

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| 1. O AGRONEGÓCIO BRASILEIRO: CARACTERÍSTICAS E DESAFIOS | 1 |
| Alexandre Lahóz Mendonça de Barros | |
| 2. O BRASIL COMO FORNECEDOR MUNDIAL DE ALIMENTOS, FIBRAS E BIOENERGIA EM 2010: UMA AGENDA DE TRABALHO | 13 |
| Marcos Fava Neves | |
| 3. A CADEIA PRODUTIVA DO LEITE | 25 |
| Roberto H. Jank Jr. | |
| 4. NUTRIÇÃO E REPRODUÇÃO EM BOVINOS | 30 |
| José Eduardo P. Santos | |
| 5. FOLICULOGÊNESE EM BOVINOS | 55 |
| José Buratini Junior | |
| 6. ANESTRO PÓS-PARTO EM BOVINOS: A SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEOS VEGETAIS PODE SER ÚTIL PARA ENCURTÁ-LO? | 63 |
| Ed Hoffmann Madureira | |
| 7. SINCRONIZACION DE LA EMERGENCIA DE LA ONDA FOLICULAR Y LA OVULACIÓN EN ANIMALES TRATADOS CON PROGESTAGENOS Y DIFERENTES ESTERES DE ESTRADIOL | 71 |
| Gabriel A. Bó | |
| 8. PROGESTERONE AND FERTILITY | 85 |
| George E. Mann | |
| 9. CONCEITOS E APLICAÇÕES DE ESTRATÉGIAS ANTILUTEOLÍTICAS VISANDO O INCREMENTO DA TAXA DE CONCEPÇÃO EM BOVINOS | 93 |
| Mario Binelli | |
| 10. PUBERDADE E MATURIDADE SEXUAL DE NOVILHAS <i>BOS INDICUS</i> | 101 |
| Guilherme de Paula Nogueira | |
| 11. IMPACTO DA IATF NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM BOVINOS DE CORTE | 113 |
| Pietro S. Baruselli | |
| 12. IMPACTO DA IATF NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM BOVINOS DE LEITE | 133 |
| Roberto Sartori | |
| 13. BULL SELECTION AND MANAGEMENT UNDER TROPICAL CONDITIONS RESULTS FROM STUDIES IN NORTHERN AUSTRALIA | 146 |
| Richard G. Holroyd | |
| 14. INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DO SÊMEN NOS RESULTADOS DE PRENHEZ EM PROGRAMAS DE IATF E TETF | 157 |
| Rubens Paes de Arruda | |
| 15. SUPEROVULAÇÃO COM INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO | 165 |
| Ciro Moraes Barros | |
| 16. SITUAÇÃO ATUAL DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR E DA FECUNDAÇÃO IN VITRO | 172 |
| Marcelo Seneda | |
| 17. CLONING AND TRANSGENIC ANIMALS FOR AGRICULTURE | 181 |
| Matthew B. Wheeler | |
| 18. UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA A SELEÇÃO | 195 |
| José Fernando Garcia | |

O AGRONEGÓCIO BRASILEIRO: CARACTERÍSTICAS E DESAFIOS

Alexandre Lahóz Mendonça de Barros¹

1 INTRODUÇÃO

Após três décadas de mudanças parece que a agricultura brasileira começa a delinear um padrão agrícola único no mundo: moderno, de larga escala, intensivo em conhecimento e essencialmente tropical. A última década permitiu constatar ao país e ao mundo o enorme potencial do agronegócio brasileiro. Entretanto, tornou-se evidente nos últimos 4 anos que existem grandes desafios a serem superados a fim de que todo potencial da agricultura possa ser atingido em sua plenitude. Não é fácil antever todos os aspectos desse modelo que ainda se encontra em construção, mas é possível levantar suas principais características, bem como delinear os principais problemas a serem superados a fim de que o processo de expansão do agronegócio brasileiro seja sustentável no tempo.

O presente artigo constitui esforço singelo no sentido de resumir algumas das principais características do sistema agrícola brasileiro². Dada a complexidade do mesmo torna-se impossível abranger todos os aspectos envolvidos em cadeias, atores, realidades regionais distintas. O objetivo consiste, apenas, em olhar a macroeconomia da agricultura brasileira. A próxima seção elenca as principais características da agricultura brasileira, ressaltando os elementos de risco que envolvem a produção agropecuária no país. A seção 3 encerra o artigo com algumas considerações finais.

2 CARACTERÍSTICAS DO AGRONEGÓCIO BRASILEIRO

2.1 SISTEMA ÚNICO E NOVO

Ao comparar a agricultura brasileira com os maiores sistemas produtivos do mundo desenvolvido (América do Norte e Europa) é possível dar conta de dois aspectos que caracterizam o sistema brasileiro: em primeiro lugar pode-se afirmar que a moderna agricultura brasileira é um sistema relativamente novo do ponto de vista histórico; em segundo lugar, pode-se afirmar que não há outra grande agricultura tropical de larga escala no mundo. Assim, fica evidente que o sistema brasileiro exigiu desenvolvimento tecnológico específico e que ele foi essencialmente construído no decorrer dos últimos 30 anos. Ademais, pode-se afirmar que as novas tecnologias permitiram assegurar ao país elevado grau de competitividade frente as principais agriculturas do mundo.

O evento tecnológico mais relevante ocorrido na agricultura brasileira nos últimos 30 anos foi sem dúvida o Sistema de Plantio Direto. Este sistema foi decisivo para viabilizar o desenvolvimento da agricultura nas áreas de cerrado. Clima tropical requer proteção do solo e o sistema de cultivo tradicional e o modelo de mecanização a ele atrelado mostrou-se inadequado a esse regime climático. Plantio direto, juntamente com nutrição de plantas e desenvolvimento genético, garantiu expressivo aumento da produtividade da agricultura na região central do país.

O domínio tecnológico da agricultura em ambiente tropical permitiu que a natural abundância de solo, luminosidade, temperatura e água pudessem ser utilizadas a fim

¹Professor da Fundação Getúlio Vargas, Escola de Economia de São Paulo.

²Barros e Barros (2005) apresentam uma visão mais detalhada do trabalho ora apresentado.

de elevar a produtividade da agricultura. Em poucas palavras, o desenvolvimento tecnológico permitiu ao país fazer uso de suas vantagens comparativas na agricultura. A possibilidade de produzir duas safras em um único ano tornou-se maior graças ao desenvolvimento do sistema de plantio direto. A realização de duas safras por ano é hoje usual no Mato Grosso, em Goiás e no Paraná, embora nesse último estado, em decorrência da elevada precipitação por quase todo o ano, o sistema de safra de verão e de inverno já era utilizado, no passado, com maior freqüência³. A técnica de plantio direto reduz o tempo despendido com mecanização, permitindo a execução de duas safras com menor risco climático.

O país possui um volume expressivo de área potencialmente agricultável. Existem diferentes estudos referentes à disponibilidade de terra que, em geral, tendem a convergir para uma área potencial superior a 100 milhões de hectares na região do cerrado. Existe, ainda, enorme área de pastagem caracterizada por baixa produtividade das forragens e que atualmente começa a ser integrada ao sistema de grãos, configurando um inovador sistema de rotação. Em trabalho recente, Brandão et alii (2005)⁴, concluem que cerca de 80% do aumento da área cultivada com lavouras nos últimos 10 anos no Brasil deu-se em antigas áreas de pasto. A área total de pastagem no país situa-se ao redor de 170 a 180 milhões de hectares. A área agrícola atualmente cultivada no Brasil encontra-se em um patamar de 50 a 60 milhões de hectares, o que permite dar dimensão do enorme potencial produtivo do país.

Ao longo da última década iniciou-se um sistema de produção que procura interagir a produção de culturas anuais (grãos e algodão) com a pecuária bovina. Este sistema passou a ser conhecido como integração lavoura-pecuária. Existe um leque de variações dos tipos de integração, mas o princípio geral é a rotação de pastagem com grão, entre anos ou em um único ano (inverno e verão). O sistema de plantio direto requer palhada para proteger o solo. Ao final do período de chuvas é usual o cultivo de alguma lavoura para garantir a proteção do solo com palha quando do plantio da safra em setembro/novembro. Ocorre que o pasto pode perfeitamente ser utilizado para esse propósito, conferindo excelente proteção ao solo. Além disso, com a rotação com lavoura há melhoria da fertilidade do solo, elevando a produtividade das pastagens. A rotação com pasto permite, por sua vez, reduzir a infestação de doenças o que reduz as pulverizações necessárias às lavouras anuais. O sistema de integração lavoura-pecuária é uma novidade que não é freqüente em nenhuma outra grande agricultura do mundo. Esse sistema trás vantagens agronômicas decorrentes da rotação, reduzindo a incidência de pragas e doenças na lavoura de soja especialmente.

A presença da agricultura permite ampliar a qualidade da nutrição dos bovinos. O processamento da safra colhida acaba por gerar sub-produtos que podem ser utilizados em rações de confinamento, semi-confinamento ou suplementação a pasto a um custo reduzido, o que amplia consideravelmente a produtividade da pecuária. É interessante notar a presença de estruturas de confinamento disseminadas por todo país, até em regiões do cerrado que nunca fizeram uso dessa tecnologia por razões de custos de produção. Além disso, a presença de uma dieta de melhor qualidade amplia consideravelmente o benefício advindo do melhoramento genético, estimulando a adoção dessa tecnologia. É notório que ao longo dos últimos anos o uso de técnicas de melhoramento genético (touros provados, inseminação artificial, transferência de embrião, fertilização *in vitro*) cresceu muito no país.

³O sistema de plantio direto foi inicialmente desenvolvido por agricultores paranaenses em meados dos anos 70. Após essas experiências iniciais a tecnologia de plantio direto foi sendo desenvolvida, disseminada e adotada na região do cerrado.

⁴Brandão et alii (2005) Crescimento agrícola no período 1999-2004, explosão da área plantada com soja e meio-ambiente no Brasil. Texto para discussão 1062, IPEA/DIMAC.

Note-se, portanto, que há forte sinergia entre a produção de grãos e a pecuária bovina. Afora as vantagens tecnológicas, a diluição de risco decorrente da diversificação configura outro ganho do sistema de integração.

O sistema agrícola brasileiro dependeu e continuará dependendo pesadamente de seu sistema de pesquisa. O sistema de pesquisa federal liderado pela EMBRAPA desenvolve pesquisas em todo país, englobando diferentes condições edafo-climáticas e distintos produtos. Existe, ainda, um conjunto de centros de pesquisas estaduais, notadamente no Estado de São Paulo, que desenvolve tecnologia adaptada às condições locais. Além disso, diversas associações privadas de pesquisa foram criadas por produtores rurais a fim de desenvolver pesquisa nas áreas de nutrição de plantas e de melhoramento genético de plantas. Existe amplo número de empresas privadas que adapta e desenvolve material genético, novos equipamentos e técnicas de pulverização e mecanização, nutrição de plantas, etc. A maior parte das multinacionais produtoras de insumos tem longa tradição no país.

No decorrer das últimas décadas diversas escolas de engenharia agronômica e florestal, medicina veterinária, zootecnia e biologia foram criadas no país, multiplicando consideravelmente o número de profissionais em ciências agrárias. Número igualmente significativo de programas de pós-graduação foi fundado, elevando a qualidade dos profissionais que atuam na área. Atualmente, o Ministério da Educação requer que as universidades mantenham em seus quadros professores e pesquisadores com padrão mínimo de formação. A maior parte das universidades públicas e parcela crescente das privadas apresenta, em seus quadros, profissionais com mestrado e doutorado. Parte desses profissionais obteve sua pós-graduação em instituições internacionais, elevando o padrão de conhecimento do país.

Os profissionais de ciências agrárias atuam em empresas privadas de insumos, nos centros de pesquisas públicos e privadas, em empresas agrícolas, cooperativas, empresas de consultoria, etc. Nota-se, freqüentemente, que as propriedades mais modernas contam com consultoria especializada nas diversas etapas do processo produtivo: nutrição, pulverização, mecanização, caracterizando forte especialização do conhecimento, o que acaba por elevar a produtividade do sistema. As empresas de insumos possuem em seus quadros um corpo de profissionais para aplicar e disseminar tecnologia. No passado esse processo foi essencialmente feito pelo estado. Entretanto, em decorrência tanto do crescimento do setor, quanto da crise fiscal dos anos 80 e 90, as empresas privadas assumiram a liderança na disseminação do conhecimento como uma estratégia de marketing. Atualmente, muitos encontros tecnológicos são organizados pelas empresas privadas e cooperativas.

A inovação é o elemento central do agronegócio no país. Dadas as especificidades do meio-ambiente brasileiro não há como garantir a continuidade do desenvolvimento do agronegócio sem um fluxo permanente de inovação. É necessário, portanto, assegurar um marco institucional que garanta e estimule o processo de geração e incorporação de novas tecnologias.

2.2 SISTEMA COMPLEXO

O agronegócio brasileiro é um sistema complexo. O país apresenta diversas cadeias completas de produção. Todo segmento de insumos (máquinas agrícolas e tratores, fertilizantes, defensivos, sementes, reprodução animal, melhoramento genético, etc), segmento de produção agrícola (que contempla as principais culturas e animais produzidos no mundo), toda cadeia processadora e de distribuição, informática

associada ao agronegócio, dentre outros, constituem e caracterizam um amplo sistema produtivo.

Ao longo das últimas décadas a qualidade e o controle da produção e dos processos produtivos melhoraram sistematicamente. Este movimento foi consequência da elevação da qualidade das indústrias processadoras, da sofisticação dos supermercados, da maior exigência por qualidade por parte dos consumidores e da introdução da tecnologia da informação. Essas transformações sugerem que a rastreabilidade e a certificação da maioria dos produtos brasileiros é uma realidade não muito distante, como já pode ser vista em algumas cadeias. Esse aspecto é especialmente relevante ao comércio mundial. Além disso, o país possui boa indústria de insumos (máquinas, defensivos de fertilizantes), sendo o local de centros mundiais de produção de máquinas e equipamentos.

2.3 SISTEMA DIVERSIFICADO

Aspecto interessante do agronegócio brasileiro é seu amplo número de produtos que são estruturados em uma cadeia completa. Açúcar e álcool, laranja, café, soja, algodão, segmento da madeira (móveis, papel e celulose, compensados, etc), tabaco, borracha, cacau, frutas, tomate, carne vermelha, carne de frango, cadeia de suínos, ovos, leite, batata, tomate e cadeias menores como flores e hortaliças encontram-se presentes no país. Essa diversificação garante estabilidade ao sistema produtivo, posto que naturais variações de preços das *commodities* afetam menos o sistema como um todo. Ademais, note-se que o Brasil tem, além da diversificação das exportações, um grande mercado consumidor doméstico.

2.4 SISTEMA DE ECONOMIA AGRÍCOLA ABERTA

Os anos 90 marcaram uma profunda transformação estrutural no agronegócio brasileiro: a forte integração com o comércio internacional. É certo que historicamente sempre houve forte relação entre o mercado brasileiro e o internacional. As cadeias de açúcar, café e, mais recentemente, o setor de laranja foram caracterizados por alta participação das exportações. Entretanto a abertura dos anos 90 integrou de maneira definitiva o mercado nacional de insumos agrícolas ao mercado internacional. Além disso, mais recentemente, o setor pecuário ampliou consideravelmente sua presença no mundo. Os setores de carne vermelha e de frango e suínos que eram essencialmente voltados ao mercado doméstico passaram a responder por parcela significativa do mercado internacional: o Brasil se tornou, em 2005, o maior exportador mundial tanto de carne bovina quanto de aves, e quarto maior exportador de suínos. O resultado desse processo é que praticamente todas as grandes cadeias componentes do agronegócio brasileiro encontram-se integradas ao mercado internacional.

As implicações dessas transformações são profundas. Em primeiro lugar, há que ser considerado que a abertura econômica limita fortemente a ação de políticas agrícolas clássicas, as quais são: política de preços mínimos conjugada com a política de estoques reguladores. Em uma economia aberta, sem barreiras tarifárias, não é possível manter preços internos superiores aos internacionais. Esse fato exige o desenvolvimento de políticas novas e distintas daquelas presentes nas grandes agriculturas do mundo, como a dos EUA e Europa.

Outro aspecto relevante é que o processo de maior integração aos mercados internacionais torna muito difícil voltar a uma economia agrícola essencialmente

doméstica. Isso se dá porque uma vez que a participação das exportações sobre a produção doméstica assuma tamanho relevante, a reversão desse processo passaria por forte queda de renda e de emprego no setor produtivo nacional. A recente crise decorrente do surto de aftosa mostrou claramente o impacto nos preços internos decorrentes da redução das exportações brasileiras; o produto excedente que ficou restrito ao mercado interno derrubou fortemente o preço da carne vermelha no país. Vê-se, portanto, que a integração com o resto do mundo é um processo sem volta.

2.5 SISTEMA CRESCENTEMENTE PRIVADO E CONCENTRADO

O rápido crescimento da agricultura brasileira, combinado com a crise fiscal do governo federal que marcou a história recente da economia brasileira fez com que o sistema privado assumisse informalmente o financiamento da agricultura no país. Estima-se que cerca de 30% das necessidades financeiras dos agricultores são oriundas de empresas pertencentes à cadeia do agronegócio. Outros 30 a 40% correspondem ao capital próprio do agricultor, cabendo ao Estado o outro terço das necessidades. Nota-se, portanto, que o setor privado responde pela maior parte do setor, fato que deve se acentuar conforme se dê o crescimento da agricultura, uma vez que as limitações financeiras do setor público seguirão presentes.

A expansão dos últimos anos veio acompanhada de forte concentração nos mercados de insumos agrícolas, comercialização e de processamento. Essa concentração cria potencial poder de mercado que requer atenção quanto às questões relativas ao poder econômico (leia-se, ao direito de concorrência).

