crossbred *Bos indicus* cows. J Dairy Sci. Suppl. 1, 2000;83:217 (Abstr. 914).

Funk DL,Anderson LH. Effect of dosage of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in an estrus synchronization protocol on conception rates to a fixed-time insemination in postpartum beef cows. J Dairy Sci. Suppl. 1, 2000;83:217 (Abstr 915).

Hanlon DW, Williamson NB, Wichtel JJ, Steffert IJ, Craigie AL, Pfeiffer DU. The effect of estradiol benzoate administration on estrous response and synchronized pregnancy rate in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone. Theriogenology 1996;45:775-785.

Irvin HJ, Zaied AA, Day BN, Garverick HA. GnRH induced LH release in suckled beef cows. 1. The effects of days postpartum and estradiol-17β concentrations on the release of LH following administration of GnRH. Theriogenology 1981;15:443- 448.

Jemmeson A. Synchronising ovulation in dairy cows with either two treatments of gonadotropin-releasing hormone and one of prostaglandin, or two treatments of prostaglandin. Aust. Vet. J. 2000;78:108-111.

Lammoglia MA, Short RE, Bellows SE, Bellows RA, MacNeil MD, Hafs HD. Induced and synchronized estrus in cattle: Dose titration of estradiol benzoate in peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin $F_{2\alpha}$. J. Anim. Sci. 1998;76:1662-1670.

Lemaster JW, Yelich JV, Kempfer JR, Schrick FN. Ovulation and estrus characteristics in crossbred Brahman heifers treated with an intravaginal progesterone-releasing insert in combination with prostaglandin $F_{2\alpha}$ and estradiol benzoate. J. Anim. Sci. 1999;77:1860-1868.

Lopez H, Bunch TD, Shipka MP. Estrogen concentrations in milk at estrus and ovulation in dairy cows. Anim. Reprod. Sci. 2002;72:37-46.

Maatje K, Loeffler SH, Engel B. Optimal time of insemination in cows that show visual signs of estrus by estimating onset of estrus with pedometers. J. Dairy Sci 1997;80:1098-1105.

Macmillan KL, Taufa VK, Day AM. Effects of injection oestradiol benzoate (ODB) during the period of pro-oestrus following an induced luteolysis. Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol. 1997;28:20.

Macmillan KL, Colson DD, Eagles VM. Modifications to improve whole herd synchrony programs in seasonal dairy herds. Proc. Of the Aust. Assoc. Cattle Vet., Indooroopilly QLD, 1999;21 - 129.

Macmillan KL, Segwagwe BVE, Pino CS. Associations between the manipulation of patterns of follicular development and fertility in cattle. Anim. Reprod. Sci. 2003;78:327-344.

Martinez MF, Adams GP, Bergfelt DR, Kastelic JP, Mapletoft RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. Anim. Reprod. Sci. 1999;23-33.

Martínez MF, Kastelic JP, Adams GP, Mapletoft RJ. The use of progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengesterol acetate with GnRH, LH or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. J. Anim. Sci. 2002;80:1746-1751.

Martínez MF, Mapletoft RJ, Kastelic JP, Carruthers T. The effects of 3 gonadorelin products on luteinizing hormone release, ovulation, and follicular wave emergence in cattle. Can. Vet. J. 2003;44:125-131.

McDougall S., Williamson NB, Macmillan KL. GnRH induces ovulation of a dominant follicle in primiparous dairy cows undergoing anovulatory follicle turnover. Anim. Reprod. Sci. 1995;39:205-214.

Mulvehill P, Sreenan JM. Improvement of fertility in postpartum beef cows by treatment with PMSG and progestagen. J. Reprod. Fertil. 1977;50:323-325.

Murdoch WJ, Van Kirk EA, Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in the follicular phase. Endocrinol. 1998;139, 3480-3484.

Nancarrow CD, Radford HM. Use of oestradiol benzoate to improve synchronization of oestrus in cattle. J. Reprod. Fertil. 1975;43:404.

O'Rourke M, Diskin MG, Sreenan JM, Roche JF. The effect of dose and route of oestradiol benzoate administration on plasma concentrations of oestradiol and FSH in long-term ovariectomised heifers. Anim. Reprod. Sci. 2000;59:1-12.

Pancarci SM, Jordan ER, Risco CA, Schouten MJ, Lopes FL, Moreira F, Thatcher WW. Use of estradiol cypionate in a presynchronised timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. J. Dairy Sci. 2002;85:122-131.

Peters MW, Pursley JR. Timing of final GnRH of the Ovsynch protocol affects ovulatory follicle size, subsequent luteal function, and fertility in dairy cows. Theriogenology 2003;60:1197-1204.

Peters JB, Welch JA, Lauderdale W, Inskeep EK. Synchronization of estrus in beef cattle with $PGF_{2\alpha}$ and estradiol benzoate. J Anim Sci 1977; 45:230-235.

Plasse D, Warnick AC, Koger M. Reproductive behavior of *Bos indicus* females in asubtropical environment. IV. Length of estrous cycle, duration of estrus, time of ovulation, fertilization, and embryo survival in grade Brahman heifers. J. Anim. Sci. 1970;30: 63-72.

Rajamahendran R, Taylor C. Follicular dynamics and temporal relationships among body temperature, oestrus, the surge of luteinizing hormone and ovulation in Holstein heifers treated with norgestomet. J. Reprod. Fertil. 1991;92: 461-467.

Rajamahendran R, Ambrose JD, Schmitt EJ-P, Thatcher J-J, Thatcher WW. Effects of buserelin injection and deslorelin (GnRH-agonist) implants on plasma progesterone, LH, accessory CL formation, follicle and corpus luteum dynamics in Holstein cows. Theriogenology 1998;50:1141-1155.

Rasby RJ, Day ML, Johnson SK, Kinder JE, Lynch JM, Short RE, Wettemann RP, Hafs HD. Luteal function and estrus in peripubertal beef heifers treated with an intravaginal progesterone releasing device with or without a subsequent injection of estradiol. Theriogneology 1998;50:55-63.

Ross PJ, Aller JF, Callejas SS, Butler H, Alberio RH. Estradiol benzoate given 0 or 24 h after the end of a progestagen treatment in postpartum suckled beef cows. Theriogenology 2004;62:265-273.

Ryan DP, Galvin JA, O'Farrell KJ. Comparison of oestrous synchronization regimens for lactating dairy cows. Anim Reprod Sci 1999;56:153-68.

Saacke RG, Dalton JC, Nadir S, Nebel RL, Bame JH. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. Anim. Reprod. Sci. 2000;60-61:663-677.

Sartori R, Fricke PM, Ferreira JCP, Ginther OJ, Wiltbank MC. Acquisition of ovulatory capacity by ovarian follicles during growth of follicular waves in lactating dairy cows. J. Anim. Sci. 1998;76(Suppl. 1): 223.

Schams D, Schallenberger E, Hoffmann B, Karg H. The oestrus cycle of the cow: Hormonal parameters and time relationship concerning oestrus, ovulation and electrical resistance of the vaginal mucus. Acta Endocrin. 1977;86: 180-192.

Schmitt ÉJ-P, Diaz T, Barros CM, de la Sota RL, Drost M, Fredriksson EW, Staples CR, Thorner R, Thatcher WW. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. J. Anim. Sci 1996;74:1074-1083.

Shephard R. Investigation of a whole-herd controlled breeding program using GnRH and prostaglandin in commercial seasonally-calving dairy herds. Aust. Cattle Vet. 2002:23:24-28.

Shephard R. Australian and New Zealand Ovsynch AA study. Parnell Laboratories (Aust) Pty Ltd. Data on file. 2004.

Spicer LJ, Echternkamp SE. Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: A review. J Anim Sci 1986;62: 428-451.

Stevenson JS, Kobayashi Y, Thompson KE. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combinations of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin $F_{2\alpha}$. J Dairy Sci 1999;82:506-515.

Taponen J, Kulcsár M, Katila T, Kátai L, Huszenicza G, Rodríguez-Martínez H. Short estrous cycles and estrous signs after premature ovulations induced with cloprostenol and gonadotropin-releasing hormone in cyclic dairy cows. Theriogenology 2002;58:1291-1302.

Taufa VK, Macmillan KL, Morgan S, Hooper R, Day AM. Improving oestrous synchrony in yearling heifers for set-time inseminating. Proc. Aust. Soc. Reprod. Biol. 1998;29: 17.

Tenhagen B-A, Drillich M, Surholt R, Heuwieser W. 2004. Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: Reproductive and economic considerations. J. Dairy Sci. 87:85-94.

Thatcher WW, Patterson DJ, Moreira F, Pancarci M, Jordan ER, Risco CA. Current concepts for estrus synchronization and timed insemination. Proc. Am. Assoc. Bov. Pract. 2001;34:95-105.

Trimberger GW. Breeding efficiency in dairy cattle from artificial insemination at various intervals before and after ovulation. Nebr. Agric. Exp. Stn. Res. Bull. 1948;153:1-26.

Vaca LA, Galina CS, Fernández-Baca S, Escobar FJ, Ramírez B. Oestrous cycles,oestrus and ovulation of the zebu in the Mexican tropics. Vet. Rec. 1985;117: 434-437.

Vasconcelos JLM., Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. Theriogenology 2001;56:307-314.

Vynckier L, Debackere M, De Kruif A, Coryn M. Plasam estradiol-17β concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17β benzoate and estradiol-17β cypionate – a preliminary study. J. Vet. Pharmacol. Therap. 1990;13:36-42.

Walker WL, Nebel RL, McGilliard ML. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. J. Dairy Sci. 1996;79:1555-1561.

Welch JA, Hackett AJ, Cunningham CJ, Heishman JO, Ford SP, Nadaraja R, Hansel W, Inskeep. Control of the estrus in lactating beef cows with prostaglandin $F_{2\alpha}$ and estradiol benzoate. J Anim Sci 1975;41:1686-1692.

Yamada K, Nakao T, Nakada K, Matsuda G. Influence of GnRH analogue (fertirelin acetate) doses on synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in lactating dairy cows. Anim. Reprod. Sci. 2002;74:27-34.

ANESTRO PÓS-PARTO EM VACAS DE CORTE

Paulo Bayard Dias Gonçalves, João Francisco Coelho de Oliveira, Rosane da Silva da Silveira, Rogério Ferreira
Universidade Federal de Santa Maria
Departamento de Clínica de Grandes Animais
Laboratório de Biotecnologia e Reprodução Animal – BioRep
Santa Maria – RS
e-mail: bayard@biorep.ufsm.br

INTRODUÇÃO

O Brasil detém o segundo maior rebanho bovino do mundo, com cerca de 163 milhões de cabeças (IBGE, 2001), cuja produção representa, hoje, 50% do PIB agrícola. Entretanto, no Estado do RS, o efetivo animal se mantém estável há 10 anos, com cerca de 13 milhões de cabeças. Nesse Estado, a bovinocultura de corte se caracteriza historicamente pela criação extensiva, com baixos índices de produtividade e rentabilidade. Essa realidade é acentuada pelos altos custos dos insumos que resultam no baixo uso de tecnologias, flutuações anuais no preço do kg vivo, devido, entre outros fatores, a estacionalidade na produção forrageira do campo nativo e, finalmente, pela falta de gerenciamento dos produtores.

Sem dúvidas, o principal ponto crítico da pecuária gaúcha está situado no sistema de cria, devido à baixa fertilidade pós-parto. Um exemplo disso, é o índice geral de natalidade do RS que, apesar de possuir empresas rurais com elevadíssimo nível de produção, se encontra em torno de 50-60%, sendo que novilhas e vacas solteiras apresentam índices entre 75-95% de prenhez na temporada reprodutiva. Esse decréscimo de produção é atribuído às vacas com cria ao pé que, quando adultas, apresentam cerca de 20 a 25% de repetição de cria anualmente e, quando de primeira cria, apenas 6 a 15% (Cachapuz, 1991). Dessa forma, a maioria das fêmeas bovinas produz apenas um bezerro a cada dois anos, ficando o intervalo médio parto-concepção em torno de 300 dias (Moraes, 1999; Neves et al., 1999). Com base nesses dados, pode-se concluir que não houve aumento de produtividade e do efetivo animal nos sistemas de cria do RS, em relação às evoluções biotecnológicas das últimas décadas.

O principal responsável por esses dados alarmantes, que demonstram a baixa eficiência reprodutiva das vacas com cria ao pé, é o anestro pós-parto prolongado, causado pela subnutrição e o anestro lactacional (Short et al., 1990). Essa realidade é oposta ao principal objetivo da pecuária de corte racional e competitiva que visa obter uma cria/vaca/ano. Com esse propósito, considerando-se os 365 dias do ano e um período médio de gestação de 280 dias, a vaca necessita conceber novamente em até 85 dias pós-parto para atingir o seu potencial fisiológico máximo de produção.

Indiscutivelmente, a suplementação alimentar seria a maneira fisiológica mais adequada de se melhorar a taxa de concepção em bovinos de corte. Entretanto, essa decisão torna-se limitada a fatores político-econômicos do custo do produto (kg de carne). Por isso, pesquisas têm sido realizadas com o objetivo de gerar tecnologias a serem aplicadas para incrementar os índices reprodutivos com custos compatíveis com a realidade nacional. Os sistemas desenvolvidos para reduzir o bloqueio hormonal endógeno em bovinos e, conseqüentemente, os prejuízos causados pelo prolongado período improdutivo da fêmea em anestro pós-parto envolvem manejo nutricional, práticas de desmame definitivo ou temporário, protocolos de indução hormonal e identificação de animais mais produtivos e melhor adaptados ao meio ambiente por

marcadores moleculares. É importante salientar que não existe um sistema único perfeito, considerando custo-benefício, para aumentar os índices de natalidade pós-parto, indistintamente, para todas as empresas rurais. Portanto, o objetivo desta revisão é abordar brevemente as alternativas que o BioRep tem enfocado para solucionar o problema da baixa repetição de cria durante o pós-parto em gado de corte.

INDUÇÃO DE ESTRO DURANTE O PÓS-PARTO

O crescimento de folículos antrais em bovinos é caracterizado por ondas foliculares, compreendidas pelos processos de recrutamento, seleção, dominância, divergência e, culminando, com atresia ou ovulação. O folículo dominante se desenvolve por ação do FSH até o aumento na produção de estrógeno e inibina, provocando uma redução dos níveis séricos de FSH (Martin et al., 1988; Ginther et al., 1989). Além do mecanismo endócrino, a seleção da dominância folicular ocorre por regulação autócrina e parácrina. Esses mecanismos não estão ainda compreendidos em sua totalidade, mas já foi estabelecido que inibina, ativina, fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) e suas proteínas de ligação (IGFBP) estão envolvidas e atuam diretamente nas células da teca e granulosa, modulando o desenvolvimento folicular e a esteroidogênese. O crescimento do folículo dominante e o incremento da produção de estrógeno e inibina estão acompanhados pela diminuição nos níveis de ativina e IGFBP, simultaneamente com o aumento nas concentrações de IGF-I livre. Há evidências de que a inibina, ativina e IGFBP-2, -4 e -5 (IGFBPs de baixo peso molecular) têm efeito negativo no desenvolvimento folicular e que atresia folicular está associada a elevadas concentrações dessas IGFBPs (Giudice, 1992, Monget et al., 1996, Rivera et al., 2001, Fortune, et al., 2001). Esses fatores são regulados em resposta às gonadotrifinas hipofisárias (Roche, 1996; Evans & Fortune, 1997).

A liberação de FSH é independente da liberação de GnRH, porém é regulada pela secreção de estrógeno e inibina provenientes do folículo dominante. Porém, os pulsos de LH ocorrem concomitante com os pulsos de GnRH, esse último controlado pela secreção de estrógeno e progesterona (P_4), e suas interações com neuro-hormônios (Cupp et al., 1995; Schams & Berisha, 2002). Os eventos de crescimento folicular e maturação final dos folículos podem ser observados principalmente devido ao contraste no sistema secretório dos hormônios sintetizados e armazenados na hipófise anterior. Enquanto o sistema secretório do LH é absolutamente dependente da pulsatilidade do GnRH, a secreção do FSH parece ser regulada por dois mecanismos, um de controle basal e outro controle pulsátil, que confere a esse hormônio uma certa independência em relação aos pulso de GnRH (Padmanabhan & McNeilly, 2001).

No período pós-parto precoce (10-20 dias), as ondas foliculares recomeçam, com a formação de folículos dominantes que falham em ovular devido à baixa freqüência de pulsos de LH, em decorrência da diminuição dos estoques desse hormônio na hipófise anterior, que se restabelecem entre 15 e 30 dias pós-parto. O aumento da freqüência de pulsos de LH, chegando a intervalos de 12-15 minutos, é fundamental para o desenvolvimento folicular final até o processo de ovulação. No entanto, em decorrência da mamada e da condição corporal (CC), uma interação entre glicocorticóides, leptina, estradiol-17□ e neuro-hormônios (ex: opióides e neuropeptídeo Y) é a principal responsável por inibir os pulsos de GnRH e, conseqüentemente, de LH durante o pós-parto em bovinos de corte. Com o aumento do intervalo pós-parto, em dependência dos níveis nutricionais, os hormônios que inibem o gerador de pulsos de GnRH começam a diminuir sua atividade e inicia o restabelecimento da freqüência de GnRH,

permitindo o desenvolvimento folicular final, ovulação e retomada da ciclicidade (Yavas & Walton, 2000).
A CC no momento do parto, o ganho de peso e o balanço energético são os principais fatores envolvidos com o retorno a ciclicidade após o parto. Vacas de corte com baixa CC na parição, perda de peso e conseqüentemente balanço energético negativo nas primeiras semanas após o parto, permanecem por um período mais prolongado na condição de anestro pós-parto (Ferreira, 1995). As vacas em CC baixa ao parto têm um intervalo mais longo do parto a primeira ovulação que vacas com CC alta, sendo associado com a baixa freqüência de pulsos de LH e atraso no desenvolvimento de folículos estrogênio-ativos (Pinto Andrade et al., 1995). Animais com melhores CC pré e pós-parto têm um menor intervalo parto/concepção, respondem melhor aos tratamentos hormonais e têm uma estrutura luteal induzida pelo desmame e pelos tratamentos com GnRH mais duradoura (Williams, 1989).
O escore de CC na parição é correlacionado positivamente com o desenvolvimento folicular precoce no período pós-parto (Ryan et al., 1994), conteúdo pituitárico de LH aos 30 dias pós-parto (Connor, et al., 1990), concentrações de IGF-I circulantes e freqüência dos pulsos de LH (Bishop et al., 1994). O metabolismo basal, a atividade, o crescimento e as reservas básicas de energia têm prioridade aos processos reprodutivos, como o início da ciclicidade e o estabelecimento e manutenção da prenhez (Short et al., 1990).
O balanço energético negativo reduz a disponibilidade de glicose e aumenta a mobilização de reservas corporais (Grimard et al., 1995). Evidentemente, as variações de CC estão relacionadas com outros aspectos do indivíduo, como é o caso da amamentação. Existe uma correlação entre o estado de CC e suas conseqüências com o efeito inibitório da amamentação, sendo um fator altamente potencializado pelo outro. Fisiologicamente, no período pós-parto precoce, a diminuição de pulsos de LH é devido à falta desse hormônio no estoque da hipófise anterior e esse fato ocorre independente da amamentação. Após o restabelecimento dos estoques, a diminuição de pulsos de LH é dependente dos efeitos da amamentação. A ação inibitória da mamada ocorre pela inibição na freqüência de GnRH do hipotálamo e conseqüente supressão na liberação pulsátil de LH.
Estudos têm demonstrado que a amamentação suprime o retorno dos pulsos de LH pela estimulação tátil do úbere ou tetos pelo bezerro (Williams et al., 1987), entretanto outros fatores como a visão e o olfato também têm ação inibitória na liberação do LH (Griffith & Williams, 1996). A presença física do bezerro modula o efeito supressivo da amamentação na ovulação pós-parto, por afetar sinais somatossensoriais (Williams & Griffith, 1995). Esse efeito é significativamente maior quando as vacas amamentam seu próprio bezerro (Lalman et al., 1997).
Relacionado aos mais importantes fatores para o adequado desempenho reprodutivo, como condição nutricional da vaca e conseqüente disponibilidade de energia, vários estudos demonstram os possíveis efeitos da leptina. A leptina é um produto do gene da obesidade, secretada pelos adipócitos e apontada como responsável pela ligação entre o estado metabólico e a capacidade reprodutiva. Estudos demonstram que a sua função é de contribuir na regulação do metabolismo energético, comportamento alimentar e na reprodução de várias espécies de monogástricos, incluindo humanos. Os mais recentes estudos reportam que a leptina é funcionalmente relevante também em ruminantes, contribuindo em importantes eventos reprodutivos.
A leptina age na liberação de LH, por ação direta na secreção basal e indiretamente na liberação do GnRH. Também o neuropeptideo Y (NPY) tem sido proposto como um mediador primário da ação da leptina no hipotálamo, por regular o LH e a somatotrofina, com uma modulação positiva ou negativa conforme o estado fisiológico

do animal. A ação parece ser via eixo reprodutivo central diretamente em seus próprios receptores e na neurotransmissão do NPY. A atividade e as concentrações circulantes de leptina, em bovinos, mudam em associação ou em resposta a estímulos nutricionais, ambientais e de maturidade sexual (Williams et al., 2002). Os níveis plasmáticos de leptina são proporcionais à massa de tecido adiposo e diminuem após a perda de peso corporal (Maffei et al., 1995). Os ruminantes são menos sensíveis a mudanças agudas na dieta energética, o que provavelmente está relacionado à atividade contínua do rúmen, servindo como estoque energético por algum tempo (Williams et al., 2002). Vacas submetidas a um período curto de jejum (60 h), apresentam uma redução na concentração plasmática de insulina e leptina e diminuição em 30% na expressão do gene da leptina, mas não tem efeito na concentração de glicose e na liberação pulsátil de LH. Vacas adultas que têm altas concentrações séricas de leptina no período pós-parto, apresentam um intervalo parto-concepção reduzido (Strauch et al., 2003). O tratamento com leptina recombinante exógena provocou um incremento da insulina plasmática e da concentração de LH. O aumento no estoque de LH e na concentração basal desse hormônio, causado pela leptina exógena resultam em maior freqüência de pulsos de LH (Amstalden et al., 2002).

Os padrões de liberação de GnRH/LH em novilhas pré-púberes são similares aos de vacas durante o anestro pós-parto. A expressão e as concentrações circulantes de leptina aumentam significativamente durante a maturidade sexual em vaquilhonas na puberdade (Williams et al., 2002). As concentrações séricas de leptina em novilhas com restrição alimentar são significativamente menores do que em novilhas em condições adequadas de nutrição (Zieba et al., 2004). Aplicação exógena de leptina previne a redução da freqüência de pulsos de LH causada pelo jejum e aumenta a liberação de LH mediada pelo GnRH em novilhas pré-púberes (Maciel et al., 2004). Os resultados evidenciam de que a leptina é um sinal metabólico que regula a secreção de gonadotrofinas em resposta a aguda ou crônica restrição alimentar em vacas e novilhas.

Ainda relacionado à disponibilidade energética, os animais com balanço negativo de energia têm menores níveis plasmáticos de glicose, insulina e IGF-I, menor freqüência de pulsos de LH e baixas concentrações de progesterona no plasma. Também é afetada a viabilidade do oócito, a dinâmica de crescimento folicular, a função luteal e a fertilidade (Santos & Amstalden, 1998). O IGF-I possui um importante papel aumentando a sensibilidade de pequenos folículos antrais à ação das gonadotrofinas e na dominância folicular. Os reflexos reprodutivos poderão ser amplamente compreendidos quando se conhecer a ligação desses sistemas com o principal fator para o desempenho da reprodução de bovinos: a disponibilidade energética.

Visando a redução do bloqueio hormonal endógeno da vaca e, conseqüentemente, dos prejuízos causados pelo prolongado período improdutivo da fêmea em anestro pós-parto, várias pesquisas vêm sendo realizadas e diferentes sistemas, que podem ser aplicados à reprodução, têm sido desenvolvidos. Os sistemas criados para utilização em vacas no período de anestro pós-parto têm o objetivo de antecipar o reinício da atividade cíclica e facilitar o manejo de vacas de corte com cria ao pé. As alternativas encontradas para minimizar esses problemas envolvem manejo nutricional, práticas de desmame, protocolos de indução hormonal e identificação de animais mais produtivos por marcadores moleculares.

A nutrição, evidentemente, é a maneira fisiológica mais adequada de ajustar as necessidades da fêmea às exigências do período pós-parto, porém freqüentemente, a adoção de medidas de melhorias nutricionais se torna economicamente inviável. No entanto, o objetivo não é substituir a nutrição por sistemas de indução de estro, mas

superar o bloqueio fisiológico em vacas pós-parto em condições mínimas de nutrição, obtendo uma relação positiva de custo/benefício.

O desmame é um método que tem sido amplamente utilizado com o objetivo de solucionar os problemas do pós-parto. Os métodos de desmame que têm sido utilizados são: separação total e definitiva dos bezerros, conhecido como desmame precoce, ou por separação total temporária dos bezerros, variando o tempo de afastamento. As práticas de desmame precoce aos 60 dias têm mostrado resultados satisfatórios, porém com custos de implantação elevados e variados. No entanto, embora ocorra uma diminuição abrupta nas exigências nutricionais da vaca, o restabelecimento da função reprodutiva é dependente das condições climáticas e forrageiras. O desmame por separação temporária dos bezerros, quando aplicado como única ferramenta para o retorno da ciclicidade, não apresenta resultados satisfatórios.

As técnicas de indução hormonal são fundamentadas, principalmente, na criação de protocolos que têm a função de induzir e/ou sincronizar o cio no período após o parto. Esses protocolos preconizam a utilização de um progestágeno, aliado a outros hormônios que possibilitem uma ação em conjunto, realizando modificações da regulação endócrina, simulando os acontecimentos fisiológicos da fêmea e possibilitando dessa maneira que vacas em estado de anestro pós-parto retornem a sua atividade cíclica e antecipem sua concepção na estação reprodutiva. Essa tecnologia inclui o uso de hormônios, com aplicações em diferentes combinações, em conjunto ou não com práticas de desmame. Essas alternativas de manejo para vacas amamentando no pós-parto têm sido utilizadas em distintas situações, apresentando variações nos resultados, interagindo com a CC, sendo dessa maneira dependente principalmente da disponibilidade forrageira (diretamente relacionada com as condições climáticas). Os resultados variam conforme o protocolo escolhido, o período após o parto e a CC dos animais. Outra dificuldade enfrentada é o manejo de observação de cio, especialmente em vacas pós-parto que estão amamentando seus bezerros. Protocolos hormonais que visam uma redução da interação dos fatores ambientais e intrínsecos dos animais e a racionalização do manejo têm sido amplamente estudados.

Nas últimas décadas não houve mudanças expressivas nas taxas reprodutivas, levando a um questionamento sobre os motivos pelos quais os produtores não têm adotado a tecnologia gerada pela pesquisa para incrementar a produtividade. É possível que os protocolos desenvolvidos não estejam completamente adaptados a situação real da pecuária, em termos de manejo e custos. Baseado nesse fato, é necessária a criação de modelos de manejo que sejam aplicáveis para o incremento das taxas de interesse reprodutivo. Entretanto, muitos fatores relacionados à fisiologia, endocrinologia e a mecanismos de ação dos hormônios, utilizados nos protocolos de indução hormonal, não estão totalmente esclarecidos. O sucesso dos programas de indução hormonal depende do conhecimento básico de algumas funções, no sentido de alcançar os melhores resultados, otimizando os efeitos gerados e reduzindo as possíveis interações com o meio ambiente. Buscando atender todos esses fatores, sistemas que tenham por objetivo a inseminação em tempo pré-fixado estão sendo, atualmente, amplamente avaliados.

As condições do Rio Grande do Sul são peculiares em decorrência da variação existente entre os diferentes anos em relação às geadas durante os meses de inverno, e às secas durante o verão, afetando diretamente a disponibilidade forrageira. Por isso, os sistemas de indução de estro baseados unicamente em progesterona ou acetato de medroxiprogesterona (MAP) e benzoato de estradiol (BE) têm resultados variados em decorrência do balanço energético do rebanho (anabolismo ou catabolismo).

Há nove anos (desde 1995), o BioRep, associado ao Núcleo Cooperativo de Pesquisa em Reprodução Animal (NCPRA), tem realizado estudos na busca de um sistema que inclua repetibilidade, inseminação com horário pré-fixado, manutenção dos bezerros ao pé da vaca, inseminação artificial (IA) 60 dias pós-parto, prenhez acima de 60% após uma única inseminação (sem repasse) e prenhez a partir de IA entre 75% e 90% ao final da estação reprodutiva em vacas pós-parto, a um custo compatível com a situação da pecuária de corte do Estado do Rio Grande do Sul. O NCPRA é composto por quatro grupos básicos (UFSM-BioRep, Embrapa-Pecuária Sul, UFRGS-Departamento de Genética e UFPel-Setor de Reprodução Animal) e foi estabelecido tendo em vista a interação de pesquisadores com especialidades e/ou formações distintas na análise e busca de soluções para problemas importantes ao setor produtivo primário.

Nesse sentido, os hormônios gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e GnRH foram incluídos nos protocolos de indução de estro e seus efeitos foram avaliados na dinâmica folicular durante o período pós-parto. Nesses estudos, um dos pontos fundamentais é que o folículo só atinge a sua capacidade ovulatória (resposta ao GnRH) quando atinge um diâmetro em torno de 12mm em vacas *Bos taurus* (Sartori et al., 2001). O momento da aplicação do eCG para o crescimento folicular, do GnRH e da IA é crucial para obter índices elevados de prenhez. A dinâmica folicular foi avaliada, após aplicação de eCG em diferentes momentos em relação à retirada do pessário vaginal, e somente os animais que receberam essa gonadotrofina no dia 6 (um dia antes da retirada do pessário vaginal) apresentaram uma média de diâmetro folicular compatível com a capacidade ovulatória (a média foi de 13mm) no momento da aplicação do GnRH (45 horas após a retirada do pessário vaginal). A partir desses estudos foi desenvolvido o Sistema BioRep para indução de estro (Silveira et al., 2003, 2004; Bastos et al., 2004), já tendo sido empregado em mais de 500 animais em diferentes condições de criação e manejo.

O Sistema BioRep consiste na aplicação de progestágeno intra-vaginal (250mg de MAP), associado à injeção intramuscular de Benzoato de Estradiol (5mg) no dia 0. No dia 6, deve ser aplicado eCG (300-500UI) e um análogo de $PGF_2\alpha$ na submucosa vulvar em dose reduzida (ex. 100μg de Cloprostenol ou 5mg de dinoprost; Suñe et al., 1985), e realizado desmame temporário por 96h, com separação total dos bezerros. A $PGF_2\alpha$ deve ser aplicada somente quando um número significativo de vacas estiver ciclando. Os progestágenos intra-vaginais permanecem por um período de 7 dias. Após a retirada destes, o cio é observado por um período de 48h, período que coincide com o afastamento dos bezerros, e os animais são inseminados de maneira tradicional (12h após a observação do estro). Aquelas fêmeas que não apresentam cio durante esse período, recebem GnRH e são inseminados em horário pré-fixado (15-18h após aplicação de GnRH; Figura 1).

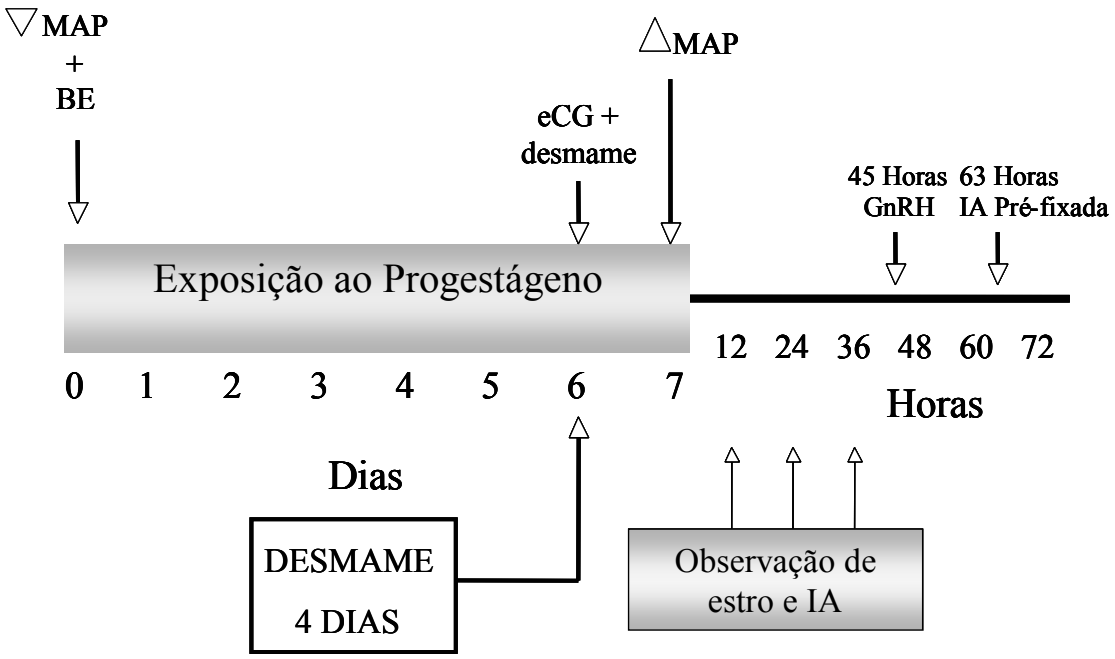


Figura 1. Sistema BioRep para indução de estro e ovulação em vacas 60 dias pós-parto.

Para aplicação do Sistema BioRep, os animais são divididos em lotes, conforme as datas de parição das fêmeas: aquelas paridas no início da estação reprodutiva formam o lote 1, as quais recebem até três induções e IA com intervalos de 25 a 30 dias, se o diagnóstico de gestação por ultra-sonografia for negativo. O lote 2 recebe duas induções, enquanto o lote 3 somente uma indução hormonal (Figura 2).

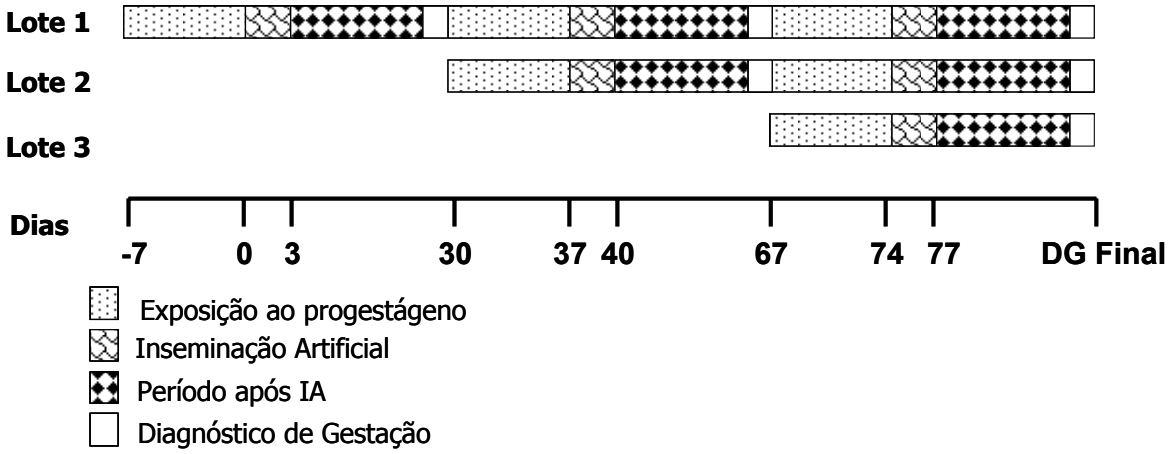


Figura 2. Distribuição dos lotes de vacas pós-parto para indução de estro pelo Sistema BioRep. As vacas devem estar entre 50-70 dias pós-parto (média de 60 dias) no momento da colocação do pessário vaginal (dia -7). O primeiro dia da inseminação artificial (IA) é considerado dia 0. O diagnóstico de gestação (DG), em cada lote, é realizado em torno de 30 dias após IA.

Esse sistema resultou em 85% de prenhez em vacas CC 3 e 4, não sendo diferente dos índices obtidos com desmame precoce definitivo aos 60 dias, com vantagens diretas como IA em vacas com cria ao pé, em período concentrado, reduzindo

identificação de estro, mão-de-obra e manejo dos animais. Esse sistema é recomendado para propriedades que utilizem estação reprodutiva de, no máximo, 90 dias.

O Sistema BioRep de indução de estro foi empregado em 546 animais em diferentes condições climáticas, nutricionais e de manejo, sendo obtida uma média por etapa de indução (sem replicação) de 74% de prenhez. Os bezerros do sistema indução apresentaram uma vantagem média de 40kg em relação aos desmamados aos 60 dias (desmame definitivo precoce). Essa vantagem no período de 200 dias, corresponde a um ganho de peso médio diário de 0,2kg, o que demonstra uma vantagem independente da finalidade a que serão destinados os bezerros, seja terminação aos 10 meses de idade em sistema de confinamento no caso dos machos ou acasalamento aos 14 meses, como é o caso das fêmeas. Mostrando assim, que o sistema está adaptado a todo o processo produtivo, trazendo benefícios diretos e indiretos ao processo de produção da pecuária de corte.

MARCADORES MOLECULARES

As técnicas atuais de biologia molecular possibilitam a identificação de polimorfismos ligados a regiões cromossômicas relacionadas com a variação fenotípica de características quantitativas, já tendo sido descritos marcadores para inúmeras características, em espécies de interesse zootécnico (Oliveira & Henkes, 2001). No entanto, a busca de marcadores num genoma com tamanho estimado em 3 bilhões de pares de bases pode se tornar uma tarefa bastante laboriosa e frustrante. Nossa equipe vem utilizando uma abordagem através do estudo de um conjunto de aspectos fisiológicos em animais caracterizados previamente quanto ao grau de eficiência reprodutiva, no sentido de evidenciar diferenças, e assim, formular hipóteses sobre genes candidatos. Associado a isso, a genotipagem de marcadores que possam estar ligados a genes com efeito expressivo sobre a regulação dos processos reprodutivos tem se constituído numa alternativa promissora.

Marcadores moleculares do tipo microssatélite (short tandem repeats, STRs) são particularmente úteis devido à sua grande variabilidade e distribuição aleatória por todo o genoma, e por apresentarem padrões de herança mendeliana (Tautz, 1993). Outro aspecto importante com relação aos microssatélites, e que só recentemente vem sendo estudado, é a possibilidade destes locos influenciarem na regulação gênica (Schroth et al., 1992; Comings, 1998), formulando-se a partir disto hipóteses sobre o modo de interação dos STRs com a herança poligênica. Comings (1998) propôs que microssatélites exerçam efeito sobre a expressão dos genes aos quais eles estão associados, sendo esta ação dependente do tamanho da repetição. Isso se baseia na observação de que seqüências ricas em purinas e pirimidinas alternadas, (CA)n, como os microssatélites, apresentam a capacidade de formar o Z-DNA em condições fisiológicas. Como há uma tendência para seqüências de Z-DNA se concentrarem nas regiões de iniciação da transcrição com uma ausência virtual das mesmas em posições intergênicas e pseudogenes, os microssatélites teriam um papel potencial na regulação gênica. Baseado nisso, a associação de um microssatélite com um determinado fenótipo poligênico não dependeria de um alelo específico, mas haveria um limiar no tamanho da repetição que interferiria na regulação gênica (Comings et al., 1996). Alelos grandes ou pequenos podem interferir na regulação dos genes, levando a um aumento ou a uma redução da expressão. Assim, Comings (1998) agrupou os genótipos em função do tamanho dos alelos em: homozigotos para alelos curtos, homozigotos para alelos longos e heterozigotos.

Baseado nessas evidências, Oliveira et al. (2004) estudaram a associação entre eficiência reprodutiva e marcadores genéticos do tipo microssatélites, localizados em sintenia com genes envolvidos na regulação de mecanismos reprodutivos utilizando uma amostra de 107 fêmeas pertencentes a uma população Brangus Ibagé (5/8 Aberdeen Angus x 3/8 Nelore). Os animais foram genotipadas para os microssatélites HEL5(D21S15) e AFZ1 (D21S37), os quais se apresentam ligados ao receptor do IGF. Os genótipos foram agrupados em classes de acordo com o tamanho dos alelos em homozigoto para alelos longos, homozigotos para alelos curtos e heterozigotos. Observou-se um maior intervalo entre partos (IEP) nos homozigotos para alelos longos no loco HEL5 (P=0,072). Observou-se também para o loco AFZ1 uma associação (P=0,076) onde homozigotos para alelos longos apresentaram menor IEP, homozigotos para alelos curtos maior IEP e indivíduos heterozigotos valores intermediários. No entanto, uma análise adicional agrupando os genótipos favoráveis para os dois marcadores revelou associação significativa (P=0,022). As associações observadas neste estudo indicam a possibilidade de utilização dos genótipos favoráveis dos microssatélites HEL5 e AFZ1 nesta população como forma de incremento da eficiência reprodutiva.

Também usando a abordagem de gene candidato, Schoenau (2003) estudou a associação entre um polimorfismo no gene da Leptina e precocidade sexual em novilhas Nelore. As fêmeas foram genotipadas para caracterização de um polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (RFLP). Os animais analisados apresentaram uma freqüência do alelo A de 0,81 contra 0,19 do alelo B. A análise de regressão logística evidenciou que os animais portadores do alelo B possuem uma probabilidade 238,84 vezes maior de serem precoces do que os animais não portadores deste alelo, indicando pela primeira vez uma associação evidente entre um marcador para a leptina e a precocidade sexual em fêmeas bovinas. Adicionalmente, a menor freqüência do alelo B, indica a possibilidade de um ganho genético substancial para a característica através do uso deste marcador.

Esses resultados demonstram que num futuro muito próximo, a utilização de marcadores moleculares associado aos programas de melhoramento genético convencionais, poderá proporcionar um ganho substancial, sobretudo para características que normalmente não são incorporadas aos programas de seleção devido sua baixa herdabilidade. Além disso, a possibilidade de discriminação precoce de indivíduos mais produtivos pode encurtar substancialmente o intervalo entre gerações e incorporar um melhoramento notável sobre características produtivas de difícil incorporação nos sistemas clássicos de melhoramento com implicações revolucionárias na produção de bovinos de corte.

CONCLUSÃO

Os sistemas disponíveis para diminuir o intervalo parto-concepção devem ser empregados de acordo com as condições de manejo e nutrição do rebanho, respeitando as peculiaridades das propriedades. O sistema hormonal de indução de estro deve servir como ferramenta para incrementar os índices reprodutivos, estando entre as principais vantagens a viabilização ou facilitação da inseminação artificial em vacas amamentando, redução do intervalo parto-concepção, parição concentrada, antecipação da prenhez na temporada de monta, padronização dos lotes de bezerros e aumento da eficiência no índice de desmame (peso ao desmame e número de animais desmamados), refletindo diretamente em redução e racionalização da mão-de-obra. É importante salientar que, para a implantação desse sistema (especificamente o

Sistema BioRep), os animais devem estar em condições nutricionais e sanitárias adequadas (vacas em CC igual ou superior a 3). Porém, é de competência do técnico escolher a alternativa mais apropriada às condições de cada estabelecimento (manejo nutricional, protocolos de indução hormonal, práticas de desmame definitivo ou temporário), com o objetivo de atingir o maior índice de prenhez pós-parto em cada empresa criatória de gado de corte. Aliadas a essas alternativas de manejo, as técnicas de biologia molecular estão tendo, gradativamente, uma maior importância no cenário produtivo e, em um futuro próximo, serão importantes instrumentos para identificar os animais mais produtivos em um rebanho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amstalden, M.; Garcia, M.R.; Stanko, R.L.; Nizielski, S.E.; Morrison, C.D.; Keisler, D.H.; Williams, G.L. Central infusion of recombinant ovine leptin normalizes plasma insulin and stimulates a novel hypersecretion of luteinizing hormone after short-term fasting in mature beef cows. **Biology of Reproduction**, 66:1555-1561, 2002.

Bastos, G.M.; Brenner, R.H.; Willke, F.W.; Neves, J.P.; Oliveira, J.F.C.; Bragança, J.F.M.; Machado, S.A.; Porciúncula, P.M.; Goncalves, P.B.D. Hormonal induction of ovulation and artificial insemination in suckled beef cows under nutritional stress. **Theriogenology**, 2004. No prelo

Bishop, D.K.; Wettemann, R.P.; Spicer, L.J. Body energy reserves influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows. **Journal of Animal Science**, 72:2703-2708, 1994.

Cachapuz, J. M. A. O setor primário no Rio Grande do Sul – Diagnóstico e perspectivas sócio econômicas. **Pecuária de Corte nos Anos 80**., Porto Alegre, 1991. p.17-39.

Comings, D.E.; Gade, R.; MacMurray, J.P.; Muhleman, D.; Peters, W.R. Genetic variants of the human obesity (OB) gene: Association with body mass index in young women, psychiatric symptoms, and interaction with the dopamine D-2 receptor (DRD2) gene. **Molecular Psychiatry**, 1:325-335, 1996.

Comings, D.E. Polygenic inheritance and micro/minisatellites. **Molecular Psychiatry**, 3:21-31, 1998.

Connor, H.C.; Houghton, P.L.; Lemenager, R.P.; Malven, P.V.; Parfet, J.R.; Moss, G.E. Effect of dietary energy, body condition and calf removal on pituitary gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic opioids in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, 7:403-411, 1990.

Cupp, A.S.; Stumpf, T.T.; Kojima, F.N.; Werth, L.A.; Wolfe, M.W.; Roberson, M.S.; Kittok R.J.; Kinder, J.E. Secretion of gonadotrophins change the luteal phase of the bovine oestrous cycle in the absence of corresponig change in progesterone or 17 β-oestradiol. **Anim. Reprod. Sci.**, 37:109-119, 1995.

Evans, A.C.O.; Fortune, J.E. Selection of the Dominant Follicle in Cattle Occurs in the Absence of Differences in the Expression of Messenger Ribonucleic Acid for Gonadotropin Receptors. **Endocinol.**, 138:1963-2971, 1997.

Ferreira, A.M. Novos conceitos sobre o anestro pós-parto. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11. 1995, Belo Horizonte. **Anais...**Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p.62-70, 1995.

Fortune, J.E.; Rivera, G.M.; Evans, A.C.O.; Turzillo, A.M. Differentiation of Dominant Versus Subordinate Follicles in Cattle. **Biology of Reproduction,** 65:648-654, 2001.

Ginther, O.J.; Kastelic, J.P.; Knopf, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, 20:187-200, 1989.

Giudice, L.C. Insulin-like growth factors and ovarian follicular development. **Endocrinology Review**, 13:641-669, 1992.

Griffith, M.K.; Williams, G.L. Roles of maternal vision and olfaction in suckling-mediated inhibition of luteinizing hormone secretion, expression of maternal selectivity, and lactational performance of beef cows. **Biology of Reproduction**, 54:761-768, 1996.

Grimard, B.; Humblot, P.; Ponter, A.A.; Mialot, J.P.; Sauvant, D.; Thibier, M. Influence of postpartum energy restriction on energy status, plasma LH and oestradiol secretion and follicular development in suckled beef cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, 104:173-179, 1995.

IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil**, Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 1996.

Lalman, D.L.; Williams, J.E.; Hess, B.W.; Thomas, M.G.; Keisler, D.H.; Effect of dietary energy on milk production and metabolic hormones in thin, primiparous beef heifers. **Journal of Animal Science**, 75:2762-2769, 1997.

Maciel, M.N.; Zieba, D.A.; Amstalden, M.; Keisler, D.H.; Neves, J.P.; Williams, G.L. Leptin Prevents Fasting-Mediated Reductions in Pulsatile Secretion of Luteinizing Hormone and Enhances Its Gonadotropin-Releasing Hormone-Mediated Release in Heifers. **Biology of Reproduction**, 70:229–235, 2004.

Maffei, M.; Halaas, J.; Ravussin, E.; Pratley, R.E.; Lee, G.H.; Zhang, Y.; Fei, H.; Kim, S.; Lallone, R.; Ranganathan, S. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nature Medicine**, 1:1155-1161, 1995.

Martin, G.B.; Price, C.A.; Thiery, J.C.; Webb, R. Interaction between inibin, oestradiol and progesterone in the control of gonadotrophin secretion in ewe. **Journal of Reproduction and Fertility**, 82:319-328, 1988.

Monget, P.; Besnard, N.; Huet, C.; Pisselet, C.; Monniaux, D. Insulin-like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. **Hormone Research**, 45:211-217, 1996.

Moraes, J.C.F. Anestro e fertilidade pós-parto em bovinos de corte. In: GALINA.C. et al. **Avanços na reprodução bovina.** Editora Universitária: UFPel/ Pelotas, 1999. Cap. 2, p. 25-33.

Neves, J.P.; Gonçalves, P.B.D.; Oliveira, J.F.C. Fatores que afetam a eficiência reprodutiva na vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 23:99-105, 1999.

Oliveira, J.F.C.; Henkes, L.E. Marcadores moleculares em reprodução animal. **In**: Gonçalves, P.B.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina.** São Paulo : Varela, 2002. 12:261-280.

Oliveira, J.F.C.; Neves, J.P.; Almeida, E.A.; Steigleder, C.S.; Moraes, J.C.F.; Goncalves, P.B.D.; Weimer, T. Association between reproductive traits and four microsatellites in brangus-ibagé cattle. **Genetics and Molecular Biology**. 2004. No prelo.

Padmanabhan, V.; McNeilly, A. Is there an FSH-releasing factor? **Reproduction**, 121:21-30, 2001.

Pinto Andrade, L.; Rhind, S.M.; Wright, I.A.; Mcmillen, S.R.; Goddard, P.J.; Bramley, T.A. Effects of infusion of GnRH pulses and level of body condition on ovarian function in postpartum beef cows. **Animal Reproduction Science**, 40:177-192, 1995.

Rivera, G.M.; Fortune, J.E. Development of Codominant Follicles in Cattle Is Associated with a Follicle-Stimulating Hormone-Dependent Insulin-Like Growth Factor Binding Protein-4 Protease. **Biology of Reproduction**, 65:112-118, 2001.

Roche, J.F. Control and regulation of folliculogenesis-a symposium in perspective. **Review of Reproduction,** 1:19-27, 1996.

Ryan, D.P.; Spoon, R.A.; Griffith, M.K.; Williams, G.L. Ovarian follicular recruitment, granulose cell steroidogenic potential and growth hormone/insulin-like growth factor-I relationships in suckled beef cows consuming high lipid diets: effects of graded differences in body condition maintained during the puerperium. **Domestic Animal Endocrinology**, 11:161-174, 1994.

Santos, J.E.P.; Amstalden, M. **Effects of nutrition on bovine reproduction.** Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS, 26:19-89, 1998.

Sartori, R.; Fricke, P.M.; Ferreira, J.C.P.; Ginther, O.J.; Wiltbank, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction,** 65:1403-1409, 2001.

Schams, D.; Berisha, B. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, 23:53-65, 2002.

Schoenau, W. **Polimorfismos nos genes do receptor do IGF-I e da Leptina na espécie bovina e sua associação com produção e reprodução.** 2003. 150p. Tese (Dotourado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria.

Schroth, G.P.; Chou, P.J.; Ho, P.S. Mapping Z-DNA in the human genome - computer-aided mapping reveals a nonrandom distribution of potential Z-DNA forming sequences in human genes. **Journal of Biological Chemistry**, 267:11846-11855, 1992.

Short, R.E.; Bellows, R.A.; Staigmiller, R.B.; Berardinelli, J.G.; Custer, E.E. Phisiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. **Journal of Animal Science**, 68:799-816,1990.

Silveira, R.S.; Pimentel, C.A.; Loguercio, L.; Oliveira, J.F.C.; Henrique, K, Portela Jr, V.V.; Goncalves, P.B.D. Sistema de indução de estro e inseminação artificial pré-fixada (sistema BioRep) com diferentes doses de eCG para vacas de corte no pós-parto. In: Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 16, 2004, Passo Fundo.v. CD-ROM.

Silveira, R.S.; Pimentel, C.A.; Loguercio, L.P.; Bastos, G.M.; Mondadori, R.G.; Oliveira, J.F.; Goncalves, P.B.D. Proposta de um novo sistema de indução de estro e inseminação artificial pré-fixada (Sistema BioRep) em comparação com sistemas de desmame definitivo e temporário para vacas de corte no pós-parto. **Acta Scientiae Veterinariae**, 31:590-591, 2003.

Strauch, T.A.; Neuendorff, D.A.; Brown, C.G.; Wade, M.L.; Lewis, A.W.; Keisler, D.H.; Randel, R.D. Effects of lasalocid on circulating concentrations of leptin and insulin-like growth factor-I and reproductive performance of postpartum Brahman cows. **Journal of Animal Science,** 81:1363-1370, 2003.

Suñe, JFV, Gonçalves, PBD, Moraes, JCF, Macedo, JLB. Inseminação artificial em gado de corte durante dez dias utilizando uma minidose de prostaglandina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** 9:141-145, 1985

Tautz, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. **In.**: Pena, S.D.J.; Chakraborty, J.T.; Epplen, J.T. *et al.* **DNA Fingerprinting: State of the Science**. Switzerland : Birkhäuser Verlag Basel, 1993. p.21-28.

Williams, G.L. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. **Journal of Animal Science**, 67:785-793, 1989.

Williams, G.L.; Amstalden, M.; Garcia, M.R.; Stanko, R.L.; Nizielski, S.E.; Morrison, C.D.; Keisler, D.H. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, 23:339-349, 2002.

Williams, G.L.; Griffith, M.K. Sensory and behavioural control of gonadotrophin secretion during suckling-mediated anovulation in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, 49:463-475, 1995.

Williams, G.L.; Koziorowski, M.; Osborn, R.G.; Kirsch, J.D.; Slanger, W.D. The postweaning rise of tonic luteinizing hormone secretion in anestrous cows is not prevented by chronic milking or the physical presence of the calf. **Biology of Reproduction**, 36:1079-1084, 1987.

Yavas, Y.; Walton, J.S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. **Theriogenology**, 54:1-23, 2000.

Zieba, D.A.; Amstalden, M.; Morton, S.; Maciel, M.N.; Keisler, D.H.; Williams, G.L. Regulatory Roles of Leptin at the Hypothalamic-Hypophyseal Axis Before and After Sexual Maturation in Cattle. **Biology of Reproduction**, 2004. No prelo

SINCRONIZAÇÃO COM PROGESTÁGENOS

Ed Hoffmann Madureira, J.R.V. Pimentel**, A.B. Almeida**, L.A.F.Rossa***
*Professor e **Pós Graduandos do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

INTRODUÇÃO

Nos sistemas extensivos de criação de gado de corte, tanto no Brasil como nos EUA, observa-se que 50% das vacas encontram-se em anestro no início da estação de monta (GASSER et al.;2003 , LUCY et al.,2001)
Esta alta taxa de anestro, associada à baixa eficiência na detecção de cios, entre as vacas que estão ciclando, resulta em uma baixa taxa de serviço. É fundamental que o programa de sincronização do estro tenha a capacidade de induzir ciclicidade nas vacas em anestro, com aceitável taxa de concepção, para que apresente um custo – beneficio favorável.
Alem do anestro pós parto e das falhas na detecção do cio, outros fatores como sub-nutrição, amamentação, e incidência de "ciclos curtos" estão diretamente ligados à duração do período pós parto .
Neste artigo, objetivam-se abordar os aspectos fisiológicos destes fatores e os possíveis benefícios da sincronização do estro com o emprego de progestágenos.

PERÍODO PÓS PARTO

Para um rebanho comercial obter máxima produtividade reprodutiva, o ideal seria cada vaca produzir um bezerro por ano (THOMAS, 1992). Com um período de gestação de aproximadamente 280 dias, as vacas devem conceber entre 80 e 85 dias pós parto. Todavia, vacas no período pós parto apresentam anestro, e na maioria das vezes não concebem no período esperado (YAVAS e WALTON, 2000b). Vale lembrar que o período de gestação das fêmeas zebuínas é cerca de 10 dias mais longo do que o das fêmeas bovinas taurinas.
Na maioria dos casos, o anestro é conseqüência de uma série de folículos dominantes que falham em ovular devido a baixas concentrações de LH (ROCHE *et al.*, 1992**;** JOLLY *et al.*, 1995)
Os mecanismos de controle do anestro pós parto envolvem uma complexa relação entre hipotálamo, hipófise, ovários e útero. No pós parto, os estoques de LH e FSH da hipófise anterior estão reduzidos devido ao "feedback" negativo do estradiol (E_2) no hipotálamo e das elevadas concentrações de progesterona (P_4) no final da gestação (NETT,1987).
Após o parto, com a remoção da unidade feto-placentária, as concentrações circulantes de E_2 e P_4 decrescem dramaticamente, o que resulta na remoção do "feedback" negativo e permite uma retomada gradual do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. (NETT et al.,1988)
A liberação de FSH se restabelece rapidamente no período pós parto (NETT et al.,1988; CROWE et al.,1998) de sorte que , dentro de duas semanas pós parto, o padrão de crescimento folicular em ondas já pode ser detectado, com a ocorrência de múltiplas ondas foliculares ocorrendo antes da primeira ovulação (MURPHY et al.,1990).
Ao contrário do FSH, as concentrações de LH estão baixas no pós parto imediato e o retorno ao padrão secretório compatível com a ciclicidade ocorre de maneira gradual

nos primeiros 30 dias pós parto . Entre os dias 15 e 30 pós parto a responsividade do hipotálamo ao E2 é restabelecida (NETT et al.,1988).
O primeiro folículo dominante pode desenvolver-se completamente e ovular ou tornar-se atrésico e ser substituído por um ou mais folículos dominantes subseqüentes ou ainda continuar seu crescimento e tornar-se cístico (STAGG et al.,1995 ; WILTBANK et at.,2002).
A ovulação de um folículo dominante ocorre quando sua produção de E2 é suficiente para estimular o pico pré-ovulatório de LH/FSH. A produção de E2, por sua vez, é dependente da freqüência dos pulsos de LH (STAGG et al., 1995).
Recentes artigos sobre anestro pós parto podem ser consultados para revisão (YAVAS; WALTON, 2002a ; WILTBANK et al.,2002 ; RHODES et al.,2003).

EFEITO DOS PROGESTÁGENOS SOBRE A RETOMADA DA ATIVIDADE CÍCLICA PÓS PARTO

A exposição à progesterona, por períodos de 5 a 9 dias, pode induzir ciclicidade em vacas em anestro. O tratamento com progesterona aumentou a secreção de LH durante o período de exposição a este hormônio em vacas leiteiras (RHODES et al.,2002) e de corte (GARCIA-WINDER et al.,1986) em anestro no pós parto. Roche et al.(1981) reportaram que a secreção de LH aumenta durante as 72 h que se seguem à suspensão do tratamento com progesterona em vacas em anestro.
De maneira bastante semelhante, a exposição aos progestágenos aumenta a secreção de LH durante e após o tratamento em novilhas pré púberes (ANDERSON et al.,1996 ; HALL et al.,1997).
Day; Anderson (1998) propuseram que a exposição aos progestágenos reduz a concentração de receptores de E2 no hipotálamo , amenizando o "feedback" negativo sobre a liberação de GnRH , possibilitando aumento na secreção de LH.
Além dos efeitos dos progestágenos no eixo hipotálamo-hipofisário, outros são descritos sobre os folículos ovarianos. As concentrações plasmática e intrafolicular de estradiol e ainda o número de receptores de LH nos folículos pré ovulatórios foram aumentados pela exposição aos progestágenos (GARCIA–WINDER et al.,1987; INSKEEP et al.,1988) .
Com base nestas informações, Rhodes et al.(2003) registraram a hipótese de que o tratamento com progestágenos estimula o desenvolvimento e a maturação de folículos dominantes, em vacas em anestro, por aumentar a secreção de LH, estimular o desenvolvimento de receptores de LH e a síntese de estradiol.

CICLOS ESTRAIS CURTOS

A indução da ovulação, por si só não restaura a competência reprodutiva.
Os folículos dominantes, que se desenvolvem precocemente no período pós parto, possuem capacidade de ovular bem antes da retomada espontânea da ciclicidade, pois uma única aplicação de GnRH induziu a ovulação em 100% das vacas tratadas durante a fase de crescimento do folículo dominante (CROWE et al.,1993). Neste estudo, o corpo lúteo (CL) formado após a ovulação induzida pelo GnRH teve uma curta duração (aproximadamente 8 dias) na maioria das vacas.
Os ciclos estrais curtos ocorrem com elevada freqüência após a primeira ovulação pós parto, seja ela espontânea (DAY et al.,1990) ou induzida por GnRH , estrógenos ou gonadotrofinas (DAY ,2004).