Além disso é forçoso reconhecer que o moderno sistema de produção do cerrado é concentrado. Em decorrência da escassez de capital no país e da relativa escassez histórica de mão-de-obra na região central, os preços relativos dos fatores (capital e trabalho) induziram a mecanização, configurando padrão semelhante ao dos Estados Unidos da América. Diversos fazendeiros estão se transformando em empresas com capacidade de produção, colheita, armazenagem e, em alguns casos, processamento e transporte. Nessa região, relevo plano, grandes propriedades e bom clima permitem boa produtividade decorrente dos ganhos em escala, o que gera um processo de estímulo adicional à concentração.

2.6 SISTEMA DE ALTO RISCO

A agricultura brasileira é de alto risco. Há uma combinação perversa de diferentes fontes de risco que torna preocupante o futuro do agronegócio brasileiro. Ademais, existem poucos mecanismos de proteção ao risco que contemplam a diversidade de incertezas presentes na agricultura do país. Pode-se agrupar esses riscos em quatro grandes categorias que, combinadas, confirmam a assertiva inicial. Esses grupos são:

- a) risco de produtividade;
- b) risco de variações nos preços dos produtos e dos insumos;
- c) risco de variações na taxa de câmbio;
- d) risco sanitário.

2.6.1 RISCO DE PRODUTIVIDADE

O risco de redução de produtividade por razões climáticas ou biológicas (pragas, doenças) é intrínseco à produção agrícola. Por essa razão diversos países, inclusive o Brasil, procuraram desenvolver sistemas de seguro que permitam manter a estabilidade do setor produtivo ao assegurar uma proteção à quebra de safra. As experiências internacionais sugerem que a participação do setor público no mercado de seguro agrícola é quase indispensável, salvo em algumas situações muito específicas (por exemplo, as chuvas de granizo). O baixo estímulo à participação privada deve-se essencialmente a três características conjuntas do risco agrícola que o distingue dos riscos envolvidos em outros mercados. Em primeiro lugar há o risco do clima, que requer conhecimento da probabilidade dos eventos climáticos. Esse conhecimento em si não é tão diferente do cálculo da probabilidade de morte por determinada doença no caso humano. Entretanto, no caso dos eventos climáticos associados a agricultura há o risco de catástrofe, ou seja, perdas generalizadas. Ora, no caso de ocorrência de catástrofe não há como a seguradora garantir a cobertura de toda a região, o que provavelmente levaria a quebra da mesma. Por fim, outro elemento que dificulta o interesse privado pelo mercado agrícola é o alto custo administrativo inerente ao seguro rural. As dificuldades de fiscalização, as nuances quanto a época ideal de plantio, a dificuldade de separar o efeito do clima sobre a produtividade da mal condução da lavoura, o problemas de risco moral, dentre outros, acabam por elevar sobremaneira os custos de administração do seguro agrícola.

Em decorrência das características acima enunciadas em quase todos os países do mundo a presença do setor público no seguro agrícola constitui a regra. Existem diferentes modelos institucionais, mas é comum a todos diferentes níveis de atuação do governo. O Brasil tentou em várias ocasiões criar um modelo de seguro agrícola. Entretanto, por diversas razões não houve sucesso na construção e manutenção de um modelo viável de seguro agrícola. Assim é que a agricultura brasileira não conta hoje com um sistema de seguro agrícola amplo e funcional. Há exemplos isolados com resultados modestos.

Nesse sentido pode-se afirmar que o agricultor brasileiro não conta hoje com nenhuma forma de proteção do risco de produtividade a não ser a diversificação espacial e de culturas. O risco de produtividade é bastante relevante em várias regiões do Brasil, destacando-se o sul do país. A figura 1, extraída de Burgo (2005), apresenta o desvio padrão da produtividade de soja entre 1990 e 2004, em diversos municípios do país. Percebe-se que a variância da produção é significativamente maior no Rio Grande do Sul, partes do Mato Grosso do Sul, Goiás e do nordeste. As regiões de menor risco são o Mato Grosso e partes do Paraná.

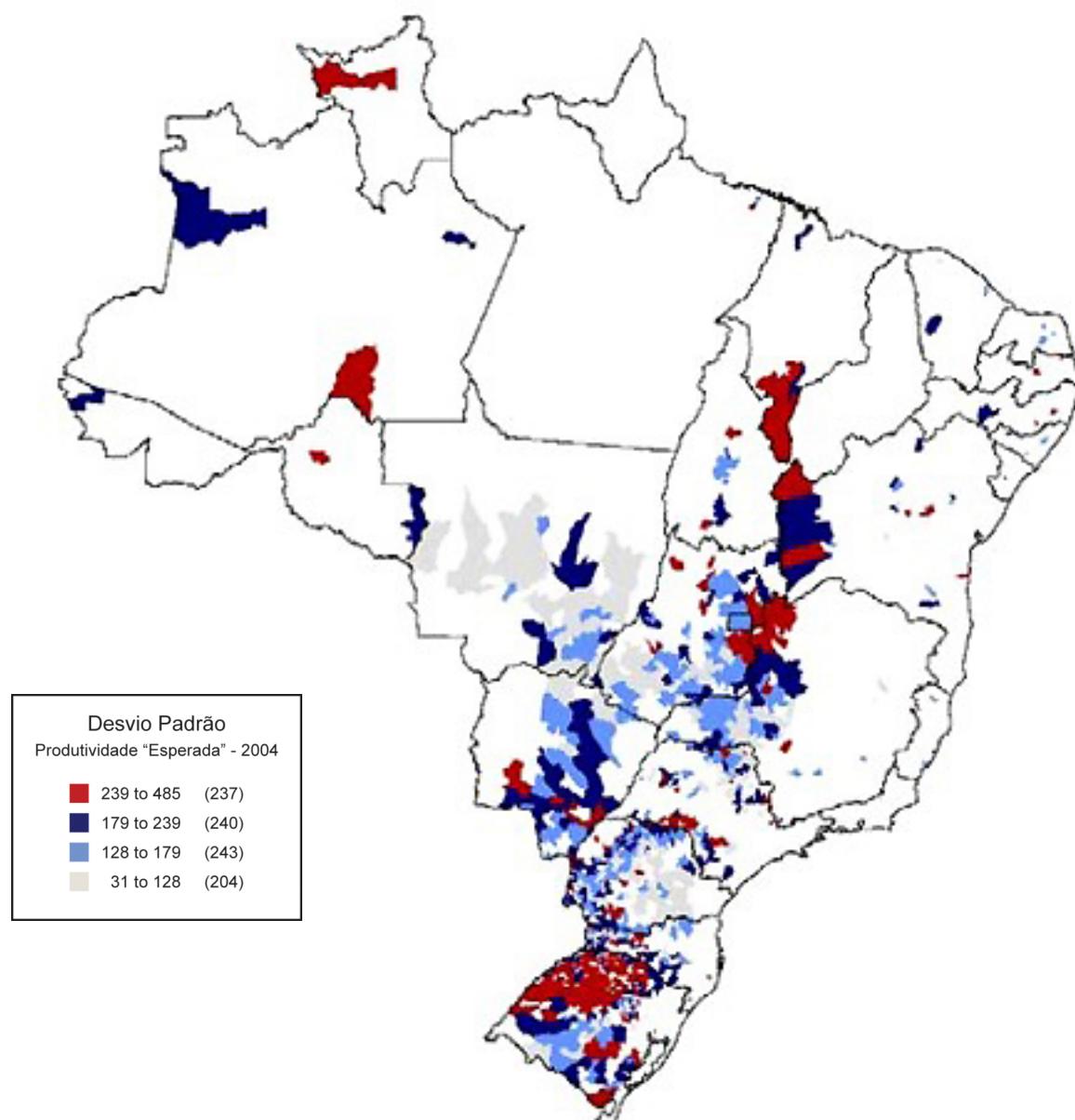


Figura 1. Desvio padrão da produtividade da soja por município calculada para o período de 1990 a 2004.

Fonte: Burgo (2005)⁵

Como mencionado anteriormente, partes do Brasil central são caracterizadas por baixo risco climático. Esse elemento passou a ser decisivo para que o sistema informal de financiamento desenvolvido nos últimos anos entre empresas privadas do ramo de insumos e de exportação (*traders*) e os agricultores crescesse consistentemente. Boa parte dos fazendeiros do cerrado necessita do capital dos exportadores para financiar a produção. Os grandes *traders* sustentam suas operações através de diversos contratos, conhecidos como Cédula de Produto Rural. Esses contratos dão boa garantia de propriedade sobre o produto pré-comercializado, mas não cobrem o risco de produtividade (quebra da safra). Não existe no país um sistema de seguro generalizado; assim, baixo risco climático é condição indispensável para a sustentação do sistema informal de financiamento. É interessante notar que entrevistas conduzidas

⁵ Burgo, Marcelo Nery Caracterização Espacial de riscos na agricultura e implicações para o desenvolvimento de instrumentos para seu gerenciamento ESALQ/USP Piracicaba, 2005

com empresas de insumos e grandes exportadores sugeriram que cerca de 60% da safra de soja do Mato Grosso é pré-comercializada, ou seja, vendida por ocasião do plantio. No sul do país, especialmente no Rio Grande do Sul, onde o risco climático é alto, a pré-comercialização é da ordem de 10 a 20% da safra. Nota-se, assim, que a falta de segurança quanto ao risco de quebra de safra acaba por afetar o mercado de crédito informal e formal desenvolvido no país ao longo dos últimos anos.

2.6.2 RISCO DE VARIAÇÃO NOS PREÇOS DOS PRODUTOS E DOS INSUMOS

A volatilidade nos preços dos produtos agrícolas bem como dos principais insumos consumidos pelo setor é uma realidade inerente ao setor agropecuário. A forma de defesa dessa volatilidade encontra-se tradicionalmente associada às operações de mercado futuro e de opções. Nas economias agrícolas desenvolvidas o risco de variação nos preços é fortemente minorado em decorrência dos amplos subsídios recebidos pelos agricultores associados a barreiras tarifárias que asseguram preços mais elevados nos mercado daqueles países. As políticas de garantias de preços acabam por assegurar estabilidade na oferta dos países desenvolvidos, posto que o custo de produção é sempre assegurado pela política agrícola. As variações nos preços se devem na maior parte das vezes a oscilações na produtividade (que não afetam a renda do produtor naqueles países graças a existência do seguro agrícola). A consequência para o Brasil e os demais países que não detém políticas de garantia de renda ao produtor é que todas as oscilações na oferta internacional de qualquer produto são corrigidas na margem pelo produtor nacional (redução de renda seguida de diminuição de área plantada). Em outras palavras, os ajustes na estrutura produtiva são muito mais severos nos países sem proteção de renda.

Pode-se imaginar que o mercado futuro seria uma alternativa de proteção às oscilações de preços. Entretanto, há alguns elementos que tornam a maior parte dos produtores refratários a entrada nos mercados futuros. Em primeiro lugar há o risco de depósito diário de margens; esse problema se acentua ao se considerar a intrínseca restrição de fluxo de caixa da atividade agrícola. Além disso, faz-se necessário considerar os elevados custos de operação nos mercado futuro agrícola brasileiro, bem como o risco de liquidez associado ao baixo volume de transação. O resultado é que não é possível imaginar que boa parte dos agricultores brasileiros fará uso de operações em mercados futuros. Uma boa solução ao problema seria o uso do mercado de opções. Contudo, esse mercado é muito pequeno no país, em decorrência de uma série de razões dentre as quais se destaca a elevada taxa de juro básica da economia. Nota-se, portanto, que os mecanismos privados de proteção de risco são quase inexistentes na agricultura brasileira. Sobra ao agricultor a estratégia de diversificação de cultura, que, dependendo do tamanho da propriedade em questão, pode limitar os ganhos em escala decorrentes da especialização.

O risco de variação nos preços do produto e dos insumos é especialmente relevante nas regiões de pior logística, como é o caso do Centro-Oeste. Ocorre que quanto mais distante dos portos, tanto mais alto é o preço dos insumos (diesel, fertilizantes, defensivos), quanto mais baixo é o preço do produto (em decorrência do desconto do frete). Ora, o custo do frete reduz a margem de rentabilidade ocasionando redução nas margens de rentabilidade. Assim, para uma mesma variação no preço do produto e/ou dos insumos, o efeito sobre a rentabilidade é tanto mais severo quanto pior for a logística da região.

Um dos principais problemas da região central do Brasil é o preço do frete. Como mencionado, a logística reduz a rentabilidade da agricultura porque os insumos

apresentam preços maiores e os produtos menores. A maior parte da produção brasileira é transportada por rodovias, as ferrovias são escassas e com problemas de integração (por conta bitolas diferentes) e de velocidade (as ferrovias cruzam por dentro de muitas cidades). A maior parte da soja produzida no Mato Grosso é exportada através dos portos de Santos e Paranaguá, sendo a trajetória composta por rodovias.

Com o rápido aumento da produção de soja, as estradas encontram-se congestionadas e em mau estado de conservação. Existe, entretanto, perspectivas de melhorias nas ferrovias e nas hidrovias. Neste caso, há possibilidade de saída pelo norte do país reduzindo consideravelmente o preço do frete (entrevistas conduzidas com o setor privado sugerem que o frete pode cair 70%). É importante comentar que as restrições ambientais farão com que a expansão da infra-estrutura logística siga uma tendência relativamente lenta.

É interessante notar que, de fato, a região central do país é aquela pior servida por sistema de transportes. A figura 2 apresenta a malha ferroviária nacional. É possível notar que especialmente o estado do Mato Grosso praticamente não tem acesso ao sistema ferroviário, que é reconhecidamente o mais barato sistema de transporte de cargas de baixo valor (caso da agricultura). Somente a título de comparação, vale a pena examinar a malha ferroviária dos Estados Unidos da América, apresentado na figura 3. Fica claro que os riscos dos produtores norte-americanos são claramente inferiores aos nossos.



Figura 2. Malha ferroviária brasileira.

Fonte: Ministério dos transportes.

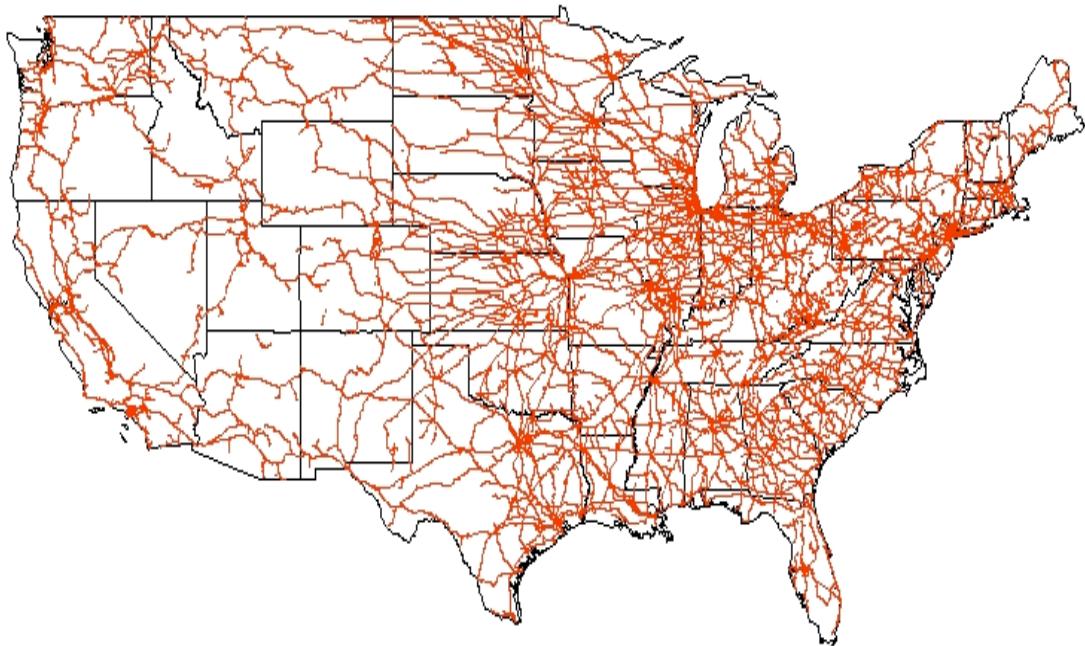


Figura 3. Malha ferroviária dos Estados Unidos da América.

Fonte: USDA

Quando se soma o alto risco climático presente no sul (e relativamente baixo no cerrado brasileiro), ao alto risco de variação de preços (relativamente maior no cerrado do que no sul em decorrência da logística), constata-se que a agricultura brasileira apresenta uma conjugação de riscos que acaba por afetar todo o país. Entretanto, em decorrência do modelo macroeconômico adotado a partir de 1998, adicionou-se mais um elemento de forte incerteza que é a variação da taxa de câmbio.

2.6.3 RISCO DE VARIAÇÃO DA TAXA DE CÂMBIO

A partir do final de 1998 a taxa de câmbio brasileira passou a flutuar livremente. A abertura na conta de capital associado a alta liquidez nos mercados internacionais sugerem que a volatilidade da taxa de câmbio será a regra na economia brasileira. Ocorre que o referido processo de integração ao mercado internacional por parte da agricultura brasileira faz com que todo sistema de preços no país tenha como referência básica a taxa de câmbio. Percebe-se, portanto, que outro elemento de risco foi adicionado à produção agrícola, afetando indistintamente praticamente todas as culturas e regiões do país. Novamente, vale a menção de que não há muitos mecanismos acessíveis à grande maioria dos agricultores brasileiros para dar conta da volatilidade cambial.

A figura 4 apresenta a evolução da taxa de câmbio real no Brasil no período de 1995 a 2006. Fica claro que as mudanças na taxa de câmbio foram expressivas, explicando boa parte da expansão e da crise na última década nos países.