Várias hipóteses foram formuladas para explicar a etiologia dos ciclos curtos e algumas das principais conclusões podem ser registradas. O tamanho dos folículos ovulatórios da primeira e segunda ovulações pós parto são semelhantes em vacas de corte (PERRY et al., 1991; YAVAS et al. 1999) o que indica que o CL de curta duração, que se segue à primeira ovulação, não é resultante da ovulação de um folículo menor. Os ciclos curtos não são devidos a um CL predestinado a ter uma menor duração (COPELIN et al.,1987), a um estímulo gonadotrófico inadequado (GARVERICK et al. 1988), reduzido número de receptores para LH no CL (SMITH et al., 1996), reduzida função do CL (HU et al.,1990; RUTTER et al.,1985), reduzida responsividade do CL ao LH (DUBY et al.,1985), ou aumentada responsividade do CL a PGF2α (COPELIN et al.,1989). Sugere-se que o CL de curta duração seja devido à luteólise prematura (DUBY et al.,1985), envolvendo o útero (COPELIN et al.,1987).
Relata-se em estudos recentes que o endométrio libera PGF2α prematuramente o que resulta em luteólise prematura (BUFORD et al.,1996; COPELIN et al.,1989; GARVERICK et al.,1992; ZOLLERS et al.,1991) e que este mecanismo envolve a liberação de ocitocina induzida pela amamentação (TROXEL; KESLER,1984; TROXEL et al.,1984).
As concentrações de P4 muito baixas, que precedem a primeira ovulação pós parto, resultam em um número menor de receptores para P4 e maiores de receptores para ocitocina, nas células endometriais, favorecendo o estabelecimento precoce do "feedback" positivo entre ocitocina e PGF2α (ZOLLERS et al. 1993). É bastante provável que baixas concentrações pré ovulatórias de E2 também estejam envolvidas no aumento do número de receptores endometriais para ocitocina, favorecendo a ligação da ocitocina e a prematura liberação de PGF2α (MANN; LAMMING, 2000)

EFEITO DOS PROGESTÁGENOS NA PREVENÇÃO DA OCORRÊNCIA DO CICLO CURTO

A ocorrência de um ciclo curto, após a primeira ovulação pós parto , proporciona uma elevação das concentrações plasmáticas de P4 por um período de aproximadamente 8 dias. A segunda ovulação pós-parto, ao contrário da primeira, é acompanhada de manifestação do estro e de um ciclo estral sem alterações em sua duração. O mesmo ocorre após um tratamento de curta duração com progesterona ou progestágeno.
No caso dos ciclos curtos, o tratamento com progesterona ou progestágeno é bastante indicado pois prolonga a duração do CL que se forma após a interrupção da administração dos progestágenos provavelmente por suprimir os receptores de ocitocina no endométrio (PARKINSON et al. 1990). Vacas no período pós parto, tratadas com norgestomet, também tiveram reduzido número de receptores para ocitocina no endométrio (ZOLLERS et al. 1993).

EFEITO DA AMAMENTAÇÃO

A ausência dos pulsos de LH nas primeiras semanas após o parto é devida à depleção dos estoques hipofisários de LH e isso independe da amamentação. Após a recomposição dos estoques de LH, entre os dias 15 e 30 pós parto , a ausência dos pulsos de LH passa a ser dependente da amamentação. O estímulo da amamentação suprime a liberação pulsátil de LH por inibir os pulsos de GnRH hipotalâmico. O efeito supressivo da amamentação é modulado pelos estrógenos ovarianos, ou seja, aumenta a sensibilidade do sistema putativo gerador de pulsos de GnRH ao "feedback"

negativo dos estrógenos ovarianos. O efeito supressivo da amamentação parece influenciar a duração do período pós parto do momento em que os estoques de LH hipofisário se recompõem até aproximadamente 45 dias pós parto. O desmame ou as interrupções temporárias da amamentação possuem pouca influência sobre o intervalo pós parto quando praticados fora desse período (para revisão, YAVAS e WALTON, 2000b).

Griffith; Williams (1996) identificaram que o olfato e a visão são os elementos de reconhecimento materno, para o estabelecimento de uma relação da vaca com seu próprio bezerro, responsável pela supressão da liberação de LH, mediada pela amamentação, enquanto outros autores (STEVENSON et. al., 1994; VIKER et al 1993) sugeriram que os estímulos táteis na região inguinal, durante a amamentação ou tentativa de amamentação, seriam responsáveis por essa supressão .

Durante a amamentação ou somente o contato inguinal, ocorre liberação de ocitocina (STEVENSON et. al., 1994) que é liberada em concentrações mais elevadas em vacas quando amamentam seu próprio bezerro do que em outras quando amamentam um bezerro estranho (SILVEIRA et. al. 1993). A ocitocina estimula a liberação de PGF2α pelo endométrio, o que pode resultar em luteólise precoce e ciclo estral curto após a primeira ovulação pós parto.

Peptídeos opióides endógenos são produzidos em resposta aos estímulos da amamentação e parecem estar diretamente ligados à supressão da liberação de LH, uma vez que estas endorfinas inibem a liberação de GnRH, diretamente nos neurônios hipotalâmicos (LESHIN et. al., 1991) e a de LH, na hipófise anterior (CHAO et. al., 1986).

Os glicocorticóides e a prolactina não parecem estar envolvidos no processo de anovulação pós parto modulado pela amamentação (YAVAS; WALTON, 2000b).

EFEITO DOS PROGESTÁGENOS EM VACAS AMAMENTANDO

Os efeitos diretos dos progestágenos sobre o sistema opióide peptidérgico central em vacas que estejam ou não amamentando, não são bem conhecidos e constituem-se em interessante objeto de estudo na atualidade. Com base nos estudos realizados até o momento, o emprego de tratamentos à base de progesterona ou progestágenos em vacas amamentando se justifica por pelo menos dois motivos: a amamentação proporciona um estímulo adicional, que aumenta a sensibilidade do hipotálamo aos estrógenos, no momento em que ele apresenta, naturalmente, uma elevada sensibilidade ao “feedback” negativo a esse hormônio, por conta do próprio período pós parto . Os progestágenos reduzem a concentração de receptores de estradiol no hipotálamo, o que atenua o “feedback” negativo do estrógeno sobre a liberação de GnRH (ANDERSON; DAY, 1998).

O segundo motivo diz respeito ao fato da amamentação provocar a liberação de ocitocina que estimula a síntese de PGF2α, produzindo luteólise prematura e portanto ciclos estrais de curta duração. A progesterona e os progestágenos são capazes de suprimir os receptores endometriais de ocitocina e bloquear o mecanismo que leva à ocorrência de ciclos curtos como descrito acima.

A associação da interrupção temporária da amamentação aos tratamentos com progestágenos pode ser vantajosa, em algumas circunstâncias, para proporcionar indução de ciclicidade (BREUEL et. al, 1993), redução da incidência de ciclos curtos (GARVERICK et. al., 1998) e incrementar taxas de prenhez após a inseminação artificial (KISER et. al., 1980; MCVEY e WILLIAMS, 1989).

EFEITO DA NUTRIÇÃO

O efeito da nutrição sobre a reprodução no período pós parto de vacas tem sido objeto de vários artigos de revisão .(BUTLER; SMITH,1989; RANDEL,1990; SHORT; ADAMS,1988).
A redução da ingestão de energia ou proteína bruta antes do parto ou mesmo após o parto, reduz os estoques de gonadotrofinas hipofisárias e a responsividade da hipófise ao GnRH exógeno, atrasa o restabelecimento da pulsatilidade adequada de LH, prolongando a aciclicidade pós parto .(YAVAS , WALTON,2000a)
De maneira pratica, a avaliação do escore de condição corporal tem sido uma ferramenta valiosa para refletir o "status" nutricional.
O escore de condição corporal ao parto foi positivamente correlacionado com o desenvolvimento folicular precoce no período pós parto (RYAN et al.,1994), com o estoque hipofisário de LH aos 30 dias pós parto (CONNOR et al.,1990), com as concentrações circulantes de IGF1 , freqüência dos pulsos de LH e intervalo pós parto após o desmame precoce (BISHOP et al.,1994).
É provável que durante o período pós parto precoce a subnutrição desencadeie uma situação na qual o estrógeno seja inibitório à secreção hipotalâmica de GnRH (SCHILLO , 1992). Imakawa et al.(1987) apresentaram uma clara evidência de que a suplementação com dieta de baixa energia aumenta a sensibilidade do hipotálamo ao "feedback" negativo do estradiol. Há , portanto, uma semelhança entre as conseqüências da subnutrição e da amamentação sobre a responsividade do hipotálamo aos efeitos supressivos do estradiol, lembrando ainda , que os efeitos da baixa condição corporal e da amamentação, podem ser cumulativos (LUCY , 2003).
Não se pode esquecer que as interações entre nutrição e reprodução não se limitam aos efeitos de balanço energético, condição corporal e suplementação de nutrientes específicos, mas incluem abordagens de mecanismos fisiológicos celulares e moleculares (para revisão, ARMSTRONG et al.,2003 ; LUCY,2003).

EFEITO DOS PROGESTÁGENOS EM ANIMAIS SUBNUTRIDOS

Como a progesterona pode atenuar o "feedback" negativo do estrógeno sobre o hipotálamo, ela poderia ser útil no tratamento de vacas acíclicas com baixa condição corporal.
Os efeitos da nutrição sobre a reprodução envolvem os chamados hormônios metabólicos, entre os quais destacam-se a insulina, a leptina, o GH , o IGF1 e suas proteínas ligadoras.
Há participação do estradiol (e provavelmente de outros hormônios esteróides) no estímulo da secreção de insulina pelo pâncreas (MORIMOTO et al.,2001) e de IGF1 pelo fígado (RICHARDS et al.,1991).
Uma vez que estes hormônios metabólicos possuem efeito estimulatório sobre o crescimento folicular e interagem com os hormônios ovarianos, tornam-se muito interessantes os estudos do efeito dos progestágenos na secreção dos hormônios metabólicos e sua conseqüência sobre o desempenho reprodutivo.
Antes de se recomendarem os progestágenos como um tratamento para vacas acíclicas com baixa condição corporal, é essencial registrar que uma boa condição corporal é pré-requisito para obtenção de bons resultados de prenhez.

TRATAMENTOS COM PROGESTERONA/PROGESTÁGENOS

Nos tratamentos com progesterona ou progestágenos geralmente são empregados acetato de melengestrol pela via oral , a progesterona e a medroxiprogesterona na forma de dispositivos vaginais e o norgestomet em implantes auriculares.
De um modo geral , os progestágenos se ligam aos receptores de progesterona , mas não possuem respostas biológicas idênticas (STANCZYK , 2003). A habilidade da progesterona e do norgestomet de reprogramar o eixo hipotalálamo-hipofisário parece ser maior do que a do MGA (PERRY et al.,2004) . Numa comparação direta entre os dois progestágenos, Perry et al.,(2004 a) concluíram que a progesterona é mais eficiente para induzir a ovulação e eliminar a ocorrência de ciclos curtos do que o MGA.
De qualquer maneira , os implantes e dispositivos vaginais são apenas um dos componentes necessários na composição do protocolo de sincronização do estro ou da ovulação.
A exposição aos progestágenos , mesmo por curtos períodos de tempo (7 a 10 dias), na ausência de um CL pode resultar em reduzida fertilidade pela ocorrência de folículos persistentes (AHMAD et al.,1996 ; AUSTIN et al.,1999). Portanto , é necessário induzir a atresia ou a ovulação do folículo dominante presente no ovário, no momento da colocação do implante , o que pode ser obtido pela administração de estradiol ou GnRH (BO et al.,2003). A duração da fase progestacional depende do hormônio aplicado para sincronizar a emergência da onda folicular. Assim, os implantes devem permanecer por 7 ou 8 dias quando se empregam o GnRH, o benzoato de estradiol ou o 17-β-estradiol e por 9 ou 10 dias quando se emprega o valerato de estradiol. A retirada dos implantes e a aplicação de PGF2α asseguram a interrupção da fase progestacional, proporcionando ao folículo dominante um ambiente hormonal favorável à maturação folicular final. Com objetivo de se diminuir variação no momento da ovulação , recomenda-se a aplicação de 1 mg de benzoato de estradiol 24 horas após a retirada do implante ou de GnRH (100 µg de gonadorelina ou 10 µg de acetato de buserelina) 36 a 48 horas após a retirada do implante . Em ambos os casos, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) deve ser realizada cerca de 54 a 56 horas após a retirada do implante (mais especificamente 30 h após a aplicação de benzoato de estradiol ou 16 h após a aplicação de GnRH).
A aplicação de 300 a 400 UI de eCG no momento da retirada do implante , vem sendo estudada por vários autores .
Os folículos dominantes no período pós parto são menores que os ovulatórios que precedem os ciclos curtos ou normais, o que significa que os folículos dominantes não ovulatórios no pós parto sofrem atresia antes de atingirem o tamanho ótimo para ovulação (MURPHY et al.,1990 ; YAVAS et al.,1999).
O eCG possui a capacidade de se ligar tanto aos receptores de LH quanto do FSH (MURPHY e MARTINUK , 1999) e pode ser importante para incrementar o crescimento final do folículo dominante e estimular a síntese de estradiol.
Cavalieri et al.(1997) observaram um incremento no grau de sincronização com redução significativa da variação no tempo para o pico pré-ovulatório de LH e ovulação, quando administraram 400 UI de eCG na retirada do implante de norgestomet.
O eCG pode ser útil em vacas de corte amamentando, com baixa condição corporal (ROCHE et al.,1992) ou vacas tratadas precocemente no período pós parto (ROSSA,2002) ou com alta incidência de anestro (BÓ et. al.,2003) mas pode ser desnecessário em vacas ciclando ou com boa condição corporal (KASTELIC et al.,1999).

Na prática, temos seguido uma classificação de escore ovariano (tab.1) , avaliado por palpação retal, no momento da colocação do implante/dispositivo e isto possibilita a aplicação de eCG somente nas vacas com escores 2 e 3 , proporcionando siguinificativa redução de custo.

Tabela 1. Escores de condição ovariana

Escore ovariano	Características
1	Fêmeas ciclando, ovários com comprimento acima de 30mm, macios, presença de CL, ou útero com turgidez acentuada, denotando a presença de folículos grandes (> 10mm), estrógeno-ativos.
2	Fêmeas que possuem ovários com comprimento entre 15-30 mm, ausência de CL e de turgidez no útero. Incluem-se nesta categoria fêmeas cujos folículos atingem a fase de dominância (≥ 8,5mm), mas não ovulam
3	Fêmeas que possuem ovários pequenos, duros e lisos. Nesta categoria são incluídas fêmeas cujos folículos não chegam até a divergência.

**Folículos maiores do que 20 mm, na ausência de corpo lúteo e que persistem por mais do que 10 dias são considerados Cistos.

A IATF tem a grande vantagem de proporcionar uma alta taxa de serviços e eliminar a necessidade de detecção de cio. De um modo geral, nosso grupo de pesquisa vem obtendo taxas de prenhez em torno de 45 a 67 % na IATF com emprego de progesterona/progestágeno, tanto em vacas e novilhas zebuínas ou cruzadas, como em taurinas (em menor escala) (BARUSELLI et al.,2004) .
Em recente estudo, Barreto et al. (2004) testaram a reutilização dos implantes de Crestar, sincronizando-se a emergência da onda folicular com valerato ou benzoato de estradiol, em vacas amamentando da raça nelore. Não houve efeito da interação entre tipo de implante e tipo de éster de estradiol sobre a taxa de prenhez na IATF. As taxas de prenhez na IATF também não diferiram entre animais que receberam implante novo ou reutilizado (48,3 vs 48,7%), nem entre os que receberam valerato ou benzoato de estradiol (49,5 vs 47,5%).
Em outro experimento, vacas da raça nelore amamentando, suplementadas com caroço de algodão, apresentaram taxa de prenhez na IATF, semelhante à das vacas que receberam dieta controle, após tratamento de sincronização da ovulação com Crestar (65 vs 61%). A taxa de prenhez após 60 dias de estação de monta para ambos os grupos foi de 93% (dados não publicados)

CONCLUSÕES

O emprego da sincronização dos estros com progestágenos possui a capacidade de induzir ciclicidade em vacas de corte amamentando e em anestro, reduz a incidência dos ciclos curtos, proporciona alto grau de sincronização da ovulação e IATF com taxas de prenhez bastante atraentes.

A associação com eCG deve ser a opção de escolha quando se tratam vacas com condição corporal menor do que 5 (escala de 1 a 9) , intervalo pós parto menor do que 50 dias ou sempre que se detectar o anestro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, N.. SCHRICK, F.N. BUTCHER, R.L INSKEEP, E.K. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows, **Biol. Reprod**. v. 52 ,p.1129–1135, 1995

ALMEIDA, A. B.; MADUREIRA E.H.; BINELLI,M.;BARUSELLI,P.S.;ROSSA L.A.F.;GASPAR P. S. Reutilização de implantes de norgestomet em vacas nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** (submetido) , 2004

ANDERSON, L. H., AND M. L. DAY. Development of a progestin-based estrus synchronization program: I. Reproductive response of cows fed melengestrol acetate for 20 days with an injection of progesterone. **J. Anim. Sci**.,v.76,p.1267-1272, 1998.

ANDERSON, L.H.; McDOWELL, C.M.; DAY, M.L. Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biology of Reproduction**, v.54, n.5, p.1025-31, 1996.

ARMSTRONG, D.G.; GONG, J.G. and WEBB, R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: physiological , cellular and molecular mechanisms. **Reproduction** Supplement , v.61, p.403-414,2003.

AUSTIN JE, MIHM M, RYAN MP, WILLIAMS DH, ROCHE JF. Effect of duration of dominance of the ovulatory follicle on onset of estrus and fertility in heifers. **J.Anim**. **Sci.**,v.77p.2219–26,1999.

BARUSELLI, P.S. REIS, E.L.; MARQUES, M.O. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, Londrina, 2004.

BISHOP, D.K.; WETTEMANN,R.P.;SPICER,L.J., Body energy reserves influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows. **J.Anim.Sci**.,v.72,p.2703-2708,1994

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. MARTINEZ, M.F. Patttern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim.Reprod. Sci**., v.78,p.307-326,2003.

BREUEL, K. F., P. E. LEWIS, E. K. INSKEEP, AND R. L. BUTCHER. Endocrine profiles and follicular development in early-weaned postpartum beef cows. **J. Reprod**. **Fertil**. v. 97 , p.205–212. 1993.

BUFORD,W.I ; AHMAD, N. ; SCHRICK, F.N. ; BUTCHER, R.L. ; LEWIS, P.E. INSKEEP, E.K. Embryo toxicity of a regressing corpus luteum in beef cows supplemented with progestogen. **Biol. Reprod**.,v.54,p. 531-537, 1996.

BUTLER, W.R. ; SMITH, R.D. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle **. J. Dairy** Sci. ,v.72 , p. 767-783, 1989.

CAVALIERI, J.; RUBIO, I.; KINDER, J.E.; ENTWISTLE, K.W.; FITZPATRICK, L.A. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 47, p. 801-14, 1997.

CHAO, C.C. ; MOSS, G.E. ; MALVEN, P.V. Direct opioid regulation of pituitary release of bovine luteinizing hormone**. Life Sci.** , v.39 p. 527-534 , 1986.

CONNOR, H.C.; HOUGHTON, P.L.; LEMENAGER, R.P.; MALVEN, P.V.; PARFET, J.R.; MOSS, G.E. Effect of dietary energy, body condition and calf removal on pituitary gonadotrophins, gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic opioids in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 7, p. 403-11, 1990

COPELIN, J. P., M. F. SMITH, H. A. GARVERICK, AND R. S. YOUNGQUIST**.** Effect of the uterus on subnormal luteal function in anoestrous beef cows. **J. Anim. Sci**.. v.64,p.1506–1511. 1987

COPELIN, J. P., M. F. SMITH, H. A. GARVERICK, AND R. S. YOUNGQUIST**.** Effect of the uterus on subnormal luteal function in anoestrous beef cows. **J. Anim. Sci**. v.64,p.1506–1511, 1987.

COPELIN, J. P.,. SMITH, M. F,;KEISLER , D.H.;. GARVERICK, H. A**.,** Effect of active immunization of pre-partum and post-partum cows against prostaglandin F2α on lifespan and progesterone secretion of short-lived corpora lutea . **J. Reprod. Fertil**.,v.87,p.199-207,1989.

CROWE, M.A.; GOULDING, D.; BAGUISI, A.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F.Induced ovulation of the first postpartum dominant follicle in beef suckler cows using a GnRH analogue. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.99, n.2, p.551, 1993.

CROWE, M.A.; PADMANABHAN, V.; MIHM, M.; BEITINS, I.Z.; ROCHE, J.F. Resuption of follicular waves in beef cows is not associated with periparturient changes in follicle-stimulating hormone heterogeneity despite major changes in steroid and luteinizing hormone concentration. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 1445-50, 1998.

DAY, M.L. ; DYER, R.M.; WILSON, G.W.,POPE,W.F.Influence of estradiol on duration of anestrus and incidence of short estrous cycles in postpartum cows. **Domest. Anim**. **Endocrinol**. v.7,p.19-25,1990.

DAY, M.L. Hormonal induction of estrous cycles in anestrous *bos taurus* beef cows. **Animal Reproduction Science** v.82-83,p. 487-484., 2004.

DAY,M.L.,and ANDERSON,L.H. Current concepts on the control of puberty in cattle **. J. Anim. Sci** .v.76(suppl. 3),p.1-15.,1998.

DUBY,R.T. ; BROWNING, T. ; CAREY, D. BLACK, D.L**.** Progesterone synthesis and histology of postpartum bovine corpora lutea . **Theriogenology** ,v. 23,p.619-630 , 1985.

GARCIA-WINDER, M.; LEWIS, P.E.; DEAVER, D.R.; SMITH, V.G.; LEWIS, G.S.; INSKEEP, E.K. Endocrine profiles associated with life span of induced corpora lutea in postpartum beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 62, p. 1353-62, 1986.

GARCIA-WINDER, M.; LEWIS, P.E.; TOWNSEND, E.C.; INSKEEP, E.K**.** Effects of norgestomet on follicular development in postpartum beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 64, p. 104-112, 1987.

GARVERICK, H. A., R. G. ELMORE, D. H. VAILLANCOURT, AND A. J. SHARP.Ovarian response to gonadotropin-releasing hormone in postpartum dairy cows. **Am. J. Vet. Res**. ,v..41,p. 1582-1585, 1980.

GARVERICK, H. A., W. G. ZOLLERS, AND M. F. SMITH. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. **Anim. Reprod. Sci**.,v. 28,p.111–124,1992..

GASSER,C.L.,BEHLKE,E.J.,BURKE,C.R.,GRUM,D.E.,MUSSARD,M.L**.** Improvement of pregnancy rate to fixed-time artificial insemination with progesterone treatment in anestrous pos-partum cows. **J. Anim. Sci**. v.81, Suppl. 2 , p.45 (abstract)2003.

GAVERICK, H.A. ; PARFET, J.R. ; LEE,C.N. ; COPELIN, J.P. ; YOUNGQUIST,R.S. ; SMITH, M.F. Relationship of pre and post-ovulatory gonadotropin concentrations to subnormal luteal function in postpartum beef cattle. **J. Anim. Sci**.,v. 66,p.104-111, 1988.

HALL, J.B.; STAIGMILLER, R.B.; SHORT, R.E.; BELLOWS, R.E.; MacNEIL**, M.D.;** BELLOWS, S.E. Effect of age and pattern of gain on induction of puberty with a progestin in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.75, p.1606-11, 1997.

HU,Y.F.;SANDERS, J.D.;KURZ,S.G.;OTTOBRE, J.S.;DAY,M.L. In vitro prostaglandin production by bovine corpora lutea destined to be normal or short-lived. **Biol. Reprod**., v.42,p. 801-807 , 1990.

HUTTER,L.M. ; CARRUTHERS, T.D. ; MANNS, J.G. the pos-partum induced corpus luteum : functional differences from that of cycling cows and effects of progesterone pre-treatment . **Biol. Reprod**. v. 33,p.560-568 , 1985.

IMAKAWA K, DAY ML, ZALESKY DD, CLUTTER A, KITTOK RJ, KINDER JE. Effects of 17β estradiol and diets varying in energy on secretion of luteinizing hormone in beef heifers. **J Anim** Sci.v.64,p. 805-815, 1987.

INSKEEP, E.K.; BRADEN, T.D.; LEWIS, P.E.; GARCIA-WINDER, M.; NISWENDER, G.D**.** Receptors for LH and FSH in large follicle in postpartum beef cows. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 587-91, 1988.

JOLLY, P.D.; MCDOUGALL, S.; FITZPATRICK, L.A.; MACMILLAN, K.L.; ENTWISTLE, K.W. Physiologiacl effects of under nutrition on postpartum anoestrum in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 477-92,. 1995.

KASTELIC, J.P.; OLSON, W.O.; MARTINEZ, M.A.; COOK, R.B.; MAPLETOFT, R.J. Syncronization of estrus in beef cattle with norgestomet and estradiol valerate. **Canadian Veterinary Journal**, v. 40, p. 173-8, 1999.

KISER, T.E. ; DUNLAP, S.E. BENYSHEK, L.L. MARES, S.E. The effect of calf removal on estrous response and pregnancy rate of beef cows after Syncro-Mate-B treatment . **Theriogenology** . v. 13,p.381-389, 1980.

LESHIN, L. S. ; RUND, L.A. ; KRAELING, R.R. ; KISER , T.E. The bovine preoptic area and median eminence : sites of opioid inhibition of luteinizing hormone-releasing hormone secretion. **J. Anim. Sci**. v.69 , p. 3733-3746 , 1991.

LUCY, M.C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. **Reproduction** Supplement , v.61 , p. 415-427, 2003.

LUCY,M.C.,BILLINGS,H.J.,BUTLER,W.R.,EHNIS,L.R.,FIELDS,M.J.,KESLER,D.J.KINDER,J.E.MATTOS, R.C.,SHORT,R.E.,THATCHER,W.W.,WETTEMAN,R.P.,YELICH,J.V.,HAFS,H.D., Efficacy of an intravaginal progesterone insert and injection of PGF2α for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows , peripubertal beef heifers and dairy heifers . **J. Anim. Sci**. v. 79, p. 982-995 , 2001.

MANN, G. E., AND G. E. LAMMING. The role of sub-optimal preovulatory oestradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrous cycle in the cow. **Anim. Reprod. Sci**., v. 64, p.171–180. 2000.

MARIMOTO, S.; FERNANDEZ-MEJIA, C. ; ROMERO-NAVARRO, G. ; MORALES-PEZA, N. and DIAZ-SANCHEZ, V. Testosterone effect on insulin content, Messenger ribonucleic acid levels, promotor activity, and secretion in rats . **Endocrinology.** v.142,p.1442-1447,2001.

MCVERY, W.R. Jr ; WILLIAMS, G.L. Mechanical masking of neurosensory pathways at the calf-teat interface: Endocrine , reproductive and lactational features of the suckled anestrous cow . **Theriogenology** , v.35 , p. 931-941 , 1991.

MURPHY, B.D.; MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotrophin. **Endocrine Rewiews**, v. 12, p. 27-44, 1991.

MURPHY, M. G., M. P. BOLAND, AND J. F. ROCHE. Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in postpartum beef suckler cows. **J. Reprod. Fertil**. v..90,p.523–533, 1990.

NETT, T.M. Function of the hypothalamic-hypophysial axis during the post-partum in ewes and cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 34, p. 201-13, 1987

NETT, T.M.; CERMARK, D.; BRADEN, T.; MANNS, J.; NISWENDER,G. Pituitary receptor for GnRH and estradiol and pituitary content of gonadotophins in beef cows II. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 5, p. 81-9,. 1988.

PARKINSON, T.J ; JENNER, L.J. ; LAMMING, G.E. Comparison of oxytocin/prostaglandin F2α interrelations in cyclic and pregnant cows. **J. Reprod. Fertil**., v.90,p. 337-345, 1990.

PARKINSON, T.J., LAMMING, G.E., Inter-relationships between progesterone, 12, 14-dihydro-15-keto PGF-2 (PGFM) and LH in cyclic and early pregnant cows. **J. Reprod**. **Fertil.,** v. 90, p. 221–233, 1990.

PERRY GA, SMITH MF, GEARY TW. Ability of intravaginal progesterone inserts and melengestrol acetate to induce estrous cycles in postpartum beef cows. **J Anim Sci**., v. 82, p.695–704, 2004.

PERRY, R.C.; CORAH, L.R. ; KIRACOFE, G.H.; STEVENSON,J.S.; BEAL, W.E. , Endocrine changes and ultrasonography of ovaries in suckled beef cows during resumption of postpartum estrous cycles. **J. Anim. Sci** .,v. 69, p. 2548-2555 , 1991.

PERRY,R.CCORAH,L.R.;COCHRAN,R.C.;BEAL,W.E.;STEVENSON,J.S.;MINTON,J.ESIMMS,D.D.;BRE THOUR, J.R. Influence of dietary energy on follicular delopment , serum gonadotropins , and fist postpartum ovulation in suckled beef cows, **J.Anim Sci**., v. 69, p. 3762-3773 , 1991.

RANDEL, R. D. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. **J. Anim. Sci**. ,v. 68,p.853-862, 1990.

RHODES, F..M.,C.R.BURKE,C.R.,CLARK, B.A., DAY, M.L.,MACMILLAN,K.L, Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. **Anim. Reprod.Sci**., v. 69 , p. 139-150, 2002.

RHODES,F.M.; MACDOUGALL, S. ; BURKE, C.R. ; VERKERK, G.A. MACMILLAN , K.L. Invited Review: Treatment of cows whit an extended postpartum anestrous interval,. J. Dairy Sci. v 86 , p 1876-1894,2003.

RICHARDS, M.W., WETTEMANN, R.P., SPICER, L.J., MORGAN, G.L., Nutritional anestrus in beef cows: effects of body condition and ovariectomy on serum luteinizing hormone and insulin-like growth factor-I. **Biol. Reprod**. v. 44, p.961–966,1991.

ROCHE, J.F. ; IRELAND, J. ; MAWHINNEY, S. Control and induction of ovulation in cattle . **J. Reprod. Fertil**., v.30(suppl),p.560-568,1985.

ROCHE, J.F.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P. Pospartum anoestrus in dairy and beef cows. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 371-8, 1992.

ROSSA, L.A.F. Sincronização da ovulação por eCG ou bezoato de Estradiol em vacas de corte tratadas com crestar no período pós parto. Tese (mestrado) Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia , Universidade de São Paulo.,80f . 2002.

RYAN, D.P.; SPOON, R.A.; GRIFFITH, M.K.; WILLIANS, G.L. Ovarian follicular recruitment, granulosa cell steroidogenic potential and grown hormone / IGF-I relationships in suckler beef cows consuming high lipid diets: effects of graded differences in body condition maintained during puerperium. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 11, p.161-174, 1994.

SCHILLO KK. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **J Anim Sci** . , v.70, p.1271-1282,1992.

SHORT ,R.E. ADAMS, D.C. Nutritional and hormonal interrelationships in beef cattle reproduction . **J. Anim. Sci.** , v.68 , p.29-39, 1988.

SILVEIRA, P.A. ; SPOON, R.A. ; RYAN, D.P. ; and WILLIAMS, G.L. , Evidence for the maternal behavior as a requisite link in suckling mediated anovulation in cows. **Biol. Reprod**. v.49 , p.1338-1346, 1993.

SMITH,G.D. ; SAWER, H.R.; MIRANDO, M.A. GRISWOLD, M.D. ; SADHU, A. ; REEVES, J.J., Steady – state luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid levels and endometrial cell composition in bovine normal – and short-lived corpora lutea. **Biol. Reprod**.,v.55, p. 902-909, 1996.

STAGG, K., L. J. SPICER, J. M. SREENAN, J. F. ROCHE, AND M. G. DISKIN. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and to interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. **Biol. Reprod**.,v. 59, p.777–783,1998.

STAGG, K.; DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F. Folicular development in long-term anoestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. **Animal Reproduction Science**, v. 38, p. 49-61, 1995.

STANCZYK, F.Z. All progestins are not created equal. **Steroids** , v.68,p.879-890,2003.

STEVENSON, J.S. ; KNOPPEL, E.L. ; MINTON, J.E. ; SALFEN, B.E. ; GARVERICK, H.A**.** Estrus , ovulation , luteinizing hormone , and suckling – induced hormones in mastectomized cows with and without unrestricted presence of the calf . J. Anim. Sci., v.72 p.690-699 ,1994.

THOMAS, V.M. Beef cattle production. **3ª. ed. Wave Land Press**,. 348p,1992

TROXEL, T.R.; CRUZ, L.C.; OTT, R.S.; KESLER, D.J. Norgestomet and gonadotropin releasing hormone enhance corpus luteun function and fertility of pospartun suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, v. 71, n.10, p. 2579-85, 1993.

TROXEL, T.R.; KESLER, D.J. The effects of progestin and GnRH treatments on ovarian function and reproductive hormone secretions of anestrous pospartum suckled beef cows. **Theriogenology**, v.21, n.5, p.699-711, 1984.

TROXEL, T.R.; OPSOMER, M.J.; KESLER, D.J**.** The effect of days pospartum, indomethacin and oxytocin on prostaglandine metabolite concentration in pospartum suckled beef cows. **Theriogenology**, v. 22, p. 187-96, 1984.

VIKERS, S.D. ; LARSON, R.L. ; KIRACOFE, G.H. ; STEWART, R.E. STEVENSON, J.S**.** Prolonged postpartum anovulation in mastectomized cows requires tactile stimulation by the calf. **J. Anim. Sci**., v.71, p. 999-1003, 1993.

WILTBANK, M. C., A. GUMEN, AND R. SARTORI. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology.** v.57, p.21–52, 2002.

YAVAS, Y.; WALTON, J.S. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: A review. **Theriogenology**, v. 54, p. 1-25,. 2000a

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

YAVAS,Y.; JOHNSON,W.H ; WALTON,J.S., Modification of follicular dynamics by exogenous FSH and progesterone , and the induction of ovulation using hCG in postpartum beef cows. **Theriogenology.** v. 52, p. 949-963, 1999.

ZOLLERS, W. G. J., H. A. GARVERICK, M. F. SMITH, R. J. MOFFATT, B. E. SALFEN, AND R. S. YOUNGQUIST**.** Concentration of progesterone and oxytocin receptors in endometrium of postpartum cows expected to have a short or normal oestrus cycle. **J. Reprod. Fertil**. v.97, p.329–337, 1993.

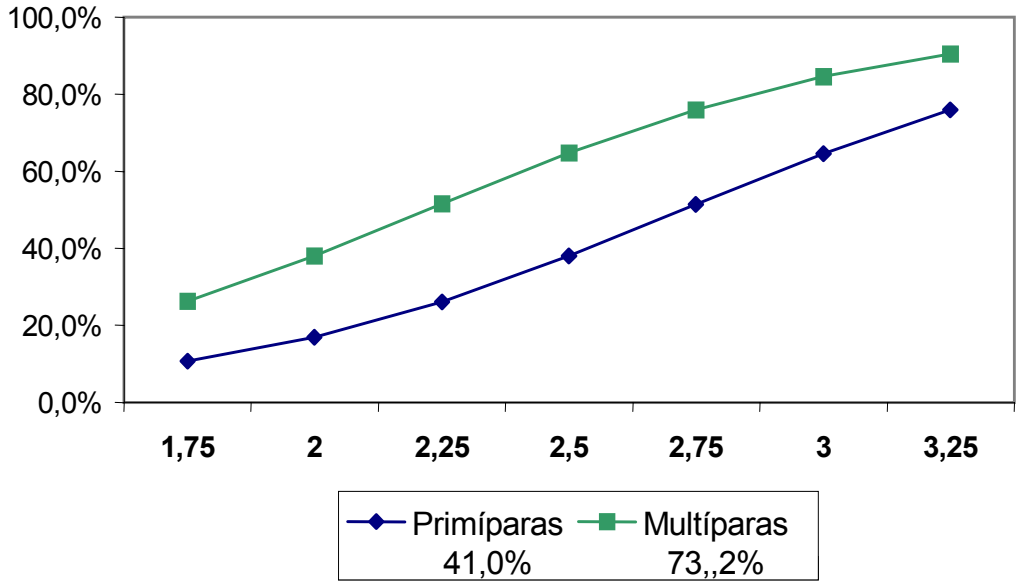
ZOLLERS, W.G. Jr ; GARVERICK, H.A. ; YOUNGQUIST, R.S. ; OTTOBRE, J.S. ; SILCOX, R.W. ; COPELIN, J.P. ; SMITH, M.F**.** In vitro secretion of prostaglandins from endometrium of postpartum beef cows expected to have short or normal luteal phases. **Bio**l. **Reprod**.,v.78, p. 1909-1920,1991.

CONTROLE DO ESTRO E DA OVULAÇÃO VISANDO A INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BOVINOS DE LEITE A PASTO OU CONFINADOS

José Luiz Moraes Vasconcelos, Ricarda Maria Santos e Gabriela Campos Perez
FMVZ – UNESP – Botucatu – SP
Vasconcelos@fca.unesp.br

INTRODUÇÃO

O desempenho reprodutivo é responsável direto pela produção de leite por dia de vida útil da vaca, número de animais de reposição, redução de custos e aumento do ganho genético.
Ao se delinear estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva de animais mantidos a pasto ou confinados, deve-se lembrar que existem diferenças entre eles.
Os animais mantidos a pasto são geralmente mestiços Girolando, que apresentam anestro pós-parto mais prolongado, devido perda de peso mais acentuada, e menor persistência da lactação. Neste grupo de animais sempre deve-se ter a preocupação com a relação entre o número de vacas em lactação e secas na propriedade e utilizar estratégias para induzir ciclicidade e fazer as vacas ficarem gestantes o mais rápido possível pós-parto. Como pode ser observado na figura abaixo, cada 0,5 ponto a mais no Escore de Condição Corporal (ECC, escala de 0 - 5), a taxa de ciclicidade aumenta 22,4% (P<0,01).



Já animais mantidos em confinamento são geralmente da raça Holandesa, com maior produção de leite e conseqüentemente menor prenhez. Esta característica é que deve-se ficar atento com este grupo de animais dentro da propriedade, pois aumenta o número médio de dias em lactação (DEL) do rebanho, diminuindo a produção por dia de intervalo entre partos.
Falhas na detecção do estro são problemas nesses dois grupos de animais, e reduzem a performance reprodutiva e, indiretamente, a produção de leite por dia de intervalo entre partos (BRITT, 1985; FOOTE, 1975). Prolongado intervalo parto/primeira

inseminação, resultante de inadequada taxa de detecção do estro, prolonga o intervalo entre partos.
Manifestações de estro são menores devido às doenças, problemas nas pernas e pés ou a outros fatores estressantes (LUCEY et al., 1986). Fatores ambientais (estresse térmico) podem influenciar o número de montas durante o período de estro, e também decrescem a duração e a intensidade do estro (POSTON et al., 1962). Vacas alojadas em piso de concreto também mostram menor intensidade de estro do que vacas mantidas a pasto (BRITT, 1985), porém em pastos com capim alto a observação também é dificultada. Resumindo, são muitos os fatores que influenciam a rotina da observação de estro, o que a torna muitas vezes falha, levando à baixa taxa de detecção de estro, menor taxa de prenhez e maior intervalo entre partos.
Progressos na redução do impacto negativo da baixa eficiência de detecção de estro em vacas lactantes tem sido obtidos com o uso de protocolos de sincronização da ovulação e inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que podem ser iniciados em qualquer fase do ciclo estral. Esses protocolos aumentam a taxa de prenhez, por aumentar o número de animais inseminados, porém ainda não foram demonstrados efeitos consistentes sobre a concepção (PURSLEY et al., 1997).

ESTRATÉGIAS PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE ANIMAIS A PASTO

As estratégias para aumentar a eficiência reprodutiva de animais mantidos a pasto devem levar em consideração a maior incidência de anestro pós-parto e a menor taxa de sincronização destes animais, portanto as estratégias devem visar o retorno rápido da ciclicidade no pós-parto e aumento da taxa de sincronização na inseminação artificial em tempo fixo.
Exemplo do efeito da persistência da lactação na porcentagem de vacas em lactação e secas na propriedade. Intervalos entre partos logos, associado com menor persistência, diminui a proporção de vacas em lactação. Quanto menor a persistência, maior a importância de ficar gestante mais rapidamente.

Período de Lactação	Intervalo entre Partos	% Vacas Lactação	% Vacas Secas
10	12	83	17
	14	71	29
9	12	75	25
	14	64	36

RETORNO A CICLICIDADE

Vacas em anestro apresentam liberação de FSH, porém os folículos dominantes falham em ovular, pois não crescem o suficiente (devido menor pulsatilidade de LH) e conseqüentemente não produzem suficiente estradiol para estimular pico de LH e ovulação, portanto para estimular o retorno a ciclicidade devemos utilizar tratamentos que interfiram na pulsatilidade de LH e conseqüentemente no desenvolvimento folicular.
Concentração subluteal de progesterona (P4) aumenta a freqüência de pulsos de LH e o período de manutenção do folículo dominante (FORTUNE, 1994). O implante de progesterona em vacas em anestro, mantém a progesterona em nível subluteal,

aumentando a pulsatilidade de LH, permitindo que o folículo continue crescendo e, devido maior produção de estradiol, possa ocorrer pico de LH e ovulação.
Portanto os protocolos de sincronização da ovulação em vacas em anestro devem utilizar implantes de progesterona ou progestágenos (progesterona sintética)

INIBIÇÃO DA OCORRÊNCIA DE CICLO CURTO

Outro fato com o qual deve-se preocupar ao trabalhar com as vacas no inicio do pós-parto é a ocorrência de ciclo curto ("short cycle"), que se caracteriza por regressão prematura do corpo lúteo resultante da primeira ovulação pós-parto, causando alteração na duração do ciclo. Isto ocorre devido a liberação prematura de prostagladina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) pelo endométrio.
A primeira ovulação pós-parto geralmente ocorre sem a manifestação de estro e é seguida por um ciclo curto (8 a 12 dias) na maioria das vacas. De acordo com GUILBAULT et al. (1987), o útero no pós-parto produz maiores quantidades de $PGF_{2\alpha}$, e quando ocorre a primeira ovulação, não havendo prévia exposição a progesterona, esta maior concentração de $PGF_{2\alpha}$, lisa o corpo lúteo assim que o mesmo fica responsivo, resultando numa fase lútea curta (RIVERA et al., 1998). TROXEL & KESLER (1984) relataram que tratamentos com progesterona no pós-parto diminuem a concentração de metabólitos de $PGF_{2\alpha}$ (PGFM). RIVERA et al. (1998), comparando vacas pós-parto que receberam implante de progesterona ou não, observaram que não houve regressão prematura do corpo lúteo no grupo tratado, enquanto nos animais sem implantes todos tiveram regressão prematura.

AUMENTO DA TAXA DE SINCRONIZAÇÃO

Outro problema das vacas mestiças mantidas a pasto é a baixa taxa de sincronização de ovulação devido ao maior número de ondas de crescimento folicular (3 ondas vs. 2 ondas nas vacas da raça Holandesas de alta produção), que faz com que os protocolos desenvolvidos para vacas Holandesas tenham menor eficiência nas mestiças, devido a ovulação antes da aplicação do segundo estimulo hormonal ou a não ovulação a esse estimulo hormonal, nos protocolos de sincronização da ovulação.
Para solucionar esse problema tem-se utilizado o implante de progesterona ou progestágeno que faz com que o desenvolvimento folicular seja mantido devido a concentração subluteal de progesterona e iniba ovulações antes da aplicação do segundo estimulo hormonal.
Visando diminuir falhas de ovulação ao segundo estimulo hormonal em vacas mestiças (maior proporção de 3 ondas foliculares) tem sido utilizado a antecipação em um dia da aplicação de $PGF_{2\alpha}$ (dia 6 vs. dia 7 do protocolo), pois devido a lise do corpo lúteo e queda da concentração plasmática de progesterona, o folículo continua crescendo e estará responsivo quando da aplicação do segundo estimulo hormonal (VASCONCELOS, et al., 2000).

ESTRATÉGIAS PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE ANIMAIS CONFINADOS

Os animais mantidos em confinamento são geralmente bem alimentados, não apresentam problemas de anestro e nem de ciclo curto, sendo que a primeira ovulação geralmente ocorre entre 20 a 30 dias pós-parto. Nas vacas Holandesas ocorre recuperação do desenvolvimento folicular cerca de 7-10 dias após o parto que é caracterizado pelo crescimento de pequenos (<4mm) ou médios (5-9mm) folículos, e um desses folículos é selecionado e se torna dominante. Neste grupo de animais, por apresentarem alta produção e conseqüentemente baixa concepção, o objetivo é utilizar estratégias para aumentar a taxa de sincronização e a concepção.
Nesse grupos de animais deve-se preocupar com o número médio de dias em lactação das vacas, que reflete a eficiência reprodutiva e interfere na produtividade do rebanho.

		PERSISTÊNCIA (%)		
Produção em 300 dias	**DEL**	**5,0**	**7,5**	**10,0**
9000	150	30,0	30,0	30,0
9000	180	28,5	27,8	27,0
9000	210	27,0	25,7	24,3
6000	150	20,0	20,0	20,0
6000	180	19,0	18,5	18,0
6000	210	18,0	17,0	16,2

AUMENTO DA TAXA DE SINCRONIZAÇÃO

A ovulação ao primeiro estimulo hormonal do protocolo de sincronização se mostrou muito importante no aumento da taxa de sincronização (VASCONCELOS et al., 1999; SANTOS et al., 2003), portanto estratégias devem ser desenvolvidas para aumentar essa resposta.
Uma forma de aumentar a resposta ao primeiro estimulo hormonal é o tratamento prévio com implantes de progesterona ou progestágemos, associado a indução da ovulação com estimulo hormonal.

CONCEPÇÃO

Em vacas leiteiras, a correlação entre produção de leite e ingestão de matéria seca é alta e positiva (0,88). VASCONCELOS (1998) verificou que vacas de maior produção de leite apresentaram menor concentração de progesterona. O aumento da ingestão de matéria seca pode reduzir a concentração de progesterona, o que poderia influenciar negativamente a reprodução. Isto ocorre porque, com a maior ingestão, o fluxo sangüíneo na veia porta é aumentado, disponibilizando mais progesterona no fígado, que será metabolizada. Estes dados sugerem que, vacas de alta produção poderiam apresentar menores níveis de progesterona em função da maior ingestão de matéria seca de dieta com alta densidade nutricional, provavelmente em função do maior fluxo de sangue para o sistema porta e maior "clearance" ou remoção deste hormônio pelo fígado.
Estas informações sugerem que, além do déficit energético que pode afetar negativamente a reprodução, vacas de alta produção de leite podem ter a eficiência reprodutiva comprometida mesmo em situação oposta, caracterizada pelo alto

consumo de matéria seca (e conseqüentemente de energia), devido redução da concentração sérica de progesterona.
Portanto os protocolos de sincronização da ovulação devem ser delineados visando aumentar os níveis de progesterona antes e depois IA, para aumentar a concepção.

SEQÜÊNCIA DE EXPERIMENTOS VISANDO MAXIMIZAR EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE VACAS MANTIDAS A PASTO E VACAS CONFINADAS

VACAS MANTIDAS A PASTO

Objetivos:

- Induzir ciclicidade, devido a baixa persistência da lactação
- Aumentar a taxa de sincronização.

Para chegar a esses objetivos deve-se solucionar os seguintes problemas:

- Anestro pós-parto
- Ondas de crescimento folicular curtas
- Ovulação antes do segundo estimulo hormonal dos protocolos de sincronização
- Não ovulação ao segundo estimulo hormonal dos protocolos de sincronização

ESTRATÉGIAS DESENVOLVIDAS:

Aplicação da prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) no dia 6 após a primeira aplicação de GnRH do protocolo "Ovsynch".

Esse experimento foi conduzido em dois rebanhos leiteiros comerciais (um com vacas Holandesas e outro com vacas Girolandas), em setembro, 1999 (inverno) e janeiro, 2000 (verão).
As vacas (n=159) foram escolhidas aleatoriamente para receber injeção de PGF2α (Cloprostenol sódico, 0,500 mg, Ciosin®) no dia 6 no ponto de acupuntura BAI HUI, localizado no espaço lombo sacro, ou no dia 7 I.M., após a primeira injeção de GnRH (Gonadorelina, 50μg, Cystorelin®). Ambos os grupos receberam a segunda injeção de GnRH 48 horas após a $PGF_{2\alpha}$, e foram inseminadas 12 horas depois.

Taxa de ovulação ao primeiro GnRH e taxa de sincronização, no inverno do que no verão, em vacas Holandesas e Girolandas.

Grau de sangue	Taxa ovulação ao primeiro GnRH		Taxa de sincronização	
	Inverno	Verão	Inverno	Verão
Holandesas	61,4[a]	37,8[b]	72,7[a]	62,2[b]
½ HZ	58,3[a]	45,2[b]	63,9[a]	59,5[a]

Valores com diferentes sobrescritos na mesma linha são diferentes, (P<0,05).

Taxa de regressão do CL e taxa de sincronização da ovulação à aplicação de $PGF_{2\alpha}$ no dia 6 ou 7 do protocolo Ovsynch, em vacas Holandesas e Girolandas.

Aplicação de $PGF_{2\alpha}$	Taxa de regressão CL (%)	Taxa de sincronização (%)		
		Sincronizadas	Ovulação antecipada	Sem ovulação
Dia 6	92	71,6	13,5	14,9
Dia 7	100	58,8	16,5	24,7

Valores com diferentes sobrescritos na mesma coluna são diferentes, (P<0,05).

Vacas mestiças e vacas holandesas durante o verão devem receber a aplicação de a $PGF_{2\alpha}$, no dia 6 após a aplicação do GnRH no protocolo "Ovsynch".

Utilização de dispositivo intravaginal de progesterona entre as aplicação de GnRH e $PGF_{2\alpha}$ do protocolo "Ovsynch"

Vacas Mestiças mantidas em sistema de pastejo rotacionado foram distribuídas aleatoriamente em um dos quatro grupos:

Grupo 1: aplicação de $PGF_{2\alpha}$, à cada 14 dias e IA 12h após observação de cio.

Grupo 2: GnRH -6d- $PGF_{2\alpha}$, -2d- GnRH – 12 a 18h – IA

Grupo 3: GnRH -5d- GnRH -6d- $PGF_{2\alpha}$, -2d- GnRH - 12 a 18h – IA

Grupo 4: GnRH + CIDR -6d - $PGF_{2\alpha}$, + retirada do CIDR -2d- GnRH - 12 a 18h – IA

Efeito de tratamento nas taxas de ovulação (Dias -5 e 0) e de sincronização

Tratamento	Taxa de ovulação e de sincronização		
	GnRH dia -5	GnRH dia 0	GnRH dia 8
2	-------	50.0% (17/34) [a]	58.9% (20/34) [a]
3	57.7% (15/26)	50.0% (13/26) [a]	73.1% (19/26) [ab]
4	-------	48.1% (13/27) [a]	88.9% (24/27) [b]

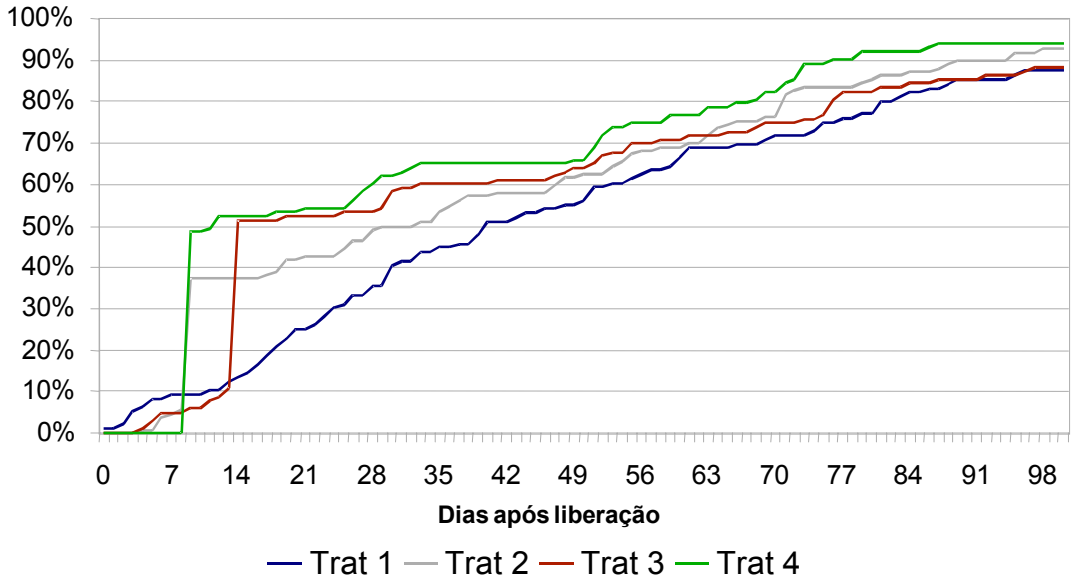
Diferentes letras na coluna (P<0.05).

Dias para primeira inseminação artificial, porcentagem de vacas inseminadas no dia pré-determinado, taxa de concepção à 1a IA das vacas inseminadas no estro e no dia pré-determinado, % vacas prenhez durante os primeiros 21 dias após o PVE, e % vacas prenhez sobre o total de vacas sincronizadas.

Tratamento	**1**	**2**	**3**	**4**
Dias para 1ª IA	118[a]	86[b]	89[b]	92[b]
% de vacas inseminadas no dia pré-determinado		90.0% (99/110)	87.4% (90/103)	99.0% (102/103)
Taxa de concepção à 1ª IA de vacas inseminadas no estro	70.8% (68/96)	54.6% (06/11)	84.6% (11/13)	0.0% (0/1)
Taxa de concepção das vacas inseminadas no dia pré-determinado		33.3% (33/99)[a]	46.7% (42/90)[ab]	49.0% (50/102)[b]
% vacas prenhez nos primeiros 21 das	25.0% (24/96)[a]	42.7% (47/110)[b]	52.4% (54/103)[bc]	54.4% (56/103)[c]
% vacas prenhez / total de vacas sincronizadas		30.0% (33/110)[a]	40.8% (42/103)[ab]	48.5% (50/103)[b]

Diferentes letras na coluna (P<0.05).

Taxa de prenhez após liberação para inseminação artificial.



A adição do implante de progesterona aumenta a taxa de sincronização, a concepção à IATF e a taxa de prenhez

Substituição do 2º GnRH por ECP no protocolo "Ovsynch", em vacas leiteiras Girolandas lactantes primíparas e multíparas mantidas a pasto.

Vacas Mestiças mantidas em sistema de pastejo rotacionado e produção de 13,8±3,2 Kg de leite/dia, com 94±66 DPP, foram distribuídas aleatoriamente em um dos quatro grupos:

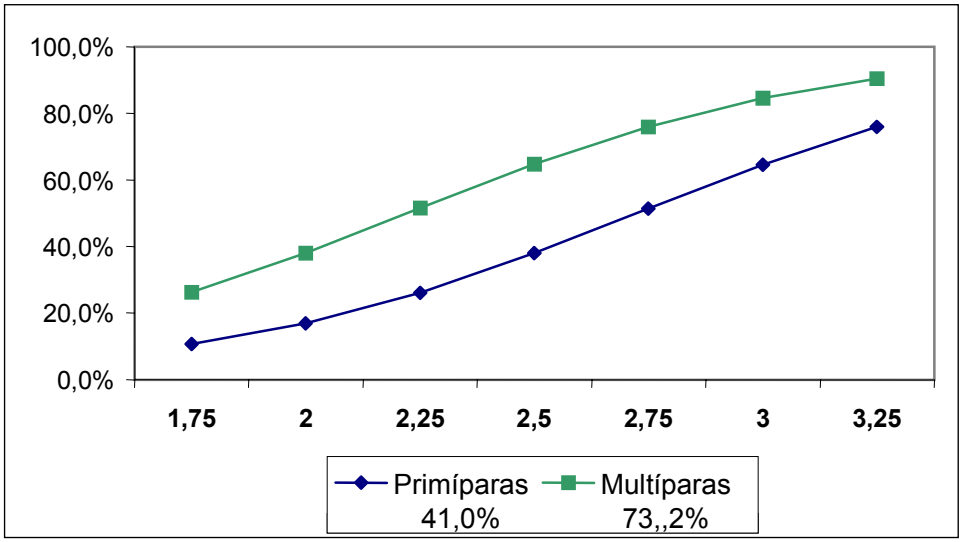
Grupo 1 (N=100) controle, com inseminação artificial (IA) 12h depois da detecção do estro (DE);

Grupo 2 - (N=100) CIDR (Eazi-Breed™CIDR®) + GnRH (Cystorelin®, 50mcg, i.m.) - 6d – retira o CIDR + PGF2α (Lutalyse®, 25mg, i.m.) - IA - 12h depois da DE;

Grupo 3 (N=102) CIDR + GnRH - 6d – retira o CIDR + PGF2α - 24h - ECP (ECP®, 1mg, i.m.), todas as vacas deste grupo foram inseminadas em horário pré-determinado sendo que no período 1, com 48 horas e no período 2 com 36 horas após a aplicação de ECP;

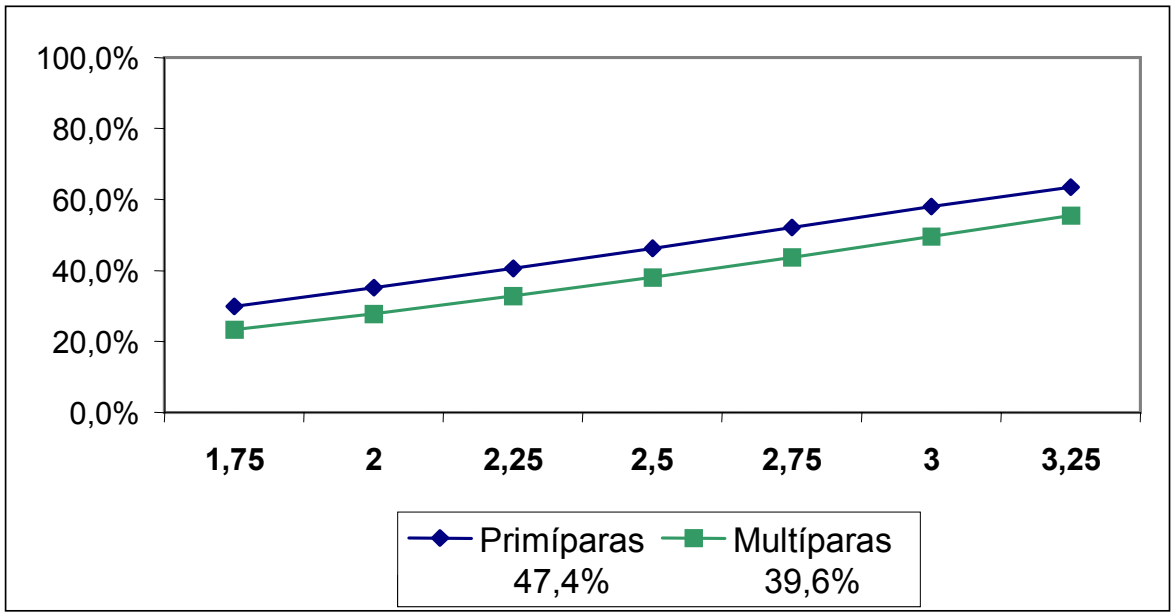
Grupo 4 (N=103) CIDR + GnRH - 6d – retira o CIDR + PGF2α - 36h (período 1) ou 48h (período 2) - GnRH - 12h - AI.

Ciclicidade de acordo com ECC em vacas primíparas e multíparas



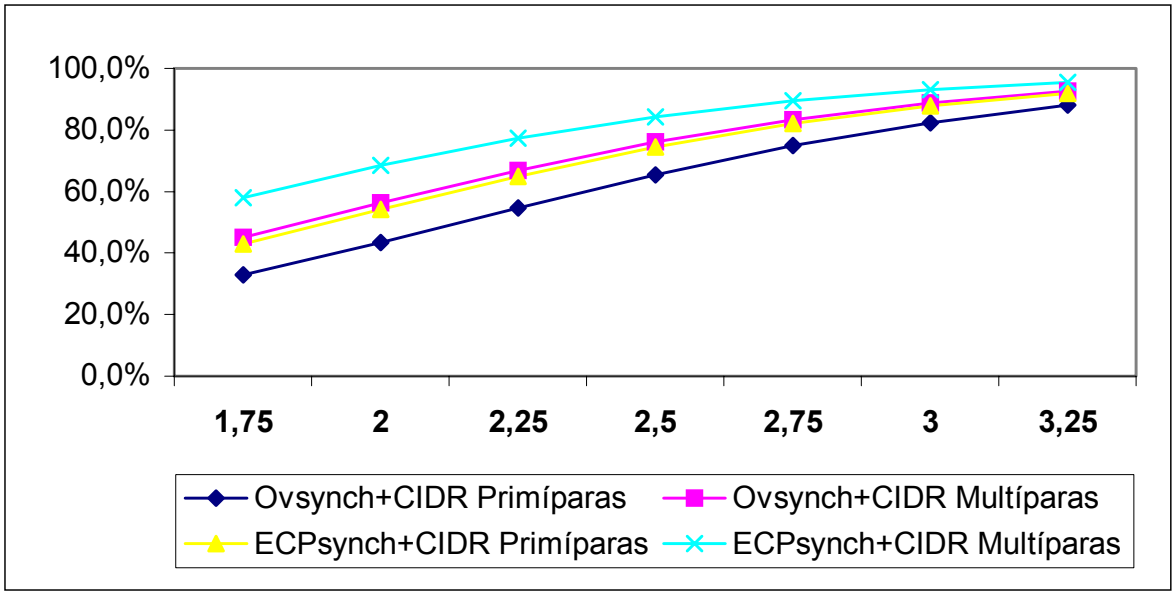
Cada 0,5 ponto a mais no ECC (escala de 0 - 5), a taxa de ciclicidade aumenta 22,4% (P<0,01).

Taxa de ovulação ao primeiro GnRH de acordo com o ECC em vacas primíparas e multíparas

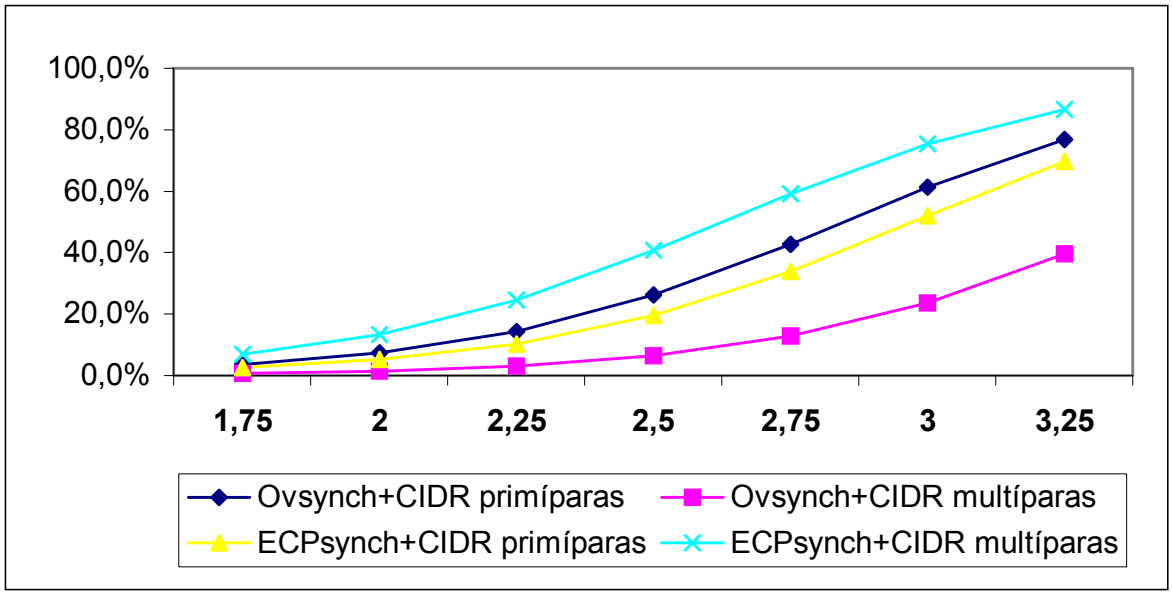


Cada 0,5 ponto a mais no ECC (escala de 0 - 5), a resposta ovulatória ao primeiro GnRH aumenta 11% (P<0,01).

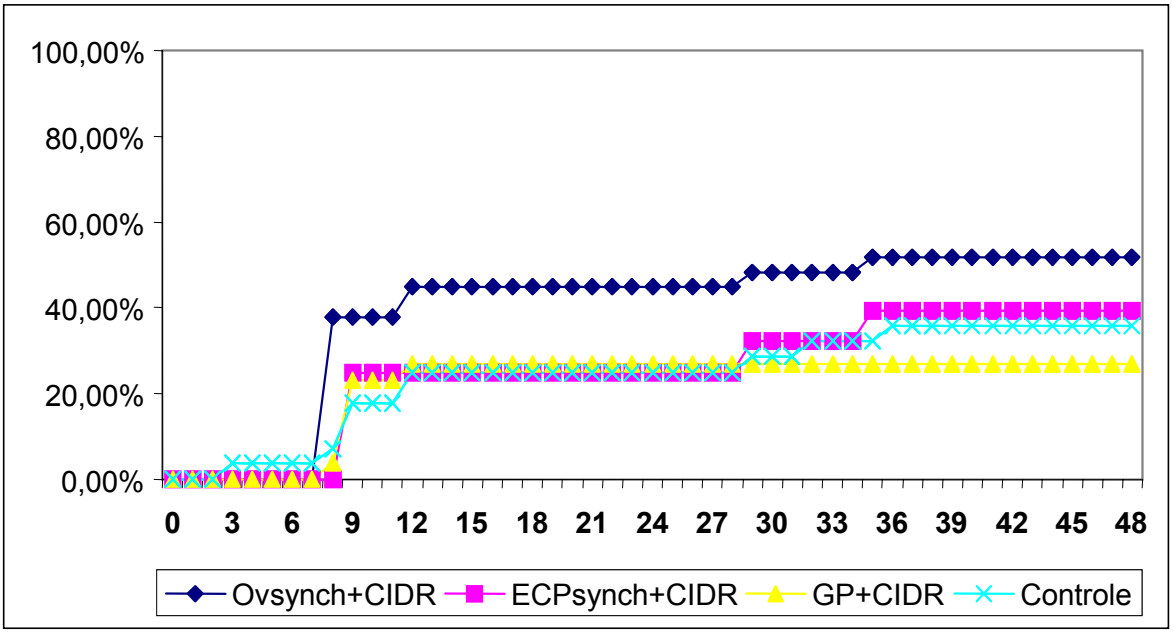
Taxa de sincronização de acordo com os tratamentos e ECC em vacas primíparas e multíparas.



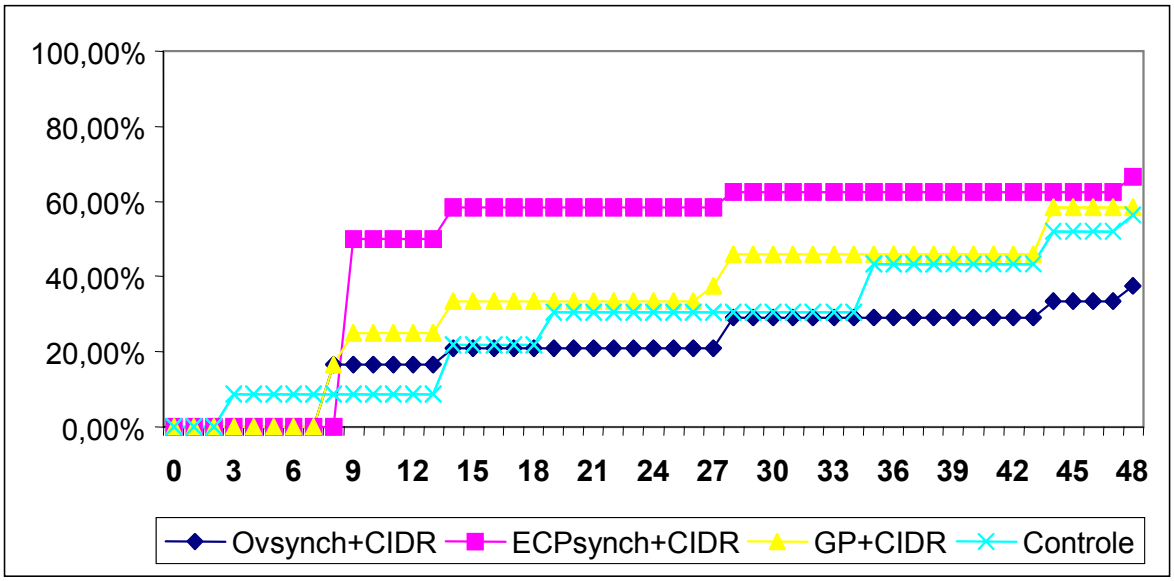
Taxa de Prenhez de acordo com os tratamentos e ECC em vacas primíparas e multíparas



Taxa de prenhez cumulativa, de acordo com os tratamentos, em vacas primíparas



Taxa de prenhez cumulativa, de acordo com os tratamentos, em vacas multíparas

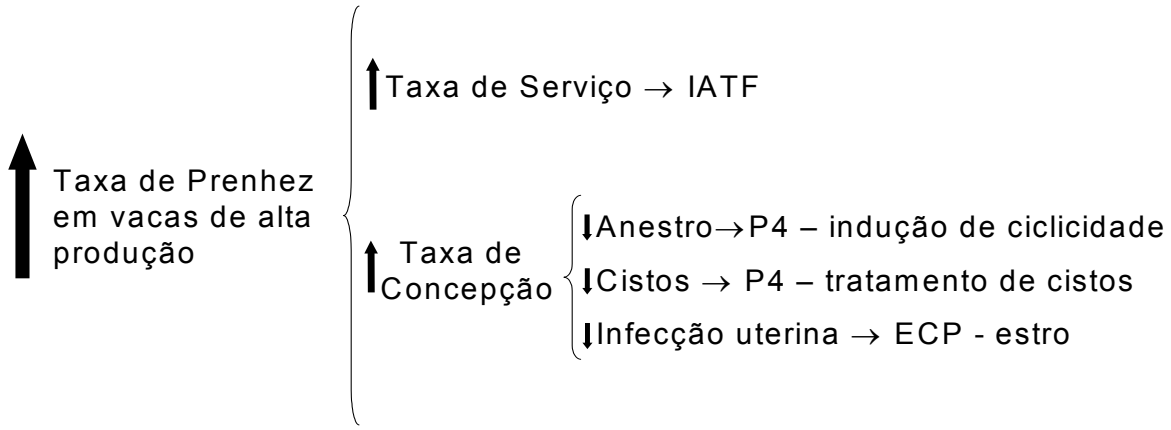


A taxa de prenhez cumulativa foi maior com o uso de GnRH em vacas primíparas e com ECP em vacas multíparas.
O ECP deve substituir o segundo GnRH nas vacas multíparas.
O ECC é importante na ciclicidade, e nas taxas de ovulação ao primeiro GnRH, de sincronização e de prenhez.

VACAS CONFINADAS

Objetivos:

- Aumentar a taxa de sincronização
- Aumentar a concepção



Para chegar a esses objetivos devemos solucionar os seguintes problemas:

- Anestro
- Cistos foliculares
- Baixa taxa de detecção de estro
- Baixa taxa de ovulação ao primeiro estimulo hormonal

Utilizar protocolo que reduza os principais problemas da vacas holandesa de alta produção citados anteriormente.

Vacas Holandesas (N=195), produzindo 30,4 ± 1,3 Kg de leite/dia com 90 ± 23 DEL no momento da IATF foram distribuídas aleatoriamente em 5 grupos:

Grupo 1 (N=37): CIDR (Eazi-Breed™CIDR®) – 7d – retira o CIDR + PGF2α (Lutalyse®, 25mg, im)– 24h - ECP (ECP®,1mg,im) – 2,5d – CIDR – 6d – retira o CIDR + PGF2α - 24h - ECP – 44h – IATF

Grupo2 (N = 36): CIDR – 7d – retira o CIDR + PGF2α – 24h - ECP – 2,5d – CIDR – 6d – retira o CIDR + PGF2α - 48h - GnRH (Cystorelin®, 100mcg, i.m.) – 12h – IATF;

Grupo 3 (N = 37): CIDR – 7 d – retira o CIDR + PGF2α – 48h - GnRH – 24h – CIDR – 6d – retira o CIDR + PGF2α - 24h - ECP – 44h – IATF;

G4 (N = 35): CIDR – 7 d – retira o CIDR + PGF2α – 48h - GnRH – 24h – CIDR – 6d – retira o CIDR + PGF2α - 48h - GnRH – 12h – IATF;

Grupo 5 (N = 50): controle, aplicações de PGF2α a cada 14 dias e IA após detecção de estro.

Efeito dos tratamentos nas taxas de sincronização e de prenhez

Tratamento	Taxa de Sincronização	Taxa de Prenhez
G1	81,1% (30/37)	35,1% (13/37)
G2	88,9% (32/36)	50,0% (18/36)
G3	89,1% (33/37)	32,4% (12/37)
G4	94,3% (33/35)	40,0% (14/35)

Efeito do tratamento na concepção da vacas que foram efetivamente sincronizadas (regressão do CL e ovulação sincronizada)

Tratamento	Concepção
G1	43,3% (13/30) [a]
G2	58,1% (18/31) [b]
G3	36,4% (12/33) [a,]
G4	43,8% (14/32) [a,]
G5	32,0% (16/50) [a,]

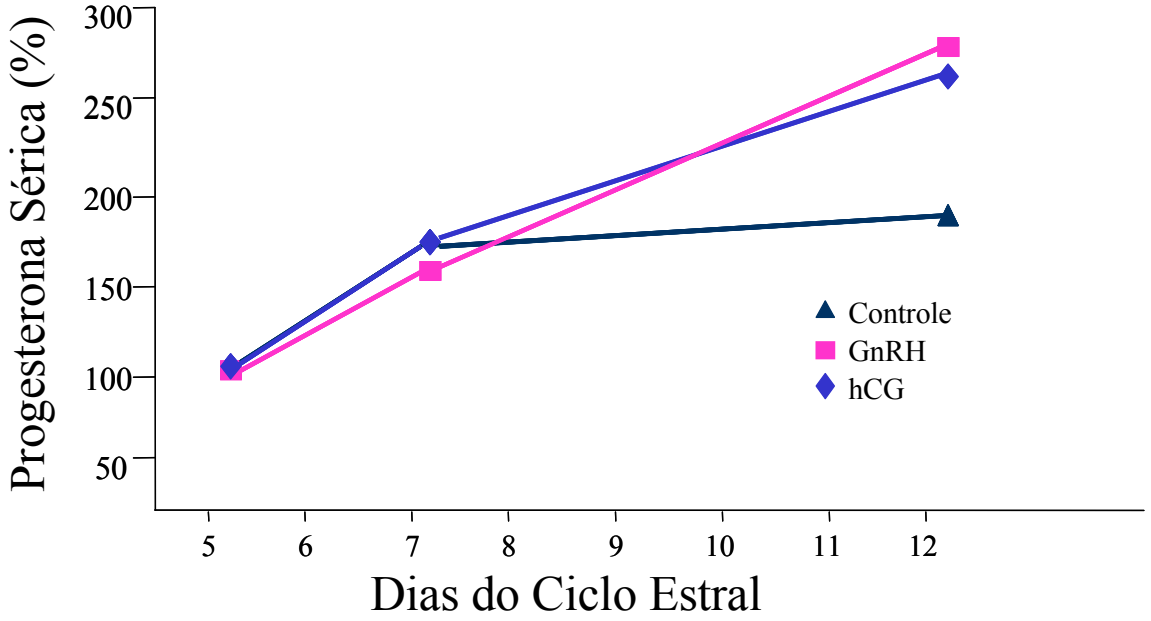
[a], [b] Valores com diferentes sobrescritos na mesma coluna são diferentes (P=0,053)

Este estudo sugere que o protocolo utilizando CIDR/ ECP/ PGF2α/ GnRH aumenta a taxa de prenhez de vacas Holandesas no pós-parto, através do aumento da concepção na primeira inseminação.

Aumentar a concentração plasmática de progesterona após a inseminação artificial. Avaliar o efeito da aplicação de GnRH ou hCG no dia cinco pós IA na concentração sérica de P4 e na taxa de concepção de vacas Holandesas no verão.

Foram utilizadas 158 vacas da raça Holandesa, inseminadas 12 horas após a observação do cio e a temperatura retal foi aferida no momento da IA. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos experimentais: grupo controle (n-52); grupo GnRH (n=55): receberam aplicação de 100mcg IM de Gonadorelina; grupo hCG (n=51): receberam aplicação de 2500 UI IM de hCG. A aplicação dos tratamentos foi realizada no dia 5 pós IA, no período da manhã, considerando o dia do cio como dia zero.

Aumento percentual da concentração de progesterona



Taxas de concepção (%) conforme o tratamento realizado no dia 5 pós IA e temperatura retal no momento da IA.

GRUPO (n)	TAXA DE CONCEPÇÃO (%) (prenhes/total)	
	< 39,7°C	≥ 39,7°C
Controle (52)	10,14 (3/26)^{A}	15,19 (4/26)^{A}
GnRH (55)	36,86 (9/27)^{B}	17,78(6/28)^{A}
hCG (51)	32,79 (7/21)^{B}	24,37(7/30)^{A}

A,B: valores na mesma coluna com diferentes sobrescritos diferem estatisticamente (P<0,01).

Visando o aumento da concepção no verão, em vacas com temperatura retal <39,7°C no momento da IA é indicada a aplicação de GnRH ou hCG no dia 5 pós IA, enquanto

que em vacas com temperatura retal ≥ 39,7 °C este tratamento não é indicado. Sugere-se TE neste grupo de animais.

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES COMO FERRAMENTA PARA MELHORAR OS ÍNDICES REPRODUTIVOS

Uma técnica promissora para melhorar os índices reprodutivos no verão é a transferência de embriões. Considerando que os embriões mais jovens são os mais sensíveis, a transferência destes para receptoras nos dias 7 ou 8 após o cio, pode resultar em maior taxa de concepção em relação à inseminação artificial.

Em trabalho realizado durante o verão, no Brasil, Demétrio et al. (2004) avaliaram a concepção após inseminação artificial (IA) ou transferência de embriões (TE) em vacas Holandesas lactantes. Vacas ciclando (n = 251) produzindo 33,5 ± 7,2 Kg de leite por dia com 174,4 ± 116,2 DPP receberam uma aplicação de PGF2α (Lutalyse®, 25 mg, IM). Vacas detectadas em cio entre 48 e 96 horas após a aplicação PGF2α (n = 106) foram divididas em dois grupos: Grupo IA – (n = 57) inseminação 12 horas após a detecção do cio e Grupo TE - (n = 49) transferência de embrião fresco (grau 1 e 2) 6 a 8 dias após a detecção de cio, por um técnico treinado. A produção de leite foi avaliada diariamente e foi utilizada a média de 7 dias de produção (a partir do dia da detecção do cio). A prenhez foi detectada entre os dias 25 e 32 após a detecção do cio por exame ultra-sonográfico.

A concepção foi afetada pelo tratamento (P = 0,07) e os resultados ajustados foram 31,6% de concepção no grupo IA e 54,4% no grupo TE. Foi detectada uma interação entre produção de leite e tratamento (P < 0,05). Vacas com produção abaixo da média (33,5 kg de leite/dia) tiveram concepção similar nos dois grupos, sendo 49,1% (n = 26) no grupo IA e 40,1% (n = 24) no grupo TE. Vacas com produção acima da média tiveram diferente concepção no grupo IA (14,01%; n = 31) e no grupo TE (68,7%; n = 25).

Este estudo sugere que a transferência de embrião pode ser usada como ferramenta para aumentar a concepção de vacas de leite de alta produção e não somente de vacas “repeat breeders”. Também sugere que os efeitos negativos da produção de leite na concepção podem estar ocorrendo nos 7 primeiros dias após a ovulação.

A transferência de embriões associada à sincronização de ovulação pode vir a ser uma técnica promissora para aumentar a taxa de prenhez em vacas leiteiras. Pois os custos com mão-de-obra da produção de embriões ficam reduzidos quando as colheitas e as transferências podem ser feitas em dias programados, facilitando também a inovulação de embriões frescos, o que aumenta a concepção.

PERDA EMBRIONÁRIA PRECOCE

A concepção decresce conforme a produção de leite aumenta. Atualmente a concepção em vacas de alta produção de leite é em torno de 40% enquanto que nas novilhas é de 74% (PURSLEY et al., 1997). Stevenson et al. (1995) mostraram que a perda embrionária em vacas de leite em lactação é maior que em novilhas (20 vs. 5%). É possível que o mesmos fatores que reduzem a concepção também aumentem a perda embrionária.

Em um estudo com 111 rebanhos de Israel, Markusfel-Nir (1997) avaliou 58.048 gestações por palpação retal entre os dias 40 e 50 após a IA e verificou 10,2% de perda embrionária. A perda embrionária foi maior em vacas de leite lactantes (primeira lactação = 19,8%; segunda lactação 19,8% e três ou mais lactações = 17,1%) do que

em novilhas (4,5%). A perda embrionária foi quatro vezes maior no primeiro trimestre da gestação quando comparado com o segundo e o terceiro.
A maioria dos estudos sobre perda embrionária não fizeram avaliações antes do dia 45 de gestação. Sreenan & Diskin (1986) mostraram que a taxa de fertilização em vacas é 90 a 95% e também sugeriram que a perda embrionária ocorre entre os dias 8 e 20, momento em que o embrião começa a se alongar e produzir sinais para o reconhecimento materno da gestação.
Vasconcelos, et al. (1997) avaliaram a perda embrionária em 1444 vacas de leite de alta produção de três rebanhos. Foi realizado exames de ultra-som para diagnóstico de gestação nos dias 28, 42, 56, 70 e 98 após a IA. A perda embrionária total foi de 25% sendo que a maioria (17%) ocorreu durante os primeiros 60 dias. Certamente ocorre uma grande perda embrionária antes do dia 28, entretanto ainda não existe um método preciso de diagnóstico nesta fase.

Efeito do momento da IA após o segundo GnRH do protocolo Ovsynch na taxa de prenhez e na perda de gestação em vacas Holandesas em lactação (VASCONCELOS et al., 1997).

Taxa de Prenhez no dia 28 pós IA % (n)	Perda de Gestação nos intervalos 1 % (n)					
	28-42	43-56	57-70	71-98	99-parto2	Total3
32,4 (468/1444)	10,5 (49)	6,3 (26)	2,1 (8)	1,3 (5)	7,7 (27)	26,5 (115)

1Calculo % perda de gestação = Numero de perdas * 100 /vacas gestantes antes do período - vacas descartadas no período;
2Período de gestação = 281 ± 5.6 dias;
3 Foram descartadas 31 vacas durante o experimento.

Não pode-se esquecer que uma potencial causa da baixa concepção e perda embrionária são as doenças infecciosas (virais e bacterianas). Por isso rebanhos leiteiros devem sempre tem um bom programa de vacinação.

EFEITO DE TOURO NA TAXA DE PERDA DE GESTAÇÃO EM VACAS HOLANDESAS

Vacas mais produtivas são as que apresentam maior produção de leite por dia de intervalo entre partos. A taxa de perda de gestação entre os dias 28 e 98 em vacas Holandesas é de aproximadamente 20% (VASCONCELOS et al., Biol. of Reprod., suppl.1; v.56; p.140; 1997).
Este trabalho teve como objetivo avaliar se raça do touro ou touro influenciam a taxa de perda de gestação. Este estudo foi realizado na Fazenda São João, Inhaúma, MG (janeiro e fevereiro de 2004), e foram utilizados dados de 279 vacas (25,3 ± 8,94 Kg de leite/dia e 259,9 ± 152,30 dias pós-parto no dia da IA) gestantes de 3 touros da raça Gir (201 gestações) e dois touros da raça Holandesa (78 gestações), diagnosticadas gestantes por ultra-sonografia entre os dias 28 e 35 após a IA e submetidas a novo diagnóstico de gestação, por palpação retal, entre os dias 70 e 84 após a IA.
Foi considerada perda de gestação quando as vacas foram observadas em estro ou diagnosticadas vazias na palpação retal. Os dados foram analisados pelo GLM, sendo incluídas no modelo as variáveis touro, raça do touro (Gir vs. Holandês), dias pós-parto, produção de leite nos sete dias anteriores à IA, ordem de lactação, tipo de inseminação (IATF vs. IA 12 horas após a detecção do estro).

Não foi detectado efeito de raça do touro na taxa de perda de gestação (15,38 ± 3,93% para touros Holandeses vs. 13,43 ± 2,45% para touros Gir).
É interessante observar que foi detectado efeito de touro (P<0,05) na taxa de perda de gestação, sendo que os touros da raça Gir apresentaram taxa de perda de gestação de: 18,6 ± 5,24% (touro 1); 8,1 ± 3,99% (touro 2) e 15,47 ± 3,75% (touro 3) e os touros da raça Holandesa: 10,0 ± 4,44% (touro 1) e 33,3 ± 8,10% (touro 2).
Não foi detectado efeito do tipo de inseminação (16,9 ± 3,45% na IATF vs. 17,2 ± 2,95% na IA 12 horas após detecção estro) na taxa de perda de gestação.
As variáveis dias pós-parto, produção de leite nos sete dias anteriores à IA e ordem de lactação também não influenciaram a perda de gestação.
Estes dados indicam que alguns touros têm maior efeito na manutenção da gestação, independente da raça. Estes touros devem ser detectados e utilizados estrategicamente para aumentar a taxa de parição de vacas Holandesas lactantes.

Resultados práticos da utilização de protocolos de sincronização em fazendas comerciais

Vacas confinadas (Holandesas)

Mês da IA	Nº de inseminações	Concepção (%)
Abril/2003	165	24,2
Maio/2003	402	24,4
Junho/2003	347	32,8
Julho/2003	588	31,5
Agosto/2003	530	31,3
Setembro/2003	632	24,7
Outubro/2003	539	26,5
Novembro/2003	487	21,3
Dezembro/2003	387	23,0
Janeiro/2004	393	9,9
Fevereiro/2004	507	11,2
Março/2004	460	21,5

Tipo de inseminação	Número de inseminações	Concepção (%)
IA após detecção de cio	3551	25,8
IATF	2015	23,3

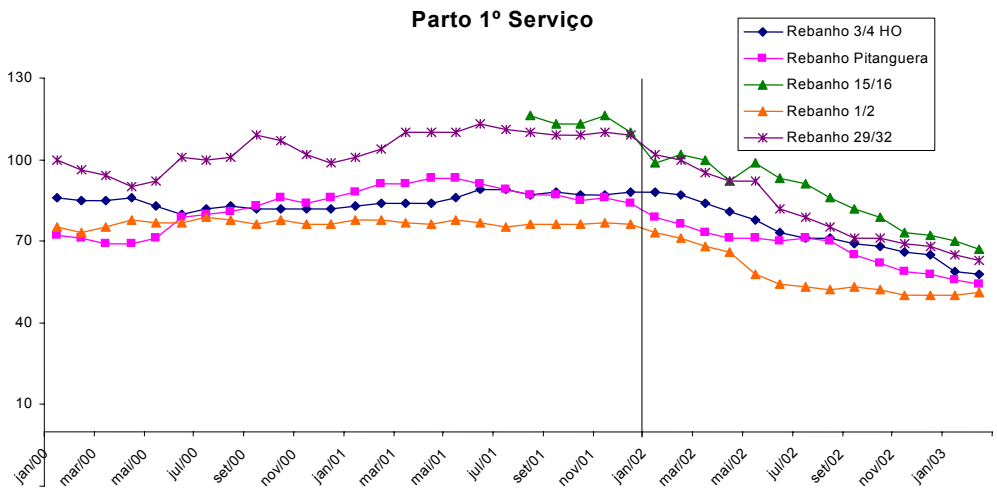
Ordem de Lactação	Número de inseminações	Concepção (%)
1ª	3297	24,1
2ª	2106	26,7
3ª	35	22,9

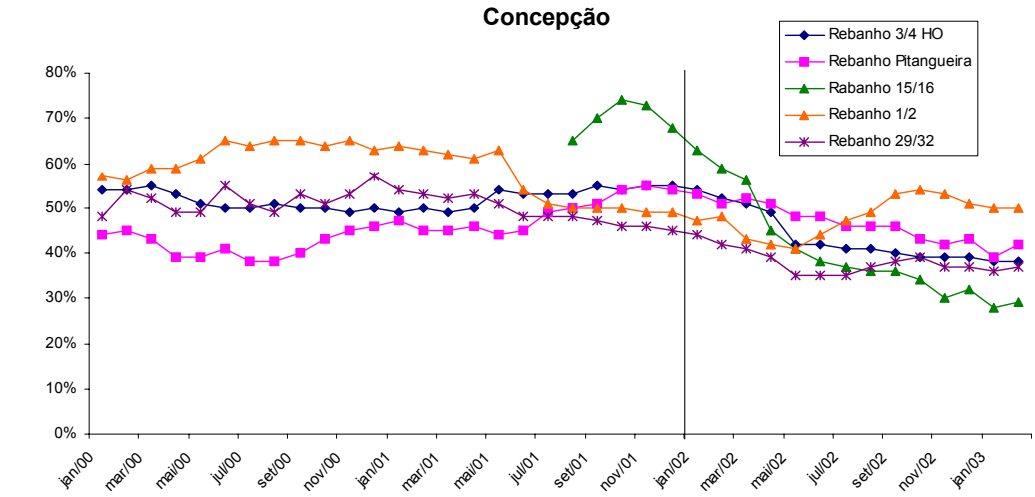
Touro	Número de inseminações	Concepção (%)
A	152	22,4
B	154	27,3
C	552	28,4
D	539	27,1
E	490	23,9
F	331	27,8
G	660	24,2
H	302	18,2
I	31	32,3
J	61	31,1
K	659	24,9
L	521	22,5
M	248	29,0
N	348	23,3
O	374	25,9
P	141	14,9
Inseminador	**Número de inseminações**	**Concepção (%)**
A	139	28,1
B	233	26,6
C	670	24,8
D	932	24,5
E	489	26,6
F	2377	23,8
G	531	25,0
H	108	29,6
I	56	32,1

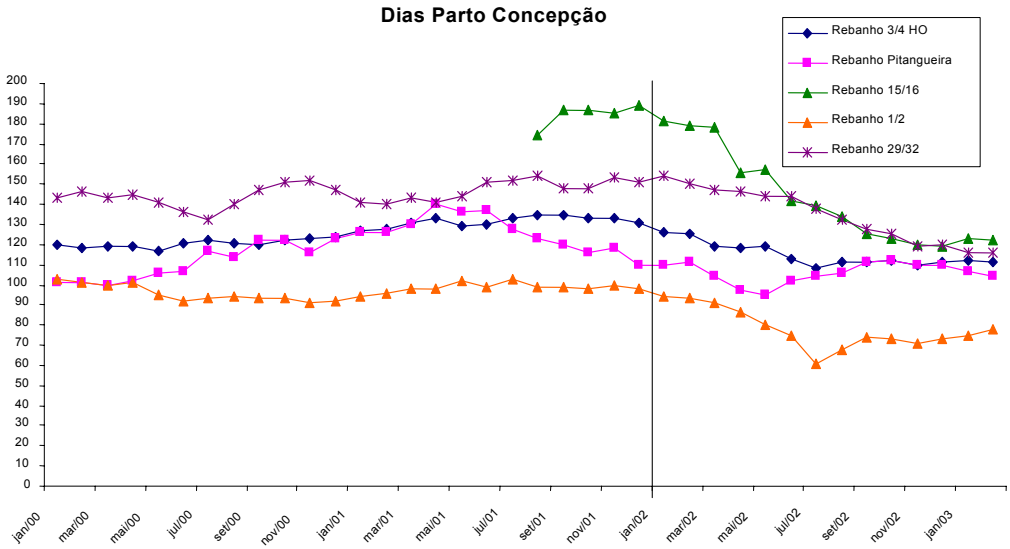
A utilização da IATF não alterou a taxa de concepção da fazenda, porém possibilita aumento do número de animais inseminados, com aumento da taxa de prenhez.

Vacas mantidas a pasto (mestiças)

Foi utilizado o Protocolo: GnRH + CIDR -6d - $PGF_{2\alpha}$, + retirada do CIDR -2d- GnRH - 12 a 18h – IA, para vacas primíparas e o Protocolo: CIDR + GnRH - 6d – retira o CIDR + PGF2α - 24h - ECP (ECP®, 1mg, i.m.) - 48h – IA, para as vacas multíparas.







A utilização da IATF antecipou a primeira inseminação, reduziu a taxa de concepção, porém reduziu o intervalo parto/concepção.

CONCLUSÕES

Existem muitos fatores que interferem na eficiência reprodutiva das vacas de leite, muitos estudos ainda deverão ser realizados visando entender melhor o processo e consequentemente desenvolver novas estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva tanto dos animais mantidos a pasto como dos animais confinados.
Dados sugerem que diminuição do intervalo entre partos em 30 dias permite aumento da produção de leite em rebanhos puros, por diminuir o numero médio de dias em lactação em aproximadamente 15 dias e conseqüentemente aumento de 5% na produção de leite.
Já em rebanhos mestiços, diminuição do intervalo entre partos em 30 dias permite aumentar em aproximadamente 5% o numero de animais em produção, o que também representa mais leite pelo maior numero de animais em produção.
Isto mostra que boa eficiência reprodutiva esta relacionada com diluição do custo fixo e por maior produção de leite por unidade animal ou por área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRITT, J. H. Enhanced reproduction and its economic implications. *J. Dairy Sci*., v.68, p.1585-92, 1985.

FOOTE, R.H. Estrus detection and estrus detection aids. *J. Dairy Sci*., v.58, p. 248- 56, 1975.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. of Reprod.,* v.50, p.225-232, 1994.

GUILBAULT, L. A. et al. Influence of a physiological infusion of prostaglandin F2α into postpartum cows with partially supressed endogenous production of prostaglandins. 1. Uterine and ovarion morphological responses. Theriogenology, v.27, p.931, 1987.

LUCEY, S., ROWLANDS, G.J., RUSSEL, A.G. The association between lameness and fertility in dairy cows. Vet. Rec., v. 118 , p.628-31, 1986.

POSTON, H. A., ULBERG, L.C., LEGATES, J.E. Analysis of seasonal fluctuations of reproductive performance in dairy cows. J. Dairy Sci., v.45, p.1376-82, 1962.

PURSLEY, J.R., WILTBANK, M.C., STEVENSON, J.S., et al., Pregnancy rate per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.,* v.80, p.295-300, 1997.

RIVERA, G.M. et al. Ovarian follicular wave synchronization and induction in postpartum beef cows. Theriogenology, v.49, p.1365- 75, 1998.

SANTOS, R.M.; VASCONCELOS, J.L.M.; MENEGUETTI, M.; SILVA, E.P.B.C.; WECHSLER,F.S. Effects of the ovulatory response to the first GnRH injection on synchronization and pregnancy rates in lactating dairy cows. *J. Dariy Sci.,* v.86, suppl.1, p.185, 2003.

TROXEL, T. R. & KESLER, D. J. The effect of progestin and GnRH treatments on ovarian function and reproductive hormone secretions of anestrous postpartum suckled beef cows. Theriogenology, v.21, p. 699- 708, 1984.

VASCONCELOS, J.L.M. Avaliação da sincronização de ovulação e fatores relacionados com a produção de leite e taxa de concepção em vacas. Jaboticabal, SP: UNESP – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, 1998, Dissertação (Doutorado).

VASCONCELOS, J.L.M., ARAUJO, T.P.B., CERRI, R.L.A., VALARELLI, R.L., WESCHLER,F.S. Ovulation and synchronization rates in Holstein and crossbred lactating dairy cows during two seasons when receiving the PGF2α injection on d 6 or 7 of the Ovsynch protocol. J. Dariy Sci., v.83, suppl.1, p.214, 2000.

VASCONCELOS, J.L.M.; SILCOX, R.W.; ROSA, G.L.M.; PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. Theriogenology, v.52, p.1067-1078, 1999.

PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO E INDUÇÃO DE ESTROS EM VACAS DE CORTE NO RIO GRANDE DO SUL

Ricardo Macedo Gregory & Dimas Correa Rocha
Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Veterinária – UFRGS
baragem@terra.com.br

A fertilidade das vacas é considerada como item de maior importância a afetar economicamente os rebanhos de corte. Por outro lado, o peso à desmama dos terneiros, aferido em determinado momento, constitue-se, associado ao total de animais desmamados, na forma mais precisa de avaliar a produtividade da exploração pecuária de corte. A eficiência reprodutiva das vacas é medida tomando-se em conta o número de animais expostos aos serviços de reprodução e o número de terneiros desmamados. O peso total de terneiros desmamados depende de seu número e seu peso final. Diversos trabalhos demonstram que é mais rentável aumentar o número de terneiros obtidos à desmama do que aumentar o seu peso. O peso à desmama, além de envolver características herdáveis de crescimento, está também influenciado pela idade do terneiro. Deste modo, os terneiros que nascem no início da estação de partos, certamente serão os mais pesados no momento da desmama. Outro fator a considerar, é a uniformidade da idade dos terneiros, ou seja, quanto menor o período de parição mais parelhos serão os produtos à desmama. Analisando os fatos anteriormente enumerados, bastante clara se torna a necessidade da obtenção de altos porcentuais de gestação, associados a uma parição uniforme e mais precoce possível dentro da estação reprodutiva.

Com o objetivo da obtenção de alta eficiência reprodutiva em gado de corte pode-se atuar, portanto, buscando máxima eficiência reprodutiva das vacas, redução no número de perdas durante a gestação, parição mais precoce e concentrada possível dentro da estação reprodutiva e baixa mortalidade dos terneiros do parto ao desmame.

A pecuária de corte caracteriza-se ainda em nosso meio como uma atividade com ciclo de produção longo e de pouca eficiência. Das diversas causas que contribuem para o baixo desfrute resultante, a falha na reprodução decorrente principalmente da nutrição deficiente é a que determina os maiores prejuízos. Para que as vacas de corte mantenham um intervalo entre partos de até um ano, é necessário que sejam cobertas e a concepção ocorra até 82 dias após o parto, considerando-se um período de gestação de 283 dias.

A aciclia prolongada com anestro no pós-parto é o principal fator envolvido na baixa taxa de repetição de cria, especialmente em vacas primíparas. Alternativas para reduzir a falha reprodutiva, como, “flushing” antes do primeiro acasalamento, manejo da condição corporal ao parto, desmame temporário e desmame precoce aos 60 dias, têm sido recomendadas.

O objetivo principal na primeira temporada reprodutiva é de que as novilhas concebam o mais cedo possível dentro da estação de acasalamento para com isto, parirem no início da temporada subseqüente aumentando as chances de repetição de crias. (Lobato & Azambuja,2002)

O uso da suplementação de progesterona com o intuito de sincronização de estros em novilhas é uma hormonioterapia a ser levada em conta no manejo da reprodução em gado de corte. A progesterona quando administrada a novilhas, inclusive às pré-puberes é capaz de iniciar a atividade cíclica estral, efeito este devido a um aumento na secreção pulsátil de LH que é responsável pela aceleração do crescimento folicular (Patterson et al., 1990).

SINCRONIZAÇÃO E INDUÇÃO DE ESTROS NA NOVILHA VISANDO A PRIMEIRA INSEMINAÇÃO

O acasalamento de novilhas, nas condições de manejo no RS na maioria das explorações prevê o primeiro serviço aos 24-26 meses de idade. Com este objetivo, não são necessários ganhos de peso do desmame ao primeiro serviço muito expressivos. Entretanto para raças britânicas como Hereford e Aberdeen Angus, as novilhas para apresentarem alto porcentual de atividade cíclica já no início da estação reprodutiva, devem apresentar pesos em torno de 290 kg. As raças sintéticas resultantes do cruzamento de *Bos taurus* com *Bos indicus* como Braford e o Brangus são um pouco mais tardias necessitando pesos um pouco maiores no início da estação reprodutiva.

A sincronização e a indução de estros na primeira estação reprodutiva pode ser considerada como metodologia capaz de incrementar o índice de repetição de cria nas primíparas, principalmente por resultar na concentração das parições no início da temporada. Os procedimentos que prevêem a sincronização de estros e indução da ovulação, tanto em novilhas cíclicas como nas ainda em aciclia, pelos efeitos enumerados anteriormente, devem fazer parte do manejo da reprodução visando especialmente a utilização da inseminação em tempo pré-fixado (IATF).

Programas de sincronização de estros em novilhas oferecem uma série de benefícios dentro de uma exploração moderna de corte, sendo as principais:

1) Pré-fixação do momento do estro ou da inseminação artificial;
2) Redução de custos de mão de obra;
3) Redução do período de parição com conseqüente uniformidade de produtos e menor tempo de observação dos partos; e;
4) Maior praticidade na execução de programas de inseminação artificial.

Randle (1993) sugere que o manejo da reprodução em gado de corte deve ter como objetivo principal a obtenção de 70% das vacas parindo nos primeiros 21 dias da estação reprodutiva. A grande maioria dos rebanhos, porém, apresenta histogramas de parição dispersos em intervalos que se estendem por longos períodos.

A concentração das parições no início da estação reprodutiva só será obtida através de programas de manejo que contemplem desde a criação da terneira, com altos pesos à desmama, ganhos de peso da desmama ao primeiro acasalamento, até maior número de concepções o mais precoce possível na estação reprodutiva.

Para obtenção do maior número possível de concepções no início da estação reprodutiva, deve-se considerar o uso de hormonioterapias que objetivam a indução e sincronização da ovulação e do estro.Obviamente estes recursos só encontram indicação uma vez preenchidos requisitos outros, em especial aqueles associados ao manejo nutricional.

Dentro da filosofia de buscar-se o maior número de partos o mais cedo e mais concentrado possível na estação reprodutiva com reflexos diretos no histograma de parição que pode influenciar a repetição de crias nas primíparas, realizou-se um experimento com novilhas de corte.

Gregory et al (2004) testaram uma proposta de manejo para novilhas que constou da utilização de um protocolo misto de observação de estros, aplicação de prostaglandina e inseminação artificial em tempo fixo com gestágenos. Foi realizado um experimento em que foram utilizadas 194 novilhas Hereford e Braford de 24 –26 meses de idade divididas em dois grupos experimentais. O primeiro grupo foi submetido ao controle de estro tradicional (manhã – tarde) e inseminação por 7 dias e no sétimo dia aplicação de PGF (150 ug D (+) Cloprostenol – Veteglan – Calier) em todas as novilhas ainda não

inseminadas e observação de estro e inseminação por mais 5 dias . Ao final do 5º dia todas as novilhas ainda não inseminadas por não terem sido observadas em estro, foram submetidas a uma aplicação de 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE) e a inserção de uma esponja intravaginal impregnada com 250 mg de acetato de medroxi progesterona (MAP) por 7 dias . No momento da retirada da esponja foi aplicado PGF e 24 hs após foi aplicado 1 mg de BE. Todas as novilhas foram inseminadas 52 a 56 horas após a retirada do implante. Ao final deste período as novilhas foram submetidas a repasse durante 40 dias com 2 touros Hereford. O outro, grupo denominado controle, foi submetido a um manejo convencional de inseminação artificial com observações de estros diárias duas vezes ao dia e inseminação no turno subseqüente durante 45 dias seguido de um período de repasse com 2 touros Hereford por 20 dias.Tanto no grupo tratado como no controle resultaram 89 (91,75%) novilhas gestantes que foram acompanhadas quanto ao seu desempenho reprodutivo como primíparas na temporada seguinte quando submetidas a um período de serviço de 70 dias por monta natural com 6 touros.Observaram-se os animais quanto à data de parto, histograma de parição e repetição de crias.
Os partos acumulados por período de parição estão expressos na Tabela 1

Tabela 1: Distribuição acumulada de partos em primíparas submetidas à sincronização de estros ou não

PARTOS		20/8 A10/9		11/9 A 30/9		01/10 A 20/10		21/10 A 10/11	
	N	N	%	N	%	N	%	N	%
Tratadas	89	44[a]	49,4	73 [a]	82,0	77 [a]	86,5	89 [a]	100
Controle	89	30[b]	33,7	46 [b]	51,7	68[a]	76,4	89 [a]	100

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ($p<0,05$)

Observou-se diferença significativa na concentração das parições ocorridas nos 20 e até os 40 dias da temporada reprodutiva nas novilhas submetidas à sincronização de estros ou não quando do primeiro serviço.
Após a classificação de acordo com o período de parição observou-se o índice de repetição de crias nos dois grupos. Os resultados estão expressos na tabela 2

Tabela 2 Repetição de crias em novilhas submetidas à sincronização e indução de estros ou não de acordo com a distribuição de partos

PARTOS	TOTAL	20/8 A10/9		11/9 A 30/9		01/10 A 20/10		21/10 A 10/11	
	(%)	Prenhe	Vazia	Prenhe	Vazia	Prenhe	Vazia	Prenhe	Vazia
Tratadas	65 [a](73)	37	7	19	10	4	0	5	7
Controle	49 [b](55)	21	9	10	6	12	10	6	15

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença. estatística ($p<0,05$)

O manejo hormonioterápico, conforme indicam estes resultados preliminares, foi capaz de induzir a uma concentração significativa das parições no início da temporada reprodutiva que resultou em um índice de repetição de cria significativamente maior nas novilhas submetidas à sincronização de estros na primeira temporada de reprodução.
No caso deste experimento os resultados não foram mais evidentes visto se tratarem de novilhas que se apresentavam ao início do período de inseminação artificial com excelente condição corporal o que resultou em uma boa atividade cíclica também no grupo controle não sendo tão evidente o efeito de “priming” da progesterona observado em novilhas com estado reprodutivo marginal ao início da puberdade.

INSEMINAÇÃO DA VACA DE CORTE COM TERNEIRO AO PÉ

A causa mais importante de falha reprodutiva pós-parto na vaca de corte é decorrente da aciclia devida à inatividade ovariana. Este quadro ocorre especialmente associado à amamentação, a deficiências nutricionais e a fatores relacionados à presença do terneiro ao pé. (Zaleski et al, 1990)
Entre as medidas que podem ser adotadas para melhorar o desempenho reprodutivo em rebanhos de corte estão: a adequação da época de parição, redução da incidência de distocias, introdução de planos nutricionais, bioestimulação, indução e sincronização de estros férteis através de terapias hormonais assim como, manejos da amamentação e práticas de desmame.
As dificuldades de manejo da inseminação artificial da vaca com terneiro ao pé tem motivado diferentes estudos no sentido de possibilitar o uso desta biotécnica nesta categoria. A inseminação artificial em tempo fixo além de dispensar o controle de estros tem-se mostrado uma alternativa capaz de diminuir os efeitos negativos dos manejos inerentes ao uso desta técnica sobre a vaca e o terneiro (Colazo et al ,1998).

USO DE HORMÔNIO ESTIMULANTE DA FUNÇÃO OVARIANA DA VACA DE CORTE NO PÓS-PARTO

A utilização de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) baseia-se na estimulação do desnvolvimento folicular, em especial por possuir efeito similar ao FSH. A administração de eCG tem sido apontada como de utilidade em protocolos para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em vacas de corte com cria ao pé (Cavalieri et al. 1997 & Madureira et al., 2001). O eCG aplicado na dose de 400 UI no momento da retirada dos implantes de progesterona poderia, segundo Bó et al (2004) incrementar as porcentagens de prenhez em vacas em anestro.
No intuito de avaliar a utilidade da aplicação de eCG em protocolos com gestágenos em vacas de corte com terneiro ao pé, nosso grupo de pesquisa realizou os experimentos descritos a seguir.
Gonçalves (2001) durante o período reprodutivo de janeiro a abril de 2000 utilizando 133 vacas Braford (½ Nelore x ½ Hereford) multíparas com cria ao pé com aproximadamente 100 dias de pós-parto e condição corporal média de 3 (escala 1 a 5), realizou um implante auricular subcutâneo de 3 mg de Norgestomet (Crestar, Intervet) associado à aplicação im de 3 mg de Norgestomet e 5 mg de Valerato de Estradiol. Após dez dias de permanência, o implante foi removido e os animais foram submetidos a quatro tratamentos distintos conforme descrito a seguir. O Grupo I (Controle) não recebeu tratamento algum, o Grupo II (eCG 300) recebeu 300 UI de eCG (Folligon, Intervet), o Grupo III (eCG 500) foi tratado com 500 UI de eCG e ao Grupo IV (eCG 700) foram administradas 700 UI de eCG. Todas as vacas foram IATF entre 52 a 54 hs após a retirada do implante auricular. Quinze dias após a IATF as vacas foram submetidas a repasse com 3 touros. Aos 40 e aos 100 dias após a IATF as vacas foram examinadas por palpação retal para identificação dos animais que conceberam por IATF ou por repasse. As taxas de prenhez obtidas não diferiram significativamente entre os grupos (p>0,05) tanto para as gestações obtidas por IATF como para aquelas resultantes do repasse com touros. Os resultados estão expressos nas tabelas 3 e 4 respectivamente.

Tabela 3 Taxas de prenhez após diferentes tatamentos com eCG resultantes de IATF

		Prenhez	
Dose	N	N	%
Controle	33	11	33,3
300 UI	34	17	50,0
500 UI	33	13	39,4
700 UI	33	15	42,5

(p>0,05)

Tabela 4 Taxas de prenhez após diferentes tatamentos com eCG ao final da temporada reprodutiva

		Prenhez	
Dose	N	N	%
Controle	33	26	78,8
300 UI	34	27	79,4
500 UI	33	30	90,9
700 UI	33	25	75,8

(p>0,05)

Não foram observados partos gemelares em nenhum dos grupos experimentais.

Arteche et al (2003) na temporada de monta da primavera 2002 – verão 2003, com o objetivo de testar 2 protocolos distintos de sincronização de estros e indução da ovulação para IATF, utilizaram 142 vacas Hereford e Braford com terneiros ao pé de aproximadamente 70 dias de idade com média de condição corporal 3,25 (escala de 1 a 5). No momento do tratamento não foi levada em consideração a função reprodutiva das vacas. Utilizou-se como controle um grupo de 42 vacas submetidas ao manejo tradicional da propriedade que consistia na interrupção da amamentação dos terneiros por 48 horas no início do período reprodutivo e monta natural com 2 touros. Foram formados 2 grupos experimentais. O grupo 1 (Grupo DT) constituído por 48 vacas nas quais foi inserido um dispositivo intravaginal de 1,9g de P4 (CIDR-B, Pharmacia, Brasil) durante 8 dias. No oitavo dia realizou-se uma aplicação de PGF (Veteglan, Calier, Brasil) quando da retirada do dispositivo. Neste momento, o terneiro foi desmamado até a realização da IATF. No nono dia, realizou-se uma aplicação de 1 mg de Benzoato de estradiol (Estrogin, Farmavet, Brasil). No décimo dia, entre 50 e 52 horas após a retirada do dispositivo de P4, foram realizadas as IATF. O grupo 2 (Grupo eCG), com 52 vacas, recebeu o mesmo tratamento do grupo 1, não sendo porém realizado o desmame dos terneiros e sim uma aplicação de 400 UI de eCG (Novormon, Syntex, Argentina) quando da retirada do dispositivo de P4. Vinte e cinco dias após a IATF realizaram-se os diagnósticos de gestação através da ultrassonografia..Os valores encontrados mostraram um índice de prenhez significativamente maior (P<0,05) nas vacas que foram submetidas ao tratamento com P4 associado ao desmame temporário e IATF, quando comparadas às vacas do grupo controle e às tratadas com P4 associado ao eCG. Não houve diferença estatística significativa (P>0,05) entre as vacas tratadas com P4 associado ao eCG e IATF e as submetidas apenas ao desmame temporário e monta natural. Os resultados deste experimento indicam que as IATF em vacas de corte com terneiro ao pé apresentam melhores resultados quando se associa o desmame temporário dos terneiros por +/-50 horas ao uso do dispositivo intravaginal com 1,9g de P4. Os resultados obtidos nos dois tratamentos estão expressos na tabela 5.

Tabela 5 Prenhez em vacas tratadas com CIDR associado ao Cloprostenol e Benzoato de estradiol e eCG ou desmame temporário para inseminação artificial em tempo fixo.

	Controle	Grupo DT	Grupo eCG
Número	42	48	52
Prenhas	21^{a} (50,5%)	31^{b} (64,6%)	20^{a} (38,5%)
CC	3,4 ±0,35	3,21 ±0,38	3,25 ±0,47

[a,b] Letras diferentes na mesma linha representam diferença estatística significativa (P<0,05)

Cardozo et al (2003) submeteram em outro experimento, 53 vacas Aberdeen Angus multíparas com cria ao pé a dois protocolos para IATF com o objetivo de avaliar a eficácia da Coriogonatrofina equina (eCG) associada ao desmame temporário. As vacas encontravam-se com um intervalo pós-parto médio de 109 dias e um escore de

condição corporal de 2,5 (escala de 1-5). As vacas do grupo denominado controle (n=29) receberam uma esponja intravaginal impregnada com 250 mg de Acetato de Medroxiprogesterona (MAP) e uma injeção de 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE) no dia 0. No oitavo dia as esponjas foram removidas sendo administrados PGF (150 ug D (+) Cloprostenol – Veteglan – Calier) e 1mg de BE. No grupo eCG (n=24) no momento da retirada da esponja, foram aplicadas 400 UI de eCG (Novormon, Syntex, Argentina). Todas as vacas dos dois grupos tiveram seus terneiros removidos temporariamente neste momento até a realização da IATF, 48-52 após a retirada das esponjas. O diagnóstico de gestação foi realizado 40 dias após a IATF por palpação retal. As taxas de prenhez foram de 44,8% para o grupo controle e de 20,8% para o grupo eCG, não diferindo estatisticamente entre si.

USO DE DIFERENTES DE DIFERENTES ESTRÓGENOS PARA IATF

O protocolo tradicional de utilização de dispositivos intravaginais impregnados com progesterona, preconiza a permanência do dispositivo na cavidade vaginal por um período de 8 dias. No primeiro dia recomenda-se a aplicação intramuscular de 2 mg de Benzoato de Estradiol (BE) principalmente com o objetivo de sincronizar o crescimento folicular. Como auxiliar no desencadeamento da ovulação, é de utilidade a administração de 1mg de BE intramuscular no nono dia, realizando a IA em tempo fixo em torno de 50 hs após a retirada do dispositivo.(Bó et al, 1995)

Existem protocolos que prevêem a substituição da aplicação de BE 24 hs após a remoção do dispositivo por um tratamento com 0,5 mg Cipionato de Estradio (ECP) no momento da suspensão do bloqueio (Colazo et al. 2003)

Rocha et al (2004) com o objetivo de testar a possibilidade de substituir o uso do BE pelo ECP, aplicaram o ECP quando da retirada do implante em um programa de IATF. O experimento foi realizado em dois rebanhos de vacas de corte fronteira oeste do Estado do Rio Grande do Sul. Utilizaram-se vacas Hereford (n=46), Angus (n=(76) e Braford (n=38) com 76,9 +/- 12,4 dias pós-parto, com uma condição corporal 3,1 +/- 0,44 (escala 1-5), manejadas em campo nativo. No dia 0 todos os animais receberam um dispositivo de progesterona CIDR-B reutilizado (haviam sido previamente utilizados por 8 días) combinado com 2 mg de BE im. No dia 8 os terneiros foram desmamados temporariamente por 60h permanecendo em um potreiro afastados de suas mães.Os dispositivos foram retirados e as vacas receberam uma aplicação de PGF im (150 mcg de D(+)-Cloprostenol, Veteglan, Calier, Brasil).As vacas foram divididas ao acaso em 2 grupos ECP e BE (controle). O grupo ECP (n=42) foi tratado com 0,5 mg de Cipionato de estradiol im, no dia 8, imediatamente depois da retirada do dispositivo. As vacas do grupo BE (n=42) foram tratadas com 1 mg de Benzoato de estradiol im no dia 9. Todas as vacas foram IATF entre 52 a 56 horas depois da remoção do dispositivo. O diagnóstico de prenhez foi realizado 45 días após a IATF por palpação retal

Os resultados de prenhez obtidos nos dois grupos estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Prenhez em vacas com cria ao pé tratadas com dispositivo CIDR-B reutilizado combinado com Cipionato de estradiol ou Benzoato de Estradiol e inseminadas em tempo fixo

Tratamentos	Vacas Tratadas	Vacas Prenhes	
	N	N	%
ECP	82	47a	57,3
EB	78	39a	50,0

Letras iguais na coluna não diferem significativamente(p>0,05)

Não foram observadas diferenças significativas entre os índices de prenhez nas vacas sincronizadas e tratadas com Cipionato de Estradiol ou Benzoato de Estradiol para indução da ovulação. Estes resultados permitem concluir que o uso do Cipionato de Estradiol facilita a IATF em vacas de corte com cria ao pé, visto que pode ser aplicado no momento da retirada do dispositivo de progesterona implicando em manejo menor das vacas.

USO DE DIFERENTES DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS PARA IATF

Rocha et al (2004) com o objetivo de avaliar a taxa de prenhez em vacas de corte com cria ao pé sincronizadas com dois tipos de progestágenos realizaram um experimento na fronteira oeste do Estado do Rio Grande do Sul. Utilizaram vacas Hereford (n=46) e Braford (n=38) com 83,9 +/- 17,74 dias pós-parto, mantidas em campo nativo, com uma condição corporal média de 2,89 +/- 0,44 (escala 1-5).

No dia 0 as vacas foram divididas ao acaso em 2 grupos de acordo com o implante intravaginal a serem tratadas. O primeiro grupo foi tratado com CIDR-B® reutilizado (utilizado previamente por 8 dias, n= 31) o outro tratamento, constou de um implante intravaginal com MAP (esponja impregnada com 250mg de acetato de medroxi-progesterona, n= 53). Ambos grupos receberam 2 mg de Benzoato de estradiol (BE) i.m. no momento da colocação do implante. No dia 8 os terneiros foram desmamados temporariamente por 60h, os implantes foram retirados e as vacas receberam PGF2 alfa i.m. (150 mcg de D(+)-Cloprostenol, Veteglan®, Calier, Brasil). Após 24 hs da retirada do implante aplicou-se 1 mg de BE i.m. Todas as vacas foram inseminadas a tempo fixo (IATF) entre 52 a 56 horas depois da remoção do implante. O diagnóstico de prenhez realizou-se aos 45 dias após a IATF por palpação retal. As taxas de prenhez entre os tratamentos foram comparadas pelo teste do Qui-quadrado a um nível de $p<0,05$.

A taxa de prenhez foi de 54,8% (17/31) no grupo CIDR-B® e de 58,4% (31/53) no grupo MAP, não diferindo estatisticamente. Os índices de prenhez obtidos neste experimento estão de acordo com os descritos na literatura para programas de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte com terneiros ao pé. Os resultados deste experimento permitem concluir que CIDR-B® reutilizado e as esponjas impregnadas com MAP produzem resultados semelhantes para a inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte em aleitamento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos por nosso grupo de trabalho em condições de criação extensiva em gado de corte, predominantemente com genótipo *Bos taurus,* tem demonstrado a viabilidade da utilização de protocolos que prevêem a utilização de gestágenos associados a estrógenos com a finalidade de realização de IATF.

A IATF em novilhas na primeira estação reprodutiva, especialmente visando a antecipação e a concentração das concepções proporciona resultados positivos na segunda temporada reprodutiva.

A associação de gonadotrofia coriônica eqüina, não foi capaz de incrementar os resultados de prenhez obtidos em vacas com cria ao pé submetidas a IATF.

A substituição do Benzoato de Estradiol (1mg) aplicado 24 hs após a remoção dos dispositivos intravaginais, por um tratamento com Cipionato de Estradiol (0,5mg) juntamente com o encerramento do bloqueio, representa uma alternativa interessante, visto que os resultados de prenhez obtidos são semelhantes e implica na redução do manejo dos animais.

Independentemente do tipo de dispositivo utilizado, os resultados médios de prenhez obtidos através de protocolos de IATF estão de acordo com os descritos na literatura.
Convém ressaltar que os protocolos para inseminação artificial não devem ser utilizados com o objetivo de corrigir manejos deficientes, em especial, problemas nutricionais. Bons resultados só são obtidos quando se trabalha com animais com escores de condição corporal pelo menos médios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTECHE, AC, ROCHA, D.C, MOREIRA, R., CARDOZO, L.D., BORGES, J.B.S., MATTOS, R.C., GREGORY, R.M. Inseminação artificial em tempo fixo de vacas de corte tratadas com CIDR, Benzoato de Estradiol, associado ao eCG ou desmame temporário.Anais V Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, p.378, 2004.

BO, G. A. ADAMS, G.P., PIERSON, R.A., MAPLETOFT R.J.,Exogenous control of follicular wawe emergence in cattle. **Theriogenology**, (43),p 31-40, 1995.