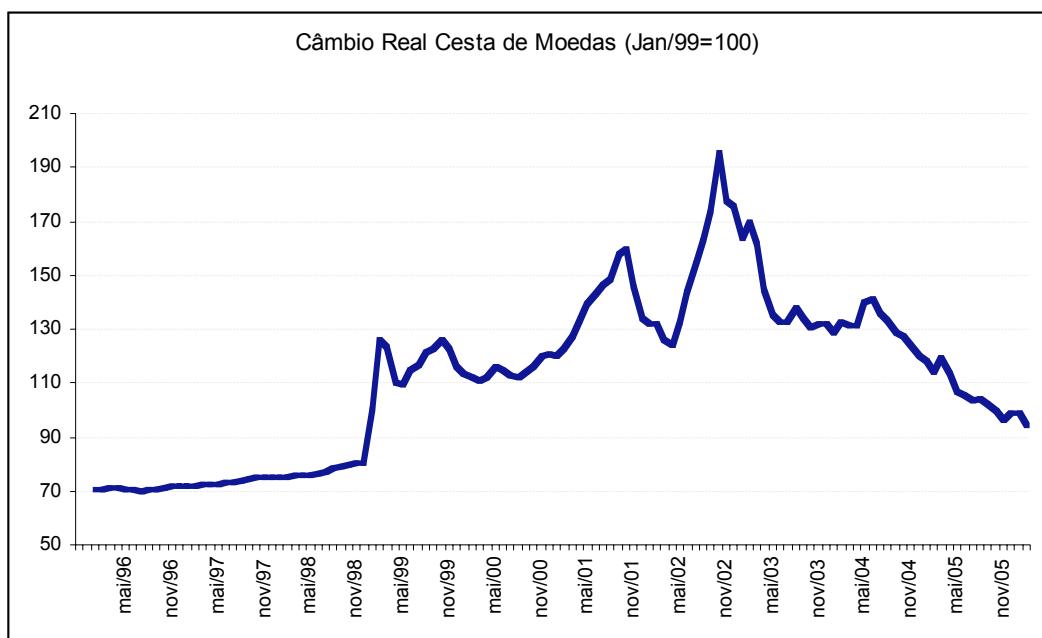


Figura 4. Evolução da taxa real de câmbio no Brasil.

Fonte: Dados primários BACEN (2006). Elaboração do autor.

2.6.4 RISCO SANITÁRIO

O aumento no tamanho do agronegócio brasileiro elevará o risco sanitário envolvido na produção. Além disso, a expansão do comércio internacional traz consigo o risco de contaminação com doenças existentes no exterior. Em outras palavras a probabilidade de problemas sanitários se eleva conforme a integração internacional aumenta.

As exportações brasileiras apresentam uma característica interessante, qual seja, envolve um amplo número de países. Por exemplo, a exportação de carne vermelha é feita para mais de 150 países diferentes. Esse vasto número de parceiros comerciais, embora reduza o risco de reduções abruptas nas exportações impõe um complexo processo de administração para as empresas privadas. Nossas entrevistas indicaram que a estrutura comercial das empresas exportadoras tem que lidar com ampla variedade de legislações sanitárias presentes em cada país. Existe um ponto positivo nesse complexo sistema: as empresas estão melhorando o controle de qualidade e a rastreabilidade. Contudo, ao mesmo tempo, é oneroso lidar com tamanha variedade de especificações e restrições.

O governo federal está empenhado em organizar a legislação e em construir uma estrutura para lidar com os padrões de qualidade que as legislações sanitárias presentes nos parceiros comerciais do país. Entretanto, as restrições financeiras parecem indicar que não haverá como a política acompanhar a velocidade do movimento privado. As restrições fiscais estão impondo cortes no orçamento da vigilância sanitária do Ministério da Agricultura. O déficit nominal do governo federal vem forçando cortes nas despesas que se generalizam por todo o governo federal. Politicamente é difícil estabelecer prioridades entre os diferentes ministérios. Por conta disso, a despeito do forte crescimento nas exportações do agronegócio (e consequentemente da necessidade de maior controle sanitário) recursos alocados para a segurança alimentar estão reduzindo a cada ano. A figura 5 apresenta o orçamento da defesa sanitária federal entre 1998 e 2005 (previsão). Pode-se observar que os recursos estão diminuindo e no ano corrente são significativamente menores (embora

ainda possam ser revertidos). Em que pese à existência de sistemas estaduais de vigilância sanitária, essa redução no orçamento federal merece forte preocupação.

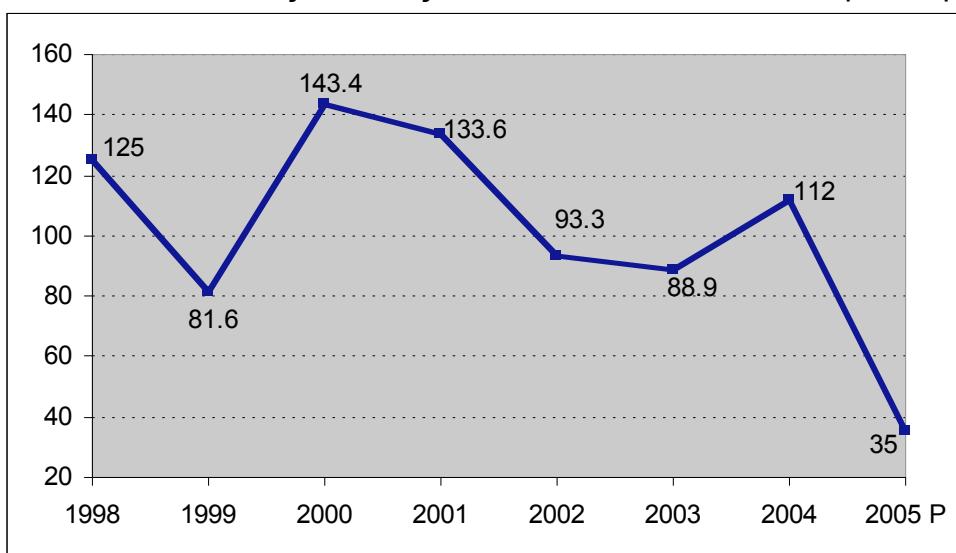


Figura 5. Orçamento Federal da Defesa Sanitária (milhões R\$).

Fonte: Ministério da Agricultura (2005)

3 COMENTÁRIOS FINAIS

Não há dúvidas que o agronegócio brasileiro é um caso de sucesso. Não há dúvidas, também, que existe enorme potencial de crescimento do setor seja para atender o mercado doméstico, seja para alcançar consumidores em todo mundo. Entretanto, o caminho de crescimento da agropecuária brasileira dependerá do desenvolvimento tecnológico em todos os elos das diferentes cadeias produtivas. Melhoramento genético de plantas e animais, ciência da nutrição, técnicas de manejo, logística, engenharia de alimentos, processamento e distribuição dos produtos agrícolas, tecnologia da informação, certificação, rastreabilidade, segurança do alimento (ressaltando a relevância do sistema sanitário brasileiro) são alguns dentre inúmeros fatores que dependem essencialmente do desenvolvimento de capital humano na área de ciências agrárias e biológicas. O futuro do agronegócio brasileiro seguirá dependendo da construção de inteligência para lidar com os riscos que envolvem a produção agrícola no país.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARROS, J.R.M. e BARROS, A.L.M. A revolução do agronegócio com ênfase na economia do conhecimento. In: VELOSO, J.P.R. O desafio da China e da Índia. A resposta do Brasil. Fórum Nacional, Editora José Olympio, Rio de Janeiro, 2005.
- BURGO, M.N. Caracterização Espacial de riscos na agricultura e implicações para o desenvolvimento de instrumentos para seu gerenciamento. Dissertação de mestrado, ESALQ/USP, Piracicaba, 2005.
- BRANDÃO et alii. Crescimento agrícola no período 1999-2004, explosão da área plantada com soja e meio-ambiente no Brasil. Texto para discussão 1062, IPEA/DIMAC, 2005.

O BRASIL COMO FORNECEDOR MUNDIAL DE ALIMENTOS, FIBRAS E BIOENERGIA EM 2010: UMA AGENDA DE TRABALHO¹

Marcos Fava Neves²; Marco Antonio Conejero; Maria Stella B. L. de Melo Saab

1 INTRODUÇÃO

É notável a posição hoje ocupada pelo Brasil de líder mundial em diversas cadeias produtivas. Também é notável a capacidade de expansão de maneira sustentável da produção nacional. Este texto tem como objetivo elencar uma série de constatações sobre o ambiente mundial da produção de alimentos, fibras e bioenergia, e propor idéias e futuros projetos decorrentes para o planejamento e gestão estratégica do agronegócio brasileiro, conforme o método GECAD³ desenvolvido pelo Prof. Marcos Fava Neves.

2 A ANÁLISE MACROAMBIENTAL

Consagrada na literatura mundial como análise PEST ou “STEP analysis”, ela considera os fatores incontroláveis às empresas agrupados em político-legais, econômicos, naturais, sócio-culturais e tecnológicos. Estes fatores foram transformados neste texto no que estamos chamando de constatações, para a seguir formular uma proposta de projetos estratégicos para o agronegócio nacional. Como sugestão de evolução futura deste material, viria uma definição dos agentes responsáveis, equipes e prazos para realização dos projetos elencados.

| CONSTATACÕES | |
|---|---|
| P O L I T I C O I N S T I T U C I O N A L | <p>INTERNACIONAL</p> <ul style="list-style-type: none"> • Distorções no comércio mundial devido ao protecionismo (subsídios de US\$ 1 trilhão/ano) tendem a reduzir gradualmente, com o setor privado se antecipando a estas mudanças, vide o caso do açúcar na União Européia. • Expectativa de redução nos próximos anos das barreiras tarifárias e elevação das barreiras não tarifárias (sanitárias, sociais e ambientais), como por exemplo, a do frango (nitrofurano, gripe aviária, newcastle), polpa cítrica (dioxina), soja (carboxin), carne bovina (aftosa, desmatamento Amazônia). • Possível mudança do protecionismo do agronegócio de alimentos para agronegócio energético. • Normas ambientais e trabalhistas mais rigorosas, tais como biosegurança, proteção de cultivares. • Produção com sustentabilidade (PPP – Pessoas, Planeta e Lucro) é a única forma de produzir. • Missões internacionais cada vez mais rigorosas com padrões de produção realizados no Brasil sejam animais ou vegetais. • Exigência de padrões de qualidade, certificação cada vez mais fortes. |

¹ Os autores agradecem as grandes contribuições recebidas da turma do MBA Agronegócios do PENSA.

² Marcos Fava Neves é professor de Estratégia e Marketing da FEA-RP/USP (Ribeirão Preto) e coordenador do PENSA, Marco Antonio Conejero e Maria Stella Saab são pesquisadores do PENSA. Contato: mfanaves@usp.br

³ A apostila do Método GECAD (Planejamento e Gestão Estratégica de Cadeias Produtivas visando Competitividade: Aplicações nos Agronegócios) pode se obtida no website: www.fearp.usp.br/fava

- Problema no reconhecimento das certificações nacionais em operações de comércio internacional.
- Países desenvolvidos com sistemas regulatórios pró-ativos, com foco na redução do custo de cumprimento de protocolos.

NACIONAL

Governo

- Escala do gasto público: 90% do orçamento federal, 16,5% do PIB, está engessado com pessoal e com a estrutura administrativa (gastos obrigatórios), excluindo o pagamento de juros sobre a dívida (que já atinge a cifra astronômica de R\$ 150 bilhões por ano). Apenas 10% está alocado para investimentos, o que representa 0,5% do PIB.
- Muitos Ministérios para cuidar do assunto alimentos, fibras e bioenergia, envolve custos desnecessários e negociações desgastantes, além da falta de convergência nas ações.
- Gestão muito lenta no Estado brasileiro. 7,6% do tempo administrativo das empresas vai para a burocracia contra 4,1%, em média, na América Latina. Gasta-se 152 dias para abrir uma empresa no Brasil, enquanto que na Austrália leva-se 2 dias, nos EUA 4, no Chile 28 no México 51 e na vizinha Argentina 68. (Valor Econômico)
- Normas tributárias. Segundo o IBPT, foram emitidas em média 55 normas por dia desde 1998, trazendo custo brutal para que empresas entendam e afugentando investimentos internacionais pela complexidade de entendimento.
- Judiciário extremamente lento com leis obscuras que confundem o setor privado e dando margem a interpretações diferentes e consequente corrupção. Aplicação de normas em velocidade diferente da capacidade de adaptação do setor privado.
- Desrespeito aos contratos, estimulado pela lentidão do judiciário e sensação de impunidade. Gera comportamento oportunista e enfraquecimento da coesão nas cadeias produtivas.
- Desarticulação e enfraquecimento das Agências Reguladoras.
- Falta de visão de cadeias produtivas no estabelecimento de políticas.
- Política cambial estimulando o consumo interno e segurando a inflação, mas substituindo fornecedores nacionais por internacionais e encarecendo insumos produtivos.

Ministério da Agricultura

- Falta de valorização política da produção de alimentos, fibras e bioenergia no Brasil, percebida pelo orçamento federal destinado a agricultura, de 3% para 0,3% em 25 anos (ABAG). Esta falta de recursos compromete o crédito, estoques e seguros.
- Debate político entre agricultura familiar e agronegócio, como se o conceito de agronegócio tivesse a dimensão tamanho em sua definição e operacionalização, algo errado. Agronegócio significa agricultura interligada.
- Racha dos esforços públicos para o agronegócio entre o MAPA de um lado e MDA e MMA do outro, em função da falsa dicotomia entre agronegócio industrial vs. agricultura familiar
- Insuficiência na representação brasileira nas negociações internacionais, necessitando de maior equipe técnica, com treinamento internacional;
- Orçamento da defesa agropecuária insuficiente (US\$ 30 milhões, 0,3% das exportações de carnes) e com falta de política de prevenção

| | |
|--|--|
| | <p>sanitária. Foco de Newcastle no RS em 2006, Foco de Febre Aftosa no MS e PR em 2005.</p> <p>Segurança Alimentar</p> <ul style="list-style-type: none"> • Necessidade de produção de alimentos com sustentabilidade: elevada produtividade, área plantada reduzida. • Setor estratégico no Brasil, principalmente para controle inflacionário: 80% da população está fora da agricultura, alto gasto com produtos alimentícios (30% a 50% da renda). <p>Segurança Fundiária</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tolerância a invasões e desrespeito à propriedade da terra causando insegurança nos investimentos nacionais e internacionais. Existe uma área de uma multinacional de insumos há 6 meses invadida no Paraná. Laboratórios de pesquisa vêm sendo destruídos. Impacto com depreciação de terras. <p>Infra-estrutura</p> <ul style="list-style-type: none"> • Os investimentos da União em transportes atingiram R\$ 4,2 bilhões em 1999. Caíram para R\$ 1,6 bilhões em 2004, apesar da entrada em vigor da Cide. • Infra-estrutura deficiente devido a um atraso nas regulamentações das PPPs e outras formas de atração de investimento privado para infraestrutura. Para uma safra de 130 milhões de toneladas de grãos, não há possibilidade de armazenamento e escoamento no período de maior pressão, entre o segundo e terceiro trimestres. • Portos com legislações, sindicatos e grupos de interesse que prejudicam o fluxo de produtos do agronegócio, trazendo um dos mais altos custos entre os países exportadores. <p>Tributação</p> <ul style="list-style-type: none"> • Falta de isonomia de ICMS, a lentidão na recuperação dos créditos de ICMS e outras políticas tributárias que influem na cadeia produtiva, exportando industrialização, como o caso da soja para Argentina. <p>Trabalho e seguridade social</p> <ul style="list-style-type: none"> • Normas trabalhistas ultrapassadas prejudicando através de litígios a atividade produtiva, consumindo tempo e recursos administrativos, constituindo uma verdadeira industria de reclamações trabalhistas. • O setor da seguridade social consome 56% dos recursos orçamentários da União, cerca de 10,5% do PIB, ou seja, algo da ordem de R\$ 202 bilhões. |
|--|--|

| | |
|--|--|
| E C O N O M I C O S | <p>INTERNACIONAL</p> <ul style="list-style-type: none"> • Ciclo de tranquilidade para o Agronegócio e Economia Brasileira nos últimos anos: Aumento da liquidez internacional, aplicações em países emergentes, forte elevação dos preços das commodities. • O mundo terá 7,2 bilhões de consumidores em 2015, seguindo uma taxa de crescimento de 1,1% (FAO e OCDE). • Grande demanda por grãos e proteína animal. • Ásia como grande mercado, China e Índia com populações crescentes e renda crescente. • Países em desenvolvimento serão o principal mercado do agronegócio brasileiro. As vendas que eram de 80% para desenvolvidos, passarão a ter 20% para desenvolvidos em 2010. São mercados com exigências distintas, portanto deve-se criar produtos e cultivar mercados. |
|--|--|

- Aumento dos fluxos migratórios e impactos na oferta de trabalho.
- Força das Associações Verticais na promoção de produtos das cadeias produtivas. A campanha Got Milk, do setor leiteiro nos EUA, usando a modelo Gisele Bundchen como garota propaganda, aumentou o consumo per capita de leite em mais de 5 litros por habitante. Cada US\$ 1 investido na promoção do suco de laranja da Flórida, EUA, retornou US\$ 6 para a cadeia produtiva.
- Biocombustível vs. Alimento: A competição por recursos limitados. Nos EUA, o abastecimento de um a cada dez carros com etanol de milho, demandaria quase um terço das terras aráveis americanas. Na Europa, para atender a exigência européia (5,75%) exigiria que 19% das terras aráveis fossem convertidas de lavouras de alimentos para biocombustíveis.
- Difícil tarefa de formar liderança e capital humano com conhecimento multidisciplinar e competência para superar desafios e aproveitar oportunidades nos agronegócios.

NACIONAL

Macroeconomia

- Taxa de câmbio desfavorável ao setor exportador. Se na safra 2004/05, durante a fase de plantio, o dólar valia R\$ 3,10, durante a colheita ficou em R\$ 2,50. Taxa 10% menor que em 2002. Alguém perde com intervenções no câmbio, desequilíbrio nos setores não-agroindustriais.
- Taxa de juros planetária (10% em termos reais, enquanto que a China é negativa), o que tira recursos da produção e transfere ao setor financeiro.
- Uma carga tributária elevada que incentiva a informalidade (quase 40% do PIB, enquanto que a da China é de 14%).
- Informalidade da mão de obra e concorrência desleal.
- Brasil atingiu a auto-suficiência na exploração e refino do petróleo. Custo de produção do petróleo nacional a US\$ 10/ barril, com venda no mercado interno a US\$ 70 / barril.
- Risco no fornecimento de gás boliviano com a nacionalização das empresas exploradoras. Demanda nacional de gás natural cresce 15% ao ano.

Agronegócio

- O agronegócio é a principal atividade econômica do Brasil: 30% do PIB, 39% das exportações e 37% dos empregos.
- Setor passa a seduzir executivos de outras áreas pela visibilidade, reconhecimento e pelos salários: na área de trading, a remuneração é quase a mesma oferecida por bancos de investimentos, um gerente de usina hoje ganha tanto quanto qualquer gerente de outro setor.
- Produtividade: Desde 1998, houve um crescimento de 1/3 na área plantada no Brasil, enquanto que as exportações agroindustriais praticamente dobraram.
- Mesmo com câmbio valorizado, o agronegócio cresceu 6% em valor em relação ao ano passado nas exportações, puxado principalmente por açúcar e álcool (21%), celulose (18%) e citrus (17%). Soja caiu 37% e carnes ao redor de 10%. Mas isso em função dos bons preços internacionais, perda de renda vem dos custos elevados.
- Perda de área agrícola de soja no MS (menos 30%, 5 mil hectares).
- Preços dos insumos comparativamente maior nas últimas duas safras

| | |
|--|--|
| | <p>(50% aumento fertilizantes, 130% aumento defensivos) e uma tendência de redução de safra e mercados para 2007, principalmente para grãos, estimada em 10 a 20% menos receita (em reais).</p> <ul style="list-style-type: none"> • O modelo de integração entre as agroindústrias e criadores de aves e suínos é uma relação contratual bem sucedida. O modelo Consecana como instrumento para balizar o preço pago pela usina ao fornecedor também é um bom exemplo. • Concentração do varejo e crescimento do globalsourcing (exportação de produtos brasileiros pelas grandes redes varejistas para outras filiais em países desenvolvidos). • Estrutura competitiva das cadeias agroindustriais deve sofrer fortes alterações nos próximos anos: com entrada de novos investidores, abertura de capital em bolsas, fusões e aquisições, novos modelos de governança (parcerias e contratos de longo prazo entre agroindústria-produtor independente), concentração na atividade fim, terceirização de funções, preferência pelo arrendamento de terras, associações ou condomínios de produtores para compras conjuntas. <p>Crédito e seguro rural</p> <ul style="list-style-type: none"> • Existe uma brutal situação de dívida do setor rural, estimada em mais de R\$ 30 bilhões. Oferta de crédito ligada a adimplência das operações. • Elevado endividamento dos produtores rurais, novidade do seguro rural e um pequeno montante de recursos (R\$ 10 milhões) para garantir renda (produção). A queda na renda foi da ordem de R\$ 18 bilhões, R\$ 10 bilhões na soja, R\$ 4 bilhões no milho e o restante nas demais atividades. • Conseqüência de redução no uso de tecnologia na lavoura, maior suscetibilidade ao ataque de pragas e doenças e baixa qualidade do produto final. • Seguros contra perda de safra agrícola ou invasão de terras – mercado incipiente. • Instrumentos financeiros oferecidos pelo setor privado precisam de mais reforço. <p>Agroenergia</p> <ul style="list-style-type: none"> • Situação do petróleo: é um insumo básico e essencial em qualquer economia (geopolítica); cada vez menos investimentos em infra-estrutura para produção de petróleo; alta demanda em países chaves como EUA, UE, China; escassez das fontes de petróleo e alta dependência de países da OPEP; Forte incerteza no abastecimento. • A agroenergia vive um bom momento com forte crescimento da exportação do álcool (possível queda da tarifa de importação nos EUA), aumento do consumo interno com os carros flex fuel, venda de créditos de carbono e com o início da produção de Biodiesel no Brasil (lançamento do HBIO pela Petrobrás). • Demanda aquecida: exportações brasileiras de álcool devem crescer e atingir 3,05 bilhões de litros, contra os 2,6 bilhões do ano passado. Preço no mercado interno de ficar cerca de 10% acima dos valores praticados no ano passado. A taxa de ociosidade das unidades processadoras de açúcar e álcool caiu de 50% para 25%. |
|--|--|

| | |
|---------------|---|
| SOCIOCULTURAL | <ul style="list-style-type: none"> • Envelhecimento da população mundial alterando hábitos de consumo. Populações de Rússia, Itália, entre outros sofrerão grande redução. • Problema da obesidade. Hoje, 24% dos americanos são obesos, o que correspondia a 19% em 1997. • China apresenta mudança na dieta alimentar da população com crescente consumo de proteínas e açúcares. Forte movimento de migração da população para grandes cidades. Péssimas condições sanitárias do rebanho e ausência de defesa contra gripe aviária. • Consumidor com o poder de decisão: ele exige maior conveniência e variedade de produtos, cuidado com o bem-estar dos animais, responsabilidade social e ambiental das empresas, mais segurança do alimento, biogenética, ingredientes funcionais, alimentos mais naturais, nutracêuticos, selos de origem, comércio justo (fair trade) e sabor dos alimentos. • Crescente demanda por produtos orgânicos, num mercado mundial que cresce a taxas superiores a 30% ao ano. O mercado mundial de orgânicos movimentou US\$ 23 bilhões em 2003. • Segmentos de mercado que demandam alimentos não geneticamente modificados. • Preocupação dos países em desenvolvimento com sua segurança alimentar: obrigação da empresa, direito do consumidor, sistemas de detecção, prevenção e eliminação de contaminantes, eliminação de riscos e tratamento de subprodutos. • Sustentabilidade (manutenção da capacidade produtiva para gerações subsequentes) para compradores internacionais. • Hábitos (cultura), tradição, envolvimento e emoção, e confiança são aspectos importantes na escolha dos alimentos. • Tendência crescente da cooperação e de ações coletivas visando a defesa de grupos. • Crescimento da profissionalização no setor de agronegócios, com investimentos em auditorias independentes, tecnologia da informação e, principalmente, recursos humanos. Os principais frigoríficos exportadores de carnes bovina, suína e de aves acompanham esta tendência, atuam verticalizados, já são grandes exportadores e estão preparados para a internacionalização. • Fortalecimento das associações de classe, com a contratação de executivos provenientes de outras áreas, como a ABEF, ABIEC e ABIPECS. • Álcool é brasileiro: afirmação da imagem do combustível limpo e valorização do produto nacional (combustível brasileiro). • Crescimento das ONG's legais e ilegais, com propósitos construtivos e destrutivos. |
|---------------|---|

| | |
|-------------|---|
| TECNOLÓGICO | <p>INTERNACIONAL</p> <ul style="list-style-type: none"> • Crescentes preocupação e investimentos no desenvolvimento tecnológico para geração de inovações. • Novas formas de comunicação, através de computadores. • Modificação genética irreversível e ampliada para diversas outras culturas. Por exemplo, demanda por novas variedades de cana, resistentes a pragas e adaptadas a regiões mais áridas. • Crescimento mundial da oferta de carros e caminhões flex-fuel (álcool, |
|-------------|---|

| | |
|--|---|
| | <p>gasolina, gás natural, diesel e biodiesel) e carros híbridos.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Foco mundial na área de bioenergia e no desenvolvimento dos biocombustíveis de segunda geração (tecnologia de conversão de biomassa celulósica, produção de etanol usando enzimas e a produção de diesel sintético bio-GTL). • Demanda por tecnologias que prezam pela eficiência energética: tecnologia que desliga o motor com trânsito parado; carros híbridos; células de combustível; biobutanol; extração do álcool residual do bagaço e aproveitamento de pontas e palha. • Inovação nos Alimentos: rápido preparo, manter atributos nutricionais, manter sabor, seguros, competitivos, funcionais, nutracêuticos, ingredientes de fontes naturais, orgânicos, fibras dietéticas, ácidos e óleos, proteínas e enzimas, validação das propriedades nutricionais e tecnologias de fermentação, filtração e preparo. <p>NACIONAL</p> <p>Geral</p> <ul style="list-style-type: none"> • Investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento insuficientes. Enquanto o Brasil aplica apenas 1% do seu PIB em pesquisa, nações mais desenvolvidas chegam a 3%. Aqui os fundos utilizados são basicamente governamentais, com participação muito pequena da área privada. Apenas 0,2% dos pedidos de patentes no mundo. • Centros de pesquisa necessitam de maior interação no Brasil. • Apesar de forte evolução nos últimos anos, o Brasil ocupa a 71ª. Posição entre as 180 economias com mais acesso às tecnologias de comunicação (telefonia fixa e móvel, acesso a computadores e Internet) (ONU). • O preço da ligação de celular no Brasil é um dos mais altos do mundo, enquanto que a média de computadores por 100 habitantes do País é inferior à média mundial. • Sistemas de informática governamentais não são integrados entre Estados e Governo Federal. <p>Agronegócio</p> <ul style="list-style-type: none"> • Embrapa trabalha na geração de inovações, necessitando de mais recursos; • Legislação na área tecnológica contaminada por ideologias. Vide lentidão para liberação das pesquisas com transgênicos (OGMs) e troca de técnicos por políticos no quadro de profissionais da Embrapa e CTNBio. • Modelo Moderfrota é modelo da aplicação de uma boa política pública. A medida estimulou a demanda e hoje o Brasil é um dos principais exportadores de máquinas agrícolas. • Forte movimento de exportação da tecnologia de produção de etanol para o Caribe e Ásia. |
|--|---|

| | |
|--|---|
| N A T U R A L | <p>INTERNACIONAL</p> <ul style="list-style-type: none"> • Valorização da ecoeficiência: valorização das tecnologias limpas, uso racional de recursos, adaptação institucional, valorização de subprodutos, minimização de impactos e uso de materiais biodegradáveis para embalagens. • Em 2001, o consumo de energia primária mundial estava concentrado no petróleo (35,1%), carvão (22,6%) e gás natural (21,7%). A biomassa moderna representava apenas 1,4% e as demais fontes renováveis |
|--|---|

| | |
|--|--|
| | <p>apenas 0,8% do consumo mundial.</p> <ul style="list-style-type: none"> • A taxa de consumo de energia nos países em desenvolvimento cresce mais rapidamente que nos países da OECD. 70% do aumento das emissões globais de CO₂ provem dos países em desenvolvimento. • Ocorrência de pragas e doenças que afetam as principais cadeias produtivas em escala global. • Pressão pelo uso de água pela sociedade. Água como fonte de vantagem competitiva. • O desmatamento, a mineração, práticas agrícolas inadequadas e aquecimento global provocam o fenômeno da desertificação em todo mundo. Isso gera perdas da ordem de US\$ 42 bilhões na agricultura (UNCCD) e milhões de há em terras agricultáveis. • A China é o país com a previsão de gerar mais créditos de carbono em todo mundo, apesar de um menor número de projetos aprovados hoje e foco na melhoria da eficiência energética. • A produção de biocombustíveis nos EUA e Europa é insustentável, conta com o uso de carvão, óleo combustível ou gás natural para co-gerar energia. <p>NACIONAL</p> <ul style="list-style-type: none"> • O Brasil apresenta um bom currículo energético. A matriz energética brasileira é bastante diversificada e voltada para a energia renovável, com 43,6% (29,1% proveniente da biomassa e 14,5% da hidroeletricidade). • Em 2005, foram desmatados ilegalmente 18 mil Km² de florestas no Brasil. O Brasil já tem 160 mil km² de área que já foram desmatadas e estão abandonadas. • Taxa alarmante de conversão de Floresta Amazônica em área agrícola. Embargo a importação de carne bovina brasileira por conta de denúncias sobre o avanço da soja e da pecuária em áreas de florestas. • Falta de incentivo à manutenção de uma maior área de mata nativa na propriedade rural além da porcentagem exigida de reserva legal (20%). |
|--|--|

3 GRANDES ESTRATÉGIAS

3.1 REFORMAS ESTRUTURAIS

As grandes reformas estruturais, que historicamente são requeridas para que o Brasil entre definitivamente na rota do desenvolvimento, são sumarizadas abaixo:

a) Redução do Gasto Público

- Reduzir ministérios, escolher os profissionais certos para certas funções.
- Aparelho burocrático com poucas regras e ausências de exceções.
- Aumentar o percentual de 0,1% do PIB como meta de redução da relação entre gastos correntes e PIB.
- Maior controle sobre os funcionários com metas físicas, avaliação de desempenho e limites de gastos pré-definidos.
- Reforma da Previdência, com desvinculação do salário mínimo, reajustes para manter o poder de compra (conforme inflação); elevação da idade mínima; eliminação de privilégios e exceções.

b) Reforma Trabalhista

- Priorizar o incentivo à negociação e promover ações para reduzir o custo dos empregados para as empresas.

c) Reforma Tributária

- Melhorar a qualidade do sistema tributário, com criação de um único Imposto sobre Valor Agregado, compartilhado com Estados e municípios.
- Isonomia tributária entre produtos de diferentes estados, e nacional ou importado.
- Unificação do IRPJ (Imposto de Renda da Pessoa Jurídica) e a CSLL (Contribuição Social sobre o Lucro Líquido).
- Eliminar impostos sobre investimento: aperfeiçoar o resarcimento de créditos tributários, compensação da CPMF.

d) Reforma política

- Mudança no sistema de partidos e eleições.

3.2 APLICADO AOS AGRONEGÓCIOS

Muito além das grandes reformas estruturais (sistemas tributário, previdenciário, partidário, judiciário e administração pública), pretende-se focar atenção em grandes projetos estratégicos para que o Agronegócio Brasileiro possa continuar com a trajetória passada de crescimento sustentado. A seguinte relação de projetos pode ser dividida em públicos, privados e conjuntos.

i) Decisões de Produção, de Produtos, Pesquisa e Desenvolvimento e Inovações

- **Atividades integradas de P&D para cada cadeia produtiva**
 - Estimular a formação de parcerias público – privadas e parques tecnológicos entre Embrapa, Institutos Agronômicos, centros de excelência nas universidades, empresas privadas, centros de tecnologia das cadeias produtivas (Fundecitrus e CTC) e Associações Verticais com incentivos fiscais e aporte de recursos para o desenvolvimento de pesquisas conjuntas.
 - Criar um banco genético para as principais culturas de domínio das cadeias produtivas, para atender a forte demanda por novas variedades, resistentes a pragas e adaptadas a regiões mais áridas.
 - Garantir o patenteamento internacional das tecnologias de produção do álcool brasileiro, para evitar “a livre importação” de tecnologia.
- **Gestão da Qualidade dos Alimentos e Defesa Sanitária via Associações Verticais**
 - Trabalho conjunto entre as Associações Verticais, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade (INMETRO) para adequação das cadeias agroindustriais aos padrões de qualidade exigido pelos países desenvolvidos – inclusive na questão de sustentabilidade – com capacitação e adoção por parte dos agentes de certificados reconhecidos internacionalmente.
 - Requisição obrigatória da certificação de origem, produção sustentável e rastreabilidade dos produtos do agronegócio.
 - Montar uma Agência Sanitária, com participação governamental, das associações verticais e de agentes privados, para coordenar as ações de defesa sanitária.

ii) Decisões de Comunicações

- Trabalho conjunto entre Associações Verticais das cadeias agroindustriais para divulgar a importância do Agronegócio Nacional na vida dos brasileiros e na interiorização do desenvolvimento. Desmistificar a idéia do rural, atrasado ou a dicotomia capital vs. interior.
- **Políticas de Promoção dos Produtos do Agronegócio Brasileiro no Mundo e Estímulo ao Comércio Exterior**
- Criação de valor por meio de ativos intangíveis: incluir os produtos do agronegócio nacional nas alternativas de escolha do consumidor global: fazer parte dos hábitos, da tradição, e ganhar a confiança dos consumidores.
- Programa de Marketing e Promoção das Exportações dos produtos do agronegócio deve ficar sob responsabilidade das associações verticais, com financiamento governamental e privado, com ações conjuntas com a APEX nas principais feiras e exposições no mundo.
- Divulgar a imagem do Brasil como um fornecedor mundial de agroenergia e soluções ambientais – álcool combustível, biodiesel, créditos de carbono, tecnologias limpas etc.
- Criar lista de países prioritários para acordos comerciais (acordos de livre comércio e acordos de redução de tarifas) particulares ao Agronegócio Brasileiro.
- Melhorar o ambiente doméstico (alfândegas, portos, solução permanente para compensar o ICMS na exportação, ampliar o alcance das garantias de exportação e melhorar o acesso de empresas menores ao financiamento).
- Adoção de políticas de favorecimento e de proteção, como escaladas tarifárias, drawback e mesmo substituição de exportações.

iii) Decisões de Distribuição e Logística (Incluindo Exportações)

- **Melhoria da infra-estrutura e logística de escoamento da produção agroindustrial**
- Destravar a regulamentação das parcerias público - privada (PPPs).
- Mudar o planejamento no setor de transportes, priorizado a integração.
- Retomar a transferência ao setor privado, de estradas, portos e áreas portuárias.
- Aumentar a oferta na navegação de cabotagem e a participação das hidrovias no transporte de álcool.
- Incentivar construção de dutos pelas refinarias (divisão de custo de construção e direitos de propriedade) para facilitar e estimular a comercialização e produção de álcool.
- Montagem de estoques estratégicos de álcool nas usinas, com incentivos fiscais governamentais, para evitar flutuações de preços e escassez do produto.
- Os estoques reguladores podem melhorar a imagem do setor sucroalcooleiro no Brasil e no Mundo e fornecer segurança do abastecimento no mercado interno e externo.
- Focar ao invés de grandes hidrelétricas nas PCHs com menor custo de construção, menor impacto ambiental e geração de créditos de carbono.
- Incentivar construção de dutos para facilitar e estimular a comercialização e produção de álcool, biodiesel e outros óleos vegetais.

iv) Decisões de Capacitação de Recursos Humanos

- Política conjunta (governo, setor privado, associações verticais e universidades) de formação de recursos humanos extremamente competitivos para o Agronegócio Brasileiro.