CARDOZO, L.D., ROCHA, D. C., PEREIRA, R.T., MOREIRA, R., KUHL, F.N., PONSATI, D,M, GUIMARÃES, C.R., BORGES, J.B. ,GREGORY, R.M. Uso de Acetato de medroxiprogesterona associado ou não ao eCG para sincronização e inseminação artificial a tempo fixo de vacas de corte com cria ao pé. Anais XV Salão de Iniciação Científica UFRGS, Porto Alegre, p.213, 2003

CAVALIERI, J., RUBIO I., KINDER, J.E., ENTWISTLE, K.W., FITAPATRICK, L.A., Synchronization of estrus and ovulation associated endocrine changes in *Bos indicus* cows,**Theriogenology**, (47) p. 801-814, 1997

COLAZO, M.G., SEFCHECK, M., ILLUMINATI, H., MEGLIA, G., SCHMIDT, E.E., & BO, G.A., Fixed time artificial insemination in beef cattle using CIDR-B devices, progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, (51)p404,1999

COLAZO, M.G., KASTELIC, J.P., MAPLETOFT, R.J., Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR- based, fixed time AI programs in beef heifers **Theriogenology**, (60) p.855-865,2003

GONÇALVES, V. C. "Efeito da associação de diferentes doses de gonadotrofina coriônica (eCG) no tratamento com progestágeno e estrógeno sobre a fertlidade de vacas de corte".Dissertação Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Faculdade de Veterinária, 54 p, 2001

GREGORY, R.M., MATTOS, R.C., ROCHA D.C. Efeitos da cronologia de parição em primíparas sobre o índice de repetição de crias na segunda temporada de monta.(dados ainda não publicados),2004

PATTERSON, D.J., CORAH, L.R., BRETHOUR, J.R., Response of prepubertal Bos taurus and Bos indicus x Bos taurus heifers to melengestrol acetate with or without gonadotropin – releasing hormone. **Theriogenology**, (33) p.661, 1990.

RANDLE, R.F. Production Medicine considerations for enhanced reproductive performance in beef herds.,405 – 417. IN "The Veterinary Clinics of North America". BRAUN Jr,W.F & YOUNGQUIST, R.S., W.B. Saunders Ed., Philadelphia 1993

ROCHA, D. C., MATTOS, R.C. ,GREGORY, R.M. Inseminação artificial a tempo fixo utilizando dispositivos com progesterona combinado com dois tipos de estradiol. (dados ainda não publicados),2004.

ROCHA,D. C., PONSATI, D,M., KUHL, F.N., MOREIRA, R., , CARDOZO, L.D MATTOS, R.C. ,GREGORY, R.M. Inseminação artificial a tempo fixo com diferentes progestágenos Anais XVI Congresso Estadual de Medicina Veterinária. Passo Fundo, RS, 1-5 de junho de 2004, p.168

ZALESKY, D. D., FORREST, D. W., McARTHUR, N. H., WILSON, J. M., MORRIS, D. L., HARMS, P. G. Suckling inhibits release of luteinizing hormone-releasing hormone from bovine median eminence following ovariectomy. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 444-448, 1990.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BOVINOS DE CORTE

Pietro S. Baruselli[1], Gabriel A. Bó[2], Everton L. Reis[1] e Márcio O. Marques[1]
[1] Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Rua Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, Sao Paulo-SP, Brasil. (e-mail: barusell@usp.br)
[2] Instituto de Reproducción Animal Córdoba, J.L. de Cabrera 106, X5000GVD Córdoba e Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Católica de Córdoba, Argentina

INTRODUÇÃO

O melhoramento genético em rebanhos bovinos, baseado na seleção de indivíduos com maior desenvolvimento ponderal, rendimento de carcaça, produção leiteira, maior capacidade de conversão alimentar e precocidade possibilita o aumento da produtividade de carne e leite. Assim, a eficiente multiplicação de animais superiores proporciona maior retorno econômico da atividade. No entanto, a multiplicação e distribuição desse material genético só é possível com adequado manejo e sem comprometimento da eficiência reprodutiva do rebanho.

VANTAGENS DA IA

A utilização da IA apresenta inúmeras vantagens como a padronização do rebanho, o controle de doenças sexualmente transmissíveis, a ordenação do trabalho na fazenda, a diminuição do custo de reposição de touros, etc. Mas a principal vantagem dessa técnica está diretamente ligada ao processo de melhoramento genético e à obtenção de animais com maior potencial de produção e reprodução. Na atualidade existem diversos programas de melhoramento genético, tanto em *Bos indicus* quanto em *Bos taurus*, que possibilitam identificar com elevada acurácia indivíduos superiores para utilização em larga escala em programas de IA. Outra vantagen da IA é a melhoria decorrente do cruzamento entre raças (Perotto et al., 1996; Cubbas et al., 1996) que, no Brasil, geralmente consiste na utilização de sêmen de touros europeus provados em vacas zebuínas de rebanho comercial. A IA é uma das poucas ferramentas disponíveis ao criador de países tropicais para obter, com sucesso, os ganhos do cruzamento entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. No entanto, falhas na detecção de cio, anestro pós-parto e puberdade tardia são os principais fatores que limitam o emprego desta biotecnologia.

DETECÇÃO DE CIO: O GRANDE PROBLEMA DA IA

Em todo o mundo há relatos que indicam baixa taxa de serviço em bovinos inseminados artificialmente, principalmente em decorrência de comprometimentos na detecção do cio. Quando poucas vacas são detectadas em cio ocorrem significativas perdas na eficiência reprodutiva do rebanho, e comprometimento do programa de IA. Nos EUA estima-se uma perda anual de mais de 300 milhões de dólares na indústria de leite por falhas na detecção ou pela detecção inadequada do cio (Senger, 1994).
Esse comprometimento é ainda maior em rebanhos *Bos indicus*, cujo comportamento reprodutivo apresenta particularidades - cio de curta duração com elevado percentual de manifestação durante o período da noite (Galina et al., 1996; Pinheiro et al., 1998). Essa característica foi recentemente confirmada com o sistema de radiotelemetria (metodologia altamente eficaz e precisa para estudar o comportamento reprodutivo) em vacas Nelore, Angus e Nelore x Angus criadas a pasto nas mesmas condições de

manejo, em investigação realizada no Departamento de Reprodução Animal da USP, em Pirassununga (Mizuta, 2003). Os resultados presentes na Tabela 1 são indicativos de que o cio das vacas Nelore (*Bos indicus*) e Nelore x Angus tem cerca de 4 horas a menos de duração que o cio das vacas Angus (*Bos taurus*).

Tabela 1. Características do estro avaliadas por radiotelemetria e intervalos estro-ovulação em vacas Nelore (*Bos indicus*), Angus (*Bos taurus*) e Nelore x Angus (*Bos indicus x Bos taurus*).

Características	Grupos Genéticos		
	Nelore	Nelore x Angus	Angus
Duração do estro (horas)	12,9 ± 2,9 (n=25)	12,4 ± 3,3 (n=35)	16,3 ± 4,8 (n=26)
Número de montas / estro	28,2 ± 13,2 (n=25)	34,1 ± 19,2 (n=35)	29,7 ± 19,4 (n=26)
Intensidade do estro (montas/hora de estro)	2,3 ± 1,3 (n=25)	2,8 ± 1,5 (n=36)	1,9 ± 1,2 (n=26)
Intervalo estro-ovulação (h)	27,1 ± 3,3 (n=8)	25,7 ± 7,6 (n=10)	26,1 ± 6,3 (n=7)

Mizuta, 2003

Ainda, em outro estudo para avaliar o momento de ocorrência do cio ao longo do dia, o grupo de pesquisa da UNESP de Botucatu (Tabela 2) verificou que 53,8% dos cios começam durante a noite, e que 30,7% começam e terminam durante a noite .

Tabela 2. Porcentagem de vacas Nelore que começaram (C), terminaram (T), ou que começaram e terminaram o estro durante o dia ou a noite.

	C	T	CT
Noite	53,8%	46,1%	30,7%
Dia	46,1%	53,8%	23,0%

Pinheiro et al., 1998

Como o Brasil possui cerca de 73 milhões de fêmeas bovinas em reprodução (Anualpec 2004), com prevalência de aproximadamente 80% de sangue zebu (*Bos indicus*), criadas, na sua grande maioria, a pasto, ocorrem significativos comprometimentos na taxa de detecção de cio e na eficiência dos programas de inseminação artificial.

USO DE PROSTAGLANDINA F2$_{\alpha}$

A protaglandina F2$_{\alpha}$ é o fármaco mais utilizado para sincronização do cio em vacas (Odde, 1990). No entanto, o estro após o tratamento é distribuído ao longo de seis dias e é influenciado, não apenas pela responsividade do corpo lúteo, mas também pelo estágio de desenvolvimento do folículo dominante (Kastelic e Ginther, 1991). Moreno et al. (1986) avaliaram previamente vacas *Bos indicus* para detectar a presença de CL e as trataram com PGF2$_{\alpha}$. Observou-se 80 a 100% de luteólise, no entanto apenas 47 a 60% foram detectadas em estro após o tratamento. A alta variabilidade de respostas ao tratamento com PGF2$_{\alpha}$ e o fato de animais criados a pasto em condições tropicais apresentarem alta incidência de anestro (ausência de corpo lúteo) tem comprometido a eficiência desse tratamento. Assim, torna-se necessário o emprego de métodos que sincronizem o desenvolvimento luteínico e folicular para controlar o crescimento dos

folículos e a ovulação, permitindo o emprego da IA em tempo fixo sem a necessidade de detecção de cio.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) SEM DETECÇÃO DE CIO

Os protocolos de IATF preconizam induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular sincronizada, controlar a duração do crescimento folicular até o estágio pré-ovulatorio, sincronizar a inserção e a retirada da fonte de progesterona exógena (dispositivo) e endógena (prostaglandina F2α) e induzir a ovulação sincronizada em todos os animais simultaneamente.

COMPARAÇÃO ENTRE PROGRAMAS DE IATF E DE IA CONVENCIONAL

A inseminação artificial em tempo fixo possibilita que as inseminações e as prenhezes se estabeleçam no início da EM, diminuindo o período de serviço e aumentando a eficiência reprodutiva do rebanho. Estudos realizados com vacas Brangus, com bezerros ao pé nos primeiros 45 dias de estação de monta, indicaram aumento significativo da taxa de prenhez em animais inseminados em tempo fixo quando comparados a animais submetidos à detecção de cio e à IA convencional (detecção de estro 2 vezes ao dia e IA 12 horas após; Gráfico 1).

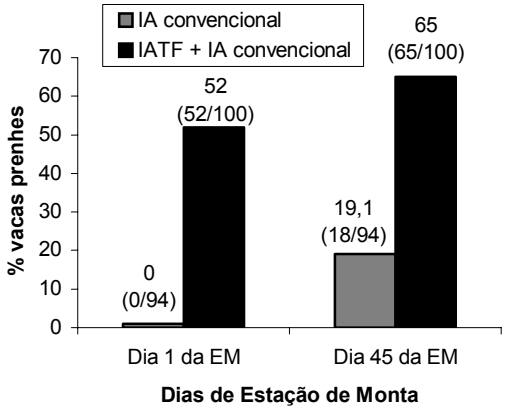


Gráfico 1 - Percentagem de vacas prenhes inseminadas após observação de cio (IA convencional) ou após programa de IATF no primeiro dia da estação de monta (EM) associado a IA convencional em 45 dias de estação de monta. (Adaptado de Baruselli *et al.*, 2002)

Após 45 dias todos os animais foram colocados com touros. A IATF reduziu em 39,3 dias o período de serviço em relação à inseminação convencional, antecipando o parto e beneficiando a estação de monta subsequente.

SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA IATF COM PROGESTERONA, PROGESTÁGENO E PELO PROTOCOLO "OVSYNCH"

Os resultados de um estudo realizado por nossa equipe, comparando IA convencional e protocolos que empregam progesterona, progestágenos e o método "Ovsynch" (GnRH/PGF$_{2\alpha}$/GnRH), estão apresentados na Tabela 3 (Baruselli et al., 2002). Nesse experimento foram utilizadas 397 vacas Brangus, paridas há 69,7 $\pm$ 22,1 dias, e mantidas a pasto. Os animais foram homogeneamente divididos em 4 grupos, de acordo com a condição corporal e período pós-parto. No grupo Controle (G-C; n=94) as vacas foram submetidas à estação de monta (EM) de 90 dias, com 45 dias de detecção de estro e inseminação artificial (2 detecções de estro/dia e IA 12 horas após início do

estro) e 45 dias de repasse com touro Brangus. Os outros três grupos foram submetidos à estação de monta semelhante, porém, no primeiro dia da EM, todas as vacas foram inseminadas em tempo fixo.

Tabela 3. Índices reprodutivos de vacas de corte lactantes de acordo com o tratamento de sincronização da ovulação para IATF.

	1° dia da EM (IATF)	45 dias de EM (observação de estro e IA)			90 dias de EM (IA + touro)
Grupo	Taxa de Concepção (%)	Taxa de Serviço (%)	Taxa de Concepção (%)	Taxa de Prenhez (%)	Taxa de Prenhez (%)
G-C	-	23,4 (22/94)[c]	81,8 (18/22)	19,1 (18/94)[e]	80,9 (76/94)
G-CIDR	52,0 (52/100)[a]	45,8 (22/48)[d]	68,2 (15/22)	67,0(67/100)[f]	79,0 (79/100)
G-Crestar	42,7 (44/103)[a]	44,1 (26/59)[d]	80,8 (21/26)	63,1 (65/103)[f]	88,3 (91/103)
G-Ov	15,0 (15/100)[b]	32,9 (28/85)[cd]	82,1 (23/28)	38,0 (38/100)[g]	85,0 (85/100)

a≠b; c≠d; e≠f≠g (P < 0,01)

Verificou-se que os tratamentos com progesterona e progestágenos possibilitam emprenhar cerca de 50% do rebanho por inseminação artificial no início da estação de monta, além de induzir ciclicidade no período pós-parto em vacas de corte lactantes. Nesse estudo, foi observada a antecipação da concepção (P<0,01) em animais que receberam tratamentos para IATF a base de progesterona e progestágenos. A média em dias em relação ao 1° parto da EM subseqüente foi de 57,6 ± 18,3 dias para animais do grupo controle (G-C), 18,3 ± 25,8 dias para o G-CIDR, 28,3 ± 28,8 dias para o G-Crestar e de 46,3 ± 26,3 dias para o G-Ov.

Pela análise dos resultados foi possível verificar que os tratamentos com progesterona e progestágenos apresentam boa eficiência em vacas lactantes criadas a pasto, aumentando significativamente a taxa de prenhez à inseminação artificial. Outra grande vantagem verificada foi a antecipação do parto na estação de monta subseqüente nos animais tratados para inseminação artificial em tempo fixo. Essa antecipação possibilita alcançar melhores índices de fertilidade devido aos animais iniciarem a estação de monta do próximo ano paridos à mais tempo. Entretanto, o protocolo "Ovsynch" apresentou baixa eficiência, não sendo indicado para IATF em vacas Zebuínas lactantes nas condições brasileiras de manejo.

USO DO ECG NOS PROTOCOLOS DE IATF

O eCG é um fármaco de meia vida longa (até 3 dias), produzido nos cálices endometriais da égua prenhe (40 a 130 dias; Murphy and Martinuk, 1991) e que se liga aos receptores foliculares de FSH e de LH e aos receptores de LH do corpo lúteo (Stewart e Allen, 1981). O eCG cria condições de crescimento folicular e de ovulação e seu uso tem-se mostrado compensador em rebanhos com baixa taxa de ciclicidade, em animais recém paridos (período pós parto inferior a 2 meses) e em animais com condição corporal comprometida (Baruselli et al., 2004a). Na Tabela 4 estão apresentados os dados de uma pesquisa realizada com 215 vacas Nelore paridas (75 ± 19 dias pós-parto) e mantidas a pasto no Estado de Mato Grosso do Sul (Baruselli et al., 2003). O grupo que recebeu eCG no momento da retirada do dispositivo apresentou maior taxa de prenhez após a IATF (38,9 vs 55,1%). Quando foi avaliada a condição ovariana dos animais tratados (Tabela 5), constatou-se que o efeito positivo do eCG aumentou conforme aumentou o grau de anestro. Nos animais cíclicos (com presença de CL) não se verificou efeito positivo do tratamento com eCG. Os resultados

positivos da utilização do eCG conforme o grau de ciclicidade também foram constatados em pesquisa realizada na Argentina (Cutaia et al., 2003).

Tabela 4. Taxa de prenhez à inseminação artificial em tempo fixo de vacas Nelore lactantes tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona (DP4) associado ou não ao tratamento com eCG na retirada do dispositivo (Dia 8).

Tratamento	Taxa de prenhez
DP4	38,9% (42/108)[a]
DP4 + eCG (400 UI)	55,1% (59/107)[b]

a,b na mesma coluna (P< 0,05)

Tabela 5. Taxa de prenhez à inseminação artificial em tempo fixo conforme classificação da funcionalidade ovariana de vacas Nelore lactantes tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona (DP4) associado ou não ao tratamento com eCG na retirada do dispositivo (Dia 8).

Classificação dos ovários	Taxa de prenhez			
	DP4	DP4 + eCG	Diferença (eCG – controle)	Valor de P
A (presença de CL)	55,5 (15/27)	64,0 (16/25)	+ 8,5%	0,37
B (fol (s) ≥ 8mm)	34,4 (22/64)	50,0 (29/58)	+ 15,6%	0,06
C (anestro)	29,4 (05/17)	56,5 (13/23)	+ 27,1%	0,08

Recentemente nosso grupo de pesquisa realizou outros experimentos para verificar o efeito do tratamento com eCG. Os resultados anteriores foram confirmados por Rodrigues et al. (2004) que verificaram aumento significativo na taxa de prenhez de vacas Nelore tratadas com eCG e submetidas a IATF [50,9% (56/110) vs. 37,8 (37/98)]. Apenas os animais em anestro responderam positivamente ao tratamento com eCG. Em um experimento subsequente (SILVA et al., 2004) também foi verificado aumento na taxa de prenhez com o uso de eCG na retirada do implante auricular de progestágeno em um grande número de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo [33,8 (101/299) vs. 51,7% (155/300); Tabela 6]. Nesse mesmo experimento também foi observado aumento na taxa de concepção pela administração de GnRH no momento da IATF [37,6 (114/303) vs. 48,0% (142/296)]. Em outro experimento para estudar a dinâmica folicular durante esses tratamentos (SÁ FILHO et al., 2004) verificou-se maior sincronização das ovulações em animais que receberam GnRH no momento da IATF ($72,0 \pm 1,0^{x}$ vs. $71,1 \pm 2,0^{y}$ h; P<0,05 – teste de Bartlett), justificando a administração de GnRH no momento da IATF em animais tratados com Crestar.

Tabela 6 – Taxa de prenhez de vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes tratadas com implante auricular contendo progestágeno (Crestar), com ou sem eCG na retirado do implante e com ou sem GnRH no momento da IATF.

ECG	GnRH	N	Taxa de Prenhez (%)
S/ eCG	S/ GnRH	152	27,6 (42/152)[c]
	C/ GnRH	147	40,1 (59/147)[b]
C/ eCG	S/ GnRH	151	47,7 (72/151)[ab]
	C/ GnRH	149	55,7 (83/149)[a]
EFEITOS PRINCIPAIS			
S/ eCG		299	33,8 (101/299)[b]
C/ eCG		300	51,7 (155/300)[a]
	S/ GnRH	303	37,6 (114/303)[b]
	C/ GnRH	296	48,0 (142/296)[a]

a ≠ b ≠ c na mesma coluna (P < 0,05)

Com o objetivo de avaliar os efeitos do uso do eCG em programas de IATF a base de progestágenos, analisou-se a dinâmica folicular de vacas Nelore (*Bos indicus*) em anestro sincronizadas com progestágeno e eCG (SÁ FILHO et al., 2004). Os animais foram tratados com Crestar e 5 mg de valerato de estradiol associado a 3 mg de Norgestomet IM no dia 0. O implante foi removido no dia 9 e os animais foram divididos conforme o tratamento ou não com eCG na retirada do implante Exames ultra-sonográficos foram realizados durante o tratamento para acompanhamento da dinâmica folicular (Tabela 7 e Gráfico 3).

Tabela 7 - Dinâmica folicular de vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes em anestro tratadas com implante auricular contendo progestágeno (Crestar) associado ou não ao eCG.

	Com eCG (n=26)	Sem eCG (n=24)	P
Taxa de ovulação (%)	73,1 (19/26)[a]	50,0 (12/24)[b]	0,04
Intervalo entre a retirada da P4 e a ovulação (h)	72,0 ± 1.1	73,0 ± 1,9	0,72
Diâmetro máximo do folículo dominante (mm)	1,22 ± 0,06	1,04 ± 0,07	0,04
Diâmetro máximo do folículo ovulatório (mm)	1,24 ± 0.05	1,21 ± 0.04	0,70
Taxa de concepção (%)	46,2 (12/26)[a]	20,8 (5/24)[b]	0,02
Taxa de concepção dos animais que ovularam (%)	63,2 (12/19)	41,7 (5/12)	0,12

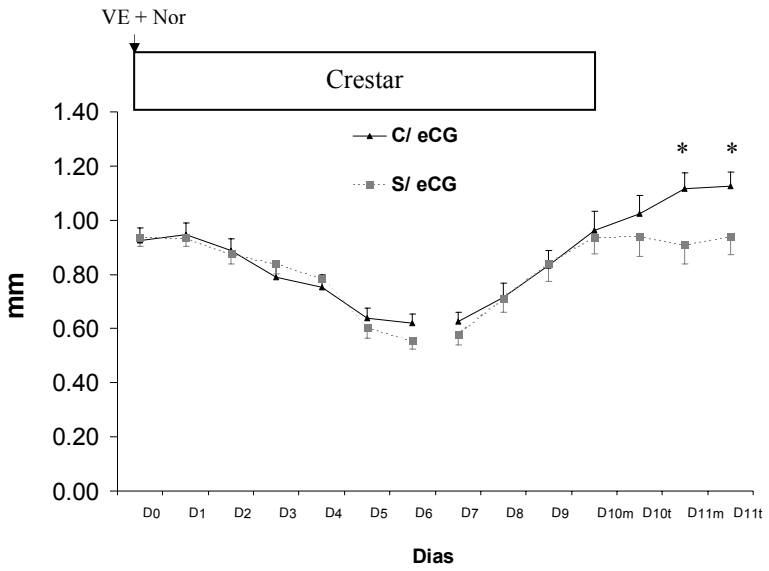


Gráfico 3. Dinâmica folicular de vacas Nelore em anestro tratadas com protocolo Crestar associado ou não a 400 UI de eCG no momento da retirada do implante auricular (dia 9).

Verificou-se que o tratamento com eCG na retirada do implante auricular de progestágeno aumentou o diâmetro máximo do folículo dominante (Gráfico 3), além de aumentar as taxas de ovulação e de concepção.

Trabalho recente foi realizado por Marques et al. (2003) para verificar os efeitos do eCG (administrado no momento da retirada dos implantes intravaginais de progesterona) em primíparas lactantes (60 dias pós-parto) meio sangue Nelore x Angus (Tabela 8). Observou-se que os animais que receberam eCG apresentaram maiores concentrações plasmáticas de P4 ($P<0,05$) 12 dias após o tratamento. Nesse experimento, o tratamento com eCG aumentou a taxa de ovulação em 16%, entretanto não se verificou diferença significativa. Esses dados foram confirmados em pesquisas recentes com novilhas Nelore, verificando aumento na taxa de ovulação (76 vs 50%) e nas concentrações plasmáticas de progesterona (4,31±0,56 vs. 2,22±0,16 ng/ml) após o tratamento com eCG (Baruselli et al., 2004b). O aumento na taxa de concepção após o tratamento com eCG pode ser também devido ao incremento nas concentrações plasmáticas de progesterona conforme descrito por Mann et al (1999). No Brasil, Reis et al. (2004) verificaram correlação positiva entre a concentração plasmática de progesterona e a taxa de concepção em receptoras de embrião bovino. Os resultados de 3 experimentos realizados pelo nosso grupo (Marques et al., 2003; Sá Filho et al., 2004 e Baruselli et al., 2004b) são indicativos de que o tratamento com eCG na retirada dos dispositivos de progesterona não influencia o intervalo entre a retirada dos dispositivos e a ovulação.

Tabela 8. Efeitos do uso de eCG em vacas Brangus lactantes tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona (DP4). São Manuel – SP. 2002

Tratamento (n)	Taxa de ovulação	Retirada DP4 / ovul (h)	Ø FD (mm)	CL (mm)	P4 total (ng/mL)	P4 ovul (ng/mL)
eCG (25)	76% (19/25)	74,2 ± 4,0	12,55 ± 0,36	1,93 ± 0,05	8,6 ± 0,9[a]	8,6 ± 0,4 [a]
s/ eCG (25)	60 %(15/25)	78,0 ± 3,1	12,50 ± 0,46	1,82 ± 0,06	4,5 ± 0,7[b]	6,4 ± 0,5 [b]

a≠b na mesma coluna, P<0,05

Assim, o aumento da taxa de concepção em animais tratados com eCG pode estar relacionado a: 1) incremento na taxa de ovulação, principalmente em animais em anestro, e; 2) aumento das concentrações plasmáticas de progesterona no diestro do ciclo subsequente à IATF, que pode melhorar o desenvolvimento embrionário e a manutenção da gestação.

No entanto, outros trabalhos realizados pelo nosso grupo com um grande número de animais (n=1243) não apresentaram efeito positivo do tratamento com eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (Marques et al., 2003b, 2004). Dessa forma, realizamos um estudo retrospectivo (Baruselli et al. 2004c) para verificar o efeito do tratamento com eCG em função da condição corporal dos animais no momento do tratamento de sincronização da ovulação. Nesse estudo foram avaliadas 1987 IATFs realizadas em vacas Nelore tratadas ou não com eCG no momento da retirada do dispositivo de progesterona. Analisou-se o efeito do escore de condição corporal no início do tratamento (escala 1-5) com a taxa de concepção (Gráfico 4). Os autores verificaram efeito positivo do tratamento com eCG somente nos animais com ECC ≤ 3. Em animais com satisfatória condição corporal (> 3) não foi verificado efeito positivo do tratamento com eCG na taxa de concepção. A condição corporal esta freqüentemente relacionada à ciclicidade (D'occhio et al., 1990; Viscarra et al, 1998). Assim, animais com boa condição corporal apresentam alta taxa de ciclicidade, o que dispensa o tratamento com eCG, conforme discutido anteriormente.

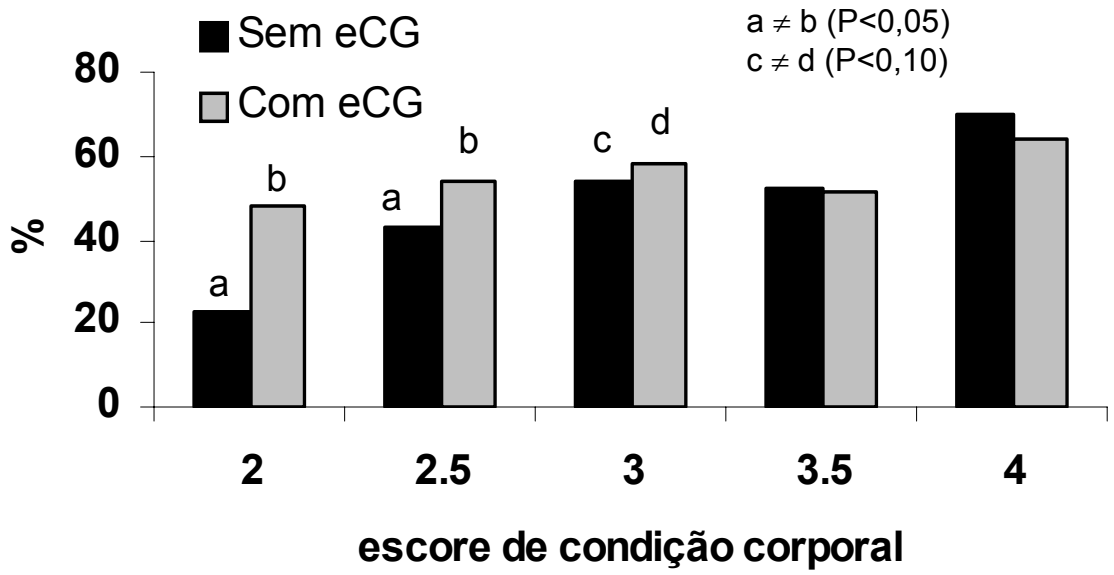


Gráfico 4. Taxa de concepção de vacas Bos indicus (Nelore) lactantes (n= 1.984) tratadas com e sem eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona conforme o escore de condição corporal.

USO DO DESMAME TEMPORÁRIO ASSOCIADO AOS PROGRAMAS DE IATF

O uso do desmame temporário associado a programas de sincronização de estro tem sido estudado com intuito de aumentar a eficiência reprodutiva em bovinos (Quesada et al. 2001). Com o objetivo de aumentar a taxa de concepção de vacas Nelore no período pós-parto submetidas a IATF, nosso grupo de pesquisa (Penteado et al., 2004) tratou 459 vacas Nelore com Crestar por 9 dias e verificaram os efeitos da administração de eCG (no momento da retirada do implante) e do desmame temporário (desde a retirada do implante até a IATF= 54 horas) em um experimento fatorial 2x2 (Tabela 8).

Tabela 8 – Taxa de prenhez de vacas nelore (*Bos indicus*) lactantes tratadas com implante auricular contendo progestágeno, com ou sem eCG e com ou sem desmame temporário por 54 horas.

eCG	Desmama	N	Taxa de Prenhez (%)
S/ eCG	**S/ Desmama**	118	37,3 (44/118)[c]
	C/ Desmama	114	47,5 (54/114)[bc]
C/ eCG	**S/ Desmama**	112	52,7 (59/112)[ab]
	C/ Desmama	115	58,3 (67/115)[a]
EFEITOS PRINCIPAIS			
S/ eCG		232	42,2 (98/232)[b]
C/ eCG		227	55,5 (126/227)[a]
	S/ Desmama	230	44,8 (103/230)[b]
	C/ Desmama	229	52,8 (121/229)[a]

a ≠ b ≠ c na mesma coluna (P < 0,05)

CONCLUSÃO

Inúmeras vantagens são obtidas com a adoção da inseminação artificial em rebanhos bovino. No entanto a baixa taxa de serviço, seja pela ineficiência na detecção do cio ou pelo alto grau de anestro no período pós parto são os principais fatores que comprometem a eficiência de programas para o emprego dessa biotecnologia. Dessa forma a inseminação artificial em tempo fixo apresenta-se uma alternativa para superar esses entraves. Há inúmeros protocolos para sincronizar a ovulação com o objetivo de realizar a inseminação artificial em tempo fixo. A escolha do protocolo mais apropriado depende da avaliação técnica das condições dos animais a serem inseminados. Quando a IATF é utilizada adequadamente, aproximadamente 50% das fêmeas sincronizadas emprenham com apenas uma inseminação realizada no período pós-parto recente (<80 dias). Os animais que não conceberem nessa inseminação podem ser novamente sincronizados, ou colocados com touros para repasse. Além disso, as vacas tratadas com progesterona/progestágenos que não se tornaram gestantes apresentam maior taxa de serviço (aumenta o número de vacas que manifestam cio) e de prenhez durante a estação de monta que vacas não tratadas, antecipando a

concepção e aumentando a eficiência reprodutiva do rebanho. Dessa forma, a inseminação artificial em tempo fixo é uma técnica que facilita o manejo e aumenta a eficiência da IA em bovinos de corte.

Referências Bibliográficas

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA (**ANUALPEC**), 2004

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; MADUREIRA, E. H.; CAMPOS FILHO, E. P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 26, n. 3, p. 218-221, 2002

BARUSELLI, P.S., MARQUES M.O., NASSER, L.F., REIS, E.L., BO, G.A. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with cidr-b devices for timed artificial insemination. Theriogenology, v. 59, n. 1, p. 214.2003.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BO, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. Animal Reproduction Science, v. 82-83, p. 479-486, 2004a.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; CARVALHO, N.A.T.; CARVALHO, J.B.P. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: International Congress on Animal Reproduction, 2004b.

BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; MARQUES, M.O.; RODRIGUES, C.A.; NASSER, L.F.; SILVA, R.C.P.; REIS, E.L.; SÁ FILHO, M.F. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas Nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (Análise Retrospectiva). Acta Scientiae Veterinarae 32 (suplemento), p. 228, 2004c.

CUBBAS, A.C.; PEROTTO, D.; ABRAHÃO, J.J.S.; JOSÉ, W.P.K.; MELLA, S.C. Desempenho ponderal de animais Nelore e cruzas com Nelore. II. Período pós desmama. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, p. 127, 1996.

CUTAIA, L., TRÍBULO, R., MORENO, D., BÓ, G.A.. Pregnancy rates in lactating beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). Theriogenology 59, p. 216, 2003 (IETS).

D'OCCHIO, M.J.; NEISH, A.; BROADHURST, L. Differences in gonadotrophin secretion post-partum between zebu and European breed cattle. Anim. Repr. Sci., v. 22, p. 311-317, 1990.

GALINA, C.S.; ORIHUELA, A.; BUBIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. Anim. Repr. Sci., V. 42, P. 465-470, 1996.

KASTELIC, J.P.; GINTHER, O.J. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. Anim. Reprod. Sci. 26, p.13-24, 1991.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E; ROBINSON, R.S.; WATHES, D.C. The regulatory of interferon-τ production and uterine hormone receptors during early pregnancy. Journal Reproduction and Fertility, v. 54, p. 317-328, 1999.

MARQUES, M.O; REIS, E.L.; CAMPOS FILHO, E P; BARUSELLI, P.S. Efeitos da administração de eCG e de benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas Bos taurus taurus x Bos taurus indicus no período pós-parto. In: V SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, Huerta Grande, v. 1, p. 392, 2003a.

MARQUES, M.O; REIS, E.L.; MELLO, J.E.; CAMPOS FILHO, E P; BARUSELLI, P.S. Taxa de concepção de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em vacas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* durante o período pós-parto In: V SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, Huerta Grande, v. 1, p. 392, 2003b.

MARQUES, M.O; REIS, E.L.; MELLO, J.E.; CAMPOS FILHO, E P; BARUSELLI, P.S. Taxa de concepção de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore lactantes. 2004 (enviado para publicação).

MIZUTA, K. Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus*

indicus), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore × Angus (*Bos taurus indicus* × *Bos taurus taurus*). 2003. 98 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MORENO, I.Y.D.; GALINA, C.S.; ESCOBAR, F.J.; RAMÍREZ; B.; NAVARRO-FIERRO, R. Evaluation of the lytic response of prostaglandin F2 alpha in Zebu cattle based on serum progesterone. Theriogenology 25, 3, p 413-421, 1986.

MURPHY, B.D.; MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotrophin. **Endocrine Rewiews**, v. 12, p. 27-44, 1991.

ODDE, K.G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. J. Anim. Sci. v. 68, p. 817, 1990.

PEROTTO, D.; CUBAS, A.C.; ABRAHÃO, J.J.S.; MELLA, S.C.; JOSÉ, W.P.K. Desempenho ponderal de animais Nelore e cruzas com Nelore. II. Período pré desmama. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33, p. 127, 1996.

PINHEIRO, O.L., BARROS, C.M., FIGUEREDO, R.A., VALLE, E.R. DO, ENCARNAÇÃO, R.O., PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2alpha or norgestomet and estradiol valerate. Theriogenology, v.49, p.667-81, 1998.

QUESADA, Y.; ESTRADA, S.; CUBERO, M.; GARCÍA, F.; GALINA, C.S.; MOLINA, R.; ORIHUELA, A. A note on the effects of calf stimuli on the response of Zebu cows to Synchro-mate-B. Applied Animal Behaviour Science, v. 71, p. 183-189, 2001.

REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; NASSER, L.F.; COSTA NETO, W.P.; BARUSELLI, P.S. Aumento da taxa de concepção em receptoras de embrião bovino com maiores concentrações plasmáticas de progesterona no dia da inovulação. Acta Scientiae Veterinariae, 32 (suplemento), p. 88, 2004.

SÁ FILHO, M.F.; REIS, E.L.; VIEL JR, J.O.; NICHI, M.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Dinâmica folicular de vacas Nelore lactentes em anestro tratadas com progestágeno, eCG e GnRH. Acta Scientiae Veterinariae 32 (suplemento), p. 235, 2004.

SENGER, P. L.. The estrus detection problem: new concepts, technologies, and possibilities J. Dairy Sci. 77, p 2745-2753, 1994.

SILVA, R.C.P.; RODRIGUES, C.A.; MARQUES, M.O.; AYRES, H.; REIS, E.L.; NICHI, M.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Efeito do eCG e do GnRH na taxa de prenhez de vacas Nelorelactantes inseminadas em tempo fixo. Acta Scientiae Veterinariae 32 (suplemento), p. 221, 2004.

STEWART, F.; ALLEN, W.R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 527-36, 1981.

VISCARRA, J.A.; WETTERMANN, R.P.; SPITZER, J.C.; MORRISON, D.G. Body condition at parturition and postpartum weight gain influence luteal activity and concentrations of glucose, insulin and nonesterefied fatty acids in plasma of primiparous beef cows. J. Anim. Sci. v. 76, p. 493-500, 1998.

IMPORTÂNCIA DA QUALIDADE DO SÊMEN EM PROGRAMAS DE IATF e TETF

Rubens Paes de Arruda, Eneiva C.C. Celeghini, A.F.C. Andrade, A.R. Garcia, J. Nascimento, C.F. Raphael, L.W.O. Souza
Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia, Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal, FMVZ/USP (arrudarp@usp.br)

INTRODUÇÃO

A necessidade de se desenvolver sistemas de criação, que possibilitassem o melhoramento do potencial produtivo e reprodutivo das diversas espécies domésticas, fez surgir várias biotécnicas. A inseminação artificial (I.A.), dentre essas, foi a primeira biotécnica a ser utilizada, revolucionando os sistemas de produção animal (ARRUDA, 2000). Neste sentido, o mérito genético e a fertilidade do touro têm um grande impacto sobre a performance do rebanho e na renda gerada (LOWMAN et al., 1994; GARCIA, 2000). Por isso, touros de maior valor genético e principalmente aqueles com características produtivas desejáveis deveriam ser largamente usados.

A fim de facilitar o uso da inseminação artificial e programas de transferência de embrões (T.E.), diversos trabalhos têm sido realizados tendo como base o controle hormonal do ciclo estral das fêmeas bovinas e o emprego da I.A. e T.E. em tempo fixo (IATF e TETF), desobrigando a detecção do estro. Estes sistemas tornam o manejo mais fácil por reduzir o custo e a mão de obra, além de possibilitar a priorização de outras tarefas de manejo dentro de uma propriedade, devido à não necessidade da detecção diária do cio. Para isso, diferentes fármacos, protocolos e momentos de inseminação têm sido usados com relatos de variação nos níveis de fertilidade (ARRUDA et al., 1997; BARBUIO et al., 1999; GARCIA et al., 1999; GARCIA, 2000; BERTAN et al., 2004; ALMEIDA et al., 2004; BARROS; ERENO, 2004; BÓ et. al., 2004).

A variabilidade da resposta continua a ser um dos maiores problemas associados aos programas de sincronização do estro e superovulação em bovinos. A incorporação de técnicas para o controle da dinâmica das ondas foliculares reduzirá a variabilidade ao tratamento de doadoras em diferentes estágios do ciclo estral, sem comprometimento dos resultados (BÓ et al., 2004)

Nos principais protocolos de IATF e TETF, a administração de uma dose de GnRH ou estrógeno, (associados ou não ao eCG) um a dois dias após a $PGF_{2\alpha}$, sincroniza o momento da ovulação e os animais (tanto de raças européis como zebuínas), podem ser inseminados com horário predeterminado.

No momento da monta, o touro deposita bilhões de espermatozóides no fundo da vagina da vaca. Na I.A., o sêmen é depositado diretamente no útero, ultrapassando a cérvix e permitindo o uso de um número reduzido de espermatozóides. Após a I.A., o sêmen é exposto a uma série de ambientes distintos que alteram significativamente o número e a função espermática. Muitos espermatozóides são perdidos no trato genital pelo movimento retrógrado (MULLINS; SAAKE, 1989; SARTORI, 2004). Espermatozóides depositados no trato genital da fêmea devem atravessar o útero, passar para o oviduto, pela junção útero-tubárica, interagir com o epitélio do oviduto e fertilizar o ovócito (BERGER, 1996; SARTORI, 2004). Para que o espermatozóide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas plasmáticas normais. A presença de

membranas íntegras é pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização, como a capacitação espermática, penetração nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oolema possam ocorrer (YANAGIMACHI, 1994; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 1997).
Quando sistemas de IATF e TETF são adotados há a necessidade do uso do sêmen congelado de vários reprodutores e ainda de várias partidas de sêmen, assim a não avaliação ou mesmo a falta de critérios na avaliação das partidas poderá afetar sobremaneira a fertilidade de todo o lote de fêmeas, trazendo prejuízos econômicos, visto os gastos com fármacos para a sincronização dos estros, bem como para a indução da ovulação destas fêmeas, além do dispêndio em material, sêmen e tempo.

INFLUÊNCIA DO RESFRIAMENTO E DA CRIOPRESERVAÇÃO NA QUALIDADE ESPERMÁTICA

Os procedimentos usados para a criopreservação do sêmen (diluição, resfriamento, congelação e descongelação) são bem conhecidos por causar danos à membrana plasmática dos espermatozóides (HAMMERSTEDT et al., 1990). É aceito que a criopreservação causa um decréscimo de aproximadamente 50% na viabilidade espermática decorrente de efeitos de temperatura e osmolaridade, alterando a organização, fluidez, permeabilidade e composição lipídica das membranas (AMANN; PICKETT, 1987; THOMAS et al., 1998). No entanto, trabalho recente do nosso laboratório (FORERO GONZALEZ, 2004), utilizando a associação de sondas fluorescentes para avaliar simultaneamente a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial em sêmen cripreservado de bovinos (ARRUDA; CELEGHNI, 2003), observou que durante o processo de criopreservação 85% dos espermatozóides sofreram algum tipo de injúria, ou seja, somente 15% permaneceram intactos.
A fertilidade reduzida, associada à inseminação com sêmen congelado, vem sendo atribuída à técnica de congelação do sêmen que produz danos nos espermatozóides que podem ser ultra-estruturais, físicos, bioquímicos e funcionais, e que levam as membranas espermáticas a apresentarem uma quebra da assimetria bilipídica (WATSON, 1995). Podendo-se ainda incluir a estes danos: a perda de motilidade, alterações na cromatina e na morfologia do espermatozóide, permeabilização significante das membranas, desestabilização das membranas e geração de espécies reativas de oxigênio (WINDSOR; WHITE, 1995; BOQUET et al., 1999; BAILEY, et al., 2000; WATSON, 2000).
As alterações nas membranas das células são associadas às mudanças de temperatura durante o processo de resfriamento, pelos efeitos deletérios dos componentes do meio (ex. crioprotetor) e finalmente pelos efeitos da descongelação (WATSON, 1995).
O sêmen pode ser resfriado rapidamente (0,7^{o}C/min) de 37 a 19°C. Durante a faixa de temperatura entre 19 a 8°C, o resfriamento deve ser lento (0,05^{o}C/min), devido à sensibilidade ao choque frio. Abaixo de 8°C o resfriamento pode ser rápido até a temperatura de armazenamento entre 4 a 6°C (MORAN et. al., 1992).
As modificações geradas nas membranas espermáticas, durante as etapas da congelação do sêmen, assemelham-se às ocorridas nas células capacitadas, o que levou alguns autores a levantarem a hipótese que a criopreservação promove a capacitação do espermatozóide (BAILEY, et al., 2000; WATSON, 2000). Esta “crio-capacitação” é freqüentemente citada como um dos fatores associados à redução da

longevidade do espermatozóide criopreservado no trato reprodutivo da fêmea (WATSON, 1995; POMMER; MEYERS, 2002; SCHEMBRI et al., 2002).

ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS) E A INTEGRIDADE ESPERMÁTICA

O espermatozóide, como qualquer outra célula em condições anaeróbias, produz espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo a maior parte delas originadas do metabolismo normal da célula. Apesar da existência de agentes antioxidantes no sêmen, o balanço entre a produção e a degradação de ROS pode ser alterado, aumentando a produção de ROS, que induz a peroxidação lipídica, comprometendo a viabilidade espermática (DE LAMIRANDE et al., 1997).

O processo de peroxidação lipídica inicia-se na presença de ROS, que ao ter contato com os ácidos decosahexaenóicos da membrana espermática, retiram um hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, que por sua vez irá agir em outro ácido decosahexaenóico. Este processo desencadeia a cascata de peroxidação, causando lesões da membrana plasmática, com perda de fluidez e de sua capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático e, por fim, perda da sua função de fertilização (AITKEN; KRAUSZ, 2001; MARQUES et al., 2002).

Apesar desses efeitos prejudiciais, a produção de espécies reativas de oxigênio faz parte do funcionamento normal da célula espermática, uma vez que baixas concentrações de ROS estão envolvidas com a hiperativação dos espermatozóides, sendo sua produção um pré-requisito para capacitação espermática, além de ser relacionada com a fusão do espermatozóide com o oócito e ligação com a zona pelúcida (AURICH et al., 1997; BROUWERS; GADELLA, 2003).

A geração de radicais livres afeta não somente a fluidez e a integridade da membrana plasmática, mas também atinge o DNA no núcleo espermático. A fragmentação do DNA é comumente observada nos espermatozóides de indivíduos inférteis e há fortes evidências que estes danos sejam mediados pela ação dos radicais livres e induzidos por estresse oxidativo (JANUSKAUSKAS et al., 2003).

EFEITOS DO TEMPO DE CONSERVAÇÃO DO SÊMEN EM BOTIJÕES CRIOGÊNICOS SOBRE A VIABILIDADE ESPERMÁTICA E FERTILIDADE

Vliet e Hafez (1974) empregam a expressão “aging of spermatozoa” para designar o processo de perda progressiva da habilidade de sobreviver, acompanhado por deteriorização geral da célula (senescência), que as mesmas adiquirem com o tempo de estocagem em botijão criogênico. No entanto, resultados discordantes são encontrados na literatura quanto ao desempenho reprodutivo do sêmen após o processo de descongelamento. Enquanto, muitos autores encontraram um declínio na fertilidade do sêmen congelado com o decorrer do tempo (BARNABE et al., 1980), outros demonstraram que o material pode ser estocado em nitrogênio líquido (-196 ºC) sem perda da capacidade fertilizante (ANDERSEN; PEDERSEN, 1976; BONADONNA; SUCCI, 1976; NISHIKAWA et al., 1976). Embora, respeitando as diversas citações literárias, é nossa opinião que as principais causas de diminuição da viabilidade espermática com o passar dos anos, rezidem no inadequado manuseio do botijão, por falta de abastecimento de nitrogênio líquido com regularidade, ou a exposição excessiva do sêmen ao ambiente externo, no momento da retirada da palheta do botijão para a I.A.. Estes, levam a uma descongelação parcial e imediata congelação

do sêmen, propiciando, com isso, a formação de cristais de gelo e lesões nas membranas plasmáticas.

TÉCNICAS USUAIS DE AVALIAÇÃO DO SÊMEN

Normalmente as avaliações laboratoriais realizadas com o objetivo de estimar o potencial de fertilidade de uma partida de sêmen são: motilidade espermática (%); vigor (1-5); concentração espermática (milhões/dose); anormalidades espermáticas (patologias do sêmen) e o teste de termo-resitência (lento ou rápido).
Desde a década de 80, nosso laboratório tem usado rotineiramente técnicas e padrões mínimos sugeridos pelo CBRA para a avaliação do sêmen bovino, como apresentado no quadro abaixo:

Motilidade progressiva (%)	30
Vigor (1-5)	3
Espermatozóides com motilidade progressiva (x 10^6/dose)	10
Motilidade após TTR (%)	20/vigor 2
Defeitos maiores individuais (%)	5
Defeitos menores individuais (%)	10
Defeitos maiores totais (%)	20
Defeitos menores totais (%)	25
Defeitos totais (%)	30

Com uma adaptação dos resultados encontrados por MIES FILHO et al. (1989), exemplificaremos a grande heterogeneidade quanto às diversas características que normalmente encontram-se ao analisar o sêmen congelado. Estes dados aproximam-se aos obtidos em nosso laboratório:

Concentração espermática (x 10^6/dose)	5,0 – 130
Espermatozóides com motilidade progressiva (x 10^6/dose)	1,7 – 50
Motilidade pós-descongelação	5,0 – 65%
Motilidade pós-TTR	0 – 55%
Defeitos maiores	8,0 – 66%
Defeitos menores	2,0 – 30%
Defeitos totais	16,0 – 78%

Quanto às provas de termo-resistência, inicialmente elas adquiriram grande aceitação, pois a permanência do sêmen por um tempo determinado, em banho-maria, submetido às temperaturas de 38°C/4 horas ou 45°C/1 hora, aproximaria às condições em que fica exposto o sêmen no trato genital das fêmeas em cio (ARRUDA et al., 1992). No entanto, quando se avalia o sêmen com diluidores, volumes, concentrações diferentes, os resultados são inconsistentes, inclusive quanto à fertilidade.

TÉCNICAS "MODERNAS" DE AVALIAÇÃO DO SÊMEN

Usualmente, a motilidade espermática é estimada de forma subjetiva, sendo analisada sob microscopia óptica, com uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente. Enquanto, as anormalidades espermáticas são avaliadas em esfregaços corados ou câmara úmida, em uma avaliação que depende da habilidade do técnico. Entretanto, estudos reportam que este tipo de análise manual é impreciso, mesmo quando executado por investigadores experientes. As análises são influenciadas por uma alta variação entre observações e observadores. Esta

imprecisão deriva, em parte, da natureza subjetiva dos testes usados, da variabilidade entre técnicos e das diferenças na implementação de padrões para a avaliação (ARRUDA, 2000).
Uma grande diversidade de biotécnicas vem sendo desenvolvida para a avaliação seminal, das quais podemos citar sistemas de avaliação computadorizada das características seminais, uso de sondas fluorescentes para a avaliação das estruturas espermáticas por microscopia de epifluorescência ou sistema de citometria de fluxo, técnicas de sexagem espermática, avaliação de proteínas do plasma seminal, prudução de ROS, entre outras.

AVALIAÇÃO COMPUTADORIZADA DA MOTILIDADE E DA MORMOFOMETRIA ESPERMÁTICA (CASA E ASMA)

Com o propósito de obter uma técnica que demonstre maior repetibilidade tanto para motilidade quanto para morfometria espermáticas, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados. Programas computadorizados para a avaliação espermática podem ser mais objetivos e imprimir maior repetibilidade às avaliações do que a habilidade humana em identificar padrões de motilidade ou de normalidade espermáticas. O poder de análise deste tipo de teste é dado pela avaliação precisa e acurada dos espermatozóides com alto grau de objetividade, podendo assim aperfeiçoar o processo de avaliação seminal em animais (ARRUDA, 2000; VERSTEGEN et al., 2002).
Os parâmetros gerados da motilidade espermática pelo sistema são: Total (%), é a soma de todas as células contadas móveis e não móveis; Motilidade (%), é a população de células que estão se movendo com uma velocidade mínima determinada no setup, é a proporção de células móveis do total; Motilidade Progressiva (%), é a porcentagem de células movendo-se progressivamente; Velocidade de Trajeto (VAP, μm/s), é a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; Velocidade Progressiva (VSL, μm/s), é a velocidade média percorrida em linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto; Velocidade Curvilinear (VCL, μm/s), que é a velocidade média mensurada de ponto a ponto do trajeto percorrido pela célula; Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH, μm), é a largura média da oscilação da cabeça conforme a célula se move; Freqüência de Batimentos (BCF, Hz), é a freqüência com que a cabeça do espermatozóide move-se para trás e para frente durante um trajeto percorrido; Retilinearidade (STR, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VAP; Linearidade (LIN, %), é o valor médio da proporção entre VSL/VCL; e Velocidade Rápida (%) (ARRUDA, 2000).
Todavia, ainda não está bem claro qual característica do movimento espermático determinada pelo CASA é capaz de predizer a fertilidade ou a taxa de fertilização (FERREIRA et al., 1997; AMANN, 1989).
Para as avaliações da morfometria espermática pelo sistema computadorizado (Automated Sperm Morphometry Analyses - ASMA) as imagens dos espermatozóides são projetadas individualmente no vídeo monitor antes da análise estatística, para permitir a eliminação de imagens que podem apresentar erros de reconhecimento (cabeças superpostas, avaliadas como uma só célula e debris digitalizados como cabeças espermáticas) e erros de digitalização (má digitalização de peça intermediária e acrossomo). Um mínimo de 200 células com imagens corretamente digitalizadas devem ser analisadas por lâmina. Os parâmetros mensurados na análise morfométrica referem-se à cabeça espermática: comprimento (μm), largura (μm), alongamento (relação entre largura/comprimento, %), área (μm2) e perímetro (μm); verificando a

presença da cauda e de gotas protoplasmáticas (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2002a).

USO DE SONDAS FLUORESCENTES PARA A AVALIAÇÃO ESPERMÁTICA

Recentes avanços na tecnologia de coloração têm fornecido novos meios de se avaliar a capacidade funcional de espermatozóides em várias espécies (GARNER; JOHNSON, 1995; ARRUDA et al., 2002b; ARRUDA; CELEGHNI, 2003; CELEGHINI et al., 2004a; CELEGHINI et al., 2004b). Dessa forma, a funcionalidade de organelas dos espermatozóides ou seus compartimentos têm sido monitorados por procedimentos específicos de coloração, tecnicamente conhecidos como sondas fluorescentes. Estas sondas possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, na dependência de suas características físicas. Atualmente uma grande variedade de sondas fluorescentes tem sido usada em andrologia.

A membrana plasmática espermática exerce um papel fundamental na sobrevivência do espermatozóide no trato genital da fêmea e para a manutenção de sua capacidade fertilizante (PARKS e GRAHAM, 1992), visto que, garantem a homeostase celular, conseqüentemente são essenciais para manter a viabilidade. Sua integridade pode ser determinada pelo uso de sondas fluorescentes, tais como o iodeto de propídio (PI), SYBR-14, Hoechst 33258 (H258) e 33342 (H342), diacetato de carboxifluoresceína (CFDA) e a Concanavalina A (ConA) associada ao isotiocionato de fluoresceína (FITC).

A integridade das estruturas flagelares é imprescindível para a motilidade espermática, que ocorre por batimento flagelar. Algumas sondas fluorescentes com afinidade às estruturas dos microtúbulos estão sendo estudas para permitir o monitoramento desta estrutura. Técnicas de imunofluorescência vem sendo utilizada para a detecção das tubulinas, sendo empregados anticorpos monoclonais contra α tubulina acetilada ou contra β tubulina, associados a anticorpos secundários conjugados a fluoresceínas. Para as dineínas ainda não existem técnicas determinadas para espermatozóides, mas o uso de imunofluorescência pode ser de grande valia (BONNE et al., 1985; RAWE et al., 2001).

As mitocôndrias espermáticas estão dispostas helicoidalmente na peça intermediária e o ATP produzido serve como suplemento energético para os batimentos flagelares. Portanto, é indispensável que haja produção de ATP pelas mitocôndrias para haver motilidade espermática (COSSON, 1996).

As sondas fluorescentes utilizadas para marcar função mitocondrial são Rodamina 123 (R123), MitoTracker Green FM (MITO) e o MitoTracker red ou CMXRos, que são fluorocromos capazes de corar mitocôndrias e promover imagens de alta fluorescência de mitocôndrias em células vivas (BENEL et al., 1986). Além do JC-1 (iodeto de 5,5',6,6' – tetracloro - 1,1,3,3' – tetraetilbenzimidazolilcarbocianina), que identifica populações mitocondriais com diferentes potenciais de membrana através de códigos de cor. Sua cor é alterada reversivelmente do verde para o laranja ou vermelho, com o aumento do potencial de membrana (REERS et al., 1991; GRAVANCE et al., 2000).

Para a determinação da integridade do acrossomo têm-se utilizado aglutininas, tais como aglutinina de Ricinus communis (RCA), aglutinina de Psium sativum (PSA), aglutinina de Arachis hypogea (PNA) (CROSS e MEIZEL, 1989; CHENG et al., 1996) ou Concanavalia ensiformis (ConA) (BLANC et al., 1991), que possuem especificidade a glicoproteínas da membrana acrossomal. Para a visualização do acrossomo espermático em microscopia de epifluorescência estas aglutininas devem ser

conjugadas a fluoresceínas, tais como o isotiocionado de fluoresceína (FITC) (CROSS et al., 1986; FARLIN et al., 1992; HOLDEN et al., 1990).
A avaliação da estrutura da cromatina espermática tem sido realizada com o uso da acridina laranja, um corante que se intercala à dupla fita de DNA e fluoresce em verde quando esta apresenta-se íntegra; todavia, quando associada a uma porção desnaturada da fita de DNA ou quando associada ao RNA, a acridina emite fluorescência laranja, permitindo a quantificação de desnaturação do DNA das células de uma amostra, podendo auxiliar na identificação de indivíduos portadores de distúrbios muito sensíveis ocorridos durante o processo da espermatogênese (EVENSON et al., 1980; TAJEDA et al., 1984; FOSSA et al., 1997; UNANIAN, 2000).
A combinação de vários corantes fluorescentes possibilita a avaliação de diversos parâmetros celulares simultaneamente. A associação das sondas PI, FITC-PSA e MitoTracker Green FM, tem sido utilizada para avaliar simultaneamente a integridade das membranas plasmática e acrossomal e função mitocondrial em bovinos (ARRUDA; CELEGHNI, 2003) e eqüinos (CELEGHINI et al., 2004a), resultando em oito categorias de células, de acordo com as marcações das sondas. Os mesmos parâmetros são avaliados nas associações de PI, H342, FITC-PSA e CMXRos; e PI, H342, FITC-PSA e JC-1 (CELEGHINI et al., 2004b).

CITOMETRIA DE FLUXO

Embora o uso de sondas fluorescentes por microscopia venha sendo um método para a avaliação dos diversos “compartimentos” espermáticos, o número de espermatozóides normalmente examinados por análise não excede 200. Na citometria de fluxo os dados são calculados em logarítimo e para cada amostra são contadas. Por exemplo, a emissão da fluorescência verde (FL1-H: FITC-PSA) é obtida por filtro de 525 nm, enquanto a fluorescência vermelha (FL2-H: PI) é obtida por filtro de 635 nm (ARRUDA, 2000; ARRUDA et al., 2003a). Após a realização das análises, histogramas são gerados para cada amostra, por software “Cell Quest” e os resultados expressos em porcentagem.
A citometria de fluxo surge como uma técnica vantajosa sobre as outras clássicas para a avaliação da célula espermática, uma vez que este sistema automatizado tem a capacidade de examinar 10.000 espermatozóides em menos de um minuto, sem a necessidade de preparações fixadoras ou extensoras, permitindo maior exatidão nos resultados (ARRUDA, 2000). Por todas estas razões, o método de citometria de fluxo tem sido cada vez mais empregado na avaliação das características espermáticas de diversas espécies mamíferas (EVENSON, 1980; GARNER e JOHNSON, 1995).

AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGENIO (ROS)

A produção de ROS leva a ocorrência da peroxidação lipídica no espermatozóide, que causa o acúmulo de hidroperóxidos lipídicos na membrana espermática, que posteriormente formam o malondialdeído (MDA), que permanece nos fluidos corporais, podendo ser usado como marcador de peroxidação lipídica. Dentre os diferentes métodos analíticos, a reação com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é o mais utilizado, onde a reação do MDA com o TBA forma um composto que pode ser mensurado através de absorbância e fluorescência, sendo estes produtos chamados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (JANERO, 1990).

A sonda fluorescente C11-BODIPY$^{581/591}$ (4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1 ,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid) é um análogo de ácidos graxos polissaturados, que se incorpora na membrana celular. Enquanto, este fluoróforo está intacto, é observada uma fluorescência vermelha, com comprimento de onda de 580 a 620 nm. Já na presença de ROS, há mudança da fluorescência de vermelha para verde, cujo comprimento de onda é 495 a 545 nm (BALL; VO, 2002).

AVALIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL

Os componentes protéicos dos ejaculados de diferentes espécies vêm sendo mapeados e identificados pela técnica de eletroforese, buscando possíveis marcadores bioquímicos da fertilidade masculina (AUTIERO et al., 1991; WOLFE et al., 1993; KILLIAN et al., 1993; FRAZER et al., 1996). As proteínas do plasma seminal são parcialmente originárias do plasma sanguíneo e parcialmente sintetizadas e secretadas pelo testículo (KATO et al., 1985), epidídimo (TURNER e REICH, 1987) e glândulas vesiculares (MANJUNATH et al., 1994).

Killian et al. (1993) detectaram quatro proteínas do plasma seminal, por SDS-PAGE bi-dimensional, como associadas à fertilidade de touros, sendo duas proteínas (26 kDa e 55 kDa) predominantes em touros de alta fertilidade e duas proteínas (16 kDa cada) predominantes em touros de baixa fertilidade. Mais tarde, Cancel et al. (1997) identificaram a proteína de 55 kDa, mais prevalente no sêmen de touros de mais alta fertilidade, como sendo a osteopontina (OPN). Da mesma forma, Gerena et al. (1998) identificaram a proteína de 26 kDa como sendo a lipocalina tipo prostaglandina D sintetase (L-PGDS).