- Mapeamento dos cursos técnicos e de graduação essenciais para o Agronegócio, bem como a sua distribuição espacial, e planejamento junto com Ministério da Educação para concessão de bolsas e incentivos à pesquisa.
- Programas de capacitação para trabalhadores do agronegócio, organizado pelas associações verticais, em gestão da qualidade dos alimentos, saúde animal, certificações e rastreabilidade, e sustentabilidade.
- Grande reciclagem profissional dos funcionários públicos ligados aos agronegócios para uma melhor atuação na gestão da qualidade dos alimentos, saúde animal, certificações e rastreabilidade, e sustentabilidade.

v) Decisões de Coordenação e Adequação ao Ambiente Institucional

- **Ambiente regulatório: mix de coordenação pública vs. privada, interações com valores e hábitos de alimentação no Brasil e no Mundo.**
- **Posicionamento governamental na Agronegócio Brasileiro**
- Inovação financeira com mercados futuros e opções: benchmark de casos internacionais.
- Reformular a política de crédito rural e volume de recursos disponíveis tanto pelo governo quanto bancos privados e cooperativas. Atrelar a oferta de crédito ao uso do instrumento de mercado futuro e opções – para neutralizar risco de preço – e a aquisição de uma apólice de seguro rural (produção) – para neutralizar o risco de adversidades climáticas e ataques de pragas e doenças.
- Governo deveria resolver a situação das operações pendentes de crédito rural, contabilizando perdas definitivas e recuperando ativos apresentados pelos produtores como garantias.
- Assegurar a segurança fundiária e proteção ao direito de propriedade rural com penalidades duras para desordeiros e perturbadores da ordem pública, via alterações no código penal, e fiel cumprimento das regras pelo Judiciário (o mesmo modelo da Lei de Crimes Ambientais).
- Descobrir qual é o mix apropriado de uso dos recursos (terra e outros) de um país para alimento e biocombustível.
- Estimular a integração e diversificação da agricultura alimentícia e energética. Aproveitar sinergia e desmistificar expectativa de concorrência, sendo a tecnologia o caminho. Por exemplo, a integração da usina de açúcar e álcool com planta de biodiesel permite adicionar um produto (biodiesel) ao mix de produtos das usinas. Ou, Biodiesel e HBIO é possível saída para problema da soja, foco no mercado interno com venda do óleo para plantas de biodiesel e Petrobrás e barateamento da oferta de farelo no complexo de carnes.
- **Constituição de uma Associação Vertical para cada cadeia produtiva**
- Cadeias produtivas se planejando, em conjunto com o Governo, via associações verticais fortes e representativas. Participação mandatária.
- A coordenação das negociações de comércio exterior na CAMEX precisa ser assessorada pelas Associações Verticais em acordos comerciais envolvendo o agronegócio.
- **Melhoria da relação contratual agricultor/pecuarista – indústria**
- Governo deveria estimular, via Associações Verticais, iniciativas de reprodução do modelo de integração presente na avicultura e suinocultura e também o cooperativismo, associativismo e consórcio de produtores para aquisição de insumos e máquinas, arrendamento de terras, contratos com agroindústrias e exportações com selo do *fair trade* (comércio justo).
- Na relação produtor – indústria, o governo via associações verticais deve estimular a definição de fórmulas de pagamento conforme o modelo Consecana, discutidas e

acordadas entre todos os agentes da cadeia produtiva, sendo adaptadas a cada safra agrícola.

- Associações Verticais devem incentivar o cooperativismo, associativismo e consórcio de produtores para aquisição de insumos e máquinas, arrendamento de terras e contratos com agroindústrias.

A CADEIA PRODUTIVA DO LEITE

Roberto H. Jank Jr.¹

SÍNTESE

RETROSPECTIVA

O Brasil é o sexto maior produtor mundial de leite e deverá ser o terceiro nos próximos 5 anos, mantidas as nossas atuais taxas de crescimento contra o decréscimo registrado por Rússia, Alemanha e França, respectivamente atuais 3º, 4º e 5º maiores produtores mundiais, após EUA e Índia.

A cadeia produtiva do leite no Brasil vem evoluindo de maneira consistente. A produção cresceu 121% entre 1980 e 2005 (Fonte:Embrapa– Gado de Leite) enquanto a população cresceu no mesmo período 64,4%.

Antes colocado entre os maiores importadores mundiais, a partir do ano 2000 o Brasil passou a exportar leite.

Os danos causados por importações excessivas e câmbio irreal ficam evidentes nas menores taxas de crescimento da produção brasileira, principalmente entre 1996 e 1999, anos em que patinamos ao redor de 117 litros de disponibilidade de leite por habitante por ano.

Neste período, após um crescimento de 30% na demanda potencializado pelo ganho de poder aquisitivo proporcionado pelo plano Real, chegamos disponibilizar entre 15 e 20 litros por habitante em leite importado por ano. Considerada a produção anual formal de 70 litros por habitante, o volume importado atingia entre 25 e 30% da demanda da época. Sobre o volume total (formal e informal), a importação chegava a 15%. Foram épocas difíceis; o leite formal brasileiro enfrentava 40% de clandestinidade associados a mais 25% de importações carregadas de práticas desleais de comércio.

Mas neste mesmo período, e por conta destes fatores, o setor teve (e tem) vitórias de políticas classistas expressivas. Durante os anos 90 unificou sua representação classista, antes dispersa.

Conseguiu figurar entre os três primeiros produtos do agronegócio a iniciar processos de análise e obter alíquotas compensatórias para subsídios e dumping na OMC, além do atual acordo de preços com Argentina, Uruguai, Oceania e CE que evitam práticas desleais de comércio e triangulações via Mercosul.

É preciso dizer que o leite, depois do arroz, é o produto mundial com maior nível de subsídios no âmbito do comércio internacional.

Depois do ano 2000, com regras de importação mais claras, fiscalização mais eficiente em produtos lácteos importados, câmbio livre e início das exportações, o leite brasileiro passa a viver nova realidade.

Nós, que chegamos a contribuir negativamente com U\$ 600 milhões na balança comercial do agronegócio nacional, passamos a exportar mais do que importar atingindo superávit na balança de lácteos pela primeira vez na história em 2004, fato repetido em 2005 (tabelas 1 e 2).

Neste mesmo ano já éramos reconhecidos por nossos principais concorrentes – Nova Zelândia e Argentina – como potenciais líderes do comércio internacional para 2015. Especialistas internacionais que reconhecem o chamado efeito “BRIC”, provável

¹Engenheiro Agrônomo, Diretor executivo da Associação para o Progresso do Agronegócio Lácteo - Láctea Brasil, Vice Presidente da Associação Brasileira dos Produtores de Leite - Leite Brasil e diretor presidente da Agrindus S/A, empresa agropecuária de Descalvado, SP.

liderança mundial de potencial produtivo e de consumo de Brasil, Rússia, Índia e China, já comentavam a possível trajetória de liderança mundial do Brasil no setor de laticínios. É preciso ressaltar que os baixos níveis de crescimento do Brasil dos últimos anos comparados aos dos outros três países, tem levado parte dos especialistas a encurtar a sigla para "RIC".

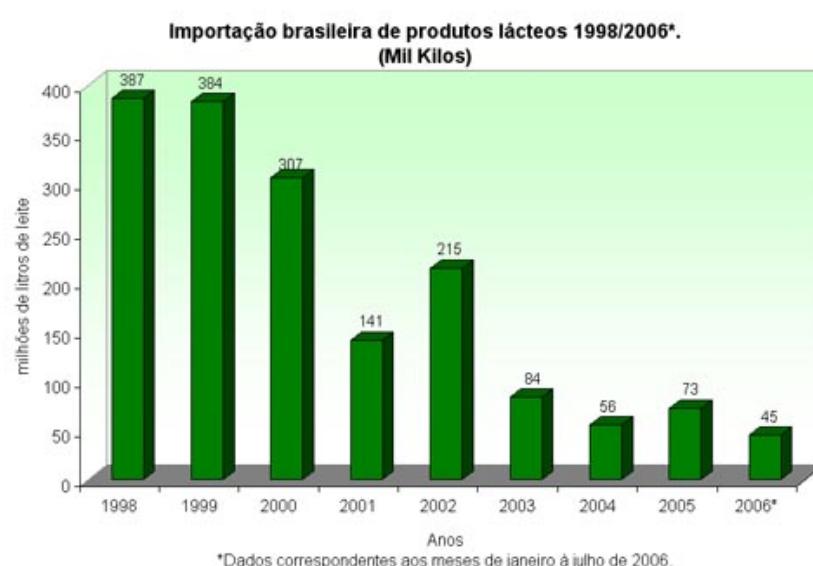
Também reconhecemos a mudança de comportamento de parte da indústria láctea nacional, quando a partir de 1998 passou a sinalizar ao mercado primário diferenciações consistentes de preços por qualidade (sólidos e padrão microbiológico), volume otimizado e distância.

Tabela 1



Fonte: EMBRAPA/Gado de Leite

Tabela 2



Fonte: EMBRAPA/Gado de Leite

MOMENTO ATUAL

Em 2004 e 2005 fechamos o ano com mais de 16 bilhões de litros formais, representando um número próximo a 70% da produção total. É uma prova de ganho de profissionalismo dos segmentos primário e industrial. Ao mesmo tempo ocorreu uma profunda e constante segmentação do mercado de produtos lácteos ao consumidor final, principalmente na área de iogurtes com novas e modernas embalagens, rótulos termo-encolhíveis, novos sabores e opções diet, light, integral, etc... .

Há um ganho expressivo de produção nos maiores laticínios nacionais (tabela 3) e o número de produtores vem caindo constantemente (tabela 4).

Ainda assim há muito a fazer. Em seu recente “Diagnóstico da pecuária leiteira em Minas Gerais e no Brasil”, o Professor Sebastião Teixeira Gomes faz considerações relevantes.

Seu estudo indica que, incluído o capital em terras, apenas o estrato de produtores com produção acima de mil litros por dia mostrou-se viável. Isso nos leva a pensar que se o objetivo é remunerar o capital adequadamente (como de fato ocorre com qualquer ativo de qualquer atividade econômica), o Brasil necessita de apenas 68 mil produtores de leite para os atuais 25 bilhões de litros produzidos. Neste caso o que fazer com os outros 700 mil produtores?

De maneira geral, o trabalho mostra evolução individual em produção, produtividade, uso de ordenha mecânica e refrigeração. O ganho tecnológico e de escala de produção permitiu que a queda de 35% do preço do leite verificada entre 1995 e 2005 não restringisse o expressivo aumento médio de 92% na produção por fazenda, obtido no mesmo período.

Tabela 3

| MAIORES EMPRESAS DE LATICÍNIOS – BRASIL – 2005 | | | | | | | | | | | | |
|--|----------------------|---------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|---------------|---------------|------------|------------|--|
| Class (1) | Empresas/Marcas | Recepção mil litros | | | | | | | Nº prod.(2) | | Litros/dia | |
| | | 2004 | | | 2005 | | | 2004 | 2005 | 2.004 | 2005 | |
| | | Produtores | Terceiros | Total | Produtores | Terceiros | Total | | | | | |
| 1 | DPA (3) | 1.136.327 | 372.740 | 1.509.067 | 1.246.000 | 462.000 | 1.708.000 | 6.112 | 6.110 | 509 | 557 | |
| 2 | ITAMBÉ | 765.000 | 64.500 | 829.500 | 982.000 | 23.000 | 1.005.000 | 6.063 | 7.325 | 346 | 366 | |
| 3 | ELEGÊ | 659.522 | 58.185 | 717.707 | 737.782 | 103.767 | 841.549 | 21.402 | 25.001 | 84 | 81 | |
| 4 | PARMALAT | 288.744 | 117.944 | 406.688 | 388.117 | 203.730 | 591.847 | 4.566 | 4.400 | 173 | 241 | |
| 5 | CCL | 300.943 | 37.494 | 338.437 | 254.057 | 106.067 | 360.124 | 4.461 | 4.388 | 185 | 158 | |
| 6 | EMBARÉ | 222.606 | 33.792 | 256.398 | 250.867 | 55.382 | 306.249 | 3.666 | 2.380 | 166 | 288 | |
| 7 | LATICÍNIOS MORRINHOS | 238.768 | 13.934 | 252.702 | 233.310 | 66.134 | 299.444 | 2.178 | 3.200 | 300 | 199 | |
| 8 | CENTROLEITE | 229.135 | 0 | 229.135 | 258.195 | 10.073 | 268.268 | 4.920 | 5.049 | 128 | 140 | |
| 9 | SUDCOOP | 234.316 | 26.783 | 261.099 | 234.876 | 31.385 | 266.261 | 6.872 | 5.998 | 93 | 107 | |
| 10 | CONFEPAR | 141.439 | 47.869 | 189.308 | 210.543 | 51.690 | 262.233 | 5.467 | 6.152 | 71 | 94 | |
| 11 | BATÁVIA | 209.893 | 0 | 209.893 | 224.561 | 0 | 224.561 | 3.907 | 4.019 | 147 | 153 | |
| 12 | LIDER ALIMENTOS | 141.052 | 10.430 | 151.482 | 184.240 | 18.439 | 202.679 | 4.557 | 5.243 | 85 | 96 | |
| 13 | DANONE | 116.119 | 84.618 | 200.737 | 134.575 | 61.824 | 196.399 | 1.072 | 605 | 297 | 608 | |
| 14 | GRUPO VIGOR | 164.224 | 32.201 | 196.425 | 171.009 | 20.913 | 191.922 | 1.510 | 996 | 298 | 469 | |
| TOTAL | | 4.848.088 | 900.490 | 5.748.578 | 5.510.132 | 1.214.404 | 6.724.536 | 76.753 | 80.866 | 173 | 186 | |

(1) Classificação base recepção (produtores + terceiros) no ano 2005; (2) Posição em 31 de dezembro; (3) Números referentes a compra de leite realizada pela DPA Manufacturing Brasil em nome da Nestlé, da Fonterra, da DPA Brasil e da Itasa

Fonte: Leite Brasil, CNA/Decon, OCB/CBCL e EMBRAPA/Gado de Leite

Tabela 4. Número de produtores das maiores empresas de laticínios no Brasil - 2002/2004.

| Class | Empresas/Marcas | Número de produtores (em mil) | | | Variação (%) no período (2004/2003) |
|-----------------|----------------------|-------------------------------|--------|--------|-------------------------------------|
| | | 2002 | 2003 | 2004 | |
| 1 ^a | DPA | 7.192 | 7.163 | 6.112 | -14,6 |
| 2 ^a | ITAMBÉ | 6.010 | 5.991 | 6.063 | 1,2 |
| 3 ^a | ELEGÊ | 28.665 | 27.676 | 21.402 | -22,6 |
| 4 ^a | PARMALAT | 9.996 | 6.920 | 4.566 | -34,0 |
| 5 ^a | CCL | 4.512 | 6.402 | 4.461 | -30,3 |
| 6 ^a | SUDCOOP | 6.993 | 6.734 | 6.872 | 2,0 |
| 7 ^a | EMBARÉ | 2.884 | 4.413 | 3.666 | -16,9 |
| 8 ^a | LATICÍNIOS MORRINHOS | 4.990 | 3.128 | 2.178 | -30,3 |
| 9 ^a | CENTROLEITE | 4.905 | 5.438 | 4.920 | -9,5 |
| 10 ^a | BATÁVIA | 6.529 | 5.111 | 3.907 | -23,5 |
| 11 ^a | DANONE | 2.470 | 1.274 | 1.072 | -15,8 |
| 12 ^a | GRUPO VIGOR | 1.525 | 1.413 | 1.510 | 6,8 |
| 13 ^a | CONFEPAR | 3.743 | 5.256 | 5.467 | 4,0 |
| 14 ^a | LÍDER ALIMENTOS | 2.807 | 2.634 | 4.557 | 73,0 |
| TOTAL | | 93.221 | 89.553 | 76.753 | -14,2 |

(1) Classificação base recepção no ano 2004

Fonte: Leite Brasil, CNA/Decon, OCB/CBCL e EMBRAPA/Gado de Leite

FUTURO

A julgar pela trajetória do leite nos países desenvolvidos onde o ganho de escala, bio-segurança e qualidade são constantes, o Brasil precisa escolher seu caminho entre o profissionalismo sempre presente nas atividades onde é líder mundial em competitividade comparativa – carnes, laranja, soja, cana e café e a reconhecida “mesmice” que enfrentamos durante anos, transformando nosso setor em “atividade marginal”.

O futuro previsto por nossos concorrentes vai acontecer, mas a velocidade depende de nós.

Apenas recentemente temos normas de origem para 95 % da produção nacional, com a IN 51. É o documento de origem para a exportação.

O marketing institucional que nos EUA trouxe U\$ 4,00 de resultado para cada U\$ 1,00 investido faz parte de nossa agenda para os próximos anos. Sem este fator que é convergente para toda a cadeia, certamente somos mais fracos.