Tanto a OPN quanto a L-PGDS são caracterizadas por apresentarem sítios de ligação com heparina e outros glicosaminoglicanos. Estes sítios de ligação têm estrutura semelhante a proteínas do líquido folicular ovariano, que são responsáveis pela estimulação das reações acrossômicas no espermatozóide bovino, suíno e de coelho, agindo provavelmente durante a capacitação espermática. A habilidade do espermatozóide em se ligar à heparina e a outros aminoglicanos pode estar correlacionada com a qualidade do sêmen e sua capacidade fertilizante (KILLIAN, 1993; JOBIM et al., 2002).

Roncolletta et al. (1999) encontraram alta incidência de uma proteína com aproximadamente 61,8 kDa em touros da raça Gir cujo sêmen foi considerado de alta congelabilidade. Jobim et al. (2002a), através da imunodetecção, encontraram a presença das proteínas albumina (66 kDa) e OPN (55 kDa) em sêmen bovino de alta congelabilidade. Contraditoriamente, Chard et al. (1991) em estudos com humanos azoospérmicos, oligospérmicos e normospérmico, verificaram correlações negativas entre as concentrações de albumina do plasma seminal e a concentração espermática.

Apesar de muitos estudos indicarem as proteínas do plasma seminal como marcadores no macho, ainda muitas pesquisas devem ser realizadas para realmente poder responder se tais marcadores da fertilidade são “mito ou realidade?” (SULLIVAN, 2004).

CARACTERÍSTICAS SEMINAIS “COMPENSÁVEIS” E “INCOMPENSÁVEIS”

É de extrema importância o entendimento da avaliação da fertilidade do macho ou do potencial de fertilidade do sêmen utilizado na inseminação artificial. É claro que há diferenças entre machos na qualidade seminal considerada “compensável”, mas estas

podem ser minimizadas ou eliminadas por ajustes na quantidade de espermatozóide por dose utilizada. Por outro lado, há machos subférteis que não podem apresentar fertilidade normal pelo aumento da dose inseminante, na tentativa de recuperar defeciências das características do sêmen, sendo estes considerados "incompensáveis".

O uso de sêmen com significativos níveis de células com formato anormal de cabeça ou com vacúolos nucleares ("diadem defects"), que normalmente tem algum comprometimento na estrutura do DNA, resulta na diminuição da taxa de fertilização e aumento da proporção de embriões de baixa qualidade e com isso perda embrionária precoce, para animais envolvidos em programas de I.A. e T.E. em tempo fixo. Isto indica que tal sêmen contém características "incompensáveis". Em contraste, sêmen com alta proporção de espermatozóides com defeito de cauda ou com gotas protoplasmáticas tem maior impacto pela depressão na taxa de fertilização, mas não na qualidade do embrião (SAACKE et al., 1995).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não se deve esperar que um teste simples do sêmen prediza a fertilidade do macho ou ejaculado, pois parece haver ambas as características compensáveis e não compensáveis que causam impacto na efeciência reprodutiva. Parece que estes dois fatores podem diferir entre ejaculados/machos/inseminações, em várias combinações e razões. Também é de conhecimento que animais superovulados possam ser mais sensíveis para ambas deficiências no transporte do espermatozóide, bem como a seleção espermática pode causar uma relativa deficiência na ovulação natural da fêmea.

Assim, é importante ressaltar que, se para fertilizar o ovócito o espermatozóide precisa apresentar um conjunto de características, quanto mais estruturas avaliadas ao mesmo tempo, mais acurada será a estimativa em predizer a capacidade fertilizante do sêmen, definindo a porcentagem de células que apresentam características desejáveis para cumprir sua função, tais como integridade de membrana plasmática, acrossomo, flagelo, função mitocondrial, cromatina, etc. (HOSHI et al., 1995).

No entanto, desde o início do século, cientistas têm procurado intensamente desenvolver técnicas laboratoriais que predizam com exatidão a fertilidade do sêmen congelado. No entanto, tais metas têm sido de difícil obtenção, uma vez que a maior parte dos problemas reside nos diferentes atributos que o espermatozóide deve possuir para fertilizar o ovócito. Infelizmente, nenhum teste laboratorial isolado pode estimar o potencial de fertilidade do sêmen congelado.

A andrologia atual passa por grandes mudanças, a ponto de que alguns cientistas usam o termo "Resurgimento da Andrologia". Com o desenvolvimento de novas técnicas, novos conceitos surgirão, e os padrões atuais de avaliação do sêmen serão substituídos por outros, visando predizer com exatidão a fertilidade do sêmen congelado.

BIBLIOGRAFIA

AITKEN, R.J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. **Reproduction**, v.122, p. 497-506, 2001.

ALMEIDA, A.B.; MADUREIRA, E.H.; BINELLI, M.; BARUSELLI, P.S.; ROSSA, L.A.F.; GASPAR, P.S. Reutilization of Norgestomet implants in Nelore cows. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** 2004 (submetido).

AMANN, R.P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? **Journal of Andrology**, v. 10, p. 89-98, 1989.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.

ANDERSEN, J. B; PEDERSEN, H. Breeding efficiency of frozen bull semen after 5 years storage at-196ºC in liquid nitrogen. *In*: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 8., Cracow, 1976. **Proceeding…** v. 4, p. 786-6.

ANDERSSON, M; HELLMAN, T.; HOLMSTROM, B.G.; JOKINEM, L. Computerized and subjective assessments of post-thaw motiliy of semen from Finnish Ayrshire AI bulls in relation to non-return rates. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 33, p. 89-93, 1992.

ARRUDA, R.P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso demicroscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA).** 2000. 121 f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; GARCIA, A.R.; LIU, I.K.M. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. **Theriogenology**, v. 58, n. 2, p.253-256, 2002.

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G.; LIU, I.K.M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomo de espermatozóides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 226-227, 2003.

ARRUDA, R.P.; BARNABE, V.H.; ALENCAR, M.M.; BARNABE, R.C. Avaliação de sêmen congelado de bovinos. Provas lenta e rápida de termo-resistência: efeitos sobre a fertilidade. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.29, n.1, p.131-7, 1992.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozóides bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 17. Beberibe, CE. 25 a 31 de agosto de 2003, **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 230-231, 2003.

ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; MIZUTA, K.; GUSMÕES, P.P.; VON ZUBEN, C.; VISINTIN, J.A.; RODRIGUEZ, P.H.M. Sincronização do estro em fêmeas bovinas com o uso de acetato de melengestrol (MGA) – prostaglandina $F_2\alpha$ e CIDR-B. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.2, p.97-9, 1997.

ARRUDA, R.P.; SOUZA, N.L.; MARQUES, A.; CELEGHINI, E.C.C.; GOBESSO, A.A.O.; MEIRELLES, F V; BINELLI, M.; BLASQUES, F.J.H. Evaluation of techiniques using CFDA/PI, H258/FITC-PSA and Trypan Blue/Giemsa for assessment of the viability and acrosomal integrity of cryopreserved equine spermatozoa. *In*: ANNUAL CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2002, Foz do Iguassu, Brasil, Elsevier, 2002b, v.57, p. 477.

AURICH, J.E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effect of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 185-192, 1997.

AUTIERO, M.; SANSONE, G.; ABRESCIA, P. Relative rations of lactoferrin, albumin and acid phosphatase seminal levels as sperm quality markers in the fertile and infertile men. **Journal of Andrology**, v. 12, n. 3, p. 191-200, 1991.

BAILEY, J.; BILOUDEAU, J.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon, **Journal of Andrology**, v.21, p.1-7, 2000.

BALL, B. Evaluation and use of transported equine semen. *In*: EQUINE ASSISTED REPRODUCTIVE TECHNOLOGY WORKSHOP, 1, Davis, **Proceedings**, 1998. p.19-24.

BALL, B.A.; VO, A**.** Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C1l-BODIPY581/591. **Journal of Andrology**, v.23, p 259-269, 2002.

BARBUIO, J.P.; MARQUES, A.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S.; ARRUDA, R.P.; MIZUTA, K. Sincronização da ovulação por benzoato de estradiol ou GnRH após tratamento com MGA/PG/17β-estradiol+progesterona em novilhas Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.312-4, 1999.

BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C.; VISITIN, J.A.; VIANA, W.G.; CASAGRANDE, J.F.; ALMEIDA, C.A.Efeito do tempo de coservação de sêmen congelado de bovinos sobre a motilidade progressiva dos

espermatozóides e a retenção do acrossomo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.4, n.3 e 4, p. 13-17, 1980.

BARROS, C.M.; ERENO, R.L. Avanços em tratamentos hormonais para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32 (Suplemento), p. 23-34. *In*: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 18. 26 a 29 de agosto de 2004. Barra Bonita, SP, Brasil.Porto Alegre: UFRGS, 2004.

BERGER, T. Fertilization in ungulates. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 351-360, 1996.

BERTAN, C.M.; BINELLI, M.; RODRIGUEZ, P.H.M.; CELEGHINI, E.C.C.; BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA E.H. Synchronization of follicular waves and characteristics of estrus in cross-bred heifers (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) treated with melengestrol acetate and prostaglandin F2α associated with hCG, GnRH or 17β-estradiol and progesterone". **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science,** 2004 (no prelo).

BLANC, G.; MAGISTRINI,M.; PALMER, E. Use of Concanavalina A for coating the membranes of the stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 191-198, 1991. Supplement.

BÓ, G.A.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L. Manipulação hormonal do cilco estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32 (Suplemento), p. 1-22. *In*: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 18. 26 a 29 de agosto de 2004. Barra Bonita, SP, Brasil.Porto Alegre: UFRGS, 2004.

BONADONNA, T. & SUCCI, G.Artificial insemination of animal in the wolrd.(Statistical analysis). In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION. 8., Cracow, 1976. **Proceeding**, v.4, p. 769-77.

BONNE, D.; HEUSELE, C.; SIMON, C.; PANTALONI, D. 4',6-Diamidino-2-phenylindole, a fluorescent probe for tubulin and microtubules. **Journal of Biology Chemistry**, v. 260, n.5, p. 2819-2825, 1985.

BOQUET, M.; SPIRITO, S.; GIULIANO, S.; NEILD, D. M.; CHAVES, M.G.; AGÜERO, A. Efectos de la criopreservación sobre la cromatina de espermatozoides equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.297-298, 1999.

BROUWERS, J.F.H.M.; GADELLA, B.M. In situ detection and localization of lipid peroxidation in individual bovine sperm cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v.35, p. 1382-1391, 2003.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J. Efeitos da criopreservação do semen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estruturas flagelares e da cromatina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. 2004b (submetido).

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J. Simultaneous evaluation of the plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in equine spermatozoa. In: INTERNACIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 15, 2004, p.511. Porto Seguro. **Abstracts...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004a.

CHENG, F.P.; FAZELI, A.; VOORHOUT, W.F.; MARKS, A.; BEVERS, M.M.; COLENBRANDER, A.B. Use of Peanut agllutinin to assess the acrossomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. Journal of Andrology, v. 17, n.6, p. 674-682, 1996.

COSSON, J. A moving image of flagella: news and views on the mechanisms involved in axonemal beating. **Cell Biology International**, v. 20, n. 2, p. 83-94, 1996.

CROSS, N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 635-641, 1989.

CROSS, N.L.; MORALES, P.; OVERSTREET,J.W.; HANSON, F.W. Two simple methods for detecting acrosome - reacted human sperm. **Gamete Research**, v. 15, p. 213-226, 1986.

DE LAMIRANDE,E.; JIANG,H.; ZINI, A., KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v.2, p 48–54, 1997.

EVENSON, D.P. Flow citometry evaluation of male germ cells. In: YEN, A. (Ed.) **Flow Citometry: advanced research and clinical applicatio**ns. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1980, p.217-46.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R.; Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v. 210, p. 1131-33, 1980.

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L.Assessment of *Psium sativum* agglutinin in identifying acrossomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, p. 23-27, 1992.

FERREIRA, J.C.P.; NEVES NETO, J.R.; PAPA, F.O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 3, p. 131-32, 1997.

FORERO GONZALES, R.A. **Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatozóide bovino**. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Pirassununga, 2004. 92 p.

FOSSA, S.D.; DE ANGELIS, P.; KRAGGERUD, S.M.; EVENSON, D.; THEODORSEN, L.; CLAUSEN, O.P. Prediction of posttreatment spermatogenesis in patients with testicular cancer by flow cytometric sperm chromatin structure assay. **Cytometry,** v. 30, n. 4, p. 192-96, 1997.

FRAZER, G.S.; BUCCI, D.M.; BROOKS, C.L. Two-dimensional polyacrilamide gel electrophoresis of bovine semen after cryopreservation in half-mililiter straws. **Theriogenology**, v. 46, p. 1103-1115, 1996.

GARCIA, A.R. **Utilização do semen resfriado e da administração de GnRH na inseminação artificial em tempo fixo de novilhas nelore (*Bos taurus taurus*)**. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Pirassununga, 2000. 121 p.

GARCIA, A.R.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; RODRIGUES, P.H.M.; MARQUES, A. Influência do uso de sêmen resfriado e da aplicação e GnRH sobre a taxa de prenhez de novilhas Nelore inseminadas em tempo fixo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p.342-4, 1999.

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A. Viability assessment of mamalian sperm using SYBR-14 and Propidium iodide. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 276-284, 1995.

GERENA, R.L.; IRIKURA, D.; URADE, Y.; EGUCHI, N.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Identification of a fertility associated protein in bull seminal plasma as lipocalin-type prostaglandin D synthase. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 826-833, 1998.

GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**, v. 53, n.9, p. 1.691-1.703, 2000.

HAMMERSTED, R. H.; GRAHAM, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. **Journal of Andrology**, n.11, p. 73-88, 1990.

HOLDEN, C.A.; ROSS, V.H.; SATHANANTHAN, A.H.; TROUNSON, A.O. Assessment of the human sperm acrosome reaction using concavalian A lectin. **Molecular Reproduction and Development**, v. 25, p. 247-257, 1990.

HOSHI, K.; SUGANO, T.; YOSHIMATSU, N.; YANAGIDA, K. Correlation of semen characteristics with acrosin, hyaluronidase, tubulin, dynein, and actin of spermatozoa. **Archiev of Andrology**, v. 35, n. 3, p. 165-172, 1995.

JANERO, D.J. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JANUSKASKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003.

JOBIM, M.I.M.; OBERST, E.R.; SALBERGO, C.G.; SOUZA, D.O.; CIMAROSTI, H.I.; MATTOS, R.C. Albumina e osteopontina – Proteínas do plasma seminal bovino realcionada com a congelabilidade do semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.136-141, 2002.

KATO, M.; SUNG, W.K.; KATO, K.; GOODMAN, D.S. Immunohistochemical studies on the localization of cellular retinal biding protein in rat testes and epididymis. **Biology of Reproduction**, v. 32, p. 172-189, 1985.

KAWAKAMI, E.; VANDEVOORT, C.A.; MAHI-BROWN, C.A.; TOLLNER, T.L.; OVERSTREET, J.W. Comparasion of a fluoresceinated lectin stain with triple staining for evaluating acrossome reactions of dog sperm. **Journal Experimental of Zoologics**. v. 265, p. 599-603, 1993.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 6, p. 1202-1207, 1993.

LOWMAN, B.G.; SCOTT, N.A.; SCOTT, P.R. An evaluation of some breeding management options in beef herds in the United Kingdom. **Veterinary Record**, v.135, n.1, p.9-12, 1994.

MANJUNATH, P.; CHANDONNET, L.; LEBLOND, E.; DESNOYERS, L. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 27-37, 1994.

MARQUES, A.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; GOBESSO, A.A.O.; NEVES NETO, J.R. Effects of ascorbic acid and pentoxifylline on equine cryopreserved semen submitted to in vitro incubation. **Theriogenology**, v. 58, p. 257-260, 2002.

MIES FILHO, A. Problemas de fertilidade com sêmen congelado importado. *In*: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18. (Palestras), p.119-126, 1989.

MORAN, D.M; JASKO, D.J; SQUIRES, E.L; AMANN, R.P. Determination of temperature and cooling rate which induce cold shock in stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.38, p.999-1012, 1992.

MULLINS, K.J.; SAAKE, R.G. Study of the functional anatomy of bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. **Anatomy and Record**, v. 225, p. 106-117, 1989

NISHIKAWA, Y.; IRITANI, A.; SHIRAYAMA, K.; TARAO, T. Motility and fertilizing ability of frozen cattle semen stored for long terms/4 to 13 years/. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION AND ARTIFICIAL INSEMINATION, 8., Cracow, 1976. **Proceeding**. V.4, p. 838-41.

PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effect of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

POMMER, A.C.; MEYERS, S.A. Tyrosine phosphorylation is an indicator of capacitation status in fresh and cryopreserved stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.58, p.351-354, 2002.

RAWE, V.Y.; GALAVERNA, G.D.; ACOSTA, A.A.; OLMEDO, S.B.; CHEMES, H.E. Incidence of tail structure distortions associated with dysplasiaof the fibrous sheath in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 16, n. 5, p. 879-886, 2001.

REERS, M.; SMITH, T.W.; CHEN, L.B. J-agregate formation of a corbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potencial. **Biochemistry**, v. 30, p. 4480-4486, 1991.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ZHANG, B.R.; LARSSON, B. Bovine semen quality and the ability to produce embryos *in vivo* and *in vitro*. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.25, n.1, p.108-126, 1997. Suplemento.

RONCOLLETTA, M.; FRANCESCHINI, P.H.; LIMA, V.F.M.H.; RODRIGUES, L.H.; OLIVEIRA, M.A.; SILVA, C. Perfil em SPS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do semen de touros doadores da raça Gir. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, 1999.

SAACKE, R.G.; NADIR, S.; DALTON, J.; NEBEL, R.L.; BAME, J. Involviment of the bull and artificial insemination in fertility and embryo quality. ARS Veterinaria (Proceedings). *In*: Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 10. São Paulo, Brasil, p.1-17, 1995.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32 (Suplemento), p. 35-50. *In*: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 18. 26 a 29 de agosto de 2004. Barra Bonita, SP, Brasil.Porto Alegre: UFRGS, 2004.

SCHEMBRI, M.A.; MAJOR, D.A.; SUTTIE, J.J.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Capacitation-like changes in equine spermatozoa throughout the cryopreservation process. **Reproduction, Fertility and Development**, v.14, p.225-233, 2002.

SULLIVAN, R. Male fertility markers, myth or reality. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 341-347, 2004.

TEJADA, R.I.; MITCHELL, J.C., NORMAN, A.; MARIK, J.J.; FRIEDMAN, S. A test for the practical evaluation of male fertility by acridine orange (AO) fluorescence. **Fertility and Sterility**, v.42, n.1, p.87-91, 1984.

THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determinated by flow cytomotry. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 3, p. 786-793, 1998.

TURNER, T.T.; REICH, G.W. Influence of protein in rat cauda epididymal lumen fluid on cauda sperm motility. **Gamete and Research**, v. 18, p. 267-278, 1987.

UNANIAN, M.M. **Integridade da cromatina: método complementar para avaliação da qualidade do sêmen bovino**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2000. 21p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Documentos, 56).

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted sêmen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VLIET, W.L.V.; HAFEZ, E.S.E. Survival and aging of spermatozoa: a review. **American Journal Obstetricy Gynecology**, 118: 1006-15, 1974.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen, **Animal Reproduction Science**, v. 60/61, p. 481-492, 2000.

WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, p. 871-891, 1995.

WINDSOR, D. P.; WHITE, I. G. Mitochondrial injury to ram sperm during procedures associated with artificial or frozen storage. **Animal Reproduction Science**, v.40, p.43-58, 1995.

WOLFE, D.F.; BRADLEY, J.T.; RIDDELL, M.G. Characterization of seminal plasma proteins and sperm proteins inejaculates from normospermic bulls and bulls with thermally-induced testicular degeneration. **Theriogenology**, v. 40, p. 1083-1091, 1993.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. *In*: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **The Physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, 1994, p.189-317.

PUBERDADE E MATURIDADE SEXUAL DE NOVILHAS *BOS INDICUS*

Guilherme de Paula Nogueira
Faculdade de Medicina Veterinária
UNESP - Araçatuba

1 INTRODUÇÃO

Atualmente o Brasil tem mantido a posição de principal exportador de carne bovina possuindo um rebanho com 170 milhões de cabeças dos quais 80% são zebuínos ou cruzados com zebu, 90 milhões destes são da raça Nelore. A grande importância desta raça na pecuária nacional é conseqüência de características específicas que incluem rusticidade e adaptação ao sistema de criação extensivo com baixo custo (ACNB, 2003). Recentemente com o surgimento do "mal da vaca louca" conseqüência de manejo de criação intensivo, a produção de carne bovina nacional ganha um apelo de importância sanitária que possibilitará a abertura de novos mercados no exterior uma vez que a maioria do rebanho nacional é mantida à pasto, conhecido como "boi verde" o que dificulta a ocorrência desta doença. Como há limitação na superfície para a expansão das fronteiras agrícolas e existe a necessidade de incrementar a produtividade da pecuária de corte nacional, resta aumentar a eficiência dos animais do rebanho.

Os bovinos taurinos são adaptados para regiões de clima temperado enquanto que os zebuínos são mais bem adaptados para regiões de clima tropical (BÓ et al., 2003), uma conseqüência fisiológica resultante da maior adaptação à pressão ambiental das criações extensivas é que normalmente os zebuínos apresentam a primeira ovulação aos 2 anos enquanto que os taurinos começam a ciclar com um ano de idade.

Práticas de manejo, alimentação e seleção genética vêm sendo adotadas buscando diminuir a idade à fertilidade de novilhas zebuínas para próximo de um ano, este é o chamado "sistema um ano" que vem sendo empregado em algumas propriedades.

O critério para a seleção dos zebuínos tem como referência a idade à primeira ovulação do gado europeu e foi utilizado por pesquisadores da Universidade Estadual do Colorado, EUA na década de 90. A observação da expressão deste fenótipo foi feita após a exposição de novilhas pré-púberes ao touro (ou inseminação artificial) seguido de diagnóstico de gestação separando as novilhas em precoces ou não precoces. A idade de 15 meses foi utilizada como referência e considera que o primeiro parto ocorra aos 2 anos de idade; se a novilha parir aos 2 anos ao invés dos 3 anos haverá um aumento de 16% no retorno econômico do sistema de criação de gado de corte. Foi demonstrado recentemente que a baixa pressão de seleção imposta às novilhas Nelore buscando diminuir a idade a puberdade resultou em um fenótipo com alta variabilidade e conseqüentemente alta herdabilidade, permitindo que a seleção dos animais quanto a apresentação deste critério possua resultados práticos e significativos (ELER et al., 2002).

A seleção genética para esse critério vem sendo feita em propriedades rurais há alguns anos e tem comprovado a elevada herdabilidade. Algumas pesquisas vêm sendo feitas buscando referências que possam antecipar o processo de melhoramento genético com relação a esse aspecto (LOBO et al., 2001) uma vez que a diminuição da idade à puberdade é um importante critério no aumento da produtividade da raça, porém o tempo para observação do fenótipo é demorado.

Estudos básicos que permitam o conhecimento da fisiologia endócrina envolvida na maturação de novilhas Nelore são importantes para se caracterizar o processo de maturação sexual em novilhas nessa raça com a primeira ovulação mais tardia.
Até pouco tempo acreditava-se que a inibição da secreção de gonadotrofinas no período pré-puberal nos bovinos era conseqüência exclusiva do excesso de sensibilidade do hipotálamo ao estradiol inibindo a secreção de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), mecanismo conhecido como gonadostático. Recentemente vários trabalhos têm demonstrado a importante participação de neuromoduladores estimulatórios e inibitórios no processo de maturação sexual (RAWLINGS et al., 2003).
Considerando os múltiplos eventos relacionados à puberdade nos bovinos e que ocorre uma seqüência de modificações durante a maturação sexual (tornando um evento controlado por vários genes) a probabilidade de se encontrar um único marcador molecular para a fertilidade precoce parece remota.
Novas ferramentas para auxiliar o processo de seleção genética podem advir do conhecimento dos processos fisiológicos que modulam as atividades reprodutivas. Como há limitação de informações em muitas variáveis reprodutivas, as abordagens de melhoramento empregadas atualmente levam em consideração apenas características zootécnicas desejáveis e possíveis de serem observadas em animais à campo.
A idade a primeira ovulação é um fenótipo que possui variabilidade na sua determinação uma vez que 25% de novilhas criadas para corte apresentam função luteínica transitória antes dos 300 dias de idade (WEHRMAN et al., 1996). Como em vacas criadas para o corte a idade a puberdade determina a duração da vida reprodutiva, a antecipação da 1ª ovulação com a ampliação do período reprodutivo eleva a produtividade e a oferta de proteínas de origem animal. Sistemas de criação com o primeiro parto das novilhas aos 2 anos de idade apresentaram maior produtividade em relação àqueles com o primeiro parto aos 3 ou aos 4 anos de idade (BERETTA et al., 2001).

2 PUBERDADE

Em mamíferos o sistema reprodutivo é o último dos principais sistemas de órgãos a amadurecer (RAMALEY, 1979). A puberdade pode ser definida como o período de transição entre a imaturidade do período pós-natal e a maturidade sexual que culmina com a aquisição da capacidade reprodutiva permitindo a geração de descendentes. O termo puberdade vem do latim *pubescere* que significa apresentar pêlos em função do aparecimento de pelos púbicos e axilares, decorrente da adrenarca (aumento da produção de andrógenos pela adrenal que ocorre independente da maturação do eixo-hipotálamo-hipófise-gônadas; TERASAWA, FERNANDEZ, 2001).
A funcionalidade do eixo reprodutivo (hipotálamo-hipófise-gônadas) começa durante o período embrionário. Os neurônios secretores hipotalâmicos começam a aparecer por volta do 32º dia do período embrionário e a hipófise começa a secretar gonadotrofinas a partir da 10ª semana do período embrionário. A necessidade da integridade do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas é importante no período intrauterino para completar a diferenciação sexual e a descida testicular nos machos (HUTSON et al., 1997).
Após o nascimento o desenvolvimento do sistema reprodutivo da novilha acontece em duas etapas: há um aumento no crescimento de todo o trato reprodutivo entre 3 e 4 meses de idade, seguido de uma fase em que o crescimento diminui e antecede uma nova fase de aceleração antes da primeira ovulação. Estas diferenças no crescimento e desenvolvimento são conseqüências de variações na concentração de

gonadotrofinas que aceleram a proliferação folicular e a produção de estrógeno determinando a diferença na velocidade de crescimento dos tecidos (HONARAMOOZ et al., 2004).
O que restringe a atividade reprodutiva no período pós-natal parece ser a diminuição da secreção de GnRH impedindo a completa função gonadal, sendo que os mecanismos que inibem esta secreção podem ter origem central ou periférica.
A contenção da atividade reprodutiva cujo término culmina com a primeira ovulação apresenta semelhanças entre a fêmea bovina e a murina (RAMIREZ; MacCANN, 1963). Ocorre um aumento da freqüência de pulsos de LH acompanhado por um declínio na amplitude, o que parece ser um pré-requisito para o início da puberdade. A diminuição na retroalimentação negativa do estradiol sobre a secreção de GnRH é resultado do decréscimo do número de receptores para estradiol no citoplasma das células do hipotálamo anterior, médio basal e hipófise anterior à medida que a puberdade se aproxima (DAY et al., 1987; SCHILLO et al., 1992; NAKADA et al., 2001).
Durante a maturação sexual na novilha além das modificações na sensibilidade do hipotálamo ao estradiol ocorrem alterações nas respostas à neurotransmissores estimulatórios e inibitórios, que dependem da idade e da disponibilidade de energia no meio interno (RAWLINGS et al., 2003).
Associado a idade também há uma necessidade da maior disponibilidade de energia, glicose, insulina e leptina aumentando a sinalização para hipotálamo de que há um balanço energético favorável para o início da atividade reprodutiva (FOSTER; NAGATANI, 1999). Foi demonstrado para fêmeas bovinas que a leptina pode ser um sinalizador importante para a aquisição da puberdade (GARCIA et al., 2002).

2.1 GONADOTROFINAS

Durante o processo pós-natal de contenção da atividade gonadal nas novilhas pré-púberes há um aumento na concentração de LH entre 2 e 5 meses de idade em função de um aumento na amplitude dos pulsos de secreção, sem uma explicação aparente. Este aumento repercutiu em um aumento no diâmetro do maior folículo e no número total de folículos, o que aparentemente auxilia a organização da ciclicidade ovariana que se mantém durante a vida reprodutiva (EVANS et al., 1994a). O tratamento com gonadotrofinas em dias alternados a partir do segundo mês de idade interferiu na foliculogênese, atrasou a primeira ovulação e diminuiu a produção de estradiol (EVANS; RAWLINGS, 1995), demonstrando que a variação seqüencial na concentração de gonadotrofinas é essencial para que a maturação sexual ocorra normalmente.
As variações endócrinas que acontecem durante a maturação sexual das bezerras podem ser divididas em 3 períodos: o primeiro do nascimento a primeira semana onde os esteróides diminuem (observado também em potras por Nogueira et al., 1997) e as gonadotrofinas aumentam; o segundo período próximo ao primeiro mês quanto há um aumento na concentração de LH, E_2, testosterona e inibina e o terceiro período começa 5 semanas antes da primeira ovulação marcado por um aumento na concentração de E_2 e LH (NAKADA et al., 2000). Estas oscilações endócrinas se refletem no padrão de crescimento dos folículos ovarianos (HONARAMOOZ et al., 2004).
Uma explicação para o aumento na concentração de gonadotrofinas entre 2 e 5 meses talvez seja uma alternância dos mecanismos moduladores da inibição do eixo hipotálamo hipófise-gônadas, já que Dodson et al. (1989) demonstraram que a elevação na concentração de gonadotrofinas após a castração é mais lenta em bezerras com 2 semanas se comparada à bezerras de 6 ou 12 semanas de idade, sugerindo que o mecanismo gonadostático de bloqueio da secreção de gonadotrofinas deve se desenvolver entre 2 e 12 semanas de idade nas novilhas.

A participação do estradiol na modulação da maturação sexual foi demonstrada em novilhas pré-púberes ovariectomizadas através da administração de altas doses de E_2 exógeno que provocou uma supressão na secreção de LH até 12 horas após, mas resultou em um aumento na concentração de LH em 28 h. As novilhas que receberam implantes com progestágenos apresentaram a supressão inicial as 12 h, mas não o aumento na concentração de LH em resposta ao E_2 as 28 h. O fato das novilhas com implante responderem ao GnRH indicou que o progestágeno interferiu na secreção de GnRH hipotalâmico mas não na reposta hipofisária ao GnRH (BOLT et al.,1990).
Comparando novilhas taurinas com zebuínas (ovariectomizadas ou intactas) Rodrigues et al. (2002) observaram que a concentração de LH permaneceu baixa nas novilhas castradas com implante de E_2 quando comparadas com as castradas, comprovando a teoria gonadostática. Foi demonstrado ainda que a diminuição da retroalimentação negativa do estradiol sobre a secreção de LH aconteceu mais cedo nas novilhas taurinas quando comparado às zebuínas.
A norepinefrina possui um efeito estimulatório sobre a secreção de LH e a diminuição dessa estimulação parece ser um dos mecanismos através do qual o estradiol exerce a retroalimentação negativa sobre a secreção tônica de LH (LEGAN; CALLAHAN, 1999).
Na ovelha foi demonstrado que os neurônios noradrenérgicos A1 e A2 parecem ser influenciados por estrógenos circulantes além destes se localizarem em região neuroanatômica que sugere uma relação neurofuncional com a rede de neurônios envolvida na secreção de GnRH (SIMONIAN et al., 1998). Em ratos, a diminuição na quantidade de receptores $GABA_A$ nos neurônios secretores de GnRH representa um pré-requisisto para sincronizar a atividade neural com a rede secretora de GnRH (SIM et al., 2000).
Durante a maturação sexual na novilha, existe a participação dos opióides atuando em conjunto com o estradiol regulando a secreção de gonadotrofinas (WOLFE et al., 1991). Com a proximidade da puberdade se desenvolve um efeito inibitório agudo e forte dos opióides endógenos, a supressão dessa inibição mostra que ela é acompanhada de um efeito estimulatório dos neurônios sobre a secreção de GnRH. A diminuição progressiva o efeito inibitório dos opióides ajusta o período em que ocorrerá a primeira ovulação. O efeito supressor dos opióides parece acontecer em parte através da inibição do sistema neuronal dopaminérgico ou pela inibição generalizada dos neurônios secretores de GnRH a outros estímulos excitatórios. Com a proximidade da ovulação os neurônios α-adrenérgicos também estimulam a secreção de GnRH mas não estão envolvidos na inibição opioidérgica da secreção de GnRH em bezerras pré-púberes (HONARAMOOZ et al., 2000).
Uma das referências somáticas para o aumento da secreção de gonadotrofinas é a disponibilidade de energia. A diminuição no ganho de peso de novilhas cruzadas (Angus x Hereford) reduziu a freqüência de pulsos de LH atrasando o início da puberdade (YELICH et al., 1996). A dependência da condição nutricional para a secreção de LH foi observada por Bossis et al. (2000) que relataram um aumento gradual na concentração de LH conseqüência da retomada do padrão de secreção em pulsos do GnRH durante a re-alimentação em novilhas que estavam em anestro nutricional induzido.
Resumindo, o mecanismo de contenção da atividade gonadal das fêmeas bovinas pré-púberes envolve um período inicial pós-natal onde o mecanismo gonadostático ainda não está bem desenvolvido e o bloqueio acontece precariamente por uma inibição central. Após o 5º mês a gônada secreta estradiol inibindo a secreção de GnRH, evento que diminui progressivamente com a maturação sexual. Paralelamente o SNC se torna mais responsivo a neuro-hormônios estimuladores como a norepinefrina, para

conter essa onda de estímulos o sistema opioidérgico assume o bloqueio até que ocorra a primeira ovulação.

2.2 FOLÍCULOS

A foliculogênese está associada com o desenvolvimento de um grupo de folículos de vários estágios de maturação que são selecionados para continuar o crescimento, esses folículos após a exposição à um ambiente hormonal específico ovulam em resposta ao pico pré-ovulatório de gonadotrofonas (EVANS, 2003; MIHM, BLEACH, 2003).

Mesmo nos animais pré-púberes os folículos sem da fase de quiescência e atingem a fase antral sem chegar aos diâmetro pré-ovulatório. Foi observado em potras desde os 2 meses de idade que o diâmetro do maior folículo acompanhou as variações sazonais na secreção de gonadotrofinas (NOGUEIRA, GINTHER, 2000).

Já com 2 semanas de idade, as fêmeas bovinas apresentam crescimento de folículos em ondas semelhantes às fêmeas adultas (EVANS et al., 1994b). O crescimento dos folículos em ondas depende do FSH e LH; o FSH atua estimulando a proliferação e diferenciação de células da granulosa. Após a seleção (~ 8 mm de diâmetro) o folículo passa por modificações que incluem o aparecimento de receptores para LH nas células da granulosa, importante para manter o crescimento folicular; sinalizadores parácrinos, esteróides sexuais, IGF e TGF estimulados pelas gonadotrofinas mantém o crescimento folicular e a produção de estrógeno até a ovulação (HILLIER, 2001; GINTHER et al., 2002).

A alimentação com dois níveis de energia determinou alterações na cronologia do desenvolvimento folicular ovariano. Elevada quantidade de energia resultou em folículos dominantes maiores quando comparados com novilhas que recebem menor quantidade de energia, mas os folículos ovulatórios apresentaram o mesmo diâmetro, embora houvesse uma diferença na idade à primeira ovulação (BERGFELD et al., 1994).

Algumas características do desenvolvimento folicular (máximo diâmetro, taxa de crescimento, taxa de regressão e persistência do folículo dominante) aumentaram gradualmente durante a re-alimentação de novilhas que estavam em anestro nutricionalmente induzido, mas houve um atraso na ovulação conseqüência de um reduzido aumento pré-ovulatório de estradiol indicando que os eventos ovulatórios não estavam completamente normais (BOSSIS, et al., 2000).

O aumento na secreção em pulsos de LH durante as ondas de crescimento folicular nos 3 últimos meses que antecederam a puberdade, permitiram que acontecesse um aumento no diâmetro folicular que produziu estradiol suficiente para deflagrar o pico pré-ovulatório de gonadotrofinas (MELVIN et al., 1999).

Utilizando ultrassonografia para determinar variações nas características da população de folículos quando as novilhas (cruzadas *B.taurus* x *B.indicus*) estavam com 11 meses de idade, Perry et al. (1991) observaram relação entre o diâmetro do maior folículo com o início da puberdade aos 14 meses de idade, sugerindo que o processo da maturação sexual caracterizado pelo diâmetro do maior folículo apresenta diferenças entre as novilhas antes da primeira ovulação.

2.3 PROGESTERONA

O corpo lúteo (CL) formado após a ovulação do folículo ovariano que se rompeu, começa a secretar progesterona estimulado pelo LH que permite quantidades suficientes de 3β-HSD e citocromo P450 SCC para a síntese de esteróides (NISWENDER, 2002). Após a primeira ovulação as novilhas apresentaram um ciclo curto de produção de progesterona, provavelmente resultado da luteinização de um

folículo, este corpo lúteo se manteve por aproximadamente 7 dias e depois regridiu, o ciclo seguinte foi antecedido de uma ovulação que resultou em um corpo lúteo que se manteve pelo período de um ciclo progestacional normal (EVANS et al., 1994b).
A progesterona parece ser importante para sincronizar a secreção de LH, determinando um pico pré-ovulatório adequado. Anderson et al. (1996) demonstraram que o tratamento de novilhas pré-púberes com progesterona induziu a secreção de LH antecipando a primeira ovulação, acelerando o decréscimo da retro-alimentação negativa de estradiol que acontece próximo à primeira ovulação na novilha. Gümen; Wiltbank (2002) demonstraram ser possível deflagrar um pico de GnRH/LH com altas doses de benzoato de estradiol, mas para a ocorrência de um pico subseqüente foi necessário a exposição da vaca à progesterona através de um evento mediado pelo hipotálamo uma vez que a administração de GnRH estimulou a secreção de LH pela hipófise.

2.4 IDADE À PUBERDADE

A idade a primeira ovulação é o principal determinante do período da vida reprodutiva das vacas criadas para corte. Em novilhas taurinas a puberdade acontece entre 7-12 meses e 250-300 kg de peso corpóreo enquanto que a primeira cobertura só acontecerá aos 15 meses com o parto estimado para 24-36 meses de idade. Nos zebuínos a puberdade acontecerá em uma idade mais avançada e com uma maior percentagem do peso adulto (DOBSON; KAMONPATANA, 1986). Em uma revisão, Galina; Arthur (1989) encontraram idade média de 43,9±1,3 meses (3,6 anos) ao primeiro parto no Nelore e concluem que são necessárias mais informações sobre os mecanismos endócrinos que regulam o início da atividade ovariana. Sereno et al., (2001) encontraram a mesma idade ao primeiro parto (3,4 anos) para novilhas Nelore criadas na região do Pantanal Mato-grossense.
Em geral novilhas zebuínas atingem a puberdade mais tarde que as novilhas taurinas (européias) (MUKASA MUGERWA, 1989; RODRIGUES et al., 2002). Mesmo novilhas cruzadas (*B.taurus* x *B. indicus*) apresentaram puberdade mais velhas e mais pesadas que novilhas taurinas (PERRY et al., 1991). A adaptação dos taurinos ao clima temperado faz com que os mesmos demorem mais para atingir a puberdade quando criados nos trópicos (GALINA, ARTHUR, 1989).
Embora exista a dependência de uma idade mínima para a primeira ovulação na novilha, relacionada ao ganho de peso do nascimento à puberdade, fatores genéticos e ambientais também influenciam a idade à puberdade (PATTERSON, et al. 1992).
Para aumentar o período produtivo em novilhas de reposição o ideal seria a prenhez entre 14 e 16 meses de idade e o parto aos 24 meses. Vários fatores interferem na idade à puberdade os mais descritos são a nutrição e a variação sazonal (SCHILLO et al.,1992). Embora a maioria dos trabalhos aborde esses fatores (nutrição e estação) como determinantes, existem menos informações sobre os determinantes hereditários individuais da idade à puberdade.
Independente do “efeito macho” provocado pela exposição ao touro, Wehrman et al. (1996) observaram que 25% das novilhas apresentaram atividade luteínica precocemente (menor que 2 vezes o desvio padrão da média do rebanho) aos 300 dias de idade.
O “sistema um ano” que busca a prenhes das novilhas ao redor de um ano de idade e o primeiro parto aos 2 anos de idade consiste em um conjunto de medidas de alimentação, manejo e seleção genética para conseguir esse objetivo (ROCHA; LOBATO, 2002). Novilhas Nelore apresentam diferentes idades a primeira concepção sugerindo variação genética entre elas quanto a apresentação deste fenótipo (MILAZOTTO et al., 2002).

A genética dos animais associada à um nível alimentar alto e contínuo determina a eficiência das novilhas em ficarem prenhes aos 24 meses de idade. Novilhas cruzadas com maior grau de sangue zebuíno apresentaram menor eficiência em emprenharem aos 24 meses quando comparadas com novilhas com maior percentual taurino (ROCHA; LOBATO, 2002).
Foi demonstrada uma associação genética favorável entre a circunferência escrotal nos touros e a idade a puberdade em novilhas, a seleção de reprodutores em função da circunferência escrotal aos 18 meses pode ser uma alternativa no sentido de diminuir a idade a puberdade em novilhas zebuínas (VARGAS et al., 1998).

2.5 PESO À PUBERDADE

Para que a primeira ovulação aconteça o peso é mais importante que a idade, uma vez que a nutrição inadequada atrasa a puberdade enquanto que o aumento da nutrição, associada a um rápido crescimento corporal, antecipa a maturação sexual. Uma questão interessante é a de como o SNC reconhece que o corpo chegou à um tamanho apropriado, adequado para a reprodução. Aparentemente um sinalizador candidato para deflagrar o início da ciclicidade é a leptina, um hormônio derivado dos adipócitos que promove a secreção de IGF-I bem como aumenta a disponibilidade de glicose ao SNC (FOSTER; NAGATANI, 1999).
A maior adaptação de novilhas cruzadas (*B.indicus* x *B.taurus*) à altas temperaturas fez com que estas apresentassem maior ganho de peso (kg/dia) que as novilhas taurinas durante a estação de monta (primavera/verão) com temperaturas elevadas. Novilhas que ficaram prenhes na primeira estação de monta, apresentaram maior ganho de peso (kg/dia) entre o nascimento e o início do acasalamento, quando comparadas com as que não emprenharam (ROCHA; LOBATO, 2002).
O ganho de peso da desmama a puberdade é um importante referencial, Alencar et al. (1987) observaram que as novilhas Nelore que apresentaram maior peso aos 12 e 18 meses possuíam menor idade ao primeiro cio. A restrição alimentar aos 8 meses de idade aumentou a idade e diminuiu o peso à puberdade (BERGFELD et al.,1994). A variação no nível de proteína bruta (19, 13 e 8%) na dieta de novilhas repercutiu em diferença de 134 dias na idade e 45 kg no peso à puberdade (OYEDIPE et al., 1982). Em um outro estudo o aumento na quantidade de proteína acima do recomendado não antecipou a idade a puberdade em novilhas zebuínas (FAJERSSON et al., 1991).

2.6 SELEÇÃO PARA PRECOCIDADE SEXUAL

Apesar do conhecimento gerado pelas pesquisas a idade ao primeiro parto se manteve em 40 meses de 1946 a 1988 (BERGMANN, 1993). A necessidade da redução da idade ao primeiro parto, tornando o zebu mais precoce reprodutivamente é um dos maiores desafios da pecuária nacional. Tanto machos quanto fêmeas apresentam variabilidades genéticas no desempenho reprodutivos que viabilizam a seleção para esse critério (MACKINNON et al., 1990; BERGMANN et al., 1996; MEYER et al., 1990).
A característica indicadora da precocidade sexual dos bovinos é a idade à puberdade e pode ser um importante referencial nos programas de melhoramento dos zebus. Para as fêmeas, a ovulação seguida de manifestação de estro caracteriza o início da vida reprodutiva. Segundo MacNeil et al. (1984) a herdabilidade da idade à puberdade é relativamente alta (0,61) permitindo seleção através deste fenótipo. No entanto do ponto de vista prático, no sistema de criação extensiva há dificuldade em se caracterizar a primeira ovulação para que possa ser utilizada como ferramenta para o melhoramento. A identificação da primeira ovulação nas fêmeas, envolve palpações retais, avaliações ultra-sonográficas ou quantificação da progesterona circulante que impossibilitam sua aplicação na rotina de propriedades rurais. Por outro lado a

identificação do primeiro estro também envolve trabalho adicional, mesmo utilizando rufiões com marcadores.
Em função da complexidade da atividade reprodutiva a seleção direta para algumas características pode ser feita através de outras variáveis reprodutivas que possam ser facilmente medidas desde que possuam variabilidade e tenham correlação genética com os eventos reprodutivos. O início da capacidade reprodutiva das fêmeas pode ser induzido a partir da idade ao primeiro parto possuindo grande importância zootécnica. A impossibilidade da identificação da primeira ovulação ou estro torna a idade ao primeiro parto uma variável de fácil acompanhamento indicativa da precocidade reprodutiva da fêmea jovem (PONZONI, 1992).
Há variabilidade genética na data do primeiro parto de Nelore resultando em uma herdabilidade de 0,11 (GRESSLER et al., 1998). A diminuição da idade ao primeiro parto aumenta a produção, antecipa a recuperação do investimento, aumenta a vida produtiva além de permitir seleção mais rápida nas fêmeas por reduzir o intervalo entre gerações (MATTOS; ROSA, 1984).
Em outro trabalho, a média das estimativas da herdabilidade para a antecipação da idade à primeira cria de fêmeas Nelore expostas ao touro aos 14 meses foi de 0,19 (PEREIRA et al., 2001), o que sugere a possibilidade de resposta à seleção para esse critério. Dessa forma, a antecipação da idade reprodutiva das fêmeas pode ser obtida ao se selecionar as novilhas para a menor idade ao primeiro parto, uma vez que a identificação da idade à puberdade (primeira ovulação com estro) apresenta dificuldades práticas para a aplicação em criações extensivas (BERGMANN, 1993). Um fator limitante da utilização da idade ao primeiro parto como critério de seleção para precocidade sexual é o tempo demandado (de 2 ou 3 anos) para a expressão desta característica.
A possibilidade da identificação de variáveis fisiológicas em novilhas pré-púberes relacionadas à fertilidade precoce permitirá antecipar o processo de seleção das novilhas com potencial para precocidade diminuindo o intervalo entre a observação do evento e seleção. Os conhecimentos poderão ser gerados através de uma pesquisa integrando de forma multidisciplinar a fisiologia, normalmente geradora de conhecimentos básicos à zootecnia com maior vocação tecnológica.

BIBLIOGRAFIA

ACNB - Associação dos Criadores de Nelore do Brasil. Histórico da Raça Nelore. (Eletronic Publication). Disponível em http://www.nelore.org.br/default3.asp. Acesso em 29 de setembro de 2003.

ALENCAR, M.M.; COSTA J.L.; CORREA, L.A. Desempenho reprodutivo de fêmeas das raças canchim e nelore. **Pesq. Agropec., Bras.**, v.22, n.7, p.753-758, 1987.

ANDERSON, LH; McDOWELL, C.M.; DAY, M.L. Progestin induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. **Biol. Reprod.**, v.54, p.1025-1031, 1996.

BERETTA, V.; LOBATO, J.F.P.; MIELITZ NETO, C.G.A. Produtividade e eficiência biológica de sistemas pecuários de cria diferindo na idade das novilhas ao primeiro parto e na taxa de natalidade do rebanho no Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Zootec.**, v.30, n.4, p.1278-1286, 2001.

BERGFELD, E.G.M.; KOJIMA, F.N.; CUPP, M.E.; PETERS, K.E.; GARCIA-WINDER, M.; INDER, J.E. Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. **Biol. Reprod.**, v.51, p.1051-1057, 1994.

BERGMANN, J.A.G. Melhoramento genético da eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In : **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 10, 1993, Belo Horizonte, **Suplemento**. Belo Horizonte: CBRA, p.70-86, 1993.

BERGMANN, J.A.G.; ZAMBORLINI, L.C.; PROCÓPIO, C.S.O.; ANDRADE, V.J.; VALE FILHO, V.R. Estimativas de parâmetros genéticos do perímetro escrotal e do peso corporal em animais da raça Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.48, n 1, p. 69-78, 1996.

BÓ G.A.; BARUSELLI P.S.; MARTIYNEZ M.F. Pattern and manipulation of follicular development in Bos indicus cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.307–326, 2003.

BOLT, D.J.; SCOTT, V.; KIRACOFE, G.H. Plasma LH and FSH after estradiol, norgestomet and GnRH treatment in ovariectomized beef heifers. **Anim. Reprod. Sci.**, v.23, p.263–271, 1990.

BOSSIS, I.; WETTEMANN, R.P.; WELTY,S.D.; VIZCARRA, J.; SPICER,L.J. Nutritionally induced anovulation in beef heifers: ovarian and endocrine function during realimentation and resumption of ovulation. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1436-1444, 2000.

DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P.L.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biol. Reprod.**, v.37, p. 1054-1065, 1987.

DOBSON, H.; KAMONPATANA, M. A review of female cattle reproduction with special reference to a comparison between buffaloes, cows and zebu. **J. Reprod. Fert.**, v.77, p.1-36, 1986.

DODSON, S.E.; MacLEOD, B.J. HARESIGN, W.; PETERS, A.R.; LAMMING, G.E. DAS.D. Ovarian control of gonadotrophin secretion in the prepubertal heifer. **Anim. Reprod. Sci.**, v.21, p.1-10, 1989.

ELER, J.P.; SILVA, J.A.II; FERAZ, J.B.S.; DIAS, F.; OLIVEIRA, H.N.; EVANS, J.L.; GOLDEN, B.L. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nelore heifers. **J. Anim. Sci.**, v.80, p.951-954, 2002.

EVANS, A.C.O.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. **J. Reprod. Fert.**, v.100, p.187-194, 1994a.

EVANS, A.C.O.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 wk of age. **J. Reprod. Fert.**v.102, p.463-470, 1994b.

EVANS, A.C.O.; RAWLINGS, N.C. Effects of treatment with LH and FSH between 8 and 12 weeks of age on ovarian follicular development and puberty in heifers. **Theriogenology**, v.44, p.725-740, 1995.

EVANS, A.C.O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. **Reprod. Dom. Anim.** , v.38, p.240-246, 2003.

FAJERSSON, P.; BARRADAS, H.V.; ROMAN-PONCE, H.; COOK, R.M. The effect of dietary protein on age and weight at the onset of puberty in Brown Swiss and Zebu heifers in the tropics. **Theriogenology**, v.35, n.4, p.845-855, 1991.

FOSTER, D.L.; NAGATANI, S. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. **Biol. Reprod.**, v.60, p. 205–215, 1999.

GALINA, C.S., ARTHUR, G.H. Review of cattle reproduction in the tropics. Part 1. Puberty and age at first calving. **Anim. Breed. Abstr.**, v.57, n.7, p.583-590, 1989.

GARCIA, M.R.; ALMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S.W.; STANKO, R.L.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; NIZIELSKI, S.E.; WILLIAMS, G.L. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and differente seasons in cattle. **J. Anim. Sci.**, v.80, p.2158-2167, 2002.

GINTHER O. J., BERGFELT D. R., BEG M. A.; KOT, K. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle **Reproduction**, v.124, p.475–482, 2002.

GRESSLER, S.L.; BERGMANN, J.A G., PENNA, V.M.; PEREIRA, C.S.; PEREIRA, J.C.C. Estudo das associações genéticas entre perímetro escrotal e características reprodutivas de fêmeas da raça Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35ª, Botucatu, SP, 1998. **Anais**. SBZ, Botucatu, SP, v.3, p. 368-370.

GÜMEN, A.; WILTBANK, M.C. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. **Biol. Reprod.**, v.66, p.1689–1695, 2002.

HILLIER, S.G.; Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. **Mol. Cell. Endocriniol.**, v.179, p.39-46, 2001.

HONARAMOOZ, A.; CHANDOLIA, R.K.; BEARD, A.P.; RAWLINGS, N.C. Opioidergic, dopaminergic and adrenergic regulation of LH secretion in prepubertal heifers. **J. Reprod. Fert.**, v.119, p.207-215, 2000.

HONARAMOOZ, A.; ARAVINDAKSHAN, J.; CHANDOLIA, R.K.; BEARD, A.P.; BARTLEWSKI, P.M.; PIERSON,R.A.; RAWLINGS, N.C. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. **Anim. Reprod. Sci.,** v.80, p.15-29, 2004.

HUTSON, J.M., HASTHORPE, S. AND HEYNS, C.F. Anatomical and functional aspects of testicular descent and cryptorchidism. **Endocr. Rev**.,v.18, p.259–280, 1997.

LEGAN, S.S.J.; CALLAHAN, W.H. Suppression of tonic LH secretion and norepinephrine release near GnRH neurons by estradiol in ovariectomized rats. **Endocrinology**, v.79, p.237-245, 1999.

LOBO, R.B., FERNANDEZ, M.B.; MAFFEI, W.E.; BEZERRA, L.A.; LOBO, M.P.; GAVIO, D.; RIBEIRO, L.B. Estudo preliminar da mensuração do perímetro ovariano em bezerras da raça Nelore participantes do PMGRN. **Rev.Bras.Reprod.Anim.**, v.25, n.2, p.127-128, 2001.

MACKINNON, M.J., TAYLOR, J.F. , HETZEL, D.J.S. Genetic variation and covariation in beef cow and bull fertifity. **J. Anim. Sci.** v. 68 , p.1208-1214, 1990.

MacNEIL, M. D., CUNDIFF, L. V., DINKEL, C. A., KOCH, R. M. Genetic correlations among sex-limited traits in beef cattle. **J. Anim. Sci**., 58:1171, 1984.

MATTOS, S.; ROSA, A.N. Desempenho reprodutivo de fêmeas de raças zebuínas. **Inf. Agropec.** v.10, n. 112, p. 29-33, 1984.

MELVIN E.J.; LIDSEY, B.R.; QUINTAL FRANCO, J.; ZANELLA, E.; FIKE, K.E.; Van TASSEL, C.P.; KINDER, J.E. Circulating concentrations of estradiol, LH and FSH during waves of ovarian follicular development in prepubertal cattle. **Biol. Reprod.**, v.60, p.405-412, 1999.

MEYER, K.; HAMMOND, K.; PAMELL, P.F.; MACKINNON, M. J.; SIVARAJASINGAM, S. Estimates of heritability and repeatability for reproductive traits in Australian beef cattle. **Liv. Prod. Sci.**, v. 25, p.15-30, 1990.

MIHM, M.; BLEACH, E.C.L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.217–237, 2003.

MILAZZOTTO, M.P.; PERRI, S.H.; CAMPAGNARI, F.; GARCIA, J.F. Genetic analysis of early puberty phenotype in Bos primigenius indicus. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.613, 2002.

MUKASA MUGUERWA, E. A review of reproductive performance of female Bos indicus (zebu) cattle. **ILCA-Monograph**, n°.6 134p. 1989.

NAKADA, K.; MORIYOSHI, M.; NAKAO, T.; WATANABE, G.; TAYA, K. Changes in concentrations of plasma immunoreactive follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol-17 β, testosterone, progesterone, and inhibin in heifers from birth to puberty, **Dom. Anim. Endocrinol.,** v.18, p.57–69, 2000.

NAKADA, K.; MORIOYOSHI, M.; NAKAO, T. Changes in pheripheral levels of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone in prepubertal heifers after estradiol treatment. **J. Reprod. Develop.**, v.47, n.6, 2001.

NISWENDER, G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **Reproduction,** v.123, p.333–339, 2002.

NOGUEIRA, G. P.; BARNABE, R. C.; VERRRESCHI, I. T. N. Puberty and growth rate in Thoroughbred fillies. **Theriogenology**, v.48, p.581-588, 1997.

NOGUEIRA, G.P., GINTHER, O.J. Dinamics of follicle population and gonadotropin concentrations in fillies age two to tem months. **Equi. Vet. J.**, v.32, n.6, p.482-488, 2000.

OYEDIPE, E.O.; VOH, A.A.; MARIRE, B.N.; PATHIRAJA, N. Plasma progesterone concentrations during the oestrous cycle and following fertile and non-fertile inseminations of zebu heifers. **Br. Vet. J.**, v.142, p.41–46, 1986.

PEREIRA, E., ELER, J.P., FERRAZ, J.B.S. Análise genética de algumas características reprodutivas e suas relações com o desempenho ponderal na raça Nelore. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**., v.53, n.6, p.720-727, 2001

PATTERSON, D.J., PERRY, R.C., KIRACOFE, G.H., Bellows, R.A., Staigmiller, R.B., Corah, L.R.. Management considerations in heifers development and puberty. **J. Anim. Sci.** , v.70, p.4018-4035, 1992.

PERRY, R.C.; CORAH,L.R.; COCHRAN,R.C.; BRETHOUR, J.R.; OLSON, K.C.; HIGGINS, J.J. Effect of hay quality, breed and ovarian development on onset of puberty and reproductive performance of beef heifers. **J. Prod. Agric.**, v.4, n.1, p.13-18, 1991.

PONZONI, R.W. Which trait for genetic improvement of beef cattle reproduction: calving rate or calving day. **J. Anim. Breed. Gen.** v.10, n 2, p. 119-128, 1992.

RAMALEY, J.A. Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. **Biol. Reprod.**, v.20, p.1-31, 1979.

RAMIREZ, D.V.; McCANN, S.M. Comparison of the regulation of LH secretion in immature and adult rats. **Endocrinology**, v.72, p.452-464, 1963

RAWLINGS, N.C.; EVANS, A.C.O.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P.M. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.259-270, 2003.

ROCHA, M.G.; LOBATO, J.F.P. Avaliação do desempenho reprodutivo de novilhas de corte primíparas aos dois anos de idade. **R. Bras. Zootec.**, v.31, n.3, p.1388-1395, 2002.

RODRIGUES H.D.; KINDER, J.E.; FITZPATRICK L.A. Estradiol regulation of LH secretion in heifers of two breeds that reach puberty at different ages. **Biol. Reprod.**, v.66, p.603-609, 2002.

SCHILLO, K.K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. **J. Anim. Sci**. v.70, p.1271-1282, 1992.

SERENO, J.R.B.; PELLEGRIN A.O.; LARA, M.A.C.; ABREU, U.G.P.; SERENO, F.T.P.S.; CHALITA, L.V.A.S. Estimativa de la edad y peso de la primera monta de novillas en el Pantanal brasileño. **Pesq.Agropec. Bras.**, v.36, n.12, p.1561-1565, 2001.

SIM, J.A.; SKYNNER, M.J.; PAPE, J-R; HERBISON, A.E. Late postnatal reorganization of $GABA_A$ receptor signaling in native GnRH neurons. **Eur. J. Neurosci.**, v.12, p.3497-3504, 2000.

SIMONIAN, S.X.; DELALEU, B., CARATY, A.; HERBISON, A.E. Estrogen receptor expression in brainstem noradrenergic neurons of the sheep. **Neuroencocrinol.**, v.67, p.392-402, 1998.

TERASAWA, E.; FERNANDEZ D.F. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. **Endocrine Reviews,** v.22, n.1, p.111–151, 2001.

VARGAS, C.A.; ELZO, M.A.; CHASE, C.C; CHENOWETH, P.J.; OLSON, T.A. Estimation of genetic parameters for scrotal circumference, age at puberty in heifers, and hip height in Brahman cattle. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.2536-2541, 1998.

WEHRMAN, M.E.; KIJIMA, F.N.; SANCHEZ, T.; MARISCAL, D.V.; KINDER, J.E. Incidence of precocious puberty in developing beef heifers. **J. Anim. Sci**., v.74, p.2462-2467, 1996.

WOLFE, M.W.; STUMPF,T.T.; ROBERSON, M.S.; KITTOK, R.J. KINDER, J.E. Opioid and 17β estradiol regulation of LH and FSH secretion during sexual maturation in heifers. **Dom. Anim. Endocrinol**., v.8, n.4, p.491-498, 1991.

YELICH, J.V.; WETTEMANN, R.P.; MARSTON, T.T.; SPICER, L.J. Luteinizing hormone, growth hormone, insulin-like growth factor-I, insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.13, n.4, p.325-338, 1996.

ATUALIZAÇÕES SOBRE ESTRATÉGIAS ANTILUTEOLÍTICAS PARA O AUMENTO DA FERTILIDADE EM BOVINOS

Mario Binelli, Rui Machado, Marco Bergamaschi, Pietro S. Baruselli

1. INTRODUÇÃO

Pode-se definir um "período crítico" no ciclo reprodutivo das vacas, entre os dias 15 e 19 do ciclo estral. Nesse período, a fisiologia da vaca deve ser apropriadamente ajustada, dependendo de se estiver vazia ou prenhe. A mudança do estado cíclico para o estado prenhe depende de um mecanismo efetivo de bloqueio da luteólise. O bloqueio da luteólise, e consequentemente a prenhez, só se estabelecerá se o concepto for competente para enviar os sinais antiluteolíticos apropriados e o endométrio tiver a capacidade de responder a tais sinais, bloqueando a produção de prostaglandina F2 (PGF). A supressão da síntese de PGF pelo embrião se dá através de interações bioquímicas parácrinas, entre as células trofoblásticas do concepto e as células epiteliais do endométrio materno. Assim, para bloquear efetivamente o processo luteolítico, o concepto deve ter-se alongado suficientemente para ocupar a maior parte do lúmen do corno uterino ipsolateral ao CL. Ou seja, embriões subdesenvolvidos e portanto não alongados suficientemente serão menos capazes de bloquear a luteólise e conseqüentemente poderão ser mais facilmente abortados. Um elemento-chave no processo antiluteolítico é o interferon-tau (IFN) secretado paracrinamente pelo concepto. Estudos *in vivo* demonstraram que infusões de IFN no útero prolongaram o ciclo estral (Meyer et al., 1995). Além disso, infusões uterinas de IFN *in vivo* diminuíam a receptividade de explantes de endométrio aos estimuladores intra-celulares da síntese de PGF, comparando-se aos explantes de endométrios de vacas que haviam recebido infusões de placebo (Arnold et al., 2000).

Tal comunicação entre as unidades do concepto e maternal freqüentemente são mal sucedidas, resultando na ocorrência da luteólise e conseqüente mortalidade embrionária. De fato, a ocorrência de mortalidade embrionária entre os dias 8 e 16 de prenhez chega a 30% (Diskin e Sreenan, 1980). Mais recentemente, Humblot (2001) reportou a ocorrência de 20,5 a 43,6% de mortalidade embrionária até o dia 25 pós-inseminação em rebanhos franceses. Já Santos et al. (2004b) sugeriram que a mortalidade embrionária se aproxime de 60% até o dia 28 pós-inseminação, sendo em geral maior para vacas de leite de alta produção.

Considerando-se a mortalidade embrionária associada ao período crítico, Binelli et al. (2001) recomendaram uma série de estratégias farmacológicas, nutricionais e de manejo objetivando reduzir tal mortalidade. Tais estratégias visam tanto a diminuição da capacidade luteolítica da unidade maternal quanto o aumento do estímulo antiluteolítico induzido pelo concepto. As mesmas podem envolver manipulações nas funções folicular, luteínica, uterina e do concepto e manipulações do ambiente. Os objetivos específicos das estratégias propostas foram: (1) aumentar o tamanho do folículo pré-ovulatório para gerar um CL maior, (2) aumentar a taxa de crescimento do CL, (3) aumentar as concentrações plasmáticas de progesterona durante a fase luteínica, (4) diminuir o efeito de um folículo dominante durante o período crítico, (5) aumentar o estímulo antiluteolítico do concepto e (6) diminuir a capacidade luteolítica do útero materno. Estratégias similares foram propostas por Santos e co-autores (2004b) para melhorar a sobrevivência embrionária em bovinos.

Objetiva-se com o presente trabalho revisar resultados científicos recentes relacionados ao uso de estratégias antiluteolíticas em bovinos. Serão enfocadas

estratégias para aumentar concentrações plasmáticas de progesterona, estratégias para reduzir as concentrações plasmáticas de estradiol e outras estratégias diversas.

2. ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA

O ambiente uterino devidamente preparado pela progesterona fornece as condições mais favoráveis para o desenvolvimento do concepto. Mann e outros (1996; 1998) recuperaram embriões 16 dias após a inseminação e os classificaram como embriões bem ou mal desenvolvidos. A análise das concentrações plasmáticas de progesterona das vacas demonstrou que baixas concentrações durante a fase luteínica estavam relacionadas com a presença de embriões mal desenvolvidos. Por sua vez, Wathes et al. (2003) sugeriram que um atraso na elevação inicial das concentrações de progesterona medidas no leite está relacionada com baixas taxas de prenhez. A partir de tais informações sugere-se que animais contendo um CL com capacidade de elevar rapidamente e manter altas as concentrações de progesterona apresentarão um melhor desenvolvimento do concepto. Tais conceptos serão mais capazes de bloquear a luteólise. De fato, Geisert e outros (1988) já haviam demonstrado que suplementação da progesterona endógena aumentou a taxa de crescimento embrionário e, conseqüentemente, sua capacidade de produzir IFN. Dessa forma, estratégias visando aumento da concentração plasmática de progesterona durante a fase luteínica pós inseminação ou transferência de embriões devem resultar em melhora nas taxas de prenhez.

Uma forma de se aumentar a concentração plasmática de progesterona é estimular a formação de um CL com maior capacidade de síntese de progesterona. Duas maneiras possíveis para se alcançar tal objetivo são (1) aumentar o tamanho do folículo pré-ovulatório, uma vez que ovulando-se um folículo de maior tamanho, deve resultar um CL também de maior tamanho (Vasconcelos et al., 2000 e Vaconcelos et al., 2001) e com maior capacidade de produção de progesterona e (2) estimular o crescimento e diferenciação do folículo pré-ovulatório com suplementação gonadotrófica adequada.

Mantovani e colaboradores (2004) mantiveram por 14 dias dispositivos intravaginais contendo progesterona e administraram injeções de PGF no dia da inserção do implante e 5 dias após para produzirem folículos persistentes em novilhas receptoras de embrião. Houve aumento significativo no tamanho dos folículos pré-ovulatórios, no tamanho dos CLs resultantes e na concentração plasmática de progesterona medida no dia da transferência de embriões em comparação ao grupo controle (dispositivos mantidos por 8 dias e injeção de PGF no dia da remoção do implante). Contudo, as taxas de concepção foram menores para novilhas do grupo tratado em comparação ao grupo controle (38,9 vs. 59,1%, respectivamente). Resultados semelhantes (39,4 vs. 47% para grupos tratado e controle respectivamente) foram reportados por Moura et al. (2001). Esses autores estimularam a produção de folículos persistentes em receptoras de embrião com implantes auriculares contendo progestágenos associados a uma injeção de PGF no dia da inserção do implante. É possível que as elevadas concentrações de estradiol (Wehrman et al., 1997) e reduzidas concentrações de progesterona (Shahan-Albalancy et al., 2001) durante o ciclo sincronizado, que precedeu a implantação embrionária, resultem em ambiente uterino desfavorável para a manutenção da prenhez.

O crescimento e diferenciação final do folículo pré-ovulatório pode ser estimulado com a administração estratégica de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG; revisado por Bó et

al., 2003 e Baruselli et al., 2004). Nos trabalhos de Cutaia et al. (2003) e Baruselli et al. (2003), vacas receberam uma injeção de benzoato de estradiol (2mg) e dispositivos intravaginais contendo progesterona, que foram deixados por 8 dias. No dia da remoção do dispositivo, os animais foram injetados com PGF e divididos para receberem 0 ou 400 UI de eCG. A seguir, todos os animais tiveram ovulação induzida por benzoato de estradiol (1 mg) e foram inseminados em tempo fixo. Em relação ao grupo controle, tratamento com eCG aumentou a taxa de prenhez em vacas Bradford (26,7 vs. 34,6%), Nelore (38,9 vs. 54,7%) e mestiças meio sangue nelore (46,8 vs. 59,1%). A hipótese é que tal aumento nas taxas de prenhez deva-se a um estímulo na função luteínica dos CLs resultantes da ovulação de folículos estimulados pelo eCG. De fato, utilizando protocolos semelhantes com dispositivos de progesterona (Marques et al., 2003) ou progestágenos (Bergamaschi, 2004 – dados não publicados) demonstrou-se que apesar do tamanho do folículo pré-ovulatório não ser diferente entre os grupos, houve aumento no volume do CL resultante e nas concentrações plasmáticas de progesterona pós-inseminação ($P<0,06$) para vacas que receberam 400 vs. 0 UI de eCG.

Outra maneira de se aumentar as concentrações plasmáticas de progesterona durante a fase luteínica é através da indução de CLs acessórios (Schmitt et al., 1996). Espera-se que aumentando a massa luteínica aumente também a produção de progesterona. Diversos autores estimularam hormonalmente a ovulação do folículo dominante da primeira onda visando a formação de um CL acessório. Santos et al. (2001) injetaram vacas holandesas em lactação com 3300 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) 5 dias pós-inseminação e obtiveram aumento no número de CLs e na concentração plasmática de progesterona em relação ao grupo controle que não recebeu hCG. Resultaram também maiores taxas de concepção para os animais tratados. Tais dados foram confirmados por Nishigai et al. (2002). Kastelic e Ambrose (2004), injetaram vacas com 12,5mg LH ou 2500 UI de hCG no dia 5 após inseminação artificial e obtiveram aumento nas concentrações de progesterona. Contudo, houve apenas aumento numérico nas taxas de prenhez em relação ao grupo controle não tratado. Observações similares foram obtidas por Machado et al. (2004), que administraram 3000 UI de hCG no dia 5 do ciclo estral de vacas Nelore. Marques (2002) injetou hCG, hormônio luteinizante (LH), hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) ou colocou um dispositivo contendo progesterona em novilhas receptoras no dia da transferência embriões. Apesar das injeções estimularem a produção de um CL acessório, apenas o tratamento com hCG aumentou significativamente as concentrações plasmáticas de progesterona e taxas de prenhez. Injeções de LH (20 mg) no dia 6 do ciclo estral também não estimularam aumento da produção de progesterona, apesar da formação de um CL acessório em vacas holandesas secas (Goissis et al. 2004). Coletivamente, sugere-se a partir dos resultados acima que a formação de um CL acessório não garante aumento nas concentrações de progesterona. Contudo, nota-se que houve aumento consistente da progesterona em animais tratados com hCG. Tal fato deveu-se provavelmente à maior meia-vida sanguínea do hormônio, assim como seu efeito estimulatório da esteroidogênese luteínica.

3. ESTRATÉGIAS PARA REDUZIR AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE ESTRADIOL

Uma série de evidências indicam que o estradiol pode ter um papel central no mecanismo luteolítico. Por exemplo, a irradiação dos folículos ovarianos, que elimina de forma reversível a produção de estradiol folicular, retarda a luteólise e prolonga o

ciclo estral (Villa-Godoy et al., 1985). Salfen e colaboradores (1999) injetaram novilhas holandesas com líquido folicular depletado de esteróide a partir da emergência da segunda onda de crescimento folicular. Devido à ação da inibina contida nesse fluído, foi retardado o crescimento folicular e a ocorrência da luteólise em comparação ao grupo controle. Sugere-se a partir dessas observações que a presença de folículos dominantes secretores de estradiol é requerida para a ocorrência da luteólise. Em novilhas, Thatcher e colaboradores (1986) demonstraram que injeções de estradiol no 13º dia do ciclo estral estimularam a liberação de PGFM, a partir de 3 horas após aplicada a injeção, atingindo-se o pico após 6 horas e retomando-se os níveis basais após cerca de 10 horas. Confirmando que os aumentos de PGFM verificados na circulação periférica representam PGF de origem uterina, Knickerbocker e outros (1986) constataram uma aguda elevação de PGF na veia uterina de vacas que haviam recebido estradiol. Mais recentemente, Castro e Paula et al. (2004) demonstraram que a produção de PGF em resposta a injeções de estradiol aumentou do dia 13 ao dia 19 do ciclo estral, sugerindo um aumento de sensibilidade ao estradiol com a aproximação da luteólise fisiológica. Coletivamente, essas constatações indicam que tanto estradiol endógeno quanto exógeno podem estimular a secreção de PGF e provocar a luteólise. Não obstante, o mecanismo de ação do estradiol ainda não foi elucidado.

Estrategicamente, seria interessante reduzir o tamanho ou eliminar o folículo dominante presente durante o "período crítico" (dias 15 a 19). Conforme mencionado acima, o estradiol pode estar diretamente envolvido com o processo de luteólise, e sua eliminação (ou redução) retardaria o processo luteolítico. Para atingir tal fim, Machado et al. (2004) injetaram vacas nelore com 0 ou 3000 UI de hCG no dia 5 e com 0 ou 5 mg de estradiol-17 no dia 12 de um ciclo estral sincronizado. Confirmando os dados de Bó et al. (1995), tal tratamento com estradiol estimulou a emergência de uma nova onda de crescimento folicular aproximadamente 4 dias após. Com isso, foi retardado o aparecimento de folículos dominantes (dia 19,4 para animais tratados com hCG e estradiol vs. dia 16,6 para os animais controle, respectivamente). Contudo, o tratamento com estradiol antecipou a ocorrência da luteólise em 1,5 dias em média em relação ao grupo controle. Esperava-se que a luteólise fosse retardada devido à ausência de folículos dominantes durante o período critico, mas tal fato não ocorreu. Sugere-se que a exposição ao estradiol durante a injeção do dia 12 tenha sensibilizado o útero e causado a luteólise prematuramente. Experimentos futuros verificarão a eficácia de outros métodos farmacológicos visando a eliminação de folículos dominantes durante o período crítico e extensão da fase luteínica.

4. OUTRAS ESTRATÉGIAS

A síntese de PGF é o resultado final de uma complexa cascata de ocorrências intra-celulares altamente coordenadas. Essa cascata envolve a ativação seqüencial da proteína acopladora do GTP, da fosfolipase-C, da proteína quinase-C, da fosfolipase-A_2 e da ciclooxigenase-2 (COX-2). A COX-2 converte o ácido araquidônico em prostaglandina-H2, que é, a seguir, convertida em PGF (esse mecanismo é descrito por Burns et al., 1997). Estratégias que objetivem a inibição específica de enzimas que participem da síntese de PGF durante o período crítico devem aumentar taxas de prenhez em fêmeas bovinas.

Elli et al. (2001) administraram lisinato de ibuprofeno (um antiinflamatório não esteroidal que inibe a atividade da enzima COX-2) uma hora antes da transferência de embriões. Taxas de prenhez foram maiores para animais tratados do que para animais controle (82 vs. 56%, respectivamente). Mais recentemente, Pugh et al. (2004) trataram vacas

com outros inibidores da COX-2 logo antes da transferência de embriões. Esses autores notaram um aumento significativo de 18% na taxa de prenhez de vacas tratadas com aspirina em comparação às vacas controle. Em contraste, tratamento com flunixin meglumine aumentou as taxas de prenhez em apenas 12%. Apesar desses tratamentos não terem sido administrados no período crítico, é possível que a liberação de PGF resultante das manipulações associadas à transferência de embriões estimule precocemente a luteólise. Dessa forma, a inibição de tal liberação pode explicar o aumento nas taxas de prenhez observadas.

O ácido linolêico foi identificado como um inibidor da síntese de PGF. Portanto, uma possível estratégia para se reduzir a produção de PGF é a administração, através da dieta, de compostos ricos em ácido linolêico. Wilkins e outros (1996) alimentaram vacas de corte com uma dieta de caroço de algodão descascado, tratado com formol. Tal dieta era rica em ácido linolêico protegido, que escapa à bioidrogenação no rúmen. Vacas controle receberam farinha de caroço de algodão peletizada. As taxas de concepção no primeiro (61 vs. 46%) e segundo (71 vs. 56%) ciclos estrais foram maiores para as vacas que receberam a dieta rica em ácido linolêico. Santos e colaboradores (2004b) administraram sais de cálcio contendo ácido linolêico e aumentaram as taxas de prenhez de vacas leiteiras.

Dois outros lipídios com atividade inibidora da enzima COX-2 são os ácidos eicosapentanóico (20:5n-3) e docosahexanóico (22:6n-3; Thatcher et al., 2001, Mattos et al., 2003). Thatcher e outros (1997) alimentaram vacas com farinha de peixe do manhaden por 25 dias e mediram as concentrações plasmáticas de um pico de PGFM induzido pela administração de estradiol seguido de ocitocina no 15º dia de um ciclo estral sincronizado em vacas holandesas secas. A farinha de peixe do manhaden inibiu significativamente o pico de PGFM causado pelo estradiol e pela ocitocina em comparação com a dieta controle, que não continha a farinha de peixe. Mattos et al. (2002) confirmaram tais resultados para vacas em lactação. Tais observações apontam para a possibilidade de controlar eventos reprodutivos através de manipulações da dieta. Por exemplo, controlando os ingredientes da dieta se pode manipular o “pool” de lipídios do útero tornando-o menos luteolítico.

Finalmente, estratégias visando estimular o crescimento do concepto devem contribuir para que esse seja mais capaz de bloquear a luteólise, uma vez que a capacidade de secreção IFN está relacionada ao tamanho do concepto. Moreira e colaboradores (2002b) demonstraram que administração de somatotropina recombinante bovina (bST) melhorou taxas de fertilização, acelerou desenvolvimento embrionário e melhorou a qualidade dos embriões. Em outro estudo, Moreira et al. (2002a) administraram bST a doadoras de embrião superovuladas e a receptoras de embrião, em um delineamento fatorial 2x2. A administração de bST aumentou a porcentagem de embriões transferíveis, o número de blastocistos obtidos por lavagem, e as taxas de prenhez de receptoras tratadas com bST ou recebendo embriões oriundos de doadoras tratadas com bST. Concluiu-se com esses estudos que tanto os componentes maternais quanto embrionários são positivamente afetados pelo bST. De fato, Santos et al. (2004a) aumentaram as taxas de concepção de vacas em lactação via tratamento com bST.

5. CONCLUSÃO

O objetivo fundamental de se elaborar e empregar estratégias antiluteolíticas é inibir a produção de PGF associada ao período crítico em animais prenhes. Descreveram-se na presente revisão diversas estratégias utilizadas recentemente e verificaram-se seus

efeitos nas taxas de prenhez. Uma vez que o controle da síntese de PGF é multifatorial, somente a integração dos novos conhecimentos sobre a biologia ovariana, uterina e do concepto pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias visando a inibição da luteólise.

6. REFERÊNCIAS

Arnold DR, Binelli M, Vonk J, Alexenko AP, Drost M, Wilcox CL, Thatcher WW. 2000. Intracellular regulation of endometrial $PGF_{2\alpha}$ and PGE_2 production in dairy cows during early pregnancy and following treatment with recombinant interferon-τ. Domest Anim Endocrinol 18:199-216.

Baruselli PS, Marques MO, Nasser LF, Reis EL, Bó GA. 2003. Effect of eCG on pregnancy rates of lactating zebu beef cows treated with cidr-b devices for timed artificial insemination. Theriogenology 59:214 (abstract).

Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. Anim Reprod Sci 82-83:479-486.

Binelli M, Thatcher WW, Mattos R, Baruselli PS. 2001. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. Theriogenology 56:1451-1463.

Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1995. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. Theriogenology 43:31-40.

Bó GA, Baruselli PS, Martinez MF. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in Bos indicus cattle. Anim Reprod Sci 78:307-326.

Burns PD, Graf GA, Haynes SH, Silvia WJ. 1997. Cellular mechanisms by which oxytocin stimulates uterine PGF2alpha syntesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A2. Domest Anim Endocrinol 14:181-191.

Casto e Paula LA, Bertan CM, da Cunha PM, Mogentale SM, Bertholazzi A, Jorge P, Madureira EH, Binelli M. 2004. Estradiol 17b- and oxytocin-induced prostaglandin F2a production at late luteal phase in cows. Anais do 37th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 2004, Vancouver, Canada, p. 169.

Cutaia L, Tríbulo R, Moreno D, Bó GA. 2003. Pregnancy rate in lactating beef cows treated with progesterone-releasing devices, estradiol benzoate and equine chorionic gonadotropin (eCG). Theriogenology 59:216 (abstract).

Diskin MG, Sreenan JM. 1980. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. J Reprod Fertil 59: 463-468.

Elli M, Gaffuri B, Frigerio A, Zanardelli M, Covini D, Candiani M, Vignali M. 2001. Effect of a single dose of ibuprofen lysinate before embryo transfer on pregnancy rates in cows. Reproduction 121:151-154.

Geisert RD, Zavy MT, Biggers BG, Garret JE, Wettemann RP. 1988. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. Anim Reprod Sci 16:11-25.

Goissis MD, Bressan FF, Almeida AB, Bertan CM, Binelli M. 2004. Influence of an accessory corpus luteum (CL) on estradiol 17-β (E2)-induced prostaglandin F2α (PGF2α) release in cattle. Anais do 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro, Brazil, p. 125.

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

Kastelic JP, Ambrose JD. 2004. Effects of modified OvSynch protocols, including presynchronization, and/or post-breeding pLH or hCG, on pregnancy rates in dairy cows. Anais do 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro, Brazil, p. 334.

Knickerbocker JJ, Thatcher WW, Foster DB, Wolfenson D, Bartol FF, Caton D. 1986. Uterine prostaglandin and blood flow responses to estradiol-17β in cyclic cattle. Prostaglandins 31:757-776.

Machado R, Bergamaschi MACM, Barbosa RT, Madureira EH, Fantini D, Binelli M. 2004. Anais do 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro, Brazil, p. 118.

Mann GE, Lamming GE, Fisher PA. 1998. Progesterone control of interferon-□ production during early pregnancy in the cow. J Reprod Fertil Abstract Series 21: (abstract 37).

Mann GE, Mann SJ, Lamming GE. 1996. The inter-relationship between the maternal hormone environment and the embryo during the early stages of pregnancy. J Reprod Fertil Abstract Series 17: (abstract 55).

Mantovani AP, Reis EL, Bó GA, Baruselli PS, Gacek F. 2004. Prolonged use of a progesterone-releasing intravaginal device (CIDR) on the induction of persistent follicles in bovine embryo recipients. Anais do 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro, Brazil, p. 133.

Marques MO. 2002. Ultrasonografia ovariana, concentração plasmática de progesterona e taxa de concepção em novilhas receptoras de embrião submetidas a diferentes tratamentos no dia 7 do ciclo estral. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. 78p.

Marques MO, Reis EL, Campos Filho EP, Baruselli PS. 2003. Efeitos da administração de eCG e de benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. Anais do 5º Simpósio Internacional de Reproducción Animal, 2001, Cordoba, Argentina, p. 392.

Mattos R, Guzeloglu A, Badinga L, Staples CR, Thatcher WW. 2003. Polyunsaturated fatty acids and bovine interferon-□ modify phorbol ester-induced secretion of prostaglandin F2□ and expression of prostaglandin endoperoxidase synthase-2 and phospholipase-A2 in bovine endometrial cells. Biol Reprod 69:780-787.

Mattos R, Staples CR, Williams J, Amorocho A, McGuire MA, Thatcher WW. 2002. Uterine, ovarian, and production responses of lactating dairy cows to increasing dietary concentrations of Menhaden fish meal. J Dairy Sci 85:755-764.

Meyer MD, Hansen PJ, Thatcher WW, Drost M, Badinga L, Roberts RM, Li J, Ott TL, Bazer FW. 1995. Extension of corpus luteum lifespan and reduction of uterine of prostaglandin F2□ of cows in response to recombinant interferon-□. J Dairy Sci 78:1921-1931.

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

Moreira F, Paula-Lopes FF, Hansen PJ, Badinga L, Thatcher WW. 2002b. Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. Theriogenology 57:895-907.

Moura MT, Marques MO, Frare J, Madureira EH, Bo GA, Baruselli PS. 2001. Sincronização da ovulação com Crestar e CIDR para inovulação de embriões bovinos em tempo fixo. Anais do Simpósio Internacional de Reproducción Animal, 2001, Cordoba, Argentina, p. 269.

Nishigai M, Kamomae H, Tanaka T, Kaneda Y. 2002. Improvement in pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. Theriogenology 58:1597-1606.

Pugh ML, Moreira MB, Gilbert GR, Youngs CR. 2004. Influence of prostaglandin F2a synthesis inhibitors on pregnancy rate of embryo transfer recipient heifers. Anais do 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro, Brazil, p. 399.

Salfen BE, Cresswell JR, Xu ZZ, Bao B, Garverick HA. 1999. Effects of the presence of a dominant follicle and exogenous oestradiol on the duration of the luteal phase of the bovine oestrous cycle. J Reprod Fert 115:15-21.

Santos JEP, Juchen SO, Cerri RLA, Galvão KN, Chebel RC, Thatcher WW, Dei C, Bilby C. 2004a. Effect of bST and reproductive management on reproductive and lactational performance of Holstein dairy cows. J Dairy Sci 87:868-881.

Santos JEP, Thatcher WW, Chebel RC, Cerri RLA, Galvão KN. 2004b. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrous synchronization programs. Anim Reprod Sci 82-83:513-535.

Santos JEP, Thatcher WW, Pool L, Overton MW. 2001. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance on high producing lactating Holstein cows. J Anim Sci 79:2881-2894.

Shaham-Albalancy A, Folman Y, Kaim M, Rosenberg M. 2001. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF2 secretion in the subsequent oestrous cycle. Reproduction 122:643-648.

Schmitt E J-P, Diaz T, Barros CM, de la Sota RL, Drost M, Fredriksson EW, Staples CR, Thorner R, Thatcher WW. 1996. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. J Anim Sci 74:1074-1083.

Thatcher WW, Binelli M, Burke J, Staples CR, Ambrose JD, Coelho S. 1997. Antiluteolytic signals between the conceptus and endometrium. Theriogenology 47:131-140.

Thatcher WW, Guzeloglu A, Mattos R, Binelli M, Hansen TR, Pru JK. 2001. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. Theriogenology 56:1435-1450.

Thatcher WW, Terqui M, Thimonier J, Mauleon P. 1986. Effect of estradiol-17 on peripheral plasma concentration of 15-keto-13,14-dihydro PGF2a and luteolysis in cyclic cattle. Prostaglandins 31:745-756.

Vasconcelos JLM. 2000. Controle do estro e da ovulação visando na inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de leite. In: Marques MO (ed), Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2000; 115-157.

Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank M. 2001. Reduction is size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. Theriogenology 56:307-314.

Villa-Godoy A, Ireland JJ, Wortman JA, Ames NK, Hughes TL,Fogwel RL. 1985. Effect of ovarian follicles on luteal regression in heifers. J Anim Sci 60:519-527.

Wathes DC, Taylor VJ, Cheng Z, Mann GE. 2003. Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in postpartum dairy cows. Reproduction supplement 61:219-237.

Wehrman M, Fike KE, Melvin EJ, Kojima FN, Kinder JE. 1997. Development of a persistent ovarian follicle and associated elevated concentrations of 17 beta estradiol preceding ovulation does not alter the pregnancy rate after embryo transfer in cattle. Theriogenology 47:1413-1421.

Wilkins JF, Hoffman WD, Larsson SK, Hamilton BA, Hennessy DW, Hillard MA. 1996. Protected lipid/protein supplement improves synchrony of oestrus and conception rate in beef cows. Anais do 13th International Congress in Animal Reproduction, Sydney, Australia, p.19-29.

SINCRONIZAÇÃO DE RECEPTORAS PARA INOVULAÇÃO EM TEMPO FIXO

Márcio de Oliveira Marques[1,2], Everton Luiz Reis[1] e Pietro Sampaio Baruselli[1]
[1] Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP-SP
[2] Geraembryo, Cornélio Procópio – PR (marquesm@usp.br)

1 INTRODUÇÃO

Cerca de 110.000 embriões bovinos foram transferidos no Brasil durante o ano de 2002, quantidade superior aos cerca de 95.000 embriões inovulados no Canadá no mesmo período(IETS, 2003). Este dado demonstra a importância da Transferência de Embriões (TE) no cenário das biotecnologias aplicadas à pecuária nacional. Inúmeros fatores interferem na eficiência de programas de TE, com destaque especial às receptoras (Spell, 2001; Hasler, 2001). Isto porque os programas de TE comerciais apresentam, em geral, baixas taxas de aproveitamento (% de receptoras aptas à inovulação/total de receptoras tratadas). Normalmente, em um lote de receptoras tratadas com protocolos tradicionais (uso de prostaglandina associado à detecção de estro), somente 40 a 50% dos animais são aproveitados para a inovulação. Considerando-se uma taxa de concepção de 50% do total de animais aproveitados, obtém-se apenas 20 a 25% de gestações ao final do tratamento (Bó et al., 2002).
Desta forma, o incremento das taxas de aproveitamento e de concepção das receptoras é fundamental para maximizar a taxa de prenhez e, com isso, elevar o retorno zootécnico e econômico da TE, determinando, além de maior número de bezerros/ano, redução dos gastos com fêmeas não prenhes no rebanho.

2 INOVULAÇÃO DE EMBRIÕES UTILIZANDO PROSTAGLANDINA E DETECÇÃO DE CIO

Alguns dos principais problemas da sincronização de receptoras com análogos da prostaglandina (PGF2α) são: a) mão-de-obra capacitada para detectar o cio; b) variação no tempo da administração da PGF2α à ocorrência do estro (2 a 7 dias); c) presença de corpo lúteo (ciclicidade) para responder ao tratamento e; d) limitada quantidade de receptoras detectadas em cio (em torno de 50%). Visando minimizar tais problemas, nosso grupo de pesquisa (Baruselli et al., 2000a) obteve, pela monitoração ultra-sonográfica do desenvolvimento folicular, maior número de ovulações sincronizadas e menor variação do momento da ovulação em novilhas cruzadas submetidas ao protocolo “Ovsynch” (Dia 0=GnRH; Dia 7= PGF2α; Dia 9=GnRH), que naquelas submetidas à administração única de PGF2α (Figura 1).

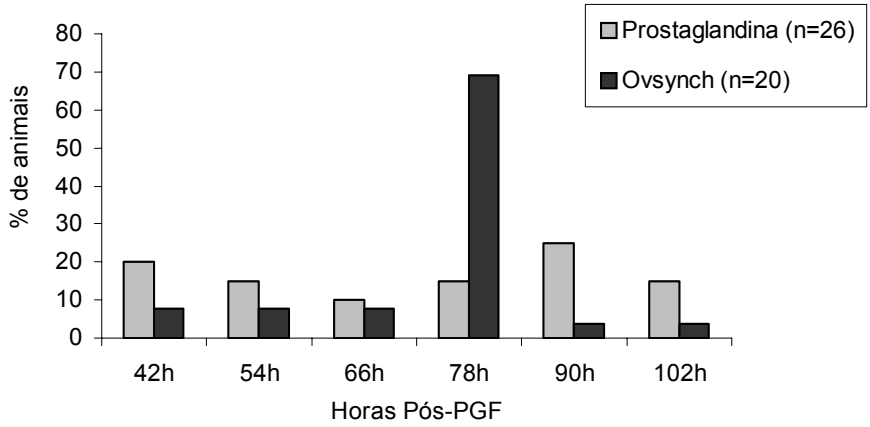


Figura 1. Distribuição das ovulações (horas) após a administração de $PGF_{2\alpha}$ em novilhas receptoras de embrião tratadas com "Ovsynch" ou dose única de $PGF_{2\alpha}$. Baruselli et al., 2000a.

Esse protocolo inicial levou ao desenvolvimento de novas condutas voltadas ao aumento da eficiência de receptoras mantidas a campo.

3 PROGRAMAS DE INOVULAÇÃO DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO

Alguns investigadores (Tríbulo et al., 2000; Baruselli et al., 2000b, 2000c e 2001; Bó et al., 2002) demonstraram que as taxas de aproveitamento[1] são maiores em receptoras submetidas a protocolos de TE em tempo fixo do que naquelas tratadas com uma ou duas administrações de PGF2α e posterior detecção de cio. Como as taxas de concepção[2] de tais protocolos são similares àquelas obtidas em receptoras tratadas exclusivamente com PGF2α, o resultado final é o aumento das taxas de prenhez[3] dos programas de TE em tempo fixo, além da vantagem de possibilitarem a programação do dia da inovulação e de evitarem o trabalho com a detecção de cio.
Nosso grupo (Baruselli et al., 2000b) também verificou que o tratamento Ovsynch para inovulação de embriões a fresco em tempo fixo determinou taxa de concepção semelhante ($P>0,05$) àquela observada em novilhas inovuladas após a administração única de PGF2α e detecção de cio por 5 dias (Tabela 1). Entretanto, como a taxa de aproveitamento (receptoras portadoras de corpo lúteo $\geq$ 10 mm) foi maior ($P<0,0001$) no grupo Ovsynch, a taxa de prenhez desse grupo foi estatisticamente mais elevada ($P<0,05$; Tabela 1).

[1] Taxa de aproveitamento = (número de receptoras aptas à inovulação x 100) ÷ número de receptoras tratadas
[2] Taxa de concepção = (número de receptoras prenhes x 100) ÷ número de receptoras inovuladas
[3] Taxa de prenhez = (número de receptoras prenhes x 100) ÷ número de receptoras tratadas

Tabela 1. Taxas de aproveitamento, de concepção e de prenhez de novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus* x *Bos indicus*) detectadas em cio após dose única de PGF2α ou inovuladas em tempo fixo após o protocolo Ovsynch. Baruselli et al., 2000b.

	Taxa de Aproveitamento	Taxa de Concepção	Taxa de Prenhez
Ovsynch	72,6% (122/168) [a]	49,2% (60/122)	35,7% (60/168) [c]
PGF$_{2\alpha}$	45,2% (80/177) [b]	56,3% (45/80)	25,4% (45/177) [d]
P	<0,0001	0,20	0,03

(a $\neq$ b; c $\neq$ d na mesma coluna; P<0,05)

Tríbulo et al. (2000) compararam a eficiência de receptoras tratadas com 2 administrações de PGF2α (intervalo de 14 dias) com a de fêmeas submetidas ao protocolo descrito a seguir: no Dia 0, inseriu-se um CIDR (Pfizer®) juntamente à administração IM de 2mg de Benzoato de Estradiol e 50 mg de Progesterona; no Dia 7 os dispositivos foram retirados, e administrou-se 0,150 mg de d-cloprostenol (PGF2α); no Dia 8 - cerca de 24 horas após a retirada dos implantes, foi administrado 1mg de Benzoato de Estradiol IM; o Dia 9 foi considerado o momento do cio; assim, no Dia 16 procedeu-se à inovulação "one-step" em tempo fixo pelo método não-cirúrgico. A inovulação das receptoras tratadas apenas com PGF2α foi realizada 7 dias após a detecção do estro. Somente as vacas portadoras de corpos lúteos (CL) $\geq$ 15mm à avaliação ultra-sonográfica foram inovuladas. Os resultados desse estudo encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2. Taxas de aproveitamento, de concepção e de prenhez em vacas solteiras detectadas em estro após 2 administrações de PGF2α ou transferidas em tempo fixo após tratamento com CIDR-B e Benzoato de Estradiol. Córdoba, Argentina, 2000.

Grupo	N	Transferidas/tratadas (%)	Prenhes/transferidas (%)	Prenhes/tratadas (%)
PGF/ detecção de estro	100	60/100 (60,0 %)	32/60 (53,3 %)	32/100 (32,0 %)
CIDR-B	100	59/100 (59,0 %)	37/59 (62,7 %)	37/100 (37,0 %)

As porcentagens não diferem (P>0,05). Tríbulo et al., 2000

Como pode ser observado na tabela 2, nas condições ótimas de resposta ao tratamento com PGF2α, os protocolos que utilizam progesterona para TE em tempo fixo apresentaram resultados semelhantes ao tratamento com PGF2α, com a vantagem de dispensar a detecção do cio. Entretanto, esse experimento foi realizado nas condições de manejo e pastagem argentinas, havendo seleção prévia apenas de receptoras cíclicas, de maneira que a taxa de aproveitamento do grupo PGF2α está acima da média brasileira.

4 EFEITO DA ÁREA DO CL E DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE PROGESTERONA NA TAXA DE CONCEPÇÃO DE RECEPTORAS *BOS TAURUS* X *BOS INDICUS*

A relação entre a taxa de concepção, a concentração plasmática de progesterona e o tamanho do CL em receptoras de embrião bovino é objeto de controvérsias entre os estudiosos. Vários pesquisadores têm verificado correlação positiva entre tais variáveis. De acordo com Vasconcelos et al. (2001), quanto maior o volume do corpo lúteo, maior será a concentração de progesterona, e, conseqüentemente, maior taxa de concepção será obtida em vacas inseminadas em tempo fixo. Esses achados concordam com experimento realizado por nosso grupo (Baruselli et al., 2000b), no qual verificou-se que a área do CL está associada à concentração plasmática de progesterona e à taxa de concepção de receptoras *Bos indicus x Bos taurus,* conforme demonstrado na Tabela 3.

Tabela 3. Concentração de progesterona e taxa de concepção conforme a área do corpo lúteo no dia 6 do ciclo estral em receptoras de embrião bovino (*Bos indicus x Bos taurus*).

Área do CL (ultra-sonografia)	Número de receptoras	Concentração de P4 (ng/ml)	Área média (cm^2)	Taxa de concepção (%)
CL1 (> 2,0 cm^2)	77	$2,44 \pm 0,86^a$	$2,66 \pm 0,51$	$58,4\ (47/77)^d$
CL2 (1,5 a 2,0 cm^2)	41	$1,75 \pm 0,69^b$	$1,74 \pm 0,10$	$41,5\ (17/41)^e$
CL3 (< 1,5 cm^2)	22	$0,96 \pm 0,56^c$	$1,19 \pm 0,20$	$31,8\ (7/22)^f$

($a \neq b \neq c$; $P < 0,01$ e $d \neq e \neq f$; $P < 0,05$).

Estudos demonstram a relação entre a concentração plasmática de progesterona e a taxa de concepção (Binelli et al., 2001; Tatcher et al., 2002; 2001; Reis et al., 2004). O aumento das concentrações plasmáticas de progesterona no diestro foi correlacionado com o desenvolvimento embrionário, pelo maior aporte de nutrientes para o lúmen uterino (Geisert et al., 1992), e com sua capacidade de secretar interferon-τ (Mann et al., 1999; Kerbler et al., 1997; Mann; Lamming, 2001), provocando diminuição da secreção de $PGF_{2\alpha}$ pelo endométrio uterino e bloqueio da luteólise (Mann et al., 1995, 1999; Wathes et al., 1998). Esse fenômeno foi associado ao aumento das taxas de concepção (MacMillan et al., 1994, Fuentes & De La Fuentes, 1997; Baruselli et al., 2000; Santos, 2001). No entanto, alguns pesquisadores não observaram esse efeito (Nogueira et al., 2004; Spell, et al., 2001; Hasler, et al., 1980; Tríbulo et al., 1997).
Outra investigação por nós realizada com o objetivo de superovular receptoras para a inovulação de embriões em tempo fixo (Baruselli et al., 2000c e 2001) demonstrou relação positiva entre o número de corpos lúteos, a concentração plasmática de progesterona e a taxa de concepção após a transferência de embriões congelados em etileno-glicol. Nesse estudo, foram utilizadas 100 novilhas mestiças *Bos taurus* x *Bos indicus* mantidas a pasto no município de Botelhos (MG). No grupo Controle (n=50), inseriu-se um implante intravaginal contendo 1,9g de Progesterona (CIDR-B, Pfizer), juntamente à administração de 2,0mg de Benzoato de Estradiol (BE), IM (Estrogin, Farmavet) e de 50mg de Progesterona, IM (dia 0). No dia 7 pela manhã foram aplicados 500μg de PGF2α (Cloprostenol sódico IM, Ciosin, Coopers), e à tarde os implantes foram retirados. No dia 8 pela manhã administrou-se 0,5 mg de BE, IM. O grupo superestimulado com eCG (n=50) recebeu o mesmo protocolo, acrescido da administração de 800 UI de e.C.G., IM (Novormon, Tecnopec) na manhã do dia 5. Para

a contagem do número de folículos ≥ 0,8cm (FG), a avaliação ultra-sonográfica ovariana foi realizada no dia 8 (Controle, n=25 ; eCG, n=24). No dia 15 foram colhidas amostras de sangue para dosagem da concentração plasmática de progesterona (48 animais por grupo), bem como realizadas avaliações ultra-sonográficas (todos animais), para contagem do número de corpos lúteos e classificação das receptoras para inovulação. Os corpos lúteos únicos foram classificados em: CL 1 (área ≥ 2,2 cm^2), CL 2 (área ≤ 2,19 cm^2 e ≥ 1,4 cm^2) ou CL 3 (área ≤ 1,39 cm^2 e ≥ 1,30 cm^2). No dia 16, todas as receptoras classificadas como aptas (Controle: n=17 e eCG: n=40) foram inovuladas em tempo fixo com um embrião descongelado "one step" (etileno-glicol), pelo método não-cirúrgico e pelo mesmo veterinário. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 4. Número médio de CL (± desvio padrão), concentração plasmática de progesterona (P4) (1 dia prévio à TE) e taxas de prenhez em receptoras *Bos taurus x Bos indicus* tratadas com dispositivos CIDR-B + Estradiol/progesterona no Dia 0, com ou sem 800 UI de eCG no Dia 5 e inovuladas em tempo fixo.

Grupo	n	Número de CLs	P4 (ng/ml)	Taxa de aproveitamento (%)	Taxa de Concepção (%)	Taxa de Prenhez (%)
Controle	50	0,5±0,5 [a]	1,3±0,8 [a]	17/50 (34,0) [a]	5/17 (29,4)[c]	5/50 (10,0) [a]
eCG	50	2,6±2,9 [b]	4,2±3,7 [b]	42/50 (84,0) [b]	21/38 (55,3)[d]	21/50 (42,0) [b]

[ab]Médias ou porcentagens nas colunas com diferentes sobrescritos diferem significativamente (P<0,05).
[cd]Médias ou porcentagens nas colunas com diferentes sobrescritos diferem (P=0,07)

Tabela 5. Área do CL, concentração de progesterona e taxa de concepção de receptoras de embrião portadoras de corpo lúteo único conforme o tratamento.

CL Único	n	Área (cm^2)	Concentração de P4 (ng/mL)	Taxa de Concepção (%)
Controle	17	2,15 ± 0,46[a]	1,35 ± 0,78	29,4 (5/17)
eCG	8	2,86 ± 0,63[b]	2,30 ± 1,60	50,0 (4/8)

(a ≠ b na mesma coluna; P < 0,05)

Assim, o tratamento com eCG no momento esperado da emergência da nova onda de crescimento folicular foi eficaz na superovulação ou desenvolvimento de um folículo dominante único de maior diâmetro e determinou, além de maior número de corpos lúteos (ou corpo lúteo único maior), maior concentração plasmática de progesterona e maiores taxas de aproveitamento, concepção e prenhez que o tratamento utilizado no grupo controle.

Bó et al. (2002) propuseram um protocolo semelhante (Figura 2), e verificaram que a utilização de 400UI de eCG no momento da emergência da onda de crescimento folicular determinou apenas 2% de dupla ovulação em receptoras cruzadas. No entanto, esse tratamento formou corpos lúteos únicos maiores e incrementou a taxa de concepção e de prenhez em receptoras inovuladas com embriões congelados em etileno-glicol que aquele empregado no grupo controle, que não recebeu eCG (Tabela 6).

Tabela 6. Diâmetro do CL (média ± desvio padrão; dia prévio à TE) e taxa de prenhez em receptoras tratadas com dispositivos DIV-B + estradiol/progesterona no Dia 0, com ou sem 400UI de eCG adminsitrados no Dia 5 e inovuladas em tempo fixo.

Grupo	n	CL [a] (mm)	Transferidas/ Tratadas (%)	Prenhes/ Transferidas (%)	Prenhes/tratadas (%)
Controle	156	17,7 ±0,4[b]	127/156 (81,4%)[b]	53/127 (41,7%)[b]	53/156 (33,9%)[b]
eCG	156	18,5 ±0,4[c]	132/156 (84,6%)[b]	76/132 (57,6%)[c]	76/156 (48,7%)[c]

[a] Diâmetro do CL aferido por ultra-sonografia em receptoras transferidas (CL ≥ 10 mm).
[bc] Médias ou percentagens nas colunas com diferentes sobrescritos diferem significativamente (P<0,02).

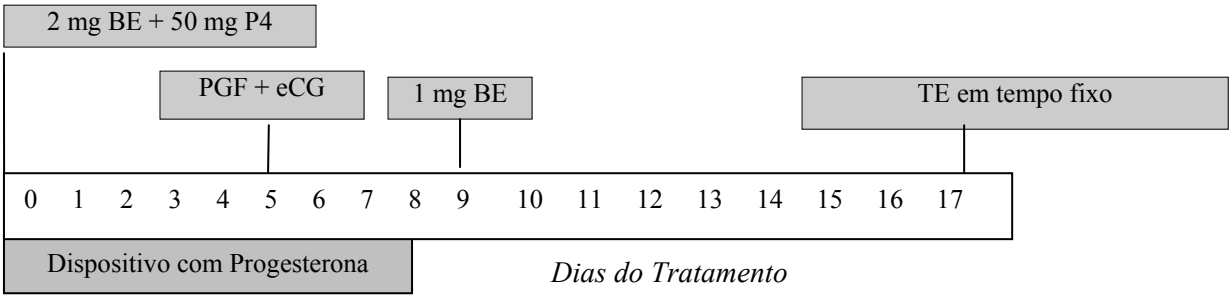


Figura 2. Protocolo para TE em tempo fixo em bovinos. O tratamento consiste na inserção de um dispositivo liberador de progesterona juntamente à administração de Benzoato de estradiol (BE) e progesterona (P4) no Dia 0, PGF e 400 UI de eCG no Dia 5, remoção do dispositivo no Dia 8, e BE no Dia 9. O estro não é observado e a TE é realizada no Dia 17 em receptoras com CL >10 mm. (Bó et al., 2002).

Trabalho recente foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Marques et al., 2003) para verificar os efeitos do eCG (administrado no momento da retirada de implantes intravaginais de progesterona) e do Benzoato de Estradiol (24 h após a retirada do implante) em vacas lactantes (60 dias pós-parto) meio sangue Nelore x Angus. Os animais foram tratados com BE (2mg) no dia 0 e com implante intravavinal de progesterona (CIDR) por 8 dias, sendo aplicado D-cloprostenol (150μg) no momento da retirada do implante (dia 8). Após a retirada dos implantes, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais: Grupo 1 – não receberam eCG nem BE; Grupo 2 – receberam eCG no dia 8 (retirada do implante) e não receberam BE; Grupo 3 – não receberam eCG e receberam o BE no dia 9 (24h após retirada do implante); Grupo 4 – receberam eCG no dia 8 e receberam BE no dia 9.

Na tabela 7 pode-se evidenciar o efeito do eCG no aumento das concentrações plasmáticas de progesterona 12 dias após o tratamento. Observou-se que os animais que receberam eCG apresentaram maiores concentrações plasmáticas de P4 (8,6 ± 0,9 vs 4,5 ± 0,7 ng/ml; P < 0,05). O tratamento com BE não influenciou as concentrações plasmáticas de P4. No entanto, verificou-se aumento na taxa de ovulação com o uso de BE (54,2 vs 80,8%; P < 0,05). O eCG aumentou a taxa de ovulação (60,0 vs 76,0%), entretanto não se verificou diferença significativa (P > 0,05). O BE mostrou-se eficaz na sincronização da ovulação (Teste de Bartlett, P=0,01) e na antecipação do momento da ovulação (com BE = 69,4 ± 2,0 vs sem BE = 86,3 ± 4,8 h; P < 0,05). Já, o tratamento com eCG foi menos eficiente que BE na sincronização da ovulação (Teste de Bartlett, P=0,59). Com a antecipação da ovulação no grupo BE, verificou-se que os folículos pré-ovulatórios apresentaram menor diâmetro em relação ao grupo que não recebeu o BE (11,72 ± 0,25 vs 13,83 ± 0,41 mm; P < 0,05).

Tabela 7 – Efeitos do uso de eCG em vacas Brangus lactantes tratadas com implante vaginal de progesterona. São Manuel – SP. 2002

N=50	P4 total (ng/mL)	P4 ovul (ng/mL)	Taxa ovul	Momento ovul (hs)	Fol pré ovul (mm)	CL (mm^2)
eCG (25)	8,6 ± 0,9[a]	8,6 ± 0,4 [a]	76% (19/25)	74,2 ± 4,0	12,55 ± 0,36	1,93 ± 0,05
s/ eCG (25)	4,5 ± 0,7[b]	6,4 ± 0,5 [b]	60 %(15/25)	78,0 ± 3,1	12,50 ± 0,46	1,82 ± 0,06
BE (26)	7,2 ± 0,9	7,3 ± 0,5	80,8% (21/26) [a]	69,4 ± 2,0[a]	11,72 ± 0,25[a]	1,84 ± 0,05
s/ BE (24)	5,8 ± 0,8	8,0 ± 0,5	54,2% (13/24) [b]	86,3 ± 4,8[b]	13,83 ± 0,41[b]	1,93 ± 0,06

a≠b na mesma coluna, P<0,05

Na seqüência dos experimentos, Reis (2004) comparou diferentes doses de eCG (400 vs 500 vs 600 UI) administradas no Dia 5 ou no Dia 8 do tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona (DIB®). Foram utilizadas 600 receptoras nulíparas *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus* mantidas a pasto no Brasil Central. Os resultados estão demonstrados na tabela 8.

Tabela 8. Número de CL, taxas de aproveitamento, de concepção, de prenhez de embriões PIV em receptoras tratadas com dispositivos intravaginais de progesterona (DIB®) no Dia 0 e com diferentes doses de eCG (Novormon®) no Dia 5 ou no Dia 8 do tratamento. Fazenda Sonho Real, Campo Grande – MS, 2004.

Dose	Dia	N	Taxa de aproveitamento (%)	Taxa de concepção (%)	Taxa de prenhez (%)	Número de corpos lúteos
400	5	101	81,2 (82/101)[b]	58,0 (47/81)[a]	46,5 (47/101)[a]	1,24 ± 0,05[bc]
	8	100	83,0 (83/100)[b]	45,8 (38/83)[ab]	38,0 (38/100)[ab]	1,10 ± 0,04[c]
500	5	98	86,7 (85/98)[ab]	48,8 (40/82)[ab]	40,8 (40/98)[ab]	1,54 ± 0,11[b]
	8	99	80,8 (80/99)[b]	39,2 (31/79)[b]	31,3 (31/99)[b]	1,11 ± 0,05[c]
600	5	100	93,0 (93/100)[a]	48,9 (45/92)[ab]	45,0 (45/100)[ab]	2,37 ± 0,21[a]
	8	96	81,3 (78/96)[b]	50,0 (39/78)[ab]	40,6 (39/96)[ab]	1,17 ± 0,06[c]
Efeitos principais						
	5	299	87,0 (260/299)[a]	51,8 (132/255)[x]	44,1 (132/299)[a]	1,74 ± 0,09[a]
	8	295	81,7 (241/295)[b]	45,0 (108/240)[y]	36,6 (108/295)[b]	1,13 ± 0,03[b]
400		201	82,1(165/201)	51,8 (85/164)	42,3 (85/201)	1,17 ± 0,03[b]
500		197	83,8 (165/197)	44,1 (71/161)	36,0 (71/197)	1,33 ± 0,06[b]
600		196	87,2 (171/196)	49,4 (84/170)	42,9 (84/196)	1,82 ± 0,12[a]

As médias ou proporções nas colunas com letras sobrescritas diferentes apresentam diferença estatística (a,b P<0,05; x,y P<0,1)

Não foi verificado efeito da dose de eCG sobre a eficiência dos protocolos empregados. No entanto, quando se analisou o efeito do dia da aplicação do eCG (D5 vs D8), observou-se diferença estatisticamente significativa (Tabela 8). Receptoras

tratadas com eCG no Dia 5 apresentaram maiores taxas de aproveitamento, de concepção e de prenhez. O número de CL e a concentração plasmática de progesterona conforme o grupo experimental estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Número de CL e concentração plasmática de progesterona em receptoras tratadas com dispositivos intravaginais de progesterona (DIB®) no Dia 0 e com eCG (Novormon®) no Dia 5 ou no Dia 8 do tratamento. Campo Grande – MS, 2004.

Dose	Dia	N	Taxa de concepção (%)	Número de corpos lúteos	Concentração plasmática de P4 (ng/ml)
400	5	36	75,0 (24/36)[a]	1,26 ± 0,09[bc]	3,53 ± 0,34[bc]
	8	39	48,7 (19/39)[ab]	1,05 ± 0,04[c]	2,45 ± 0,26[c]
500	5	37	43,2 (16/37)[b]	1,58 ± 0,15[b]	4,33 ± 0,69[b]
	8	36	38,9 (14/36)[b]	1,06 ± 0,04[c]	2,56 ± 0,29[c]
600	5	38	50,0 (19/38)[ab]	2,18 ± 0,27[a]	6,10 ± 0,98[a]
	8	36	44,4 (16/36)[b]	1,06 ± 0,04[c]	3,20 ± 0,34[bc]
Efeitos principais					
	5	111	55,9 (62/111)[a]	1,69 ± 0,12[a]	4,68 ± 0,43[a]
	8	111	44,1 (49/111)[b]	1,06 ± 0,02[b]	2,73 ± 0,17[b]
400		75	61,3 (46/75)[c]	1,15 ± 0,05[b]	2,96 ± 0,22[b]
500		73	41,1 (30/73)[cd]	1,33 ± 0,08[b]	3,45 ± 0,38[b]
600		74	47,3 (35/74)[d]	1,65 ± 0,16[a]	4,69 ± 0,55[a]

As médias ou proporções nas colunas com letras sobrescritas diferentes apresentam diferença estatística (a,b P<0,05)

Com o objetivo de analisar o efeito da administração de Progesterona (IM) e de Benzoato de Estradiol (IM) no momento da inserção dos dispositivo intravaginal de progesterona (DIB®), nosso grupo de pesquisa (Nasser et al., 2004) comparou receptoras tratadas com 50mg de Progesterona + 2mg de Benzoato de Estradiol com receptoras que receberam apenas 2mg de Benzoato de Estradiol no Dia 0. Também, comparou-se o efeito da administração de 400 UI de eCG no Dia 5 ou no Dia 8. Nesse experimento utilizou-se 300 receptoras nulíparas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*. Verificou-se que a administração de Progesterona (IM) no momento da inserção do dispositivo intravaginal não apresentou efeito positivo na eficiência dos protocolos. No entanto, o dia de aplicação do eCG (D5 vs D8) influenciou na eficiência dos protocolos (Tabela 10). Receptoras tratadas no Dia 5 apresentaram tendência de melhores taxas de prenhez (P=0,1).

Tabela 10. Taxas de aproveitamento, de concepção e de prenhez de embriões PIV em receptoras tratadas com dispositivos intravaginais de progesterona (DIB®) e Benzoato de Estradiol (BE; IM) associado ou não à Progesterona (IM) no dia 0 e com a administração de eCG no dia 5 ou no dia 8. Campo Grande – MS, 2003.

Dia 0	ECG	n	Número de CL	Inovuladas/ Tratadas (%)	Prenhas/ inovuladas (%)	Prenhas/ tratadas (%)
BE	Dia 5	75	1,32 ± 0,12 [a]	68/75 (90,7)	38/68 (55,9)	38/75 (50,7)
	Dia 8	75	1,03 ± 0,02 [b]	62/75 (82,7)	30/62 (48,4)	30/75 (40,0)
BE + P4	Dia 5	76	1,37 ± 0,12 [a]	67/76 (88,2)	33/67 (49,3)	33/76 (43,4)
	Dia 8	75	1,22 ± 0,07 [ab]	65/75 (86,6)	31/65 (47,7)	31/75 (41,3)
			Efeitos principais			
	Dia 5	151	1,35 ± 0,08 [e]	135/151 (89,4)	71/135 (52,6)	71/151 (47,0)[c]
	Dia 8	150	1,13 ± 0,04 [f]	127/150 (84,7)	61/127 (48,0)	61/150 (40,7)[d]
BE		150	1,19 ± 0,06	130/150 (86,7)	68/130 (52,3)	68/150 (45,3)
BE + P4		151	1,30 ± 0,07	132/151 (87,4)	64/132 (48,5)	64/151 (42,4)

ab, ef Médias nas colunas com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente (P < 0,05).
cd Médias nas colunas com letras sobrescritas diferentes diferem estatisticamente (P = 0,1)

Seguindo esta mesma linha, num experimento recente (Rodrigues et al., 2004) se comparou a eficácia do tratamento com progesterona (P4) ou Norgestomet (NOR) associado à Valerato de Estradiol (VE) ou a Benzoato de Estradiol (BE) no protocolo para inovulação em tempo fixo. Foram utilizadas 326 novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* inovuladas com embriões PIV. No Dia 0, o Grupo VE+NOR (n=99) recebeu um implante auricular contendo 3mg de NOR juntamente com 5mg de VE e 3mg de NOR IM (Crestar®, Intervet). No Dia 6 administrou-se 500UI de eCG IM (Folligon®, Intervet) e no Dia 9 se removeu os implantes. No Grupo BE+NOR (n=111) se administrou 2mg de BE e 50mg de P4 (Index Farmacêutica) no Dia 0, associado à inserção dos implantes contendo NOR. No Dia 5, injetou-se 500UI de eCG e 150 mg de d-cloprostenol (Preloban®, Intervet). A remoção do implante foi procedida no Dia 8 e no Dia 9 aplicou-se 1mg de BE IM. O Grupo BE+P4 (n=116) recebeu o mesmo tratamento do Grupo BE+NOR exceto pela substituição do implante de NOR por um dispositivo intra-vaginal contendo 1,9g de P4 (CIDR®, Pfizer). O dia do estro foi considerado como Dia 11 para o grupo VE+NOR (em virtude da emergência da onda de crescimento folicular ser adiada em aproximadamente 1 dia com a utilização do VE) e Dia 10 para os demais grupos. Foi procedida a avaliação ultra-sonográfica ovariana no momento da inovulação dos embriões, 9 dias após a retirada dos implantes de P4 ou NOR. Nas receptoras consideradas aptas (CL ≥ 13mm de diâmetro) foi inovulado um embrião produzido *in vitro*. O diagnóstico de gestação foi aferido por ultra-sonografia 23 dias após a TE. Os resultados estão descritos na tabela 11.

Tabela 11. Taxas de aproveitamento, de concepção e de prenhez de embriões PIV inovulados em receptoras tratadas com Progesterona ou Norgestomet associados à diferentes estrógenos no Dia 0 do protocolo para inovulação em tempo fixo. São Carlos-SP, 2004.

Grupos	N	Aproveitamento (%)	Concepção (%)	Prenhez (%)	Superovulação (%)	Número de CL	Diâmetro do CL(mm)
VE+NOR	99	72/99 (72,7)[a]	28/72 (38,9)	28/99 (28,3)[a]	36/72 (36,1)	1,7±0,1	18,2±0,4[a]
BE+NOR	111	94/111 (84,7)[b]	44/94 (46,8)	44/111 (39,6)[b]	39/94 (41,4)	1,8±0,1	20,2±0,6[b]
BE+P4	116	103/116 (88,8)[b]	41/103 (39,8)	41/116 (35,3)[ab]	49/103 (47,6)	2,0±0,2	19,5±0,5[ab]

a ≠ b na mesma coluna P<0,05

Com base nos resultados descritos conclui-se que a substituição do VE por BE aumenta a eficiência do tratamento para ITF e que a utilização de P4 ou NOR determinam taxas de aproveitamento, de concepção e de prenhez semelhantes quando se utiliza o BE.

Uma possibilidade prática que pode ser explorada a campo é a utilização de categorias animais diferentes das novilhas nulíparas, como usualmente empregado nos programas de TE. Assim, nos trabalhos de campo da Geraembryo temos empregado o protocolo de ITF (figura 2) em vacas cruzadas paridas, geralmente com bezerros oriundos de TE ao pé, e também em vacas *Bos indicus* paridas como receptoras de embrião. Observa-se os dados de campo nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12. Taxa de Aproveitamento (aptas à inovulação/sincronizadas) de receptoras de embriões bovinos submetidas a protocolo com eCG e PGF no dia 5, associado à dispositivos com P4 ou Norgestomet- dados de campo. Cornélio Procópio–PR, 2004.

Categoria Animal	*Sincronizadas*	*Aptas à TE*	*Taxa de Aproveitamento*
Novilhas Cruzadas	1647	1334	80,9%
Vacas Cruzadas Paridas	312	237	75,9%
Vacas Nelore Paridas	246	172	69,9%

Tabela 13. Taxa de Concepção de receptoras de embriões bovinos inovuladas em tempo fixo de acordo com a categoria animal e embrião – dados de campo. Cornélio Procópio–PR, 2004.

Categoria Animal	*Embrião*	*Taxa de Concepção*	*Prenhes/ Transferidas*
Novilhas Cruzadas	TE	52,8%	250/473
Vacas Cruzadas Paridas	TE	64,4%	76/118
Vacas Nelore Paridas	FIV	35,8%	52/145

O objetivo destas tabelas é demonstrar a viabilidade da utilização de tais categorias animais, geralmente não empregadas como receptoras em detrimento das novilhas. Desta forma, a sincronização destes animais proporciona uma forma eficaz de incrementar os resultados dos programas de TE, sem a necessidade de aquisição de novas receptoras e otimizando a eficiência reprodutiva de todas as fêmeas do rebanho.

Uma possibilidade alternativa para incrementar a progesterona plasmática (P_4) é a realização de tratamentos com GnRH, LH, hCG no momento da inovulação para formação de corpos lúteos acessórios (indução da ovulação do folículo dominante da primeira onda de crescimento folicular), ou a suplementação exógena de progesterona liberada por dispositivos intravaginais. O tratamento com hCG no dia 7 do ciclo estral promoveu maior aumento nas concentrações plasmáticas de P_4 e maior duração do ciclo estral que aqueles realizados com GnRH, LH e progesterona em novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* (Marques et al., 2002). Todos esses tratamentos foram testados a campo em novilhas inovuladas com embriões previamente congelados em etileno-glicol. Os resultados seguem na Tabela 14.