Há um novíssimo problema em pauta; a bioenergia.

O altíssimo custo de oportunidade gerado pelo etanol nas áreas agrícolas vai modificar de forma expressiva o panorama de outras atividades do agronegócio, aí incluído o leite.

Com o atual valor da cana e demanda agressiva de terras para arrendamento, o etanol remunera facilmente o valor do ativo “terra” em 6% ao ano, antes 2%. Este novo paradigma que atinge o centrômetro da cana acompanha regionalmente o leite. Ambas são atividades onde a produção está próxima à indústria; o leite por ser perecível e a cana crua por ter baixo valor adicionado, portanto de custo frete-dependente. Terras do triângulo mineiro, Paraná, sul do MS e Goiás estão entre os objetivos das 92 usinas de açúcar em construção no país. Não por coincidência, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Paraná e Goiás representam 66% da produção brasileira de leite. O novo desafio dos técnicos brasileiros é fazer com que a produção de leite remunere os produtores melhor que o etanol em regime de arrendamento. O expressivo ataque da cana de açúcar ao parque citrícola já é tema de diversos estudos das empresas cítricas paulistas. Certamente vamos nos deparar com o mesmo problema no leite, em futuro próximo.

Incluo MKT, planejamento e direcionamento de financiamentos, exportação e aprofundamento da sinalização mercadológica por parte da indústria como nossa agenda para 2007.

NUTRIÇÃO E REPRODUÇÃO EM BOVINOS

José Eduardo P. Santos¹ e Manoel F. Sá Filho¹

1 INTRODUÇÃO

A ingestão adequada de nutrientes é fundamental para um bom desempenho reprodutivo em bovinos. Tanto o estado nutricional e o metabólico da vaca em reprodução afeta seus parâmetros endócrinos, padrões de crescimento folicular e atividade lútea, e atividade secretória uterina. Estes efeitos acabam influenciando o aparecimento da puberdade, restabelecimento da atividade cíclica pós-parto e estabelecimento e manutenção da gestação. A nutrição tem tanto efeitos diretos como indiretos no desempenho reprodutivo de bovinos. Em animais de alta produção, como vacas de leite de raças especializadas, a nutrição durante o período de transição influencia a ocorrência de distúrbios metabólicos e afecções uterinas e estes acabam alterando o risco da vaca conceber e manter a gestação.

O estabelecimento da puberdade e maturidade sexual em fêmeas bovinas é dependente, entre muitos fatores, da sua taxa de ganho de peso e composição corpórea. O aumento na deposição de gordura corporal e no consumo de matéria seca reduzem o *feedback* negativo causado pelos estrógenos na pulsatilidade de GnRH e LH. O consumo adequado de energia é principal fator nutricional que afeta o desempenho reprodutivo de vacas. Vacas que estão em balanço de energia negativo têm menores concentrações plasmáticas de glicose, insulina e fator de crescimento semelhante a insulina-I(IGF-I); têm uma menor freqüência de pulsos de LH; possuem mais baixas concentrações de progesterona no plasma; e apresentam alterações na atividade ovariana. Os efeitos do balanço energético negativo sobre a fertilidade bovina parecem ser mediados por alterações metabólicas e endócrinas, resultando principalmente num atraso na atividade cíclica pós-parto. Esse atraso na atividade cíclica e falta de exposição a progesterona antes da primeira inseminação artificial pós-parto reduz a taxa de concepção e aumenta o risco de perda de prenhez.

A manipulação da composição da dieta e do manejo alimentar para aumentar o suprimento de energia para fêmeas bovinas geralmente reflete em uma melhora no desempenho reprodutivo desses animais. A suplementação com fontes de gordura polinsaturadas na dieta de vacas em reprodução aumenta a ingestão de energia, altera a secreção de prostaglandina $F_{2\alpha}$ pelo útero, afeta a dinâmica de crescimento folicular e melhora a função luteal, muitas vezes resultando em melhorias de fertilidade. No entanto, dados recentes sugerem que o alto consumo de alimento (alto consumo de energia líquida) pode aumentar a circulação hepática e a catabolização de progesterona pelo fígado, o que afeta a pulsatilidade de LH e o crescimento folicular. No caso de animais não lactantes, a ingestão de quantidades excessivas de energia reduzem a qualidade embrionária e podem diminuir a taxa de concepção. Da mesma forma, a ingestão de quantidades excessivas tanto de proteína bruta ou de proteína degradável no rúmen aumenta a concentração de nitrogênio uréico no sangue e no leite, e altera algumas funções secretórias uterinas, o que pode comprometer a taxa de concepção em novilhas e vacas de leite de alta produção. No entanto, o exato mecanismo pelo qual o excesso de nitrogênio uréico afeta concepção em vacas de leite ainda não está claro. Apesar das evidências indicarem que o nível de proteína na dieta pode interferir na reprodução de vacas de alta produção, os dados de rebanhos com níveis menores de produção parecem ser contraditórios. Em vacas de corte, a baixa concentração de

¹Veterinary Medicine Teaching and Research Center, School of Veterinary Medicine, UC - Davis, 18830 Road 112, Tulare, CA - 93274

proteína bruta na dieta durante os períodos pré e pós-parto influencia o retorno à atividade cíclica, e reduz a taxa de prenhez durante a estação de monta.

Mesmo subjetiva, a análise da condição corporal é um método confiável para a avaliação das reservas corporais em bovinos. Em vacas de leite, a condição corporal muito baixa ou excessiva antes do parto pode ampliar o período de anestro pós-parto, e reduzir as taxas de concepção e de prenhez durante o período de reprodução. Por outro lado, em vacas de corte, apenas a condição corporal muito baixa está associada com atraso no retorno a atividade cíclica pós-parto e decorrente diminuição no desempenho reprodutivo.

2 MATURIDADE SEXUAL

A maturidade sexual é definida como a idade em que o animal atinge o seu máximo potencial reprodutivo. Em fêmeas bovinas, essa idade está diretamente relacionada com a idade à puberdade, que é definida como a idade quando ocorre a primeira ovulação e a fase luteal. Geralmente, são necessários 2 a 3 ciclos estrais com fases luteais normais, ou seja, 40 a 60 dias após a ocorrência da puberdade, para que a fêmea bovina atinja sua maturidade sexual e adquira plena capacidade de conceber e de levar a gestação a termo.

A idade à puberdade é uma característica produtiva fundamental em bovinos. Em países onde a pecuária é avançada, novilhas de leite e de corte atingem a puberdade e entram em reprodução com 10 a 14 e 13 a 15 meses de idade, respectivamente. Em sistemas intensivos de produção de leite e de carne, novilhas devem ter a primeira parição com até 25 meses. Uma idade mais avançada ao 1º parto irá representar severas perdas econômicas nas atividades de pecuária de leite e de corte. No entanto, dados da literatura nacional indicam que a idade à puberdade para novilhas zebuínas está ao redor de 22 a 36 meses, e a idade ao primeiro parto ao redor de 44 a 48 meses de idade (Souza et al., 1995). De acordo com os dados da EMBRAPA-CNPGC citados por Torres (1996), a idade ao primeiro parto do rebanho de corte nacional é de 4 anos, e o intervalo entre partos de 20 a 21 meses. Isso representa uma enorme perda econômica para o produtor e para a indústria pecuária como um todo. É importante salientar que um dos principais motivos para o aparecimento tardio da puberdade nos rebanhos zebuínos nacionais são a sazonalidade da produção de forragens, o manejo deficiente de pastagens, e a inexistência de suplementação alimentar durante o período de crescimento desses animais. Apesar de zebuínos serem mais tardios que os bovinos de raças européias, é possível reduzir a idade à puberdade desses animais para 18 a 20 meses através de manejo nutricional adequado e de terapia hormonal.

A idade à puberdade em novilhas está diretamente relacionada ao seu peso e composição corporal. Novilhas que consomem maior quantidade de energia e apresentam maior taxa de ganho de peso diário atingem a puberdade com menor idade (Ferrel, 1991). Para que as novilhas atinjam a data de parição com idade média de 24 meses, é necessário que elas atinjam a puberdade ao redor de 10 a 12 meses no caso de novilhas de leite, e 12 a 13 meses para novilhas de corte. Isso permitirá que esses animais apresentem pelos menos 3 a 4 ciclos estrais antes do início da estação de monta. Entretanto, no caso de novilhas zebuínas, é difícil observar a ocorrência do primeiro ciclo estral ao redor dos 13 meses. De acordo com as estimativas de Lanna (1998), cerca de 50% das novilhas meio sangue zebuínas estariam aptas para reprodução aos 15 meses de idade, quando alimentadas para obtenção de alto ganho de peso diário. Entretanto, em rebanhos Nelore de corte, mesmo animais com mais de

2 anos de idade apresentam alta proporção de animais pré-púberes, provavelmente devido ao baixo peso corporal e a falta de reservas de gordura.

Sá Filho (2006) avaliou o peso, a condição corporal e a ciclicidade de 617 novilhas Nelore com idade entre 2 e 3 anos em um rebanho no Brasil central. Foi observado um relação quadrática entre o escore de condição corporal e a proporção de animais em anestro. Conforme o escore de condição corporal aumentou, a proporção de animais em anestro foi reduzida (Figura 1).

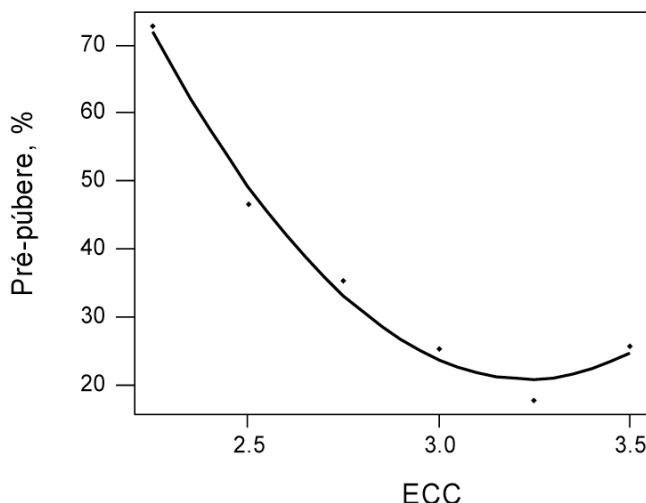


Figura 1. Relação entre a frequência de novilhas Nelore classificadas como pré-púbere entre 2 a 3 anos de idade e o escore de condição corporal (ECC; Sá Filho, 2006).

O aumento no escore de condição corporal resultou num aumento na proporção de animais púberes. Da mesma forma, conforme o peso corporal aumentou, observou-se um aumento na proporção de novilhas púberes, mas esse aumento só ficou claro após os animais atingirem 320 kg de peso vivo (Figura 2).

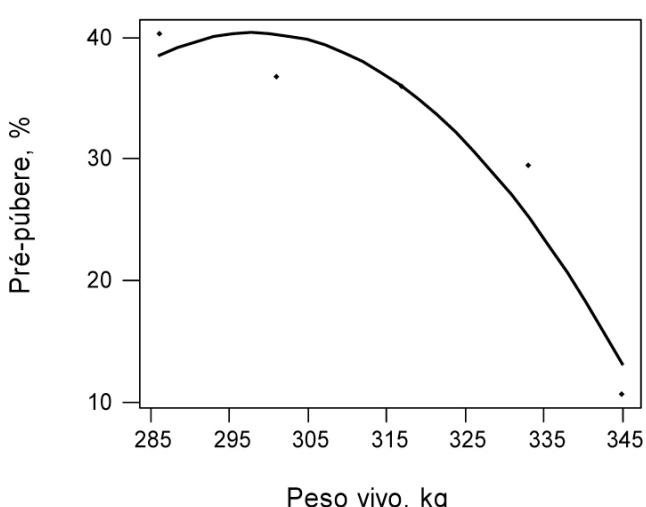


Figura 2. Relação entre a frequência de novilhas Nelore classificadas como pré-púbere entre 2 a 3 anos de idade e o peso vivo (Sá Filho, 2006).

A maior ingestão de energia aumenta a pulsatilidade da secreção do hormônio luteinizante (LH), o que está associado ao aparecimento mais precoce da puberdade (Schillo, 1992). É bastante provável que este efeito esteja relacionado a maior produção de ácido propiônico no rúmen, o qual aumenta as concentrações de glicose sanguínea e, consequentemente estimula a secreção de insulina e fato de crescimento semelhante a insulina (IGF-I). Além disso, a maior ingestão de alimento resulta, de maneira geral, num aumento na síntese de proteína microbiana no rúmen e o fluxo de amino ácidos para o intestino. Alguns amino ácidos têm a capacidade de estimular a secreção de LH.

O estabelecimento da puberdade ocorre de maneira gradual. Durante o período pré-pubere, os baixos níveis de estrógenos secretados pelos folículos ovarianos são capazes de inibir a secreção de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e de LH. No entanto, o plano nutricional parece influenciar a intensidade dessa inibição. Quando ovelhas que haviam sido submetidas à restrição alimentar passaram a ser alimentadas a vontade, a sensitividade ao mecanismo de inibição retroativo exercido pelo estradiol foi reduzido e os níveis de LH foram aumentados (Foster, 1988). Além disso, ovelhas alimentadas a vontade apresentaram uma maior concentração de RNA mensageiro para as duas subunidades de LH. A restrição alimentar também reduziu a amplitude e a freqüência de pulsos de LH após o desafio com GnRH em novilhas pré-puberdes (Ferrell, 1991).

O exato mecanismo pelo qual a maior ingestão de energia acelera a puberdade não está ainda bem esclarecido, mas é provável que vários fatores estejam envolvidos. O aumento na disponibilidade de metabólitos e hormônios que possam potencializar a secreção ou a ação de gonadotrofinas, a redução na sensitividade do tecido hipotalâmico-hipofisário ao *feedback* negativo causado por estrógenos, e o aumento na expressão de genes responsáveis pela codificação de gonadotrofinas são possíveis mecanismos associados com a maior ingestão de energia. Além disso, a maior ganho de peso aumenta a deposição de gordura corpórea, e o tecido adiposo é responsável pela secreção de hormônios e citocinas que influenciam a secreção de GnRH e gonadotrofinas. Schillo (1992) indicou que uma maior ingestão de energia estimula a secreção de GnRH, o que por sua vez aumenta a síntese e liberação de LH. Há indícios de que alguns metabólitos possam estar envolvidos com o aparecimento da puberdade em novilhas. De acordo com a revisão de Lanna (1996), novilhas suplementadas com ionóforos (monensina sódica) atingiram a puberdade mais cedo (Tabela 1). É possível que os níveis mais altos de glicose e insulina, decorrentes da maior produção de ácido propiônico no rúmen em novilhas suplementadas com ionóforos, tenham sido responsáveis pelo surgimento mais precoce da puberdade. O trabalho de Lalman et al. (1993) mostrou que a inclusão de monensina sódica na dieta de novilhas acelerou o aparecimento da puberdade, independente do seu efeito na taxa de ganho de peso e da degradabilidade da proteína no rúmen, porém os resultados são inconclusivos com relação à uma maior concentração de ácido propiônico no líquido ruminal.

Tabela 1. Efeito da suplementação com ionóforos sobre a idade à puberdade de novilhas de corte.

| Ionóforo | Idade à puberdade, d | Ganho, kg/d | Tempo tratamento, d | Referência |
|-----------|----------------------|-------------|---------------------|-----------------|
| Monensina | -14 | 1,1 | 203 | Moseley (1982) |
| Monensina | -24 | 0,63 | 157 | McCartor (1979) |
| Monensina | -9 | 0,37 | 120 | Lalman (1993) |
| Monensina | 0 | 0,56 | 171 | Moseley (1977) |

Fonte: Lanna (1996)

Novilhas devem ser alimentadas para atingir um peso equivalente a 55 a 60% do peso adulto de uma vaca da raça correspondente no início da estação de reprodução. No caso de novilhas de raças leiteiras, esse peso equivaleria a cerca de 350 a 380 kg para raças de grande porte, e 280 a 300 kg para raças de pequeno porte. Já para novilhas de corte de raças zebuínas, o peso ao início da estação de monta deve estar ao redor de 300 a 330 kg. Pesos inferiores no início da estação de monta irão comprometer o desempenho reprodutivo desses animais, afetar o peso ao parto, e trazer consequências negativas ao desempenho animal na primeira lactação, e à fertilidade na estação de monta subsequente (Wiltbank et al. 1985). No caso de novilhas zebuínas, a suplementação alimentar para obtenção de um peso vivo de 300 a 330 kg aos 18 meses parece, muitas vezes, não se justificar economicamente, se a maior parte desses animais não estiverem aptos à reprodução. Além disso, haveria a necessidade de estabelecimento de duas estações de reprodução no rebanho.

3 ATIVIDADE OVARIANA PÓS-PARTO

Está claro que vacas em início de lactação não conseguem consumir quantidade suficiente de substratos geradores de energia para atingir seus requerimentos para produção e manutenção (Butler e Smith, 1989). Esse aumento nas demandas nutricionais acaba antagonizando o retorno da atividade cíclica ovulatória tanto em vacas de leite como de corte. Em vacas de alta produção, o redirecionamento de nutrientes em favor da glândula mamária faz com que as atividades reprodutivas acabem sendo obliteradas em detrimento da sobrevivência e lactação. É interessante notar que o consumo de O₂ baseado na diferença artério-venosa pelo tecido ovariano é bastante alto considerando que o fluxo sanguíneo é negligível em relação a outros tecidos (Tabela 2).