Tabela 14. Taxa de concepção de receptoras submetidas a diferentes tratamentos (GnRH, hCG, LH e CIDR) no momento da inovulação de embriões congelados em etileno-glicol.

	Controle	***GnRH***	***hCG***	***LH***	***CIDR***
Taxa de concepção	28,6%[a]	53,5%[b]	51,0%[b]	45,4%[b]	41,1%[b*]
Prenhes/ transferidas	28/98	53/99	49/96	44/97	39/95

a≠b na mesma linha (Qui-quadrado; P < 0,01); a≠b*; P<0,05)

Como se verifica na tabela anterior, todos os tratamentos que objetivavam formar um corpo lúteo acessório e aumentar as concentrações plasmáticas de progesterona apresentaram taxas de concepção superiores àquela do grupo controle.

Em experimento recente com embriões PIV (Rodrigues et al., 2003) foram administrados 100μg de gonadorelina (GnRH) no momento da inovulação em 164 receptoras de embriões *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*. O Grupo controle (n=232) recebeu solução salina. Verificou-se aumento significativo na taxa de concepção dos animais tratados com GnRH no momento da inovulação (51,2%, 84/164[a] vs 42,2% , 98/232[b]; P < 0,05).

Diante dos resultados até aqui expostos, fica evidente que é possível aumentar a taxa de aproveitamento, de concepção e de prenhez em receptoras de embriões com o emprego de fármacos para a sincronização da ovulação para utilização da transferência de embriões em tempo fixo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Baruselli, P.S., Marques, M.O., Madureira, E.H., Costa Neto, W.P., Grandinetti, R.R., Bo, G.A. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices. Theriogenology, v. 55, p. 355, 2001 (abst.).

Baruselli, P.S.; Marques, M.O.; Carvalho, N.A.T.; Valentim, R.; Berber, R.C.A.; Carvalho Filho, A.F.; Madureira, E.H.; Costa Neto, W.P. Dinâmica folicular em novilhas receptoras de embrião bovino submetidas à sincronização da ovulação para inovulação em tempo fixo. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, v. 28, p. 217, 2000a.

Baruselli, P.S.; Marques, M.O.; Carvalho, N.A.T.; Valentim, R.; Berber, R.C.A.; Carvalho Filho, A.F.; Madureira, E.H.; Costa Neto, W.P. Aumento da taxa de prenhez em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo “ovsynch” com inovulação em tempo fixo. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, v. 28, p. 216, 2000b.

Baruselli, P.S.; Marques, M.O.; Madureira, E.H.; Bó, G.A.; Costa Neto, W.P.; Grandinetti, R.R. Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos,

concentração de P_4 e taxa de prenhez. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, v. 28, p. 218, 2000c.

Bo, G.A.; Baruselli, P.S.; Moreno, D.; Cutaia, L.; Caccia, M.; Tríbulo, R.; Tríbulo, H.; Mapletoft, R.J. The control of follicular wave development for self-pointed embryo transfer programs in cattle. Theriogenology, v. 57, p. 53-72, 2002

Geisert, R.D.; Morgan, G.L.; Short, E.C.; Zavy, M.T. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. Reproduction Fertility and Development, 4:301-305, 1992.

Hasler JF. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. Theriogenology, 56: 1401-1415, 2001.

Kerbler, T.L.; Buhr, M.M.; Jordan, L.T.; Leslie, K.E.; Walton, J.S. Relationship maternal plasma progesterone concentration and interferon tau synthesis by the conceptus in cattle. Theriogenology 47: 703-714, 1996.

Mann, G.E.; Lamming, G.E; Fray, M.D. Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. Animal Reproduction Science 37: 121-131, 1995.

Mann, G.E.; Lamming, G.E; Robinson, R.S.; Wathes, D.C. The regulatory of interferon-τ production and uterine hormone receptors during early pregnancy. Journal Reproduction and Fertility 54: 317-328, 1999.

Mann, G.E.; Lamming, G.E. Relationship between amternal endocrine environment early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. Reproduction 121: 175-180, 2001.

Mantovani, A.P., Baruselli, P.S., Bó, G.A., Cavalcante, A.K.S., Gacek, F. Aumento das dimensões do folículo dominante e do corpo lúteo, da concentração plasmática de progesterona e da taxa de aproveitamento de receptoras de embrião bovino sincronizadas com CIDR-B por tempo prolongado. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 2002 (enviado para publicação).

Marques M.O., Madureira E.H., Bo G.A., Baruselli P.S. Ovarian ultrasonography and plasma progesterone concentration in Bos taurus x Bos indicus heifers administered different treatments on day 7 of the estrous cycle. Theriogenology, v. 57, n. 1, p. 548 (abst.), 2002.

Marques, M.O.; Reis, E.L.; Campos Filho, E P; Baruselli, P.S. Efeitos da administração de eCG e de Benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas Bos taurus taurus X Bos taurus indicus no período pós-parto. In: V SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 2003, Huerta Grande. v. 1, p. 392, 2003.

Moura M.T., Marques M.O., Frare J., Madureira E.H., Bó G.A., Baruselli P.S. Sincronização da ovulação com Crestar e Cidr para inovulação de embriões bovinos em tempo fixo. Resúmenes do 4º Simposio Internacional de Reproducción Animal, p. 269, 2001. Huerta Grande, Córdoba, Argentina – 22 a 24 de Junho, 2001.

Nasser, L.F.; Reis, E.L.; Oliveira, M.A.; Bo, G.A.; Baruselli, P.S. Comparison of four synchronization protocols–for fixed time bovine embryo transfer in Bos indicus x Bos taurus recipients. Theriogenology (enviado para publicação).

Nogueira, M.F.G.; Melo, D.S.; Carvalho, L.M.; Fuck, E.J.; Trinca, L.A.; Barros, C.M. Do high progesterone concentrations in embryos recipients synchronized with PGF2α and eCG?. Theriogenology, 61: 1283-1290, 2004.

Reis, E.L.; Marques, M.O.; Carvalho, N.A.T., Nasser, CL.F.; Costa Neto, W.P.; Baruselli, P.S. Aumento da taxa de concepção em receptoras de embrião bovino com maiores concentrações plasmáticas de progesterona no dia da inovulação. Acta Scientiae Veterinariae, 32: 88, 2004.

Reis, E.L. Adequação da dose e do momento da administração de eCG no protocolo de sincronização de receptoras de embrião bovino. (Tese de Mestrado, 2004). Em vias de publicação.

Rodrigues, C.A.; Mancilha, R F; Dalalio, M.; Reis, E.L.; Nichi, M.; Madureira, E. H.; Baruselli, P. S. Aumento da taxa de concepção em receptoras de embriões FIV tratadas com GnRH no momento da inovulação. In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2003, Fortaleza. Acta Scietiae Veterinariae, p. 550-551, 2003.

Spell AR, Beal WE, Corah LR, Lamb GC. Evaluating recipients and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. Theriogenology, 56: 287-297, 2001.

Thibier, M. The animal embryo transfer industry in figures: a report from the IETS data retrieval committee. IETS Newsletter, v.19, n.4, 2001.

Tribulo H, Bo GA, Gatti G, Tegli JC, Cutaia L, Moreno D, Brito M, Tribulo R. Pregnancy rates in embryo recipients treated with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices to eliminate the need for estrus detection. 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Sweden, 2000; 2:115 (abstr).

Vasconcelos, J.L.M; Sartori, R.; Oliveira, H.N.; Guenther, J.G.; Wiltbank, M. Reduction is size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. Theriogenology; v. 56, p. 307-314, 2001.

Wathes, D.C.; Robinson, R.S.; Mann, G.E.; Lamming, G.E. The establishment of early pregnancy in cows. Reproduction Domestic Animals 33: 279-284, 1998.

SUPEROVULAÇÃO EM ZEBUÍNOS DE CORTE

Ciro Moraes Barros e [2]Marcelo F. G. Nogueira
Deptos. de [1]Farmacologia (Instituto de Biociências) e [2]Reprodução Animal (FMVZ) - UNESP, Botucatu, São Paulo. (cmbarros@ibb.unesp.br; marcelo@femanet.com.br)

RESUMO

Nos últimos anos o Brasil tem se destacado mundialmente pela elevado número de embriões bovinos produzidos tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Ambas as biotecnologias, transferência de embriões produzidos in vivo (TE) e produção in vitro de embriões (PIV), são ferramentas importantes para a multiplicação de fêmeas bovinas superiores. Nesta revisão será dada ênfase a protocolos hormonais que, por sincronizarem o crescimento folicular e o momento da ovulação, dispensam a observação do estro e facilitam o manejo das doadoras de embriões. Além disso, informações recentes sobre os receptores foliculares de LH serão exploradas com o objetivo de melhorar tratamentos superovulatórios que, a exemplo do protocolo P-36, utilizam uma fonte exógena de LH para induzir e sincronizar a ovulação.

INTRODUÇÃO

Devido à facilidade de adaptação ao ambiente tropical, os zebuínos (sub-espécie *Bos taurus indicus*, Meirelles et al., 1999) predominam em muitos países do hemisfério sul, contrastando com o hemisfério norte onde prevalecem as raças européias (*Bos taurus taurus*). A raça Nelore é o gado de corte predominante no Brasil (Santiago, 1985; Santos, 1995), criado principalmente em regime extensivo.

Além da inseminação artificial, a indução de ovulação múltipla (superovulação – SO) para a produção e transferência de embriões (TE) é uma das biotécnicas da reprodução mais importantes para acelerar o melhoramento genético de nosso gado zebuíno. Infelizmente, a variabilidade de resposta das doadoras de embriões ao tratamento superestimulatório com gonadotrofinas, continua a ser um dos maiores problemas nos programas comerciais de TE (Adams, 1994; Armstrong, 1993; Boland & Roche, 1993; Barros & Nogueira, 2001), apesar das diversas pesquisas realizadas nesta área (Callesen et al. 1986, 1987; Del Campo et al., 1990; Hytell et al., 1991; Stock et al., 1996; Nogueira et al., 2002).

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular (Pierson & Ginther, 1988; Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988) tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, de forma a viabilizar a inseminação artificial com tempo fixo (IATF, ou seja, IA com tempo pré-determinado, sem a necessidade de observação do cio) em taurinos (Twagiramungu et al., 1992a,b; Thatcher et al., 1993; Pursley et al., 1995) e zebuínos (Barros et al., 1998, 2000; Fernandes et al., 2001). De forma similar, o controle do desenvolvimento folicular e do momento da ovulação podem ser controlados farmacologicamente para melhorar os tratamentos superovulatórios empregados na transferência de embriões (Barros & Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002).

Nesta revisão será dada ênfase a protocolos hormonais que, por sincronizarem o crescimento folicular e o momento da ovulação, dispensam a observação do estro e facilitam o manejo das doadoras de embriões.

SUPEROVULAÇÃO

Diversos tratamentos hormonais, para induzir ovulação múltipla em bovinos têm sido estudados (Gordon, 1996; Barros & Nogueira, 2001). Entre os agentes superovulatórios testados destacam-se a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG ou PMSG) administrada isoladamente (Rowson et al., 1972; Elsden et al., 1976; Boland et al., 1978) ou associada a soro anti-PMSG (Dieleman et al., 1987, 1993; Alfuraiji et al., 1993; Gonzalez et al., 1994) e o hormônio folículo estimulante (FSH) proveniente de extrato de pituitárias de suínos, ovinos e eqüinos (Donaldson, 1989) ou ainda, FSH recombinante bovino (Looney & Bondioli, 1988; Bellows et al., 1991; Wilson et al., 1993).

A utilização do FSH como agente indutor de superovulação tem sido extensivamente estudada, conseqüentemente, já foi testado o uso de diferentes concentrações (Pawlyshyn et al., 1986; Gonzalez et al., 1990; Saunders et al., 1990) e vias de administração (Hockley et al., 1992; Tribulo et al., 1993), a eficiência de produtos comerciais das mais variadas marcas e procedências (Donaldson, 1989; Page et al., 1989; Del Campo et al., 1990; Donaldson, 1990a; Tribulo et al., 1993; Donaldson, 1995) e as variações na relação FSH:LH entre preparados comerciais (Donaldson & Ward, 1987; Donaldson, 1990b). Nestes trabalhos ficou caracterizada a variação de potência do FSH (muito bem demonstrado por Braileanu et al., 1998) e da relação FSH:LH existente entre diferentes produtos comerciais e dentro de um mesmo produto.

Donaldson et al. (1986), Gonzalez et al. (1990) e Mapletoft et al. (1992, 1993) demonstraram os efeitos negativos de concentrações elevadas de LH na produção e na qualidade de embriões bovinos. Foi sugerido que o nível máximo de contaminação com LH, numa preparação de FSH, deveria ser entre 15 a 20%.

INÍCIO DO TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO

Com relação ao dia do ciclo estral (CE) mais adequado para se iniciar o tratamento superovulatório, Lindsell et al. (1986) e Goulding et al. (1990) observaram que os resultados provenientes do tratamento superovulatório iniciado no 2º dia do CE foram inferiores àqueles iniciados no 10º dia. Os autores sugeriram que o 10º dia do ciclo estral mostrou-se mais adequado para a SO, devido à ausência de um folículo dominante inibindo o crescimento de folículos subordinados.

Apesar de algumas publicações discordantes (Rajamahendran & Calder, 1993; Wilson et al., 1990), existem evidências na literatura de que a presença de um folículo dominante é prejudicial para a indução da ovulação (Adams et al., 1993; Bungartz & Niemann, 1994; Guibault et al., 1991; Huhtinen et al., 1992; Lussier et al., 1995). Foi sugerido que a presença de um folículo dominante no início do tratamento superovulatório suprime o crescimento de folículos menores não dominantes, reduzindo as taxas de ovulação e recuperação de embriões, quando comparado a tratamentos com gonadotrofinas iniciados na ausência de um folículo dominante. Entretanto, Stock et al. (1996), não demonstraram prejuízo no recrutamento de novos folículos em resposta ao tratamento com FSH exógeno na presença de um folículo dominante, mas sim, uma redução na taxa de ovulação. Estes autores sugeriram que a presença de um folículo dominante no início do tratamento superovulatório pode afetar a resposta superovulatória somente se o folículo ovular prematuramente e formar um corpo lúteo. Esse corpo lúteo recém formado seria refratário à ação luteolítica da prostaglandina injetada no protocolo de superovulação e estaria determinando níveis elevados de progesterona suficientes para inibir a ocorrência dos picos endógenos pré-ovulatórios de estradiol 17β e de LH. Assim, nos animais com a formação atípica de um corpo lúteo proveniente da ovulação de um folículo dominante presente no início de um

tratamento superovulatório, ocorreriam falhas tanto na manifestação comportamental do cio como no pico endógeno pré-ovulatório de LH, levando a uma diminuição na taxa de ovulação e, conseqüentemente, na produção de embriões viáveis (Stock et al., 1996).

Considerando que após a manifestação de cio ocorre ovulação e início de uma nova onda folicular, vários autores propuseram que o tratamento para induzir superovulação fosse realizado no início do ciclo estral (Goulding et al., 1990; Fricke et al., 1994; Roberts et al., 1994; Stock et al., 1996). A desvantagem deste sistema é que o tratamento com gonadotrofinas deve ser realizado por um período mais prolongado (6 dias) de forma a permitir que o corpo lúteo recém formado tenha idade suficiente para responder a administração de PGF2α.

Outra possibilidade é a aspiração do folículo dominante ou de todos os folículos acima de 5 mm de diâmetro antes de iniciar a superestimulação com gonadotrofinas (Bergfelt et al., 1994; Bodensteiner et al., 1996; Hill & Kuehner, 1996). Entretanto, este procedimento requer a utilização de aparelhos de ultra-som de custo bastante elevado.

A forma mais prática de se evitar a presença de um folículo dominante no início do tratamento superestimulatório, foi desenvolvida a partir de uma série de trabalhos publicados por R. J. Mapletoft e G. A. Bó (revisto por Bó et al., 1995, 2003). Nestes trabalhos ficou caracterizado que o uso de dispositivos intravaginais à base de progesterona (CIDR-B® ou DIB®) e a aplicação concomitante de estrógenos (estradiol 17-β ou benzoato de estradiol) promove a atresia folicular e, conseqüentemente, origina uma nova onda folicular, cerca de 4 a 5 dias após o início dos tratamentos. O tratamento superestimulatório com FSH começa justamente no início da nova onda folicular, ou seja, 4 ou 5 dias após a aplicação do dispositivo intravaginal. Dois dias após a primeira injeção de FSH, é administrada uma dose luteolítica de PGF2α e 12 horas mais tarde o dispositivo intravaginal é removido. As doadoras são inseminadas artificialmente (IA) 12 e 24 horas após a detecção do cio. Seis a sete dias mais tarde os embriões são colhidos, classificados e congelados ou inovulados. Este protocolo apresenta duas vantagens: pode ser iniciado em qualquer dia do ciclo estral e dispensa a observação do cio base. Porém, ainda requer a detecção do estro para a inseminação artificial das doadoras.

PROTOCOLO P-36

Embora a incorporação desses novos conhecimentos tenha facilitado o manejo da doadora, a resposta superovulatória (isto é, o número de embriões viáveis colhidos) continua a apresentar resultados imprevisíveis. Em parte, esse fenômeno foi explicado pela assincronia existente entre a maturação citoplasmática e nuclear nos ovócitos de vacas sob um tratamento de SO (assincronia intrafolicular), bem como de perfis esteroidogênicos anômalos nos folículos dessas doadoras, no período pré-ovulatório, o que prejudicaria o transporte espermático e a maturação ovocitária (Hyttel et al., 1986, 1991).

Por outro lado, resultados inconstantes na resposta superovulatória (SO) foram associados com ovulações prematuras ocorrendo durante o tratamento com FSH, com a conseqüente formação precoce de um corpo lúteo secretando níveis sub-luteais de progesterona no período esperado do estro e, por fim, inibição do pico pré-ovulatório de LH e ausência de ovulações (Callesen et al., 1987; Stock et al., 1996). Além disso, uma assincronia interfolicular foi observada nos animais sob tratamento SO (Vos et al., 1994a). Nesses animais, da população de folículos que foi estimulada pelo FSH exógeno, somente 25% estavam aptos a continuar o desenvolvimento até a ovulação no momento da ocorrência do pico de LH. Esse fato foi explicado pelos diferentes

diâmetros existentes no grupo de folículos em crescimento, fazendo com que alguns poucos folículos avançados (os maiores do grupo) induzissem o pico de LH quando ainda nem todos eles (notadamente os folículos menores) estavam com a capacidade ovulatória totalmente instalada.

Baseando-se em experimentos realizados por pesquisadores holandeses (Vos et al., 1994b; Vos et al., 1995; Van de Leemput et al. 2001) e australianos (D'Occhio et al., 1997), Barros & Nogueira (2001) testaram a eficácia de protocolos, nos quais o momento esperado da ovulação era atrasado por 6 a 12 horas e a ovulação era induzida pela administração de LH ou GnRH (Barros & Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002). Estes protocolos não aumentaram significativamente o número de embriões viáveis, entretanto forneceram duas informações importantes: os tratamentos hormonais foram eficazes em controlar o momento da ovulação de forma a permitir a IA com tempo fixo (IATF) e a manutenção de níveis plasmáticos médios (ao redor de 1,5 a 2,5 ng/mL) de progesterona após a última aplicação de FSH poderia ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário, se mantida durante tempo prolongado (Barros & Nogueira, 2001; Melo et al., 2004a).

A partir dos dados acima foi desenvolvido um protocolo denominado P-36 (Barros & Nogueira, 2001), no qual a fonte de progesterona (CIDR-B® ou DIB®) é mantida por até 36 horas após a aplicação de PGF2α (daí a denominação P-36) e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 horas mais tarde. Graças à administração exógena de LH é possível controlar o momento da ovulação, que ocorre entre 24 e 36 horas após a injeção de LH (Nogueira & Barros, 2003). Conseqüentemente, a IA é realizada em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de LH, dispensando a detecção do cio das doadoras (veja figura a seguir).

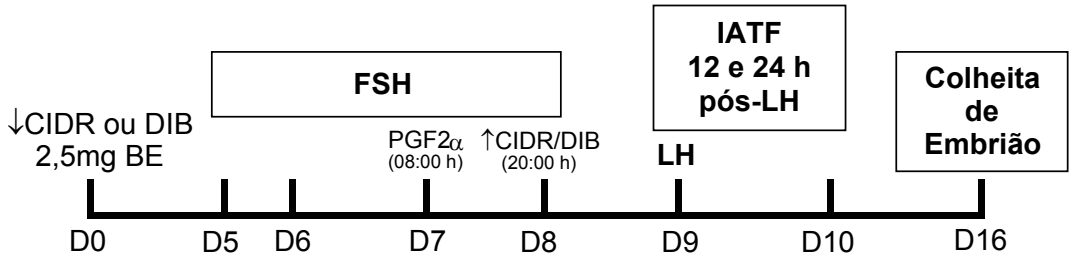


Figura 1. Protocolo superovulatório P-36. Em dia aleatório do ciclo estral (denominado dia 0 = D0) é colocada uma fonte de progesterona (no exemplo, dispositivos intravaginais contendo progesterona: CIDR-B® ou DIB®) e administrado 2,5 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, via IM). Cinco dias mais tarde, no início de uma nova onda folicular, começa o tratamento superestimulatório com FSH (4 dias consecutivos, com doses decrescentes administradas duas vezes ao dia). Na manhã do dia 7 (D7, ex: 8:00 h) administra-se dose luteolítica de PGF2α (via IM) e no dia 8 à noite (ex: 20:00 h, D8) remove-se o dispositivo intravaginal, logo após a última dose de FSH. No dia seguinte às 8:00 h (D9) é aplicado 12,5 a 25,0 mg de LH (Lutropin®, via IM) e as doadoras são inseminadas em tempo fixo (IATF) 12 e 24 h após o LH. Os embriões são colhidos 7 a 8 dias após a aplicação do LH.

A eficácia da utilização de 25 mg vs 12,5 mg de LH no protocolo P-36 foi comparada por Nogueira & Barros (2003) em vacas da raça Nelore, utilizando duas fontes de progesterona (CIDR e DIB). Os resultados apresentados, na tabela 1, indicam que tanto faz utilizar-se CIDR ou DIB como fonte de progesterona. Além disso, a média de estruturas totais colhidas, embriões viáveis e taxa de viabilidade foram similares ($p>0,05$) ao comparar-se metade da dose de LH (12,5 mg) com a dose integral (25 mg).

Tabela 1. Produção de embriões em vacas Nelore tratadas com o protocolo P-36, utilizando duas fontes de progesterona exógena (CIDR-B ou DIB) e duas doses de LH (25 ou 12,5 mg). Média±EPM.

	CIDR-B	DIB	
	25 mg (n=7)	25 mg (n=7)	12,5 mg (n=30)
Estruturas Totais	13,3±2,71	16,1±4,49	12,5±1,78
Embriões Viáveis	8,7±1,96	11,0±3,96	9,7±1,53
Taxa de Viabilidade	65,6%	68,1%	77,9%

Em experimento recente, Melo et al. (2004b) demonstraram que a utilização do protocolo P-36 não era prejudicial aos ovócitos de vacas doadoras de embriões. Estes autores observaram que em vacas submetidas ao protocolo P-36, nas quais os ovócitos foram aspirados logo após a retirada da fonte de progesterona (DIB) e fertilizados e cultivados *in vitro,* tanto as taxas de clivagem como de blastocisto foram semelhantes àquelas rotineiramente obtidas a partir de ovários provenientes de matadouro (grupo controle). Concluíram que o protocolo P-36 não afetou a viabilidade dos ovócitos, uma vez que os mesmos se desenvolveram até o estágio de blastocisto.
Resultados recentes confirmam a eficácia do protocolo P-36. Nogueira et al. (dados ainda não publicados, 2003-2004) obtiveram em 150 colheitas a média de 13,2 estruturas totais e 9,3 embriões viáveis, com 71,0% (1401/1973) de viabilidade, em doadoras da raça Nelore tratadas com o protocolo P-36. Além disso, alguns colegas (Zanenga et al., 2003) estão utilizando uma variação do protocolo P-36, onde o dispositivo intravaginal é retirado 24 h após a PGF2α (sendo, portanto, denominado P-24) e o LH continua a ser administrado no dia 9 (48 h após a PGF2α).
Em resumo, o protocolo P-36, além de facilitar acentuadamente o manejo de doadoras de embriões, por eliminar a observação do cio, resulta em taxas de embriões viáveis pelo menos tão boas quanto às obtidas após a utilização de outros tratamentos superovulatórios, que requerem a detecção do cio (Barros & Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002; Nogueira et al., 2003; Nogueira & Barros 2003; Nogueira & Barros, 2004).

IMPORTÂNCIA DAS ISOFORMAS DO RECEPTOR DE LH NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO

Os eventos decorrentes do pico pré-ovulatório de LH estão relacionados à presença de receptores para o LH (LHr) e da afinidade desta gonadotrofina pelos seus receptores.
Estudos de expressão gênica do LHr em células da teca e granulosa de folículos bovinos têm demonstrado a presença de 4 isoformas de mRNA para o mesmo gene do LHr. Duas isoformas, das 4 detectadas, poderiam ser traduzidas em proteínas funcionais (receptores acoplados à proteína G) com afinidades distintas em relação aos ligantes. Uma das isoformas (completa ou "full") tem afinidade pelo LH e hCG, enquanto que a segunda isoforma (com a deleção do exon 10) preferencialmente pelo hCG (Robert et al., 2003).
Dados preliminares obtidos com células da teca e da granulosa, de folículos oriundos de fêmeas zebuínas abatidas em frigorífico, indicam que ao menos 4 isoformas do LHr estão sendo transcritas conforme dados citados na literatura (Nogueira et al., 2004).
Com base nessas informações, foi realizado um experimento (Nogueira et al., 2004) para testar a hipótese de que, em vacas superestimuladas com FSH, a administração simultânea de LH e hCG, na expectativa de estimular qualquer variedade de LHr presente, resultaria em melhora na qualidade dos ovócitos e/ou aumento nas taxas de

ovulação. Vacas Nelore foram superestimuladas com o protocolo P-36 e os embriões colhidos 7 a 8 dias após a administração do indutor da ovulação. A ovulação foi induzida apenas com LH (pLH, 12,5 mg, im, Lutropin, Grupo 1) ou com LH (12,5 mg) e hCG (1.500 UI, im, Pregnyl, Grupo 2). Ambos os grupos foram contemporâneos quanto a superestimulação e inovulação dos embriões.
Os resultados sumariados nas Tabelas 2 e 3 são indicativos de que a administração simultânea de LH e hCG, como indutores da ovulação em animais superestimulados, não altera a produção de embriões viáveis ou a taxa de viabilidade. Contudo, houve aumento na taxa de prenhez de embriões de qualidades boa, regular e pobre (2, 3 e 4, respectivamente), inovulados a fresco e oriundos de animais tratados com hCG e LH, quando comparados aos embriões obtidos de doadoras tratadas apenas com LH.

Tabela 2. Médias (±EPM) de estruturas totais e de embriões viáveis, e taxa de viabilidade de doadoras Nelore superestimuladas e tratadas com LH (Grupo 1) ou LH+hCG (Grupo 2).

Grupo	1 (n=8)	2 (n=14)	P+
Estruturas totais	12,4±2,36	12,2±2,03	0,96
Embriões viáveis	10,0±2,38	8,9±1,66	0,71
Taxa de viabilidade	80,8%	73,1%	0,18

+Teste exato de Fisher.

Tabela 3. Taxa de prenhez de embriões inovulados a fresco, oriundos de doadoras Nelore superestimuladas e tratadas com LH (Grupo 1) ou LH+hCG (Grupo 2).

Grupo	1 (n=60)	2 (n=65)	P+
Taxa de prenhez	41,7% (25/60)	56,9% (37/65)	0,11
Taxa de prenhez por qualidade embrionária			
Qualidade 1	67,9% (19/28)	46,7% (07/15)	0,21
Qualidade 2	25,0% (04/16)	63,3% (19/30)	0,03
Qualidade 3	20,0% (02/10)	63,6% (07/11)	0,08
Qualidade 4	0 (0/06)	44,4% (04/09)	0,10
Qualidades 1, 2 e 3	46,3% (25/54)	58,9% (33/56)	0,25
Qualidades 2, 3 e 4	18,8% (06/32)	60,0% (30/50)	0,0003

Taxa de prenhez geral = 43,6% (241/553), correspondente ao período dez/03 a mai/04; inovulações a fresco de embriões de qualidades 1, 2, 3 e 4. + Teste exato de Fisher

Apesar dos dados serem apenas preliminares, são indicativos de que as diferentes isoformas dos receptores de LH podem ter papel significativo na atividade biológica das gonadotrofinas, modulando eventos ligados à capacidade de estabelecer gestações e à qualidade embrionária, e este fato deve ser explorado para melhorar protocolos superovulatórios como o P-36.

CONCENTRAÇÃO ESPERMÁTICA PARA TE

A concentração mínima de espermatozóides – com motilidade total pós-descongelação - presentes numa palheta de sêmen (6 a $10x10^6$) foi determinada tendo em mente a fertilização de uma fêmea durante o ciclo estral normal. Entretanto, a superestimulação de doadoras de embriões resulta na disponibilidade de maior número de ovócitos (cerca de 10 a 20) para a fertilização, do que em uma simples IA (1 ovócito).
Considerando que a quantidade e a qualidade do sêmen podem afetar a taxa de concepção após a inseminação artificial, e que a concentração de espermatozóides com movimento total, pós-descongelação, varia de acordo com a partida de sêmen e com o reprodutor utilizado, Nogueira & Barros (2004) verificaram se, por meio do ajuste da concentração final de espermatozóides, seria possível utilizar palhetas com baixa concentração espermática e, ainda assim, obter taxas de embriões viáveis semelhantes àquelas resultantes da utilização de palhetas com alta concentração. Neste experimento, todos os animais foram tratados com o protocolo P-36. Uma amostra de cada partida de sêmen foi analisada pelo método CASA (Computer-Assisted Semen Analysis) e a concentração final de espermatozóides, com motilidade total pós-descongelação, foi ajustada para um mínimo de $25x10^6$, que corresponde a, aproximadamente, 3 a 4 vezes a concentração mínima de espermatozóides usada na IA de um animal não superovulado. A IATF foi realizada 12, 24 e, quando aplicável, 36 h após a administração de LH. O número de palhetas de sêmen necessário para atingir a concentração desejada variou entre 2 e 6 (Grupos 2, 3, 4, 5 e 6). O número de IATFs foi ajustado para o número total de palhetas utilizadas, isto é, 2 palhetas (IATF 12 e 24 h pós LH), e 3 ou mais palhetas (12, 24 e 36 h pós LH). Os resultados obtidos estão sumariados na tabela 4.

Tabela 4. Média de estruturas totais e embriões viáveis obtidas por colheita, e taxa de viabilidade em vacas Nelore tratadas com o protocolo P-36 e inseminadas (IATF) com 2 a 6 palhetas de sêmen (Grupos 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente).

Nº de colheitas	Grupo	Estruturas totais	Embriões viáveis	Taxa de viabilidade (%)
19	2	12,2	8,9	73,6
104	3	13,5	9,6	70,9
22	4	13,3	9,4	70,9
04	5	5,5	4,0	72,7
01	6	24,0	13,0	54,2
27	4 a 6	12,5	8,7	69,8

Quando os resultados dos grupos 4, 5 e 6 foram reunidos, a média de estruturas totais, de embriões viáveis obtidos e a taxa de viabilidade foram de: 12,5; 8,7 e 69,8% (n=27; Tabela 4). Estes resultados foram similares aos obtidos nos grupos 2 e 3 (P=0,61). Além disso, não houve diferença significativa ao comparar-se os resultados dos grupos 2 a 6 (P=0,17). Portanto, apesar da utilização de palhetas de sêmen com baixa concentração de espermatozóides, foi possível, mediante o ajuste da concentração final de espermatozóides, obter taxas de viabilidade e de embriões viáveis semelhantes àquelas observadas quando utilizou-se sêmen com alta concentração espermática.
Estes resultados são indicativos de que o fato de uma partida de sêmen ter sido aprovada para inseminação artificial, não a qualifica automaticamente para um programa de TE, onde a concentração espermática necessária para a fertilização de

vários ovócitos deve ser maior do que a utilizada para apenas um ovócito. Conseqüentemente, num programa de TE, deve-se ajustar o número de palhetas a serem utilizadas de acordo com a concentração espermática de cada partida de sêmen.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Com a evolução constante das pesquisas relacionadas à fisiologia e farmacologia dos ruminantes, propiciando o entendimento dos eventos moleculares que regulam a função reprodutiva, novos tratamentos serão desenvolvidos para aumentar a eficiência e facilitar, cada vez mais, a utilização de biotécnicas como a inseminação artificial, transferência de embriões e produção in *vitro* de embriões.

AGRADECIMENTOS

Somos gratos aos Srs. Renato Eugênio de Rezende Barbosa e Paulo Fragnito (Agropecuária Campanário) por disponibilizarem o uso de animais em vários experimentos, ao Dr. José Buratini Jr. (Depto. Fisiologia, IBB-UNESP) pela colaboração na realização do experimento sobre as isoformas dos receptores de LH nos folículos ovarianos bovinos, aos Laboratórios AFRSA S.R.L. (Argentina; Tecnopec representante no Brasil) e InterAg (Nova Zelândia) pela fornecimento dos dispositivos intravaginais DIB e CIDR, respectivamente; a FAPESP pelo auxílio financeiro para realização de diversos experimentos e bolsas concedidas ao Médico Veterinário Marcelo F.G. Nogueira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams GP, Kot K, Smith CA, Ginther OJ. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. Can J Anim Sci 1993;73:267-275.

Adams GP. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. Theriogenology 1994;41:19-24.

Alfuraiji MM, Atkinson T, Broadbent PJ, Hutchinson JSM. Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG-monoclonal antibodies. Anim Reprod Sci 1993;33:99-109.

Armstrong DT. Recent advances in superovulation of cattle. Theriogenology 1993;39:7-24.

Barros CM, Moreira MBP, Fernandes P. Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de transferência de embriões. Arq. Fac. Vet. UFRGS 1998;26(Suppl):179-89.

Barros CM, Nogueira MFG, Andreussi PAT. Superovulation and fixed time artificial insemination. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS 2000;28(Suppl 1):52-64.

Barros CM, Nogueira MFG. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. Theriogenology 2001;56:1483-1496.

Bellows RA, Staigmiller RB, Wilson JM, Phelps DA, Darling A. Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. Theriogenology 1991;35:1069-82.

Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. Theriogenology 1994;42:895-907.

Bó GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Pierson RA, Mapletoft RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. Anim. Reprod. Sci. 1995;39:193-204.

Bó GA, Baruselli PS, Martinez MF. Pattern and manipulation of follicular development in Bos indicus cattle. Anim. Reprod. Sc. 2003;78:307-326.

Bodensteiner KJ, Kot K, Wiltbank MC, Ginther OJ. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. Theriogenology 1996;45:1115-28.

Boland MP, Crosby TF, Gordon I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. Theriogenology 1978;10:175.

Boland MP, Roche JF. Embryo production: alternative methods. Mol Reprod Dev 1993;36:266-270.

Braileanu GT, Albanese C, Card C, Chedrese PJ. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. Theriogenology 1998;49:1031-37.

Bungartz I, Niemann H. Assessment of the presence of dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. J Reprod Fertil 1994;101:583-591.

Callesen H, Greve T, Hyttel P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. Theriogenology 1986;25:71-86.

Callesen H, Greve T, Hyttel P. Premature ovulations in superovulated cattle. Theriogenology 1987;28:155-166.

Del Campo MR, Becerra F, Gonzalez M, Murphy BD, Mapletoft RJ. Superovulation with three different commercial pituitary extracts in the cow. Theriogenology 1990;33:208.

Dieleman SJ, Bevers MM, Gielen JTH. Increase of the number of ovulations in PMSG/PG-treated cows by administration of monoclonal anti-PMSG shortly after the endogenous LH peak. Theriogenology 1987;27:222.

Dieleman SJ, Bevers MM, Vos PLAM, de Loos FAM. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. Theriogenology 1993;39:25-41.

D'Occhio MJ, Sudha G, Jilella D, White T, Maclellan LJ, Walsh J, Trigg TE, Miller D. Use of GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. Theriogenology 1997;47:601-13.

Donaldson LE, Ward DN, Glenn SD. Use of porcine follicle stimulating hormone after chromatographic purification in superovulation of cattle. Theriogenology 1986;25:747-57.

Donaldson LE, Ward DN. LH effects on superovulation and fertilization rates. Theriogenology 1987;27:225.

Donaldson LE. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. Theriogenology 1989;31:183.

Donaldson LE. Embryo production by SUPER-OV and FSH-P. Theriogenology 1990a;33:214.

Donaldson LE. FSH-P bath variation. Theriogenology 1990b;33:215.

Donaldson LE. A comparison of FSH products. In: INTERNATIONAL WORKSHOPS OF EMBRYO TRANSFER, BIOTECHNOLOGY AND ADVANCED TECHNOLOGIES, 1, 1995, Montevideo. Anais... Montevideo: Universidad de la Republica, 1995;1:1-8.

Elsden RP, Hasler JF, Seidel GEJr. Non-surgical recovery of bovine eggs. Theriogenology 1976;6:523.

Fernandes P, Teixeira AB, Crocci AJ, Barros CM. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF2alpha and estradiol benzoate (EB). Theriogenology 2001;55:1521-32.

Fricke PM, Kirsch JD, Reynolds LP, Redmer DA. Studies of FSH-P induced follicular growth in cows. Theriogenology 1994;42:43-53.

Gonzalez A, Lussier JG, Carruthers TD, Murphy BD, Mapletoft RJ. Superovulation of beef heifers with Folltropin-V: A new FSH preparation containing reduced LH activity. Theriogenology 1990;33:519.

Gonzalez A, Wang H, Carruthers TD, Murphy BD, Mapletoft RJ. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. Can. Vet. J. 1994;35:158-62.

Gordon I. Controlled reproduction in cattle & buffaloes. Cambridge: CAB Internacional, 1996. 492p.

Goulding D, Williams DH, Duffy P, Boland MP, Roche JF. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. Theriogenology 1990;34:767-78.

Guibault LA, Grasso F, Lussier JG, Roullier P, Matton P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. J Reprod Fertil 1991;91:89.

Hill BR, Kuehner LF. Follicle aspiration prior to superovulation in cattle: a field study. Theriogenology 1996;43:324.

Hockley DK, Bó GA, Palasz AT, del Campo MR, Mapletoft RJ. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: effect of dose and site of injection. Theriogenology 1992;37:224.

Huhtinen M, Rainio V, Aalto J, Bredbacka P, Mäki-tanila A. Increased ovarian response in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. Theriogenology 1992;37:457-463.

Hyttel P, Callesen H, Greve T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. J. Reprod. Fertil. 1986;76:645-56.

Hyttel P, Callesen H, Greve T, Schmidt M. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. Theriogenology 1991;35:91-108.

Lindsell CE, Murphy BD, Mapletoft RJ. Superovulation and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. Theriogenology 1986;26:209-19.

Looney CR, Bondioli KR. Bovine FSH produced by recombinant DNA technology. Theriogenology 1988;29:235.

Lussier JP, Lamothe P, Pacholek X. Effects of follicular dominance and different gonadotrophin preparations on the superovulatory response in cows. Theriogenology 1995;43:270.

Mapletoft RJ, Pierson RA. Factors affecting superovulation in the cow: practical considerations. Embryo Transfer Newsl. 1993;11:15-24.

Mapletoft RJ, Nasser LF, Bó GA, del Campo MR. The effect of LH content in a porcine pituitary extract on superovulatory response to a single subcutaneous injection in beef heifers. In: International Congress on Animal Reproduction, 12, 1992, De Hague. Anais... De Hague: ICAR, 1992:237-9.

Meirelles FV, Rosa AJM, Lôbo BR. Is the American Zebu really *Bos indicus*? Genetics and Molecular Biology 1999;22:543-47.

Melo DS, Ferreira MMG, Monteiro FM, Nogueira MFG, Trinca LA, Barros CM. Manutenção de níveis sub-luteais de progesterona, após tratamento superestimulatório, pode diminuir a taxa de recuperação de embriões. Acta Scientiae Veterinariae, 2004a (abstract in press).

Melo DS, Ferreira MMG, Monteiro FM, Nogueira MFG, Potiens JR, Barros CM. Protocolo P-36 não é deletério para oócitos de vacas Nelore (*Bos indicus*) doadoras de embriões. Acta Scientiae Veterinariae, 2004b (abstract in press).

Nogueira MFG, Barros BJP, Teixeira AB, Trinca LA, D'Occhio MJ, Barros CM. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. Theriogenology 2002;57:1625-34.

Nogueira MFG, Barros CM. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. Revista Acta Scientiae Veterinariae 2003;31(sup.):509.

Nogueira MFG, Porto LPC, Barros CM. Dose-response trial in *Bos taurus* vs *Bos indicus* cows superstimulated with FSH, associated with controlled LH surge and fixed-time artificial insemination. Revista Acta Scientiae Veterinariae 2003;31(sup.):511.

Nogueira MFG, Barros CM. Adjusting sperm concentration used to inseminate superstimulated Nelore cows, in order to avoid decline in embryo production. Acta Scientiae Veterinariae, 2004 (abstract in press).

Nogueira MFG, Buratini Jr J, Barros CM. Embryo production and pregnancy rate in superstimulated nelore donors treated with hCG and LH to induce ovulation. Acta Scientiae Veterinariae, 2004 (abstract in press).

Page RD, Jordan JE, Johnson SK. Superovulation of Holstein heifers under heat stress with FSH-P or Folltropin. Theriogenology 1989;31:236.

Pawlyshyn V, Lindsell CE, Braithwaite M, Mapletoft RJ. Superovulation of beef cows with FSH-P: A dose-response trial. Theriogenology 1986;25:179.

Pierson RA, Ginther OJ. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. Theriogenology 1988;29:21-37.

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cattle using GnRH and PGF2α. Theriogenology 1995;44:915-23.

Rajamahendran R, Calder MD. Superovulatory responses in dairy cows following ovulation of the dominant follicle of the first wave. Theriogenology 1993;40:99-109.

Robert C, Gagné D, Lussier JG, Bousquet D, Barnes FL, Sirard M-A. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. Reproduction 2003;125:437-46.

Roberts AJ, Grizzle JM, Echternkamp SE. Follicular development and superovulation response in cows administred multiple FSH injections early in the estrous cycle. Theriogenology 1994;42:917-29.

Rowson LEA, Lawson RAS, Moor RM, Baker AA. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. J. Reprod. Fertil. 1972;28:427-31.

Santiago AA. O Zebu na Índia, no Brasil e no mundo. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, 1985:706.

Santos R. Nelore: a vitória brasileira. Uberaba: Agropecuária Tropical, 1995:391.

Saunders J, Wilmott N, Palasz A, Mapletoft RJ. Dose titration of Folltropin in the cow. Theriogenology 1990;33:319.

Savio JD, Keenan L, Boland MP, Roche JF. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. J. Reprod. Fertil. 1988;83:663-71.

Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. Biol. Reprod. 1988;39:308-17.

Stock AE, Ellington JE, Fortune JE. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. Theriogenology 1996;45:1091-1102.

Thatcher WW, Drost M, Savio JD, MacMillan KL, Entwistle KW, Schimitt EJ, de la Sota RL, Morris GR. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. Anim. Reprod. Sci. 1993;33:27-49.

Tribulo H, Jofre F, Carcedo J, Alonso A, Tribulo R, Bó GA. Superovulation in *Bos indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. Theriogenology 1993;39:331.

Twagiramungu H, Guibault LA, Proulx J, Villeuve P, Dufour JJ. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin. Theriogenology 1992a;38:1131-44.

Twagiramungu H, Guibault LA, Proulx J, Villeuve P, Dufour JJ. Influence of an agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone (Buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. J. Anim. Sci. 1992b;70:1904-10.

Van de Leemput EE, Vos PLAM, Hyttel P, Van den Hurk R, Bevers MM, Van der Weijden GC, Dieleman SJ. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. Theriogenology 2001;55:573-92.

Vos PLAM, Van der Schans A, de Wit AAC, Willemse AH, Bevers MM, Dieleman SJ. Effect of neutralization of pregnant mares' serum gonadotrophin (PMSG) shortly before or at the preovulatory LH surge in PMSG-superovulated heifers on follicular function and development. J. Reprod. Fertil. 1994a;100:387-93.

Vos PLAM, Bevers MM, Willemse AH, Dieleman SJ. Effects of supression by a progesterone-releasing device and subsequent induction by GnRH of the preovulatory LH surge on follicular function in PMSG/PG-treated heifers. J. Reprod. Fertil. 1994b;101:43-9.

Vos PLAM, Bevers MM, Willemse AH, Dieleman SJ. Does postponement of preovulatory LH surge affect ovulation rate and embryo yield in superovulated holstein heifers ? Theriogenology 1995;43:344.

Wilson JM, Jones AL, Miller DR. Influence of a dominant follicle on the superovulatory response. Theriogenology 1990;33:349.

Wilson JM, Jones AL, Moore K, Looney CR, Bondioli KR. Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. Anim. Reprod. Sci. 1993;33:71-82.

Zanenga CA, Pedrosa MF, Lima GF, Marques MO, Santos ICC, Valentim R, Baruselli PS. Comparação entre dois protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). Acta Scientiae Veterinariae 2003;31:626-27.

ESTADO DA ARTE DA FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* EM BOVINOS

Garcia[1], J.M., Avelino[1], K. B., Vantini[1], R.
[1]DMVPRA, FCAV/UNESP-Jaboticabal

RESUMO

O desenvolvimento de novas biotecnologias tem permitido significativo aumento na produção animal, especialmente em bovinos. A múltipla ovulação e a transferência de embriões (MOET) tem sido usada com êxito há anos, para aumentar o potencial de exploração de vacas de genética superior. No entanto, não se tem verificado progresso no número de embriões de boa qualidade obtidos e destinados à transferência. Aliado a isso, sabe-se, também, que repetidas superovulações podem levar a problemas reprodutivos nas doadoras. Por outro lado, recentes avanços foram alcançados em outra técnica, a produção *in vitro* de embriões (PIV). A PIV, associada à aspiração folicular guiada por ultra-sonografia, tem sido usada comercialmente por algumas empresas, com resultados razoáveis. O principal objetivo da PIV comercial consiste na obtenção de embriões viáveis a partir de fêmeas que não estão mais aptas a produzirem descendentes pelas técnicas convencionais, como em vacas doadoras que apresentam infertilidade provocada por tratamento com gonadotrofinas ou por distúrbios/patologias no sistema reprodutor feminino. Fêmeas a partir dos seis meses de idade, gestantes até o terceiro mês ou no período pós-parto (2 a 3 semanas) podem ser usadas como doadoras para a PIV. Outra vantagem da aspiração folicular guiada por ultra-sonografia na PIV está no fato de que não é necessário o uso de hormônios para a recuperação de oócitos. Apesar dessas vantagens, estudos relacionados a maturação oocitária, cultivo embrionário e criopreservação ainda são necessários para a maximização dessa técnica e a produção de embriões de boa qualidade. Isto é de suma importância para a diminuição dos custos da PIV, tornando-a mais acessível aos produtores.

ABSTRACT

The development of new biotechnologies has enabled a significant increase in animal production, specially in cattle. Multiple ovulation and embryo transfer (MOET) have been successfully used for many years to increase the exploration potential of genetic superior cows. However, no progress has been seen to increase the number of good quality transferable embryos. It is also known that repeated superovulation can lead to reproductive problems in the donors. On the other hand, recent advancements of another technique, the in vitro embryo production (IVP), have been commercially applied by some companies, with reasonable results. The main purpose of commercial IVP is to obtain viable embryos from females that may not be able to produce descendants by conventional techniques, such as donor cows that present infertility caused by treatment of gonadotropins or by problems/pathologies in the female reproductive system. Females from 6 months of age, pregnant until the third month and also after calving (2-3 weeks) can be used as donors for IVP. Another advantage of ultrasound guided follicular aspiration in IVP is related to the fact that it is not necessary the use of hormones to recovery the oocytes. Despite of these advantages, studies related to oocyte maturation, embryo culture and cryopreservation are still necessary

aiming the maximization of this technique and the production of good quality embryos. This is specially important to decrease the costs of IVP and to become more available to the producers.

INTRODUÇÃO

Em contraste com os avanços verificados nos programas de seleção de touros, a influência genética da vaca nos programas de melhoramento de bovinos era limitada pelo baixo número de crias obtidas durante a vida reprodutiva da fêmea. Os estudos envolvendo dinâmica folicular, ciclo estral e sincronização da ovulação por meio de controle hormonal da função ovariana contribuíram para que a técnica de transferência de embriões (TE) tivesse êxito no aumento da produção de embriões e de descendentes. Dessa forma, pôde-se aumentar o potencial de exploração reprodutivo das fêmeas. Entretanto, as limitações impostas pela repetibilidade da TE associadas à resposta irregular aos tratamentos de superovulação, com alta variação no número de estruturas viáveis recuperadas pós-colheita, aliada à crescente demanda de embriões para fins de pesquisa, contribuíram para a investigação de outros caminhos voltados à produção de embriões em larga escala. O aprimoramento dos sistemas de produção *in vitro* (PIV) de embriões, na espécie bovina, a partir de oócitos recuperados de folículos de ovários de vacas abatidas, tem sido fundamental para o estudo e a compreensão de vários fenômenos e mecanismos biológicos que ocorrem durante o período desde a maturação dos oócitos, capacitação espermática e fertilização até o início do desenvolvimento embrionário em fase de pré-implantação. Os registros indicam que os primeiros estudos com maturação *in vitro* e subseqüente fecundação, em bovinos, foram os de Iritani e Niwa (1977) relacionando a morfologia dos oócitos bovinos com a capacidade de maturar-se *in vitro*. Brackette *et al.* (1982) obtiveram o nascimento do primeiro bezerro produzido após fecundação *in vitro* de um oócito ovulado e Lu *et al*. (1987), o nascimento de gêmeos após maturação, fecundação e cultivo *in vitro*.
A obtenção de oócitos a partir de animais vivos, inicialmente realizada por laparoscopia e, mais recentemente, por meio da aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-sonografia, adaptada da técnica desenvolvida para humanos por Pieterse *et al*. (1988) tornou possível a aplicação da técnica de PIV *in vivo* visando aumentar o aproveitamento do potencial genético das fêmeas consideradas superiores. O aprimoramento das condições de cultivo *in vitro* bem como das técnicas de recuperação de oócitos *in vivo* tornou viável a aplicação da PIV em escala comercial, sendo importante seu desenvolvimento dentro do atual contexto de incremento da produtividade na pecuária e pesquisa de novas biotecnologias. Apesar do incremento na produção *in vitro* de embriões, os resultados são muito variáveis de um laboratório para outro e até mesmo dentro de um mesmo laboratório. Além de variáveis como meio de cultivo, água, matéria-prima utilizada, temos ainda, o fator humano. São notórias as diferenças de resultados entre os indivíduos de um mesmo laboratório. Isto deixa bem claro que a produção *in vitro* de embriões é um processo artesanal. Um artesão, mesmo tendo as diretrizes para desenvolver um trabalho, tem a sensibilidade de realizá-lo de forma que o produto final seja uma obra-prima. Além de requisitos como ótima infraestrutura e excelente qualidade de matéria-prima, todo laboratório necessita de artesãos com conhecimento e sensibilidade para a produção *in vitro* de embriões.

PRINCIPAIS ETAPAS DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Em bovinos, além da busca pela compreensão dos eventos biológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário inicial, a PIV tem sido usada como um método alternativo ou complementar à TE, com o uso de oócitos imaturos recuperados de ovários de doadoras de várias idades e estado fisiológico-reprodutivo distintos. Após a recuperação dos oócitos, três passos biológicos que ocorrem *in vivo* são realizados em laboratório para a produção de embriões: maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos, (2) fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV).

a) Recuperação dos Oócitos

Para a produção *in vitro* de embriões, uma das técnicas mais utilizadas para a recuperação de oócitos é a aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-sonografia. Com o auxílio de um ultra-som e um transdutor acoplado a uma guia de aspiração, realiza-se a aspiração mediante introdução de uma agulha no interior dos folículos ovarianos. Um sistema de bomba a vácuo permite a recuperação dos oócitos e do líquido folicular para um tubo coletor. Realiza-se, em seguida, a procura e a seleção dos oócitos, em microscópio estereoscópico, de acordo com o número de camadas de células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma do oócito. Os oócitos selecionados são, então, transportados até o laboratório, onde se inicia o processo de produção *in vitro* de embriões.

A aspiração folicular, em geral, não promove danos ao sistema reprodutor feminino, embora em alguns casos já tenha sido relatada a predominância de tecido conjuntivo no parênquima ovariano de vacas doadoras que estavam sendo submetidas a sessões de aspiração quinzenais (RODRIGUES & GARCIA, 2000).

Ao contrário da transferência de embriões, a aspiração folicular é considerada uma técnica que apresenta maior flexibilidade, uma vez que se pode obter oócitos de fêmeas a partir dos 6 meses de idade, de vacas prenhes até o terceiro mês de gestação, ou mesmo após o parto (2 a 3 semanas, segundo HASLER et al., 1995). A periodicidade das aspirações pode variar desde a realização de sessões esporádicas até regulares, a intervalos de duas semanas, durante várias semanas ou meses. Outra vantagem da realização da aspiração folicular em comparação à TE está ligada ao fato de que não é necessário o tratamento das doadoras com gonadotrofinas, o que é considerado benéfico especialmente em novilhas jovens, pois a estimulação hormonal pode provocar edema mamário e síndrome de ovário cístico. Além da possibilidade de desencadear casos de infertilidade, a superovulação, feita repetidas vezes, pode provocar ainda relaxamento dos ligamentos do úbere (GALLI et al., 2003).

b) Maturação *in Vitro* (MIV)

Os oócitos aspirados do interior dos folículos ovarianos não se encontram aptos a serem fecundados, sendo necessária uma séria de transformações do núcleo e do citoplasma, que consistem na maturação oocitária. Em condições *in vivo*, a maturação tem início logo após o pico pré-ovulatório de LH enquanto que no caso da aspiração folicular, este processo se inicia com a remoção do oócito do interior do folículo ovariano. Em bovinos, são necessárias de 20 a 22 horas para que ocorra a maturação nuclear, com progressão do estádio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estádio de metáfase II. As modificações citoplasmáticas estão relacionadas à reorganização das organelas citoplasmáticas, à migração dos grânulos corticais e às alterações dos padrões de síntese protéica, sendo que a transcrição de genes só voltará a ocorrer após a transição materno-zigótica. Além disso, ocorrem modificações nas células somáticas (células da granulosa tanto do *cumulus* como

murais) que envolvem o oócito durante o processo de maturação, atribuindo-se a estas células funções importantes na maturação nuclear e citoplasmática do oócito bem como na passagem de nutrientes e proteínas reguladoras através das junções tipo "gap".

Para que todos os eventos da maturação oocitária ocorram *in vitro*, é necessário que os meios utilizados durante este período mimetizem as condições encontradas durante o processo de maturação *in vivo*. Existem vários métodos diferentes que podem ser utilizados e que já foram testados durante a maturação *in vitro* (MIV), em bovinos (revisão de NAGAI, 2001), sendo que a grande maioria dos laboratórios tem optado pela suplementação do meio de maturação com soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas (FSH, LH e estradiol), em condições controladas de atmosfera e temperatura. Sabe-se que o potencial de desenvolvimento dos oócitos pós-maturação pode ser afetado por uma série de fatores, como osmolaridade, temperatura, pH, tensão de CO_2 e O_2 e uso de soro e células somáticas (HOLM & CALLENSEN, 1998; NAGAI, 2001; HOSHI, 2003). Após o tempo de incubação da MIV, os oócitos completam a maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e estão prontos para a fecundação (em condições ideais, mais 90% dos oócitos estão em metáfase II após a MIV).

c) Fertilização *in Vitro* (FIV)

No processo de fertilização *in vitro* são usados espermatozóides de palhetas de sêmen congelado, e a separação em gradiente Percoll tem sido o método mais comum para a obtenção da fração espermática viva após a descongelação (GALLI & LAZZARI, 1996), embora outros sistemas possam ser usados, como o "swim-up". Para se maximizar a capacidade fecundante do sêmen com o mínimo de polispermia possível, testes com diferentes concentrações espermáticas podem ser feitos, fixando-se alguns oócitos após a incubação com os espermatozóides e analisando-se em microscópio a configuração da cromatina. A partir destes resultados, determina-se a concentração de espermatozóides ideal para cada touro. Em geral, a concentração usada para a fertilização *in vitro* é de 2×10^6 espermatozóides/mL, calculada de acordo com a motilidade e a concentração da fração viva de espermatozóides obtida após a centrifugação em gradiente Percoll. O período de incubação dos oócitos com os espermatozóides varia entre 6 e 20 horas.

d) Cultivo *in Vitro* (CIV)

O cultivo *in vitro* corresponde à etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estádio de blastocisto. É durante este período de desenvolvimento pré-implantação que ocorrem eventos como ativação do genoma embrionário (transição materno-zigótica), divisão celular (clivagem), compactação dos blastômeros no estádio de mórula, início da diferenciação embrionária (células do trofoblasto, que darão origem à placenta e anexos fetais, e células da massa celular interna, que formarão o feto propriamente dito) com a formação da blastocele. Assim como nas etapas anteriores ao cultivo *in vitro*, diferentes protocolos têm sido usados durante esta fase de desenvolvimento embrionário. As condições de cultivo *in vitro* são consideradas muito importantes para que bons índices de produção de embriões sejam alcançados. Por essa razão, inúmeras pesquisas têm sido realizadas visando avaliar o efeito que diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos, podem exercer sobre o metabolismo e a capacidade de desenvolvimento destes embriões. Como exemplo, a composição dos meios de cultivo, as condições de temperatura e atmosfera gasosa, a adição de aminoácidos, vitaminas, macromoléculas e fatores de crescimento, assim como o uso de soro (GARDNER, 1998; MARQUANT-LEGUIENNE & HUMBLOT, 1998; BAVISTER, 2000; THOMPSON,

2000). O co-cultivo com células do oviduto ou sobre monocamadas de células diferenciadas, como BRL ou células VERO, tem sido usado com êxito em alguns laboratórios (EYESTONE & FIRST, 1989; HASLER et al., 1995; CARNEGIE et al., 1997). Entretanto, este sistema quase não tem sido usado na produção em larga escala de embriões *in vitro* devido à sua baixa praticidade, uma vez que é necessário a manutenção e cultivo destas células em crescimento, estando sujeitas a variações biológicas que podem levar à produção de fatores que afetariam negativamente o desenvolvimento embrionário. Recentemente, a utilização de meios semi-definidos com pouco ou nenhum soro e baixa tensão de oxigênio tem substituído quase que totalmente o co-cultivo com células ou sobre monocamadas.
O desenvolvimento embrionário *in vitro* é avaliado no 6º dia de cultivo visualizando-se a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocele, sendo que no 7º dia é feita a seleção e a avaliação final dos embriões para a transferência a fresco ou para a congelação.

GESTAÇÃO E NASCIMENTO A PARTIR DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*

As taxas de gestação de embriões produzidos *in vitro* podem ser bastante variáveis. Esta variação está relacionada à qualidade dos embriões, havendo interferência das condições de cultivo, dos meios usados durante todas as fases da PIV, da avaliação subjetiva e seleção dos embriões para a transferência, além do estado reprodutivo e nutricional das receptoras. Os índices de gestação aos 60 dias têm variado, em geral, entre 20 e 60%, de acordo com o sistema de produção *in vitro* usado pelos diferentes laboratórios.
Outro fator que tem limitado o uso da PIV é a distância entre o laboratório e local onde estão alojadas as receptoras, uma vez que, na grande maioria dos casos, realiza-se a transferência a fresco. Parece haver uma relação direta entre distância e tempo para a inovulação com relação à viabilidade dos embriões. Estes problemas de disponibilidade de grande número de receptoras e de distância poderiam ser amenizados caso os resultados de gestação a partir de embriões PIV congelados fossem melhores. A reduzida criotolerância dos embriões, dada pelo acúmulo de lipídeos, pode estar relacionada à presença do soro no meio de cultivo. A vitrificação poderia ser um método alternativo para diminuir as crioinjúrias provocadas sobre o embrião (VAJTA et al., 1998), entretanto, esta técnica ainda não tem sido adotada na prática comercial.
Uma vez estabelecida a gestação, as perdas durante o primeiro trimestre podem chegar a 10-12% (GALLI et al., 2001). Todavia, os maiores problemas parecem estar ligados ao momento do parto. Existem vários relatos descritos na literatura de prolongamento da gestação, distocia, aumento de mortalidade pré-natal e de peso corpóreo. Todas estas alterações fazem parte da "Síndrome da Cria Gigante" (LOS – *"Large Offspring Syndrome"*, revisão de YOUNG e al., 1998). Existem evidências de que a maioria destes casos está associados ao co-cultivo com células da granulosa ou sobre monocamadas de células BRL. Além disso, parece que altas concentrações de soro contribuem para o aumento da incidência destes distúrbios. Em programas comerciais, em condições mais controladas de desenvolvimento, utilizando-se tanto o cultivo *in vitro* como em oviduto de ovelhas, sem o uso de altas concentrações de soro ou BSA, existem relatos de que até 95% das gestações foram normais e de que a incidência da LOS foi reduzida (GALLI et al., 2001; NUMABE et al., 2000, VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000; SANGILD et al., 2000).

ESTADO DA ARTE

Qualquer processo de produção, por mais simples que seja, como a confecção de um bolo em uma confeitaria, segue uma conduta determinada, que requer a escolha dos ingredientes de melhor procedência, o modo de preparação da massa, o toque de tempero pessoal, a temperatura do forno e o momento exato de assado, que são habilidades particulares de cada mestre. Por outro lado, para ser um artesão é necessário possuir a capacidade de criar, inovar ou repetir tarefas com muita precisão. Desta mesma forma, os procedimentos para a produção *in vitro* de embriões bovinos já são bem definidos. Os meios de cultivo e os métodos empregados são muito similares entre os laboratórios, entretanto, os percentuais de produção de embriões, a qualidade dos mesmos e a capacidade em produzir gestação são variáveis de laboratório para laboratório e até mesmo entre indivíduos dentro de um mesmo laboratório. A capacitação em produzir embriões *in vitro* está ao alcance de todos que estão aptos para os trabalhos no laboratório. No entanto, as diferenças na sensibilidade de cada indivíduo, a dedicação e o amor à arte em fazer embriões *in vitro* são fundamentais para a constância e o sucesso de um laboratório.

Atualmente temos no país várias empresas que trabalham comercialmente com a PIV. Os resultados têm-se mostrado razoáveis, embora haja variação entre os laboratórios em decorrência de diferenças existentes em relação aos sistemas adotados de produção de embriões. Além disso, estas oscilações nas taxas de sucesso estão ligadas ao uso da PIV em situações distintas, aplicadas em diferentes categorias animais (bezerras, novilhas, vacas), idades (pré-púberes, pós-puerpério, vacas senis), raças, estado reprodutivo (ciclicidade normal, gestantes, pós-parto), freqüência de aspiração (mensal, semanal, duas vezes ao mês) e administração de hormônios (FSH, BST).

A viabilidade econômica da técnica está intimamente relacionada à eficiência dos laboratórios, não apenas com relação à produção do maior número de embriões possível, mas, principalmente, com a qualidade do embrião em capacidade de estabelecimento de gestação, desenvolvimento fetal e placentário normais, obtenção de gestações a termo e nascimento de proles saudáveis e viáveis. Embora os custos da FIV ainda sejam superiores ao da TE, justifica-se seu emprego nos casos descritos anteriormente, como em fêmeas com distúrbios reprodutivos adquiridos que inviabilizam a reprodução e a produção de descendentes, condenando o animal a uma condição de infertilidade que, anteriormente ao surgimento da PIV, seria irreversível e sem solução. A PIV ainda permite o aumento do potencial de exploração zootécnico do animal em um menor período de tempo, uma vez que sessões de aspiração folicular podem ser realizadas a intervalos regulares de 15 dias sem prejuízo à vida reprodutiva da doadora. Realizada nesta periodicidade, ou mesmo mensalmente, com índices de produção de embriões acima de 40%, seu rendimento pode superar àquele alcançado com a TE, e a relação custo/benefício pode tornar-se justificável. Entretanto, ressalta-se que o objetivo da PIV não é substituir a técnica de TE, sendo indicado seu uso em casos de infertilidade, em animais que não respondem mais à superovulação ou nos quais não seja mais possível a recuperação de estruturas viáveis no momento da colheita dos embriões.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção *in vitro* de embriões, aliada à aspiração folicular guiada por ultra-sonografia, permitiu aumentar o potencial de fêmeas de alto valor genético, bem como de animais portadores de infertilidade adquirida que estavam condenados ao abate por incapacidade de produzir descendentes. A perspectiva de aplicação em diversas outras situações, assim como a dependência que outras biotécnicas possuem ao uso dos sistemas de cultivo *in vitro*, como é o caso da clonagem, tem incentivado a realização de novas pesquisas envolvendo o aprimoramento da técnica e a compreensão dos mecanismos biológicos que ocorrem durante este período de pré-implantação, como metabolismo embrionário e expressão de genes importantes para as subseqüentes fases do desenvolvimento. A otimização da técnica, envolvendo a produção de embriões de boa qualidade e em número cada vez mais expressivo, associada à diminuição de alguns problemas que têm limitado seu uso em escala comercial, certamente contribuirá para o decréscimo do custo operacional da PIV, que ainda é alto em decorrência dos materiais e equipamentos utilizados, o que possibilitará a difusão desta tecnologia visando ao aumento da produtividade da pecuária nacional.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro que a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) tem dado às suas pesquisas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVELINO, K.B. *Efeitos de fontes energéticas, antioxidantes e atmosfera gasosa, em meio quimicamente semi-definido no desenvolvimento de embriões bovinos de duas células até blastocisto expandido.* Jaboticabal: FCAV-UNESP, 2000. 70p. Dissertação (Mestrado).

AVELINO, K.B., VANTINI, E., SENEDA, M.M., et al., *In vitro* production of embryos of cows with acquired infertility. *Theriogenology*, v.57, p.656, 2002.

BAVISTER, B.D. Interactions between embryos and the culture milieu. *Theriogenology*, v.53, p.619-626, 2000.

BRACKETT, R.G., BOUSQUET, D., BOICE, M.L., DONAWICK, W.J., EVANS, J.F., DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*. V.27, p. 147-158, 1982.

CARNEGIE, J.A., DURNFORD, R., ALGIRE, J., et al., Evaluation of mitomycin-treated vero cells as a co-culture system for IVM-IVF derived bovine embryos. *Theriogenology*, v.48, p.377-389, 1997.

EYESTONE, W.H., FIRST, N.L. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. *J. Reprod. Fert.*, v.85, p.715-720, 1989.

GALLI, C., CROTTI, G., NOTARI, C., et al., Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, v.55, p. 1341-1357, 2001.

GALLI, C., DUCHI, R., CROTII, G., et al., Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, v.59, p.599-616, 2003.

GARDNER, D.K. Changes in requirements and utilization of nutrients during mammalian preimplantation embryo development and their significance in embryo culture. *Theriogenology*, v.49, p.83-102, 1998.

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

HOLM, P., CALLESEN, H. *In vivo* versus *in vitro* produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.38, p.579-594, 1998.

HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. *Theriogenology*, v.59, p.675-685, 2003.

IRITANI, A., NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertiization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. of Reprod. Fertility*. V. 50, p. 119-121, 1977.

LU, K.H., GORDON, I., GALLAGHER, M., McGOVERN, H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived *In vitro* fertilization of follicular oocytes matured *in vitro*. *Veterinary record*. V. 121, p. 159-260, 1987.

MARQUANT-LEGUIENNE, B., HUMBLOT, P. Practical measures to improve *in vitro* blastocyst production in the bovine. *Theriogenology*, v.49, p.3-11, 1998.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturations systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology*, v.55, p.1291-1301, 2001.

NUMABE, T., OIKAWA, T., KIKUCHI, T., et al., Birth-weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of in vitro or in vivo produced bovine embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, v.64, p.13-20, 2000.

PIETERSE, M.C., KAPPEN, K.A., KRUIP, Th. A.M., TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*. V. 30, p. 751-762, 1988.

RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. Fecundação *in vitro* em bovinos: aplicação comercial. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.28, p.186-187, 2000 (Supl.)

SANGILD, P.T., SCHMIDT, M., JACOBSEN, H., et al., Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos. *Biol. Reprod.*, v.62, p.1495-1504, 2000.

SENEDA, M.M. *Aspectos técnicos e biológicos da obtenção in vivo de oócitos bovinos.* Jaboticabal: FCAV-UNESP, 2001. 76p. Tese (Doutorado).

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

YOUNG, L.E., SINCLAIR, K.D., WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.*, v.3, p.155-163, 1998.

VAJTA, G., KUGAYAMA, M., HOLM, P., et al., A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos: the OPS vitrification. *Mol. Reprod. Dev.*, v.51, p.53-58, 1998.

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

OVUM PICK UP EM BOVINOS: CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS

Marcelo Marcondes Seneda e Wanessa Blaschi
Departamento de Clínicas Veterinárias
Centro de Ciências Agrárias – UEL
Londrina, PR, 86051-990 (mseneda@uel.br)

RESUMO

A indústria da tecnologia de embriões sofreu uma importante mudança nos últimos anos, com o advento da produção in vitro de embriões (PIV). A técnica é utilizada em vários países, mas é no Brasil que se verifica um número surpreendente de embriões gerados a partir deste método. Dentre os principais aspectos relacionados a esta expressiva disseminação da técnica, pode-se apontar o domínio da PIV por laboratórios privados e a crescente valorização da raça Nelore. Vacas Nelore apresentam um melhor rendimento na produção de embriões com a PIV em relação à TE, de forma que muitos criadores têm feito opção pela PIV, buscando mais rapidez na produção de descendentes de vacas de linhagens superiores. A primeira etapa da PIV é a obtenção in vivo dos oócitos, através da técnica de aspiração folicular transvaginal, ou OPU (ovum pick up). A OPU tem sido estudada por diversos grupos e importantes melhorias foram implementadas, objetivando aumentar a eficiência e reduzir o investimento inicial para realização da técnica. Modificações no aparato de aspiração, adaptações de equipamentos de vácuo, utilização de gonadotrofinas e controle da dinâmica folicular são exemplos de mudanças observadas tanto na área acadêmica como na iniciativa privada. O presente artigo trata dos aspectos técnicos de maior interesse no procedimento de obtenção in vivo dos oócitos na espécie bovina.

INTRODUÇÃO

Embora a TE continue sendo amplamente utilizada, o aproveitamento dos oócitos bovinos ganhou novo impulso em 1982, quando Brackett et al. [1] relataram o nascimento do primeiro bezerro obtido pela produção *in vitro* (PIV) de embriões. A PIV de embriões, tem sido utilizada desde então com perspectivas promissoras, tendo viabilizado nascimento de expressivo número de produtos desde 1996 [2]. Se a aspiração folicular apresentou-se viável para fêmeas com limitações reprodutivas, sua aplicação mostrou-se mais ampla quando utilizada em fêmeas saudáveis, produzindo, no mínimo, quatro vezes mais embriões em relação à TE [3], embora com maior custo por embrião [4]. Para reduzir os custos pertinentes aos procedimentos *in vitro*, diversos trabalhos foram descritos com o intuito de incrementar a técnica. Segundo Bols [5] os principais fatores a serem analisados reúnem-se nos aspectos biológicos e os de ordem técnica, abordados a seguir.

VARIÁVEIS TÉCNICAS

As variáveis técnicas constituem o método de obtenção dos oócitos e este possui considerável impacto sobre a quantidade e a morfologia dos complexos *cumulus oophorus*, e conseqüentemente sobre a competência para o desenvolvimento [6].

Agulhas para aspiração folicular

Inicialmente, a aspiração era realizada apenas com agulhas longas (55 cm), produzidas especificamente para aspiração folicular [7]. Posteriormente, propôs-se a substituição por agulhas hipodérmicas descartáveis, pois as agulhas descritas inicialmente apresentavam custo elevado e perdiam o gume rapidamente, prejudicando a recuperação dos oócitos [8]. Em relação às agulhas longas, devido ao preço, é comum observar-se que uma mesma agulha seja utilizada para vários animais. Com a perda do gume, o bisel apresenta menor capacidade de penetrar o ovário, obrigando o operador a utilizar mais força durante a punção. Nesta situação, há dois aspectos desfavoráveis. O primeiro e mais grave é a possibilidade de danos ao estroma ovariano, especialmente naqueles animais submetidos repetidas vezes à técnica. O segundo aspecto refere-se à pior recuperação de oócitos. À medida que a agulha vai se tornando romba, aumentam as possibilidades de ocorrer uma ruptura abrupta do folículo almejado, ao invés de uma perfuração rápida e precisa. Esta ruptura abrupta poderia dificultar a captação do oócito do interior do folículo, reduzindo a eficiência da técnica.

Considerando estes aspectos críticos da agulha longa, Bols et al. [6] demonstraram a viabilidade da utilização de agulhas hipodérmicas descartáveis de 18 e 19 Gauge (G) e 50 mm de comprimento. As agulhas com diâmetros maiores de 18 G relacionaram-se a maiores taxas de recuperação embora com maior percentual de oócitos desnudos, além de maiores danos ao estroma e maior quantidade de sangue no líquido aspirado. Já as agulhas de diâmetro menor que 19 G apresentam índices reduzidos de recuperação de oócitos, possivelmente pela lentidão da aspiração do líquido folicular, no momento da punção.

Uma vez verificada a possibilidade de utilização de agulhas hipodérmicas, buscou-se avaliar a relação entre o comprimento do bisel da agulha e a taxa de recuperação de oócitos [6]. Estes autores acreditavam que o bisel curto seria mais eficiente, pela maior facilidade de ser introduzido rapidamente no interior do folículo. Contrariando as expectativas, os autores relataram melhor recuperação e qualidade de oócitos quando agulhas de bisel longo foram utilizadas. A provável justificativa seria o gume mais afiado do bisel longo, permitindo uma penetração rápida e precisa no interior do folículo, dificultado o extravasamento do conteúdo folicular. A melhor eficiência das agulhas de bisel longo constituiu aspecto bastante favorável, já que estas são mais baratas e facilmente adquiridas, quando em comparação com as de bisel curto.

Em relação ao comprimento, as agulhas hipodérmicas de 50 mm possuem restrita distribuição no mercado, mas são perfeitamente substituíveis pelas de 40 mm. Portanto, em relação às agulhas hipodérmicas descartáveis, as opções mais viáveis no mercado nacional seriam as agulhas 40mmx9 e 40mmx10. Considerando seu preço irrisório, torna-se perfeitamente possível utilizar uma agulha por vaca, ou mesmo uma por ovário, naqueles animais que apresentarem maior número de folículos para aspiração. Desta forma, o procedimento de recuperação dos oócitos pode ser realizado com mínimos danos ao estroma ovariano.

Geração de vácuo para obtenção dos oócitos

Estreitamente relacionado com a agulha utilizada encontra-se a pressão de vácuo [9]. Estes autores relacionaram que baixas pressões, como 50 mm Hg, foram pouco eficientes para a aspiração, enquanto que pressões maiores como 120 mm Hg danificavam o revestimento do *cumulus oophorus*. Há uma grande variação entre os trabalhos, com valores de 40 a 400 mm Hg [10], embora isto deva ser considerado com reservas, já que todo o sistema (comprimento e diâmetro de conexões, altura do equipamento de vácuo, diâmetro da agulha) pode influenciar na pressão de vácuo final.

Para quantificar a pressão negativa de forma mais real, sugere-se mensurar o vácuo em volume de fluido por minuto. Mesmo assim, há variações consideráveis, de 4,4 a 40 ml de água/minuto [7,11-13]. O intervalo entre 10 a 20 ml de fluido por minuto tem sido o mais utilizado atualmente, sendo pertinente que a aferição seja readequada a cada procedimento. As bombas de vácuo descritas inicialmente – Handle Cook – foram especialmente designadas para a obtenção de oócitos em vacas [7]. Tais equipamentos possuem grande estabilidade na pressão de vácuo, permitindo considerável eficiência na recuperação dos oócitos. Um aspecto desfavorável é seu custo elevado, fator que motivou a busca de bombas de vácuo alternativas. Verifica-se atualmente a utilização alternativa de bombas de aspiração odontológicas, de fluidos endotraqueais, além de bombas de infusão controlada. Todos estes equipamentos prestam-se à geração de vácuo, embora as variações na capacidade de gerar pressão negativa possam comprometer a quantidade e qualidade dos oócitos.

Transdutor ultra-sonográfico

A freqüência do transdutor constitui-se em variável importante no processo de recuperação dos oócitos [14]. Há citações de freqüências de 3.5 MHz [15], 7.5 MHz [16], 5.0 MHz [17] e 6.5 MHz [12]. A maioria dos autores cita a utilização de transdutores convexos ou setoriais para a aspiração folicular transvaginal [10,18-21], com poucos relatos de transdutores lineares [14,22]. No entanto, o transdutor linear é bastante difundido na área de reprodução em grandes animais [23-27] e a sua utilização para a aspiração folicular transvaginal foi demonstrada com sucesso [28]. O principal aspecto desfavorável da aspiração com o transdutor linear refere-se ao espaço limitado entre o transdutor e a agulha. A restrição de espaço impede que todas as regiões do ovário sejam puncionadas, mesmo modificando-se o posicionamento da gônada. É evidente que os transdutores do tipo convexo propiciam um procedimento mais rápido e facilitado. No entanto, a versatilidade do transdutor linear deve sempre ser considerada quando a utilização do ultra-som não for exclusiva para OPU. Neste caso, é possível a obtenção de resultados satisfatórios sem a necessidade de aquisição de outro transdutor.

VARIÁVEIS BIOLÓGICAS

Os aspectos biológicos da aspiração folicular possuem dados contraditórios, que podem ser considerados pela complexidade da questão, pois resultados de aspiração apresentados na literatura possuem aspectos de comparação difícil, como diferentes raças, equipamentos, habilidade do operador, estado corporal dos animais, etc.. Todo trabalho deve ser analisado com a natural ressalva em razão das particularidades de cada procedimento.

Variações individuais entre doadoras

A condição fisiológica da doadora, considerando-se peso, raça, idade e a própria variação individual, tem merecido atenção em diversos artigos. Katska & Smorag [29], trabalhando com ovários de matadouro, não encontraram diferenças na qualidade dos oócitos entre animais jovens (a partir de 18 meses) e senis (até 17 anos), embora tenham notado redução na produção de gametas nos animais mais velhos. Relatos de oócitos de qualidade inferior em animais senis são freqüentes. Looney et al. [18] relataram a possibilidade de aspiração folicular nos animais bastante jovens, e Brogliatti & Adams [30] obtiveram oócitos de bezerras com apenas 6 semanas de idade com a utilização de um transdutor adequado. No entanto, os animais pré-púberes têm

mostrado reduzida competência de seus oócitos para chegar até blastocisto [31], embora Armstrong et al. [32] tenham conseguido resultados animadores com bezerras de apenas três semanas de idade através do estímulo gonadotrófico. Parece haver um consenso quanto à condição corporal, em que animais subnutridos seriam doadores de oócitos com menor capacidade para desenvolverem-se até blastocisto [33], e há indícios de que animais submetidos à situações de estresse também seriam doadores de oócitos menos competentes [34].

Em relação à variação individual, o aspecto mais interessante refere-se à raça. Animais da raça Nelore, ou vacas zebuínas em geral apresentam normalmente um maior número de folículos recrutados por onda, em comparação com vacas de raças européias [35-36]. Esta particularidade viabilizou um crescimento bastante rápido da PIV no Brasil, uma vez que a disseminação da PIV e a maior valorização da raça Nelore ocorreram de forma simultânea. Embora a TE continue sendo largamente utilizada em animais da raça Nelore, a PIV viabiliza maior número de embriões em um mesmo período de tempo (Nonato Jr. & Seneda, dados não publicados).

Atualmente, a aspiração folicular tem sido realizada em momentos aleatórios do ciclo estral. Os resultados de campo têm mostrado que a qualidade dos oócitos não se altera com função da fase do ciclo estral. No entanto, o número de folículos disponíveis para a aspiração apresenta considerável variação, sendo o início de onda o momento mais favorável para a recuperação, pelo maior número de folículos e pela melhor eficiência de captação dos oócitos, de acordo com Seneda et al. [37].

Utilização de gonadotrofinas e taxa de recuperação de oócitos

A competência do oócito obtido pela aspiração folicular transvaginal parece não ser influenciada pelo tamanho do folículo, mas o mesmo não ocorre em relação à taxa de recuperação. Este parâmetro consiste no número de oócitos recuperados após punção de 100 folículos [7] e já foi demonstrado que folículos menores viabilizam recuperação oocitária mais eficiente [37]. A taxa de recuperação pode ser influenciada pelas terapias gonadotróficas [19,38]. Pieterse et al. [38] realizaram a aspiração folicular três dias após estímulo gonadotrófico com PMSG e relataram aumento do número e tamanho de folículos, e pior taxa de recuperação de oócitos. Pieterse et al. [39] e Goodhand et al. [40] relataram melhor recuperação quando predominavam folículos pequenos no ovário e menos oócitos por sessão quando havia predomínio de folículos maiores que 6 mm. Resultados análogos foram descritos por Seneda et al. [37], ao compararem folículos < 4 mm e > 4 mm. A relação inversa entre maior diâmetro folicular e taxa de recuperação de oócitos por sessão tem sido justificada de diversas formas, como alterações morfológicas no complexo *cumulus oophorus* [20], viscosidade do fluido folicular [40] e quantidade de material a ser aspirado e pressão intrafolicular [41]. Apesar dos folículos maiores que 5 mm serem aspirados mais facilmente [5], a aspiração de folículos pequenos mostrou-se mais eficiente quanto à captação dos oócitos [37]. Assim, a estratégia mais eficiente para associar utilização de FSH e presença de folículos pequenos é controlar o período de crescimento folicular, conforme relatado por Seneda et al. [36]. Apesar de relatos da utilização de FSH em animais zebuínos [42], é importante ressaltar que a aplicação de gonadotrofinas tem acontecido principalmente em vacas de raças européias. Os animais Bos indicus apresentam naturalmente maior número de folículos por onda, e talvez por este motivo o FSH tenha tido um impacto menor no crescimento folicular e conseqüente disponibilização de oócitos para a produção de embriões (Nonato Jr & Seneda, dados não publicados)

PERSPECTIVAS

Contrariando certo ceticismo inicial, a PIV atualmente é uma biotécnica consolidada, com expressivo número de animais nascidos por este procedimento, particularmente no Brasil. Embora os procedimentos de maturação e desenvolvimento in vitro ainda apresentem aspectos críticos a serem superados, a obtenção dos oócitos apresenta-se razoavelmente bem estabelecida. Os principais desafios para maior disseminação da aspiração folicular são o alto custo dos equipamentos e a dedicação necessária ao treinamento da técnica. Maior padronização na recuperação dos oócitos será obtida com a aplicação de protocolos de sincronização do estro, visando a realização da aspiração em momentos mais propícios. Finalizando, consideramos a permuta de informações acadêmicas e aplicadas como sendo etapa essencial para superação dos atuais entraves e a conquista de melhores resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] BRACKETT, B.G., BOUSQUET, D., BOICE, M.L., DONAWICK, W.J., EVANS, J.F., DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**., v. 101, p. 147-158, 1982.

[2] GALLI, C., LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 371-379, 1996.

[3] KRUIP, T.A.M., BONI, R., WURTH, Y.A., ROELOFSEN, M.W.M., PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v. 42, p. 675-684, 1994.

[4] RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. Fecundação in vitro: aplicação comercial. **Arquivos da Faculdade de Veterinária** UFRGS, v.28, n.1,p. 186-187, 2000

[5] BOLS, P.E.J. **Transvaginal ovum pick-up in the cow: technical and biological modifications**. 1997. 227p. Thesis (PhD). Faculty of Veterinary Medicine, University of Ghent, Belgium, 1997(a)

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

[7] PIETERSE, M. C., KAPPEN K. A., KRUIP, Th.A.M., TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, n. 04, p. 751-762, 1988.

[8] BOLS, P. E. J., VANDENHEEDE, J.M.M., VAN SOOM, A., KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: new disposable needle guindance system. **Theriogenology**, v. 43, p. 677-687, 1995.

[9] BOLS, P.E.J., VAN SOON, A., VANROOSE, G., KRUIF, A. Transvaginal oocyte pick-up in infertile Belgium Blue donor cows: preliminary results. **Theriogenology**, v. 45, p. 359, 1996a. (Abstract)

[10] BOLS, P. E. J., VAN SOOM, A., YSEBAERT, M.T., VANDENHEEDE, J.M.M., KRUIF, A. Effects of aspiration vacum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 1001-1014, 1996.

[11] VOS, P.L.A.M., de LOS, F.A.M., PIETERSE, M.C., BEVERS, M.M., TAVERNE, M.A.M., DIELEMAN, S.J., Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG treated cows. **Theriogenology**, v. 41, p. 829-840, 1994.

[12] BUNGARTZ, L., LUCAS-HAHN, A., RATH, D., NIEMANN, H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. **Theriogenology**, v. 43, p. 667-675, 1995.

[13] RICK, G., HADELER, K.G., LEMME, E., LUCAS-HAHN, A., RATH, D., SCHINDLER, L., NIEMANN, H. Long-term ultrasound guided ovum pick-up in heifers from 6 to 15 months of age. **Theriogenology**, v. 45, p. 356, 1996. (Abstract).

[14] HASHIMOTO, S., TAKAKURA, R., KISHI, M., SUDO, T., MINAMI, N., YAMADA, M. Ultrasound-guided follicle aspiration: effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 52, p. 131-138, 1999.

[15] CALLESEN, H., GREVE, T., CHRISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v. 27, p. 217, 1987. (Abstract).

[16] VAN DER SCHANS, A. VAN DER WESTERLAKEN, L.A.J., DE WIT, A.A.C., EYESTONE, W.M., DE BOER, H.A. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. **Theriogenology**, n. 35, p. 288, 1991. (Abstract).

[17] HASLER, J. F., HENDERSON, W.B., HURTGEN, P.J., JIN, Z.Q., McCAULEY, A.D., MOWER, S.A., NEELY, B., SHUEY, L.S., STOKES, J.E., TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v.43, p. 141-152, 1995.

[18] LOONEY, C. R., LINDSEY, B.R., GONSETH, C.L., JOHNSON, D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v. 41, p. 67-72, 1994.

[19] MEINTJES, M., BELLOW, M.S., BROUSSARD, J.R., PAUL, J.B., GODKE, R.A. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef for in vitro fertilization. **Journal of. Animal. Science**., v. 73, p. 967-974, 1995.

[20] BOLS, P.E.J., YSEBAERT, M.T., LEIN, A., CORYN, M., VAN SOOM, A., KRUIF, A., Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF program. **Theriogenology**, v. 49, p. 983-995, 1998.

[21] CARLIN, S.K., GARST, A.S., TARRAF, C.G., BAILEY, T.L., McGILLIARD, M.L., GIBBONS, J.R., AHMADZADEH, A., GWAZDAUSKAS, F.C. Effects of ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on oocyte recovery and hormonal profiles before and after GnRH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 1489-1503, 1999.

[22] MATTHEWS, L.; PETERSEN, H.; VAN BEEK, K. Use of linear ultrasound transducer for commercial application of transvaginal oocyte recovery. **Theriogenology**, v. 43, p. 275, 1995. (Abstract).

[23] SIANANGAMA, P.C. & RAJAMAHENDRAN R. Effect of hCG administration on day 7 of the estrous cycle on follicular dynamics and cycle length in cows. **Theriogenology** v.45, n.3, p. 583-592, 1996.

[24] BARUSELLI, P.S. , MUCCIOLO, R.G. , VISINTIN, J.A. , VIANA, W.G. , ARRUDA, R.P. , MADUREIRA, E.H., OLIVEIRA, C.A., MORELO-FILHO, J.R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (Bubalus bubalis). **Theriogenology** v.47, n.8, p. 1531-1547, 1997.

[25] FIGUEIREDO, R.A. BARROS, C.M., PINHEIRO, O. L. SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (Bos indicus) cattle. **Theriogenology** v.47, n.8, p.1489-1505, 1997.

[26] LEYVA, V. BUCKRELL, B.C.; WALTON, J.S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. **Theriogenology** v.50, n.3, p. 395-416, 1998.

[27] DICKIE, M. C. PATERSON, ANDERSON, J. L. M.; BOYD, J. S. Determination of corpora lutea numbers in Booroola - Texel ewes using transrectal ultrasound. **Theriogenology** v.51, p. 1209-1224, 1999.

[28] SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; ANDRADE, E. R.; BINELLI, M.; OLIVEIRA, J. A.; NASCIMENTO, A. B. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology** v.59, p. 1435-1440, 2003.

[29] KATSKA L, SMORAG, Z., Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p. 451-460, 1984.

[30] BROGLIATTI, G. M., ADAMS, G. P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepurbetal calves. **Theriogenology**, v.45, p. 1163-1176, 1996.

[31] REVEL, F.L., MERMILLOD, P., PEYNOT, N., RENARD, J.P., HEYMAN, Y. Low developmental capacity of in vitro matures and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **Journal of Reproduction and Fertility**., v.103, p. 115-120, 1995

[32] ARMSTRONG, D. T., IRVINE, B.J., EARL, C.R., McLEAN, D., SEAMARK, R.F. Gonadotropins stimulations regimens for follicular aspiration and in vitro embryo productions from calf oocytes. **Theriogenology**, v. 42, p. 1227-1236, 1994.

[33] LOPEZ RUIZ, L., ALVAREZ, N., NUNEZ, I., MONTES, I., SOLANO, R., FUENTES, D., PEDROSO, R., PALMA, G.A., BREM, G. Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 292, 1996. (Abstract).

[34] SENEDA, M.M., ESPER C.R., GARCIA, J.M. VANTINI, R. Effect of follicle size on recovery, quality, and developmental competence of oocytes obtained in vitro. **Abstracts of 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm,** Sweden v.01, p.62-62, 2000a

[35] DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arquivos da Faculdade de Veterinária** UFRGS. V. 28, n. 1, p. 181-185, 2000.

[36] SENEDA, M.M.; ESPER; C.R., ANDRADE; E.R., GARCIA; J.M., OLIVEIRA; J.A. Shorter interval between fsh adminIstration and follicle aspiration increases efficiency of oocyte recovery, **Theriogenology**, v. 57, p. 684, 2002. (Abstract).

[37] SENEDA, M.M.; ESPER, C.R., GARCIA, J.M., VANTINI, R.; OLIVEIRA, J.A. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37-43, 2001.

[38] PIETERSE, M.C., VOS, P.L.A.M., KRUIP, T.A.M., WURTH, Y.A., VAN BENEDEN, T.H., WILLEMSE, A.H., TAVERNE, M.A.M. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG-treated cows. **Theriogenology**, v. 37, p. 273, 1992. (Abstract).

[39] PIETERSE, M. C., VOS, P.L.A.M., KRUIP, T.A.M., WURTH, Y.A., VAN BENEDEN, T.H., WILLEMSE, A.H., TAVERNE, M.A.M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, n. 01, p. 19-24, 1991.

[40] GOODHAND, K.L., WATT, R.G., STAINES, M.E., HUTCHINSON, J.S.M., BROADBENT, P.J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following fsh treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951-961, 1999.

[41] SENEDA, M.M. **Aspiração folicular transvaginal guiada pela ultra-sonografia. Efeito do diâmetro do folículo sobre a recuperação, qualidade e competência do oócito para o desenvolvimento in vitro**.1999. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 1999, 57 p.

[42] NONATO JUNIOR, I.; PONTES, J. H. F.; ERENO JUNIOR, J. C.; BLASCHI, W.; UVO, S.; OLIVEIRA, J. A.; SENEDA, M.M. FSH prior follicle aspiration: comparison beteween two gonadotropins to *in vitro* embryo production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 513, 2003. (Abstract).

IMPACT OF NEOSPOROSIS ON BOVINE REPRODUCTION

Aurélie Andrianarivo, Mark Anderson and Patricia A. Conrad
Department of Pathology, Microbiology and Immunology,
School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95616

INTRODUCTION

Bovine neosporosis is caused by *Neospora caninum* [31], an apicomplexan protozoal parasite closely related to *Toxoplasma gondii*. The parasite was first identified in dogs with encephalomyelitis and myositis [18, 19, 31] and was first associated with an abortion storm in 1987 on a dairy in New Mexico [60]. Since then, bovine neosporosis has emerged as an important worldwide cause of reproductive disease affecting both dairy and beef cattle [4, 32, 33, 34]. Bovine neosporosis has been diagnosed in many countries from six continents. Neosporosis is a major cause of bovine abortion in New Zealand, the Netherlands, the United Kingdom and California in the USA, resulting in significant economic losses. In addition to cattle, natural *N. caninum* infection has been reported in dogs, goats, sheep, horses and deer [4, 32, 33, 34].

NEOSPORA CANINUM: LIFE CYCLE AND MODES OF TRANSMISSION

Like other apicomplexan coccidia, the life cycle of *N. caninum* requires two hosts: an intermediate host and a definitive host. The asexual cycle involves the tachyzoite and the bradyzoite stages of the parasite and occurs in a wide range of intermediate hosts, including cattle, dogs, goats, sheep, horses and deer. The sexual cycle occurs in the definitive host and leads to the production of oocysts. Dogs (*Canis familiaris*) and coyotes (*Canis latrans*) were induced to excrete oocysts in their feces after being fed *N. caninum*-infected murine and/or bovine tissues; they are therefore definitive hosts of *N. caninum* [27, 36, 37, 45, 47]. To date, there are three reported cases of dog naturally excreting oocysts of *N. caninum* [15, 48, 59]. One study reports that dogs fed *N. caninum*-infected bo*vine* fetuses failed to shed oocysts [17].
Cattle may acquire *N. caninum* infection, either by horizontal (postnatal) or vertical (prenatal) transmission. Horizontal infection occurs through ingestion of feed or water contaminated with oocysts shed in the feces of the definitive canine host [26, 36, 67]. Vertical infection involves transplacental transmission of tachyzoites from an infected dam to its fetus during pregnancy [3, 4, 25, 56]. When oocysts are ingested by cattle, sporozoites are released in the gut and become tachyzoites. The rapidly dividing tachyzoites spread through the body, and invade the cells of a variety of organs resulting in tissue damage. The tachyzoite stage is associated with inflammation and necrosis at the site of invasion. In pregnant cattle, tachyzoites can invade the fetus via the placenta. With the onset of the bovine host immune response, tachyzoites revert to the slowly-dividing bradyzoites within tissue cysts. Tissue cysts are surrounded by a thick cyst wall and are mostly found in neural tissues (brain, spinal cord). Tissue cysts elicit minimal inflammatory reaction and can persist in cattle for long periods of time without clinical manifestations. It is assumed that during pregnancy, the bradyzoites in these latent cysts become activated and differentiate into the motile, infective tachyzoite stages which travel via the blood and/or tissues to the placenta and fetus. As a result of this “reactivation” of the parasites, repeat fetal infections can occur in the same persistently infected dam in multiple pregnancies. While some fetal infections lead to

abortion, most result in the birth of live but congenitally infected calves. Congenitally infected heifers can in turn transmit the infection to their future progeny. This cycle of vertical transmission is a major factor in maintaining *N. caninum* infection in cattle herds [3, 20, 25, 51, 56].

Vertical transmission appears to be the predominant route of infection in Europe and the USA with an efficiency rate between 80 and 95% [3, 20, 25, 51, 56, 65, 70], while lower rates (23.5-60%) are found in New Zealand [54, 57]. In endemic herds, the majority of calves born to naturally infected cows have serologic evidence of congenital infection. In addition, the rate of seropositivity in the herd is not associated with the age of the cow, suggesting that the rate of postnatal infection is low. Moreover, the congenitally infected calves have a chronic persistent infection which can be passed on transplacentally to their offspring.

While vertical transmission appears to be the major way that cattle become infected with *N. caninum* in endemic herds, there is serologic evidence that cows that have aborted during an epidemic probably acquired the infection after birth based on the lack of association between the seropositivity of dams and daughters [65]. In addition, the pattern of abortion outbreaks in epidemic neosporosis is suggestive of a point source exposure with acquired infection [14, 30, 32, 46, 61]. Another study reports a high rate of seroconversion for *N. caninum* in a dutch dairy herd, involving 47% of seronegative animals within a period of 6 months [28]. In this herd, a low avidity antibody (indicating a recent infection) and a lack of association between the serological status of daughters and mothers are consistent with a point source exposure. Interestingly, the high rate of seroconversion was not associated with an increase in abortions, indicating that mass seroconversion in dairy herds may go unnoticed [28]. In endemically infected herds which have been sampled more extensively, there is serologic evidence that a low level of postnatal infection from unknown sources, apparently does occur [16, 25, 39, 52, 56, 66]. This is consistent with results from mathematical modeling studies which suggest that *N. caninum* infection would disappear from cattle herds over time if vertical transmission was the only route of infection [35].

There is epidemiological evidence which suggests that dogs play a role in the transmission of neosporosis. Several studies report an association between the herd seroprevalence of *N. caninum* infection and the presence and number of dogs at the herd [29, 49, 53, 55, 71]. A spatial analysis study in Texas beef cattle herds reveals that seropositivity for *N. caninum* was associated with cattle density and abundance of coyotes and/or grey foxes (*Urocyon cinereoargenteus*), suggesting a possible sylvatic transmission cycle of the infection [8].

CLINICAL PRESENTATION

There are no signs of clinical illness in cows that abort due to *N. caninum* infection. The aborted fetuses are usually autolyzed with no gross lesions and placentas are not retained. Abortions have been diagnosed from three months of gestation to term, but the majority of *N. caninum* abortions occur in the second trimester of pregnancy. This pattern of mid-gestation abortion is distinctive from other diagnosed causes of infectious abortion in dairy cattle which tend to occur later in gestation. Whether *N. caninum* infection can cause reproductive problems in the first trimester of gestation is unknown. Fetal mummification has been associated with *N. caninum* outbreaks. *N. caninum* abortions occur throughout the year and have been reported in both dairy and beef cattle.

Cattle with serologic evidence of infection have an increased risk of abortion [50, 52, 63, 68, 70]. In a California study, seropositive congenitally infected cows had a 7.4 increased risk of abortion in their first pregnancy. The risk in the second pregnancy was considerably lower, though this may have been influenced to some degree by selective culling of aborting cows from the first pregnancy [63]. In the Netherlands, a 3-fold increase in abortion risk was associated with seropositive cows, when compared to seronegative herdmates [70]. A case-control study involving over 1000 randomly selected cows in England and Wales showed that seropositive cows were 3.5 times mmore likely to abort than seronegative cows[25]. In addition to abortion and congenital infection, *N. caninum* infection may cause reduced milk production and shortened production life based on a study of seropositive cows which produced less milk and were culled earlier than seronegative herdmates [38, 62, 64]. The milk yield of *N. caninum*-infected, non-aborting cows was shown to be reduced by over 4% in first lactation dairy cows[65]. Seropositive beef cattle have an increased risk of abortion and stillbirth, increased risk of culling for poor reproductive performance, reductions in postweaning weight gain and feeding efficiency [7, 9].

Two patterns, endemic abortion and epidemic abortion, have been described in association with neosporosis in herds of cattle. In the endemic pattern of abortion, the herd experiences an elevated abortion rate of greater than 5% per year which persists for years. In investigations of two California dairies with endemic *N. caninum* abortions, the annual abortion rate attributable to neosporosis in these herds was estimated to be 10.6% and 17.3% [65]. The epidemic pattern of abortion is less common and is characterized by abortions in a high proportion of pregnant cattle over a relatively brief period of time. In some instances, over 30% of pregnant cattle have aborted due to neosporosis within several months [61]. An apparent mixture of these patterns may be observed in some herds that have experienced a prolonged history of sporadic cases of *N. caninum* abortion and occasional outbreaks of abortions attributable to *N. caninum*. Point-source infections are most likely the cause for *N. caninum*-induced abortion outbreaks in cattle, whereas an increased annual abortion rate may be a consequence of vertical transmission.

In most instances, cows that abort a *N. caninum* infected fetus will have either additional abortions [2] or infected fetuses in subsequent pregnancies [11, 32]. The clinical outcome of these subsequent pregnancies is variable but a seropositive cow that has an abortion has a 5.7 greater risk of abortion in the subsequent pregnancy [63].

An uncommon manifestation of fetal *N. caninum* infection is the birth of a clinically affected full-term calf which exhibits variable neurological signs manifested as limb dysfunctions, ranging from mild proprioceptive defects to complete paralysis. Microscopically there is a multifocal protozoal encephalomyelitis which may be particularly localized in the spinal cord gray matter [11, 32]. The majority of calves that acquire a *N. caninum* infection during gestation are born clinically normal. These calves will have a high precolostral antibody titer to *N. caninum* which is useful in detecting *in utero* infection. A high percentage, 80% to over 95%, of calves born to seropositive cows are congenitally infected based on serology [51, 56, 66]. These clinically normal, congenitally infected calves are important in maintaining the infection in the herd.

DIAGNOSIS

Diagnosing *N. caninum*-induced abortion will require the assistance of a veterinary diagnostic laboratory. The preferred samples in cases of abortion include one or more aborted fetuses submitted with placenta and sera from the dam. Histologic lesions in fetal tissues consist of widespread nonsuppurative infiltrates. The most diagnostically significant lesions are found in the brain and consist of scattered foci of nonsuppurative cellular infiltrates with occasional foci of necrosis. Other histologic lesions that are consistently found include nonsuppurative epicarditis and/or myocarditis, focal nonsuppurative myositis and nonsuppurative portal hepatitis, frequently with focal hepatic necrosis and focal nonsuppurative interstitial pneumonia [1, 10]. Confirmatory diagnosis of *N. caninum* infection relies on identification of the tachyzoite and tissue cyst stages of the parasite in fetal tissues by immunohistochemistry using antibodies raised against *N. caninum* antigens, and on detection of *N. caninum*-specific DNA by polymerase chain reaction PCR [40, 41, 42].

An accurate diagnosis of *N. caninum* abortion can be achieved if the diagnostician takes into consideration, prior to establishing the infection as the cause of the abortion: 1) the gestational age and postmortem condition (autolyzed), 2) the presence of compatible disseminated inflammatory lesions, 3) the presence of detectable parasites with immunohistochemistry or parasite DNA by PCR, and 4) the lack of other abortifacients. Conversely, a *N. caninum* infected aborted fetus with mild focal lesions, (usually consisting of focal encephalitis in late term fetuses), may have an incidental *N. caninum* infection and other causes for the abortion should be investigated.

A variety of serologic tests are available to assist in the diagnosis of neosporosis [21, 42]. These include the indirect fluorescent antibody test (IFAT), the modified agglutination test and a number of enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). The assays utilize *N. caninum* tachyzoites or specific derived antigens. Laboratories utilizing any of the serologic tests for *N. caninum* should establish appropriate cut-off titers using sera from known infected and noninfected cattle. A single serum sample from an individual cow may not accurately reflect her infection status since titers in known positive cattle fluctuate and may fall below the cut-off value for some period of time [24].

Neospora caninum serology is effective in detecting elevated antibodies in the serum of congenitally infected calves, or aborted infected fetuses six months or more in gestation. IFAT was shown to be the most accurate method to detect fetal antibodies [12, 69]. However, a negative fetal *N. caninum* IFA titer does not rule-out the possibility of infection and a positive titer does not prove that this infection was the cause of the abortion. In the individual aborting cow, a positive serology result does not prove that the abortion was due to neosporosis but it can assist the diagnosis. In addition to its use in the routine abortion screen in individual abortion cases, the ELISA test is used on a herd basis. The test can be used to estimate herd seroprevalence of *N. caninum* infection, to investigate the association between seropositivity and abortion, and to estimate the extent of herd infection attributable to congenital infection.

Assessment of the avidity index of *N. caninum* antibodies using an avidity ELISA has made it possible to differentiate recent (low avidity) from chronic (high avidity) infections [22, 58].

ECONOMIC IMPACT

The major economic impact of bovine neosporosis is associated with abortion. In California, neosporosis is the most important cause of abortion in dairy cattle and the second most frequently diagnosed cause of abortion in beef cattle [4]. A recent survey of bovine abortions cases received from January 1998 to July 2003 at three veterinary diagnostic laboratories reveals that *N. caninum*-abortions were the largest category (50.5 %) of bovine abortion diagnosed in California and exceed all other combined diagnosed cases. The annual cost of *N. caninum*-associated abortions to the California dairy industry was conservatively estimated in 1997 at $35 million [13].
Additional costs are related to reduced milk production and premature culling in dairy cattle [38, 62, 64]. A recent prospective study involving 565 Holstein cows reports a 3 to 4% decrease in milk production or 800 lb/seropositive cow for a typical 305-day lactation which represents a loss of $128/cow [38]. Studies with beef cattle in Texas show that in addition to abortion, *N. caninum* infection is associated with significant reductions in postweaning weight gain, carcass weight and feeding efficiency, costing the Texas beef industry at least $ 37 million in 2001 [7, 9].
In New Zealand, where horizontal transmission is considered an important route of *N. caninum* infection, the average annual loss associated with abortion outbreaks was estimated at NZ$ 24 million at a national and NZ$ 6,800 at an individual farm level [5].

CONTROL AND PREVENTION

Currently, there is no effective method for control of bovine neosporosis. Although various antimicrobial agents have been tested against *N. caninum in vitro* there is currently no known method whereby an infected cow can be cleared of the infection. One explorative study reports that calves experimentally infected with *N. caninum* tachyzoites and treated with Toltrazuril-sulfone (Ponazuril) for six consecutive days starting one day after infection, did not have detectable parasite DNA, had reduced fever and significantly lower *N. caninum* antibodies, when compared to non-treated controls [43].
A major method of *N. caninum* transmission in herds is through the infection of fetuses in cattle that are chronically infected. These chronically infected cows can be identified based on their serologic titers or from a history of previous *N. caninum* abortion or congenital infection. With this knowledge, control of the infection could be focused on reducing the numbers of infected cows in the herd and limiting the introduction of infected replacement cattle into the herd. Culling decisions concerning cows that have had a confirmed *N. caninum* abortion can be made with the knowledge that there is a higher risk of repeat abortion in these animals [50, 63]. Seropositive cows also have a greater risk of abortion and there is a very high probability of congenital infection in the calves born to these cows [50, 52, 63, 68, 70]. In addition, seropositive heifers have been shown to have a reduced milk production [64]. In both dairy and beef cattle, epidemiological studies have found that seropositive cattle have an increased rate of culling for a variety of reasons [62, 68]. However, culling seropositive cows or heifers may not be economically viable in herds with high seroprevalence. Embryo transfer into seronegative recipients has been shown to be effective in preventing vertical transmission [6, 23, 44].
There are no proven methods available to prevent postnatal infection. However, based on the evidence that dogs and coyotes can be definitive hosts [37, 47] and the association between dogs on farms and the seroprevalence in the herd [29, 49, 53, 55, 72], it would be

prudent to take measures to reduce the potential for this type of transmission. The removal of all potentially infected tissues, such as aborted fetuses and placentas from the environment, that might serve as a source of infection for susceptible hosts would be advisable. In addition, fecal contamination of feed and water sources by other animals should be minimized.

NeoGuard®, a USDA-approved *Neospora caninum* vaccine manufactured by Intervet Inc., has been shown to reduce abortions in healthy, pregnant heifers challenged with *N. caninum* (Technical bulletin 2).

REFERENCES

1- Anderson ML, Barr BC, Conrad PA. 1994 Protozoal causes of reproductive failure in domestic ruminants. Vet Clin North America. Food Animal Practice, 10, 439-461.

2- Anderson ML, Palmer CW, Thurmond MC, et al. 1995 Evaluation of abortions in cattle attributable to neosporosis in selected dairy herds in California. J Am Vet Med Assoc, 207, 1206-1210.

3- Anderson ML, Reynolds JP, Rowe JD, et al.. 1997 Evidence of vertical transmission of *Neospora* sp. infection in dairy cattle. J Am Vet Med Assoc, 210, 1169-1172.

4- Anderson ML, Andrianarivo AG, Conrad PA. 2000 Neosporosis in cattle. Animal Reproduction Science, 60-61, 417-431.

5- Antony A, Williamson NB. 2001 Recent advances in understanding the epidemiology of *Neospora caninum* in cattle. NZ Vet J 49, 42-47.

6- Baillargeon P, Fecteau G, Paré J, et al. 2001 Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. J Am Vet Med Assoc 218, 1803-1806.

7- Barling KS, McNeill JW, Thompson JA, et al. 2000 Association of serologic status for *Neospora caninum* with postweaning weight gain and carcass measurements in beef calves. J Am Vet Med Assoc 217, 1356-1360.

8- Barling KS, Sherman M, Peterson MJ, et al. 2000 Spatial associations among density of cattle, abundance of wild canids, and seroprevalence to *Neospora caninum* in a population of beef calves. J Am Vet Med Assoc 217, 1361-1365.

9- Barling KS, Lunt DK, Snowden KF, et al. 2001 Association of serologic status for *Neospora caninum* and postweaning feed efficiency in beef steers. J Am Vet Med Assoc 219, 1259-1262.

10- Barr BC, Anderson ML, Dubey JP, Conrad PA. 1991 *Neospora*-like protozoal infections associated with bovine abortions. Vet Pathol 28,116.

11- Barr BC, Conrad PA, Breitmeyer R, et al. 1993 Congenital *Neospora* infection in calves born from cows that had previously aborted *Neospora*-infected fetuses: four cases (1990-1992). J Am Vet Med Assoc, 202, 113-117.

12- Barr BC, Anderson ML, Sverlow KW, Conrad PA. 1995 Diagnosis of fetal *Neospora* infection with the *Neospora* indirect fluorescent antibody test (IFAT). Vet Rec 137, 611-613.

13- Barr BC, Bjerkas I, Buxton D, Conrad PA, et al. 1997 Neosporosis - Report of the International *Neospora* Workshop. Compendium On Continuing Education For the Practicing Veterinarian, 19, S120-144.

14- Bartels CJM, Wouda W, Schukken YH. 1999 Risk factors for *Neospora caninum*-associated abortion storms in dairy herds in the Netherlands (1995-1997). Theriogenology 52, 247-257.

15- Basso W, Venturini L, Venturini MC, et al. 2001 First isolation of *Neospora caninum* from the feces of a naturally infected dog. J Parasitol 87, 612-618.

16- Bergeron N, Fecteau G, Paré J, Martineau R, Villeneuve A. 2000 Vertical and horizontal transmission of *Neospora caninum* in dairy herds in Québec. Can Vet J 41, 464-467.

17- Bergeron N, Fecteau G, Villeneuve A, Girard C, Paré J. 2001 Failure of dogs to shed oocysts after being fed bovine fetuses naturally infected by *Neospora caninum*. Vet Parasitol 97,145-152.

18- Bjerkås I, Mohn SF, Presthus J. 1984 Unidentified cyst-forming sporozoan causing encephalomyelitis and myositis in dogs. Z. Parasitenkd 70, 271-274.

19- Bjerkås I, Dubey JP. 1991 Evidence that *Neospora caninum* is identical to the *Toxoplasma*-like parasite of Norwegian dogs. Acta Vet Scand 32, 407-410.

20- Björkman C, Johansson O, Stenlund S, Holmdahl OJM, Uggla A. 1996 *Neospora* species infection in a herd of dairy cattle. J Am Vet Med Assoc, 208, 1441-1444.

21- Björkman C, Uggla A. 1999 Serological diagnosis of *Neospora caninum* infection. Int J Parasitol 29, 1497-1507.

22- Björkman C, Naslund K, Stenlund S, Maley SW, Buxton D, Uggla A. 1999 An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. J Vet Diagn Invest 11,41-44.

23- Campero CM, Moore DP, Lagomarsino H, et al. 2003 Serological status and abortion rate in progeny obtained by natural service or embryo transfer from *Neospora caninum*-seropositive cows. J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health 50, 458-460.

24- Conrad PA, Sverlow KW, Anderson ML, et al. 1993 Detection of serum antibody responses in cattle with natural or experimental *Neospora* infections. J Vet Diagn Invest 5, 572-578.

25- Davison HC, Otter A, Trees AJ. 1999 Estimation of vertical and horizontal transmission parameters of *Neospora caninum* infections in dairy cattle. Int J Parasitol, 29, 1683-1689.

26- De Marez T, Liddell S, Dubey JP, et al. 1999 Oral infection of calves with *Neospora caninum* oocysts from dogs: humoral and cellular immune responses. Int J Parasitol 29, 1647-1657.

27- Dijkstra T, Eysker M, Schares G, Conraths FJ, Wouda W, Barkema HW. 2001 Dogs shed *Neospora caninum* oocysts after ingestion of naturally infected bovine placenta but not after ingestion of colostrum spiked with *Neospora caninum* tachyzoites. Int J Parasitol 31, 747-752.

28- Dijkstra T, Barkema HW, Bjorkman C, Wouda W. 2002 A high rate of seroconversion for *Neospora caninum* in a dairy herd without an obvious increased incidence of abortions. Vet Parasitol 109, 203-211.

29- Dijkstra T, Barkema HW, Eysker M, Hesselink JW, Wouda W. 2002 Natural transmission routes of *Neospora caninum* between farm dogs and cattle. Vet Parasitol 105, 99-104.

30- Dijkstra T, Barkema HW, Hesselink JW, Wouda W. 2002 Point source exposure of cattle to *Neospora caninum* consistent with periods of common housing and feeding and related to the introduction of a dog. Vet Parasitol 105, 89-98.

31- Dubey JP, Carpenter JL, Speer CA, Topper MJ, Uggla A. 1988 Newly recognized fatal protozoan disease of dogs. J Am Vet Med Assoc 192, 1269-1285.

32- Dubey JP, Lindsay DS. 1996 A review of *Neospora caninum* and neosporosis. Vet Parasitol, 67, 1-59.

33- Dubey JP. 1999 Recent advances in *Neospora* and neosporosis. Vet Parasitol, 84, 349-367.

34- Dubey JP. 2003 Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. Korean J Parasitol 41, 1-16.

35- French NP, Clancy D, Davison HC, Trees AJ. 1999 Mathematical models of *Neospora caninum* infection in dairy cattle: transmission and options for control. Int J Parasitol 1999 29,1691-1704.

36- Gondim LF, Gao L, McAllister MM. 2002 Improved production of *Neospora caninum* oocysts, cyclical oral transmission between dogs and cattle, and in vitro isolation from oocysts. J Parasitol 88, 1159-63.

37- Gondim LFP, McAllister MM, Pitt WC, Zemlicka DE 2004 Coyotes (*Canis latrans*) are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 34, 159-161.

38- Hernandez J, Risco C, Donovan A. 2001 Association between exposure to *Neospora caninum* and milk production in dairy cows. J Am Vet Med Assoc 219, 632-635.

39- Hietala SK, Thurmond MC. 2001 Postnatal *Neospora caninum* transmission and transient serologic responses in two dairies. Int J Parasitol 31, 209-215.

40- Ho MS, Barr BC, Marsh AE, et al. 1996 Identification of bovine *Neospora* parasites by PCR amplification and specific small-subunit rRNA sequence probe hybridization. J Clin Microbiol 34, 1203-1208.

41- Ho MS, Barr BC, Rowe JD, et al. 1997 Detection of *Neospora* sp. from infected bovine tissues by PCR and probe hybridization. J Parasitol 83, 508-514.

42- Jenkins M, Baszler T, Björkman C, Schares G, Williams D. 2002 Diagnosis and seroepidemiology of Neospora caninum-associated bovine abortion. Int J Parasitol 32, 631-636.

43- Kritzner S, Sager H, Blum J, Krebber R, Greif G, Gottstein B. 2002 An explorative study to assess the efficacy of Toltrazuril-sulfone (Ponazuril) in calves experimentally infected with *Neospora caninum*. Ann Clin Microbiol Antimicrob1, 4.

44- Landmann JK, Jillella D, O'Donoghue PJ, McGowan MR. 2002 Confirmation of the prevention of vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle by the use of embryo transfer. Aust Vet J 80, 502-503.

45- Lindsay DS, Dubey JP, Duncan RB. 1999 Confirmation that the dog is a definitive host for *Neospora caninum*. Vet Parasitol 82, 327-333.

46- McAllister MM, Huffman EM, Hietala SK, Conrad PA, Anderson ML, Salman MD. 1996 Evidence suggesting a point source exposure in an outbreak of bovine abortion due to neosporosis. J Vet Diagn Invest 8, 355-357.

47- McAllister MM, Dubey JP, Lindsay DS, Jolley WR, Wills RA, McGuire AM. 1998 Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. Int J Parasitol 28, 1473-1478.

48- McGarry JW, Stockton CM, Williams DJ, Trees AJ. 2003 Protracted shedding of oocysts of *Neospora caninum* by a naturally infected foxhound. J Parasitol 89, 628-30.

49- Otranto D, Llazari A, Testini G, et al. 2003 Seroprevalence and associated risk factors of neosporosis in beef and dairy cattle in Italy. Vet Parasitol 118, 7-18.

50- Moen AR, Wouda W, Mul MF, Graat EAM, van Werven T. 1998 Increased risk of abortion following *Neospora caninum* abortion outbreaks: a retrospective and prospective cohort study in four dairy herds. Theriogenology 49:1301-1309.

51- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. 1996 Congenital *Neospora caninum* infection in dairy cattle and associated calfhood mortality. Can J Vet Res, 60, 133-139.

52- Paré J, Thurmond MC, Hietala SK. 1997 *Neospora caninum* antibodies in cows during pregnancy as a predictor of congenital infection and abortion. J Parasitol, 83, 82-87.

53- Paré J, Fecteau M, Fortin M, et al. 1998 Seroepidemiologic study of *Neospora caninum* in dairy herds. J Am Vet Med Assoc 213, 1595-1598.

54- Patitucci AN, Charleston WAG, Alley MR, et al. 1999 Serological study of a dairy herd with a recent history of *Neospora* abortion. N Z Vet J 47, 28-30.

55- Sanchez GF, Morales SE, Martinez MJ, Trigo JF. 2003 Determination and correlation of anti-*Neospora caninum* antibodies in dogs and cattle from Mexico. Can J Vet Res 67,142-145.

56- Schares G, Peters M, Wurm R, et al. 1998 The efficiency of vertical transmission of *Neospora caninum* in dairy cattle analysed by serological techniques. Vet Parasitol, 80, 87-98.

57- Schares G, Conraths FJ, Reichel MP. 1999 Bovine neosporosis: comparison of serological methods using outbreak sera from a dairy herd in New Zealand. Int J Parasitol 29,1659-1667.

58- Schares G, Barwald A, Staubach C, et al. 2002 p38-avidity-ELISA: examination of herds experiencing epidemic or endemic *Neospora caninum*-associated bovine abortion. Vet Parasitol 106, 293-305.

59- Slapeta JR, Modry D, Kyselova I, et al. 2002 Dog shedding oocysts of *Neospora caninum*: PCR diagnosis and molecular phylogenetic approach. Vet Parasitol 109,157-67.

60- Thilsted JP, Dubey JP. 1989 Neosporosis-like abortions in a herd of dairy cattle. J Vet Diagn Invest 1, 205-209.

61- Thornton RN, Gajadhar A, Evans J. 1994 *Neospora caninum* abortion epidemic in a dairy herd. N.Z. Vet J. 42, 190-191, 1994

62- Thurmond MC, Hietala SK. 1996 Culling associated with *Neospora caninum* infection in dairy cows. Am J Vet Res 57, 1559-1562.

63- Thurmond MC, Hietala SK. 1997 Effect of congenitally acquired *Neospora caninum* infection on risk of abortion and subsequent abortions in dairy cattle. Am J Vet Res, 58,1381-1385.

64- Thurmond MC, Hietala SK. 1997 Effect of *Neospora caninum* infection on milk production in first-lactation dairy cows. J Am Vet Med Assoc 210, 672-674.

65- Thurmond MC, Hietala SK, Blanchard PC. 1997 Herd-based diagnosis of *Neospora caninum*-induced endemic and epidemic abortion in cows and evidence for congenital and postnatal transmission. J Vet Diagn Invest 9, 44-49.

66- Thurmond MC, Hietala SK. 1999 *Neospora caninum* infection and abortion in cattle. In Howard and Smith eds. Current Veterinary Therapy: Food animal practice, 1999, W.B Saunders, pp 425-431.

67- Trees AJ, McAllister MM, Guy CS, McGarry JW, Smith RF, Williams DJ. 2002 *Neospora caninum*: oocyst challenge of pregnant cows. Vet Parasitol 109,147-154.

68- Waldner CL, Janzen ED, Ribble CS 1998 Determination of the association between *Neospora caninum* infection and reproductive performance in beef herds. J Am Vet Med Assoc 213, 685-690.

69- Wouda W, Dubey JP, Jenkins MC. 1997 Serological diagnosis of bovine fetal neosporosis. J Parasitol 83,545-547.

70- Wouda W, Moen AR, Schukken YH. Abortion risk in progeny of cows after a *Neospora caninum* epidemic. Theriogenology 49:1311-1316, 1998.

71- Wouda W, Dijkstra T, Kramer AM, et al. 1999 Seroepidemiological evidence for a relationship between *Neospora caninum* infections in dogs and cattle. Int J Parasitol 29, 1677-1682.