Tabela 2. Fluxo sanguíneo e consumo ou produção líquida de O₂, glicose e lactato por diferentes tecidos em vacas de leite.

| | Tecido | | |
|--------------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| | VDVP ¹ | Fígado ¹ | Ovário ² |
| Fluxo sanguíneo, L/h | | 2.437,0 | 1,1 |
| Consumo de O ₂ , mMol/h | 4.217,0 | 3.911,0 | 960,0 |
| Produção de CO ₂ , mMol/h | 1.297,0 | 1.105,0 | --- |
| Consumo de glicose, mMol/h | 4,7 | --- | 132 |
| Produção de glicose, mMol/h | --- | 840,0 | --- |
| Consumo de lactato, mMol/h | --- | 140 | --- |
| Produção de lactato, mMol/h | 208,1 | --- | 131 |

¹ VDVP = Visceras drenadas pela veia porta; Dados de Reynolds et al. (2003).

² Dados de Rabiee et al. (1997).

Considerando o consumo de glicose e a produção de lactato pelo tecido ovariano na Tabela 2, é estimado que o consumo de equivalente de hexose pelos ovários seja de cerca de 1,6 mols de glicose/dia, ou seja, cerca de 285 g de glicose/dia em vacas de leite. É provável que durante períodos de excasses de nutrientes, a disponibilidade de

glicose para utilização pelos tecidos reprodutivos fique limitada, alterando assim suas funções.

Durante períodos de restrição de energia, substratos normalmente oxidáveis por tecidos acabam sendo priorizado para funções de manutenção celular, atividade circulatória e neuronal (Figura 3; Wade e Jones, 2004).

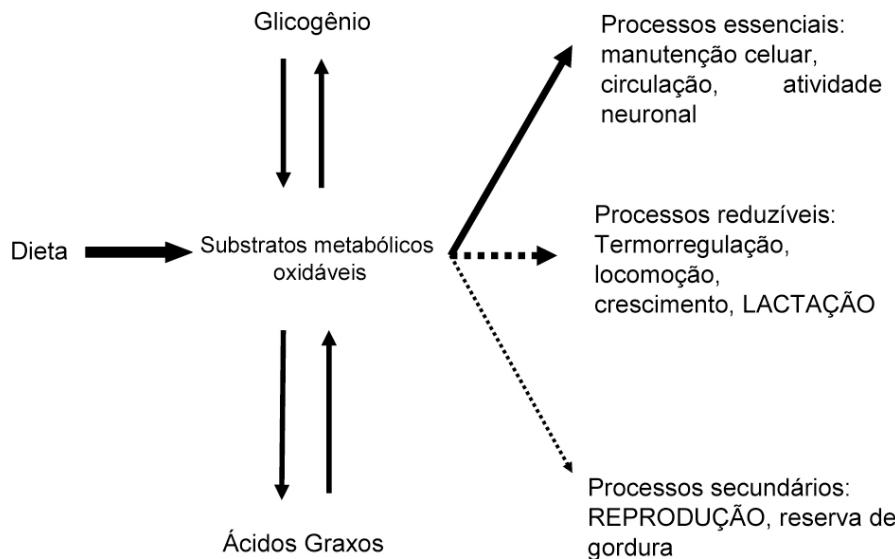


Figura 3. Distribuição de substratos metabólicos de acordo com as prioridades (Adaptado de Wade e Jones (2004))

O balanço de energia líquida (BEL) é a diferença entre a ingestão de energia consumida e a energia requerida para a manutenção e produção. Durante a últimas semana de gestação e as primeiras 4 a 8 de lactação, vacas de leite passam por um período de BEL negativo. Durante o início da lactação, os mecanismos de partição de nutrientes dão prioridade à produção de leite, em detrimento das funções reprodutivas. O atraso no ressurgimento da atividade cíclica ovariana está diretamente relacionado com o balanço energético do animal (Butler, 2000). Em vacas de leite, a primeira ovulação pós-parto ocorre cerca de 10 a 14 dias após o valor mais baixo do balanço negativo de energia líquida (Butler, 2000). A perda excessiva de peso durante o início da lactação pode levar ao anestro em vacas de corte (Rice, 1991), principalmente naquelas fêmeas com uma baixa condição corporal, ou em animais ainda em crescimento (NRC, 1996). Além disso, a subnutrição seja ela causada por falta de disponibilidade de alimento, ou por falta de capacidade de consumo de alimento para atender as necessidades do animal acaba inibindo os sinais de estro e reduzindo a resposta de centros neurais a estímulos excitatórios por redução na quantidade de receptores de estradiol- α (Figura 4).

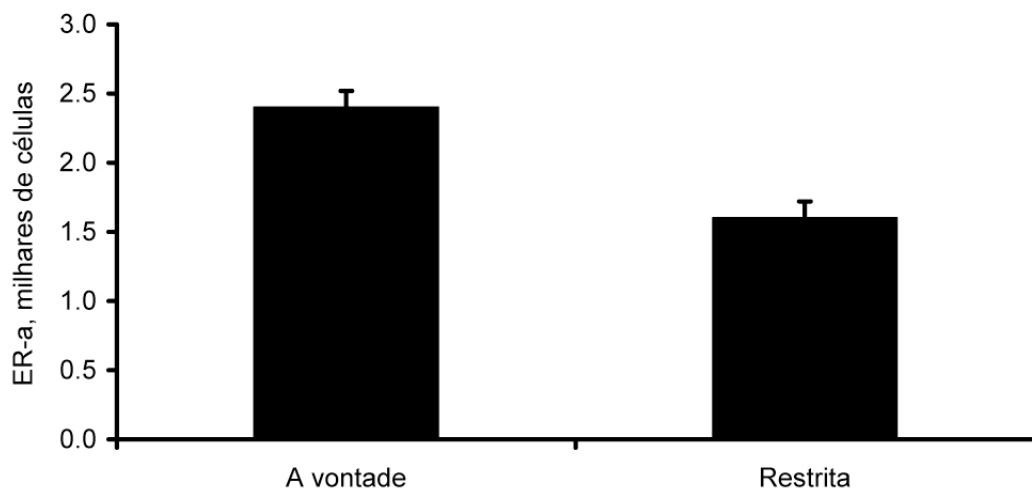


Figura 4. Mudança na quantidade de células contendo receptores α para estrógeno (ER- α) em ovelhas submetidas a diferentes disponibilidades de alimento (Hileman et al., 1999).

Em vacas de leite, há uma correlação entre o escore de condição corporal no início do período de inseminação, ao redor dos 60 dias pós-parto e a proporção de vacas em anestro (Figura 5; Santos et al. 2004).

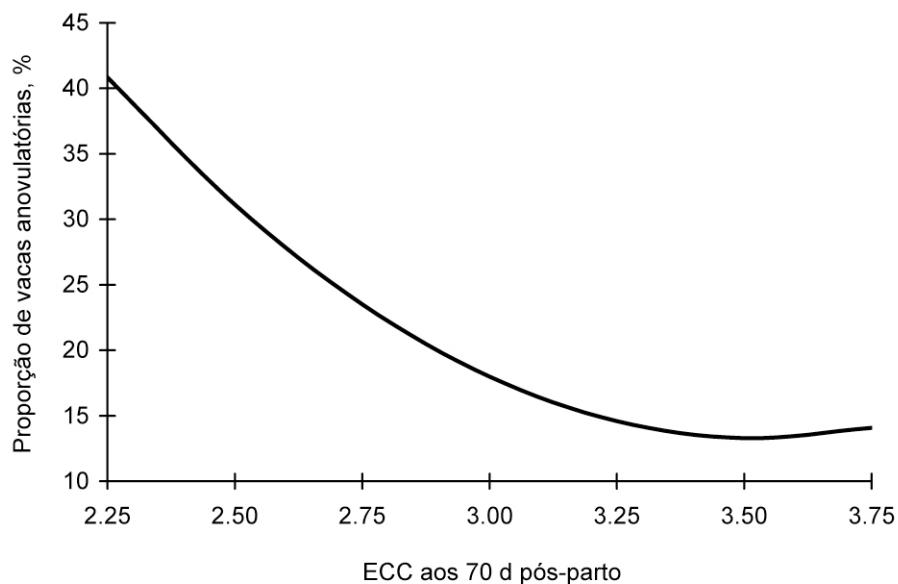


Figura 5. Relação entre a frequência de vacas de leite classificadas como anovulatórias aos 63 dias pós-parto e o escore de condição corporal (ECC; Santos et al., 2004).

A duração do período de anestro pós-parto em vacas de corte em sistema de cria é de extrema importância econômica. Para esses animais, o retorno precoce à atividade ovariana pós-parto irá determinar quando eles estarão aptos para iniciar a estação de monta, e quanto tempo permanecerão ativos no período de monta. Bezerros nascidos de vacas com longo período de anestro pós-parto na estação de monta anterior tendem a ser mais jovens e pesar menos no período de desmama (Ferrell, 1991).

Em gado de leite, o retorno precoce à atividade ciclica ovariana é importante para que se obtenha o maior número de prenhezes logo após o final do período voluntário de espera. Tanto a expressão de sinais de cio quanto a fertilidade do cio aumentam com um aumento no número de ciclos estrais antes da primeria inseminação artificial (IA). A ingestão de energia é o fator de maior efeito no BEL em bovinos. Villa-Godoy et al. (1988) demonstraram que a variação no BEL em vacas de leite pós-parto é mais influenciada pelo consumo de matéria seca ($r = 0,73$) e menos pela produção de leite ($r = -0,25$). Portanto, a diferença entre vacas no que se refere à severidade do BEL negativo está mais relacionada à quantidade de energia que esses animais consomem, e não à quantidade de leite que produzem.

Durante períodos quando o BEL é negativo, as concentrações de glicose, insulina e IGF-1 no sangue são baixas, assim como a freqüência de pulsos de GnRH e LH. As concentrações de progesterona no plasma também são afetadas pelo BEL. Tem sido mostrado que estes metabólitos e hormônios afetam a foliculogênese, a ovulação e a produção de esteróides *in vitro* e *in vivo*. O exato mecanismo pelo qual a energia afeta a secreção de GnRH e de gonadotrofinas ainda não está claro, mas é possível que os níveis séricos mais baixos de glicose, IGF-I e insulina possam mediar este processo. O aumento nas concentrações de insulina restabelece a expressão de receptores de hormônio de crescimento (GHR-1A) tanto no tecido hepático (Butler et al., 2003; Rhoads et al., 2004), assim como no tecido adiposo (Rhoads et al., 2004), o que favorece a secreção de IGF-I e restabelece a produção de estradiol folicular (Butler et al., 2004). Portanto, a melhora no BEL pós-parto associado com a maior ingestão de energia favorece o restabelecimento das concentrações plasmáticas de insulina e IGF-I, o que resulta em folículos mais esteroidogênicos e, provavelmente, capazes de ovularem.

Além dos efeitos do BEL sobre o restabelecimento da atividade ovulatória pós-parto, é possível que fatores endócrinos e metabólicos associados ao BEL que ocorrem durante o período de crescimento de folículos em estágios iniciais de crescimento acabem afetando a qualidade dos ovócitos e dos CL subsequentes a ovulação já no período de inseminação. Para testar essa hipótese, Kendrick et al. (1997) alocaram aleatoriamente 20 vacas de leite a um dos dois tratamentos formulados para que as vacas consumissem cerca de 3,6% (alto nível de energia) ou 3,2% (baixo nível de energia) de matéria seca em relação ao seu peso corporal. Os folículos foram aspirados transvaginalmente duas vezes por semana, e os oócitos foram classificados com base na densidade e homogeneidade celulares. As vacas com BEL mais favorável tiveram níveis mais altos de IGF-I intrafolicular e de progesterona plasmática, e apresentaram uma tendência a produzir maior número de oócitos de boa qualidade.

4 MANEJO NUTRICIONAL PARA AUMENTAR A INGESTÃO DE ENERGIA

O manejo nutricional visando minimizar a intensidade e a duração do BEL negativo pode melhorar o desempenho reprodutivo. O primeiro e mais importante fator que afeta o consumo de energia em vacas de leite, e possivelmente em vacas de corte, é a disponibilidade de alimento (Grant e Albright, 1995). Portanto, os animais devem sempre ter alimento à disposição, e a dieta deve ser palatável e de alta qualidade para assegurar uma máxima ingestão de matéria seca. Entretanto, o CMS é limitado durante o fim da gestação e o início da lactação, comprometendo muitas vezes o consumo total de energia e o desempenho reprodutivo. Há diversas estratégias para alterar a ingestão de energia em bovinos:

4.1 CARBOIDRATOS

O consumo de energia aumenta linearmente com o aumento na proporção de grãos na dieta até 55 ou 60% da matéria seca. Dietas com mais de 60% de concentrado e conteúdo limitado de fibra em detergente neutro estão associadas com maior osmolaridade ruminal, menor pH no rúmen, e queda na ingestão de matéria seca. Dietas com grandes quantidades de concentrado têm maior quantidade de carboidratos não fibrosos (CNF). O amido é o CNF mais importante em dietas de bovinos de alta produção. A degradação do amido no rúmen aumenta a proporção de propionato com relação aos outros ácidos graxos voláteis, e estimula a síntese de glicose pelo fígado. Tanto a glicose quanto o propionato são substâncias que estimulam a secreção de insulina. Dietas com alto nível de amido degradável no rúmen aumentam a produção de glicose pelo fígado (Theurer et al., 1996) e as concentrações de glicose e insulina no plasma (Santos et al., 2000). Tem sido demonstrado que o melhor *status* energético aumenta os níveis de IGF-I e insulina no plasma de bovinos (Spicer e Echternkamp, 1995). Insulina e IGF-I têm efeitos diretos em células ovarianas em cultivo *in vitro*. Alguns desses efeitos incluem o estímulo da mitogênese nas células granulosas e da produção de progesterona pelas células da granulosa e luteais (Spicer e Echternkamp, 1995). Santos et al. (2000) observaram que vacas de leite alimentadas com dietas com maiores níveis de amido degradável no rúmen tiveram maiores níveis de progesterona no plasma durante os dois primeiros ciclos estrais pós-parto. O fornecimento de maiores quantidades de amido degradável no rúmen para vacas de leite no início da lactação reduziu a perda de condição corporal, aumentou o BEL e a reduziu o período durante o qual as vacas apresentaram BEL negativo. No entanto, é sabido que a maior ingestão de energia após o início da lactação está também relacionada com maior metabolização de hormônios esteróides, como a progesterona (Figura 6).

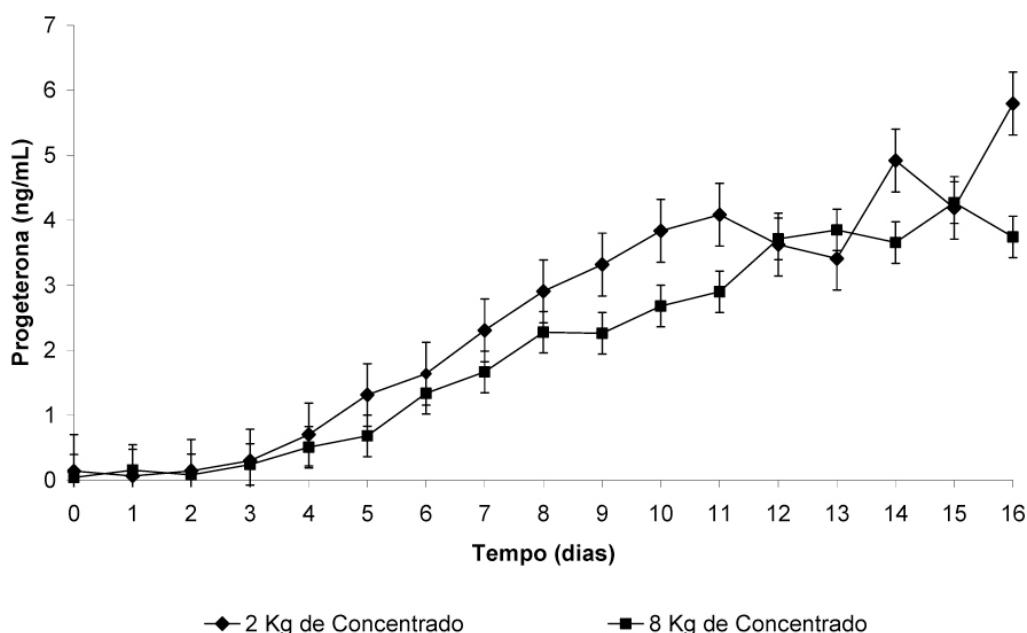


Figura 6. Concentrações de progesterona plasmática durante os primeiros 16 dias do ciclo estral em vacas Holandesa não lactantes que receberam 2 ou 8 Kg/d de concentrado (Santos, 2005).

Apesar de reduzir as concentrações plasmáticas de progesterona por um aumento em seu metabolismo hepático (Sangsritavong et al., 2002), a melhora no balanço energético e o maior suprimento de substrato oxidável como a glicose favorece a concentração de hormônios como insulina e IGF-I tanto no plasma como no líquido folicular. Em vacas recebendo 2 ou 8 kg de alimento concentrado, a concentração de IGF-I no líquido folicular foi maior nos animais recebendo a maior quantidade de concentrado (Figura 7; Santos, 2005).

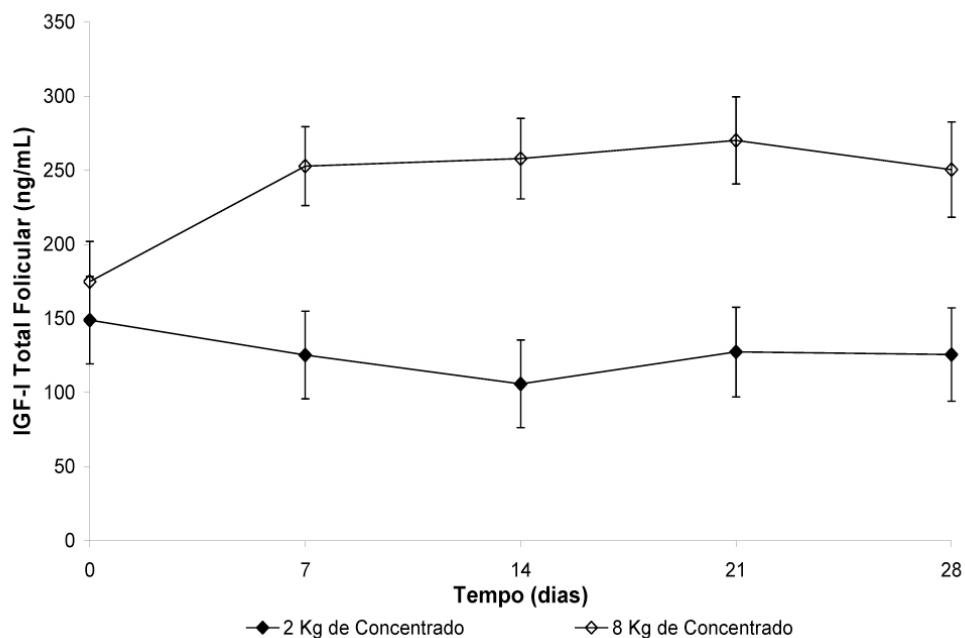


Figura 7. Concentrações de IGF-I total no líquido folicular nos dias 0, 7, 14, 21 e 28 do estudo em vacas recebendo 2 ou 8 kg/d de alimento concentrado (Santos, 2005).

Gong et al. (2002) alimentou vacas Holandesas de baixo e alto potencial genético para produção de leite com dietas isocalóricas, mas diferindo na capacidade de induzir aumentos na concentração de insulina no sangue. Os autores observaram que a dieta confeccionada para aumentar a insulina plasmática reduziu o intervalo entre o parto e a primeira ovulação e aumentou a proporção de vacas que ovularam nos primeiros 50 dias pós-parto, com ligeira melhora na taxa de concepção (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito de dietas formuladas para conferir diferentes concentrações de insulina sobre parâmetros reprodutivos de vacas Holandesas de baixo e alto mérito genético (Gong et al., 2002).

| | Dieta | | | |
|---|----------------|-------|---------------|-------|
| | Baixa insulina | | Alta insulina | |
| Mérito genético | Alto | Baixo | Alto | Baixo |
| Insulina plasmática, ¹ ng/mL | 0,34 | 0,21 | 0,48 | 0,32 |
| Ovulação até 50 d pós-parto, ¹ % | 60 | 50 | 100 | 80 |
| Dias até a 1 ^a ovulação | 43 | 54 | 28 | 41 |
| Taxa de concepção 1 ^a IA, % | 62,5 | 37,5 | 66,7 | 44,4 |

¹ Effect of high-insulin diet ($P < 0.05$)

4.2 IONÓFOROS

Os ionóforos monensina sódica e lasalocida são antibióticos que aumentam a eficiência alimentar através da alteração seletiva dos padrões de fermentação ruminal. A adição de ionóforos à dieta de vacas de leite e de corte diminui a degradação de proteína no rúmen, e aumenta a produção e concentração de propionato ruminal, sem alterar a concentração total de ácidos graxos voláteis (Bagg, 1997). Dietas que aumentam o propionato ruminal resultam maiores concentrações de glicose e insulina no sangue, o que poderiam mediar melhorias no desempenho reprodutivo. A Tabela 4 apresenta resultados de estudos com ionóforos sobre o desempenho reprodutivo de vacas de corte. Além destes resultados, há indícios de que a suplementação com ionóforos pode acelerar o aparecimento da puberdade em novilhas (Tabela 1).

Tabela 4. Efeito de ionóforos sobre o desempenho reprodutivo de vacas de corte.

| Referência | Intervalo Parto-Ovulação, d | | $P^1 <$ | Taxa de Prenhez, % | | $P <$ |
|------------------------|-----------------------------|----------|---------|--------------------|----------|-------|
| | Ionóforo | Controle | | Ionóforo | Controle | |
| Turner et al. (1977) | 30 | 42 | 0,05 | ND ² | ND | |
| Turner et al. (1977) | 49 | 48 | NS | ND | ND | |
| Belcher et al. (1980) | 59 | 69 | 0,10 | 82 | 78 | NS |
| Belcher et al. (1980) | 67 | 72 | 0,10 | | | |
| Turner et al. (1980) | 41 | 44 | NS | 100 | 84 | 0,10 |
| Clanton et al. (1981) | ND | ND | | 96 | 100 | NS |
| Clanton et al. (1981) | ND | ND | | 96 | 93 | NS |
| Clanton et al. (1981) | ND | ND | | 88 | 82 | NS |
| Hardin e Randel (1983) | 65 | 86 | 0,01 | ND | ND | |
| Hardin e Randel (1983) | 92 | 138 | 0,03 | ND | ND | |
| Média | 57,6 | 71,3 | | 92,4 | 87,4 | |

Adaptado de Randel (1990).

¹ NS: estatisticamente não significativo; ² ND: não disponível.

Estudo no Brasil com vacas da raça Nelore indicou que o uso de monensina adicionada a mistura mineral para atingir um consumo estimado de 110 mg/vaca/dia de 30 dias antes do parto até os 90 dias pós-parto alterou respostas hormonais e metabólicas e a taxa de ovulação ao estímulo com 50 ug de GnRH de vacas em anestro (Tabela 5; Biluca, 2005). Entretanto, vale ressaltar que a mistura mineral contendo monensina também recebeu polpa cítrica, sugerindo que as diferenças entre os tratamentos não ficou restrita apenas a adição de monensina sódica.

Tabela 5. Efeito da incorporação de monensina sódica a mistura mineral de vacas nelore sobre parâmetros metabólicos e hormonais e resposta ovulatória (Biluca, 2005).

| | Tratamento | | |
|------------------------|------------|-----------|------|
| | Controle | Monensina | P < |
| Mudança de ECC | -0,19 | 0,0 | 0,01 |
| AGL, mEq/L | 1,014 | 0,884 | 0,01 |
| IGF-I, ng/mL | 85,1 | 118,5 | 0,01 |
| Diâmetro folicular, mm | 9,6 | 10,1 | 0,03 |
| Ovulação, % | 31,5 | 35,9 | 0,02 |

É interessante notar que conforme a concentração de IGF-I no plasma aumentou, observou-se um aumento linear na taxa de ovulação em resposta ao estímulo com GnRH (Figura 8). Isso indica que animais em melhor estado metabólico, indicado pela maior concentração de IGF-I tiveram folículos com maior capacidade de resposta ovulatória.

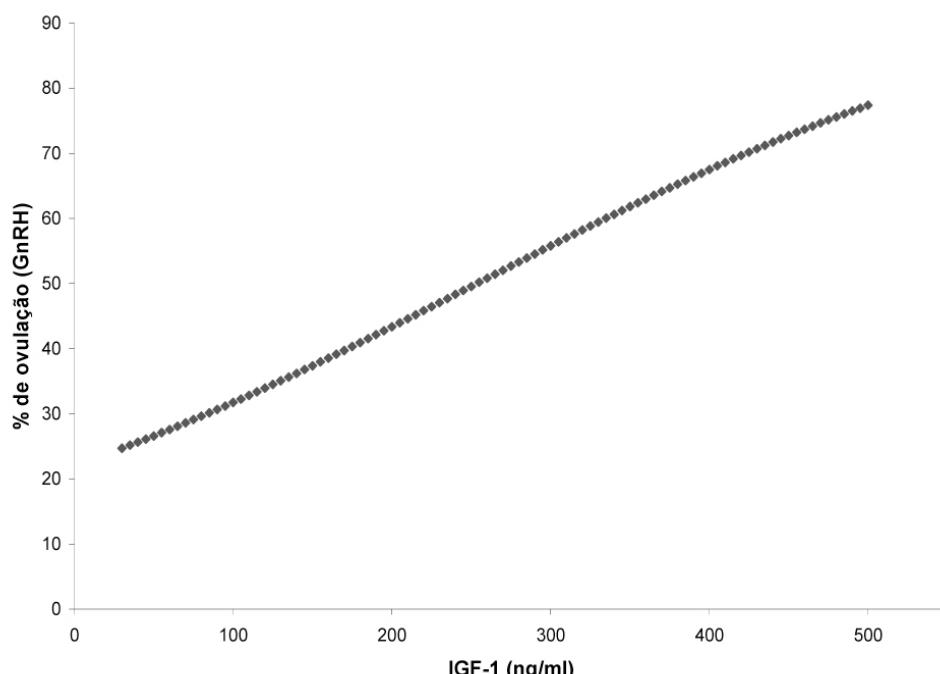


Figura 8. Relação entre a concentração plasmática de IGF-I e a taxa de ovulação em vacas Nelore em anestro aos 54 dias pós-parto após estímulo com 50 mcg de GnRH (Biluca, 2005).

Uma das dificuldades de suplementar monensina em misturas minerais em animais a pasto é a inibição da ingestão da mistura causada pelo inóforo. Para reverter isso, normalmente adiciona-se alguma outra fonte de alimento.

Um dos efeitos do uso de monensina em vacas de leite é a redução na incidência de doenças pós-parto relacionadas ao metabolismo energético (Duffield et al., 2002). Por isso, acredita-se que o uso de monensina possa melhorar o desempenho reprodutivo em vacas de leite. Entretanto, dados de 3 experimentos extensivos com milhares de vacas de leite na Austrália (Beckett et al., 1998), Canadá (Duffield et al., 1999) e Europa (Heuer et al., 2001) demonstram claramente que o uso de monensina na forma

de cápsula de liberação lenta ou adicionada a dieta não alterou os parâmetros reprodutivos de vacas de leite em lactação (Tabela 6).

| Tabela 6. Efeito de ionóforos sobre o desempenho reprodutivo de vacas de leite. | | | | | | |
|---|--------------------------------|----------|------|----------------------|----------|------|
| | Intervalo Parto-Inseminação, d | | | Taxa de Concepção, % | | |
| Referência | Ionóforo | Controle | P < | Ionóforo | Controle | P < |
| Beckett et al. (1998) ⁴ | --- | --- | 0,51 | 54,5 | 58,2 | NS |
| Duffield et al. (1999) ¹ | 73 | 76 | NS | 35,2 | 34,5 | NS |
| Heuer et al. (2001) ² | 82,9 | 80,0 | 0,21 | 57,5 | 51,3 | 0,34 |
| Heuer et al. (2001) ³ | 81,0 | 80,0 | 0,08 | 44,1 | 48,8 | 0,54 |
| Média | 79,0 | 78,7 | | 47,8 | 48,2 | |

¹Cápsula de liberação lenta contendo 32 g de monensina administrada antes do parto.

²Tratamento com monensina na dieta em diferentes concentrações iniciado após o parto.

³Tratamento com monensina na dieta em diferentes concentrações iniciado após o parto.

⁴Cápsula de liberação lenta contendo 32 g de monensina administrada aos 40 dias antes da data prevista de parto e, novamente, aos 50 dias após o parto. Animais em pastejo com suplementação alimentar. Intervalo parto-primeira IA não diferiu entre os tratamentos.

4.3 SUPLEMENTAÇÃO COM GORDURA E ÁCIDOS GRAXOS

Gordura é utilizada na dieta de ruminantes para aumentar a concentração de energia e melhorar o desempenho animal. Dietas de gado de leite e de corte sem nenhuma gordura suplementar contêm aproximadamente 2 a 3% de ácidos graxos de cadeia longa de origem vegetal, os quais são predominantemente mono e poli-insaturados.

A influência do nível de gordura na dieta sobre as funções reprodutivas ainda não é totalmente compreendida, e a maior parte das pesquisas com lipídeos para ruminantes tem se concentrado nos resultados nutricionais, e não nas funções reprodutivas. Staples et al. (1998) revisou vários aspectos da adição de gordura à dieta sobre o desempenho reprodutivo de vacas de leite (Tabela 7).

| Tratamento ¹ | Vacas/ Trt | CMS | Leite | PS ² | TC ³ 1 ^a IA | TC | TP ⁴ | IA / Concepção |
|-------------------------|---------------|------|-------|-----------------|--------------------------------------|------|-----------------|----------------|
| | | | | | Kg/d | | | |
| Controle | 120 | 20,6 | 30,3 | 116,0 | ND ⁵ | ND | ND | 2,04 |
| CA ou SG | 117 | 20,2 | 30,7 | 113,7 | ND | ND | ND | 2,02 |
| Controle G. Inerte | 629 | 20,5 | 31,1 | 109,0 | 43,1 | 74,0 | 65,8 | 1,91 |
| | 613 | 20,0 | 33,5 | 102,2 | 44,6 | 77,8 | 62,6 | 1,89 |
| Controle G. Animal | 50 | 22,3 | 31,4 | 88,0 | 33,0 | ND | 69,0 | 1,36 |
| | 50 | 22,0 | 32,3 | 95,0 | 44,0 | ND | 78,0 | 1,25 |
| Controle FP | 451 | 22,7 | 38,2 | 86,5 | 49,3 | 46,5 | 58,3 | 1,60 |
| | 466 | 22,5 | 38,4 | 83,0 | 46,3 | 56,8 | 64,8 | 1,46 |
| Controle Gordura | 1250 | 21,4 | 32,7 | 102,1 | 43,5 | 63,3 | 65,3 | 1,81 |
| | 1246 | 21,0 | 34,0 | 98,4 | 45,3 | 69,0 | 66,3 | 1,61 |
| Diferença, % | | -1,9 | +4,0 | -3,6 | +4,1 | +9,0 | +1,5 | -11,0 |

Adaptado de Staples et al. (1998). Médias de 20 estudos com 40 comparações.

¹CA = caroço de algodão, SG = soja grão, G = gordura; FP = farinha de peixe.

²Período de serviço; ³ TC 1^a IA = taxa de concepção à primeira inseminação artificial; ⁴ TP = taxa de prenhez; ⁵ Não disponível.

A suplementação com ácidos graxos para bovinos não só aumenta a densidade energética da dieta, mas também fornece substrato na forma de acetil-CoA para síntese de hormônios esteróides, altera a expressão gênica em tecidos reprodutivos, modula a secreção de prostaglandinas. Devido a esses efeitos, têm havido um aumento considerável em pesquisas avaliando o uso de diferentes fontes de ácidos graxos, principalmente aqueles mais insaturados sobre parâmetros reprodutivos em bovinos. É importante notar que para que esses ácidos graxos insaturados tenham efeitos benéficos na reprodução bovina, eles devem resistir a biohidrogenação ruminal e serem absorvidos no intestino delgado tal qual como foram fornecidos na dieta.

De maneira geral, a suplementação com fontes de gordura na dieta de vadas de leite e de corte aumenta as concentrações de colesterol e progesterona no plasma sanguíneo e o crescimento do folículo ovulatório. Vacas recebendo gordura no período pós-parto têm folículo dominante com maior diâmetro e, potencialmente com maior capacidade ovulatória. Quando fornecidos para aumentar a densidade energética da dieta, o uso de ácidos graxos geralmente têm efeito benéfico no desempenho reprodutivo de vacas de leite quando oferecidos no período pré-parto (Tabela 8) ou pós-parto (Tabela 9).

Tabela 9. Efeito da suplementação com ácidos graxos livres saturados pré-parto sobre o desempenho reprodutivo de vacas de leite (Ferguson et al., 1990).

| | Tratamento | |
|------------------------------|------------------|------------------|
| | 2,9% gordura | 4,6% gordura |
| Vacas, n | 40 | 41 |
| Intervalo parto – prenhez, d | 141 ^a | 110 ^b |
| Gestantes, % | 58 ^c | 86 ^d |

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha ($P < 0.05$).

Tabela 10. Efeito da suplementação com 500 g de ácidos graxos livres saturados pós-parto sobre o desempenho reprodutivo de vacas de leite (Ferguson et al., 1990).

| | Tratamento | |
|----------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|
| | Controle, sem gordura suplementar | 500 g/d ácidos graxos saturados |
| Vacas, n | 138 | 115 |
| Concepção a 1 ^a IA, % | 42,6 ^a | 59,1 ^b |
| Concepção após todas IA, % | 40,.. ^a | 59,3 ^b |
| Gestantes, % | 86,2 ^c | 93,0 ^d |

^{a,b} Letras diferentes na mesma linha ($P < 0.05$).

Cullens et al. (2005) avaliou o efeito do momento da adição de uma fonte de ácidos graxos rico em ácido linoéico na forma de sabão de Ca sobre parâmetros reprodutivos de vacas de leite. O grupo controle não recebeu nenhuma gordura suplementar, enquanto que as vacas suplementadas com gordura receberam a fonte de ácidos graxos iniciando ou no período pré-parto, ou logo após o parto, ou após 28 dias pós-parto. Quando os tratamentos com suplementação com ácidos graxos foram combinados, a taxa de concepção a primeira IA pós-parto aumentou ($P = 0.09$) de 27,3% (3/11) para 58,1% (18/31).

Em um experimento com um total 1,069 vacas Holandesas em lactação, Juchem et al. (2006) forneceu cerca de 400 g de ácidos graxos na forma de sebo bovino, o qual é altamente saturado ou moninsaturado (6,3% de ácidos graxos polinsaturados) ou sabão de Ca de uma mistura de óleo de palma e óleo de peixe (13% de ácidos graxos polinsaturados). Esses tratamentos foram delineados para fornecer cerca de 0 e 20 g/dia, respectivamente, de uma combinação de ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). A ingestão de matéria seca, produção de leite e de leite corrigido para 3,5% de gordura foram similares entre os tratamentos. A adição de EPA e DHA a dieta não alterou as taxas de concepção aos 28, 38 e 66 dias após a primeira IA.

O mesmo grupo (Juchem et al., 2004a, b) avaliou o efeito da adição de sabão de Ca de óleo de palma ou de uma mistura de ácido linolêico e monoenoíco trans a vacas de leite durante o final da gestação até os primeiros 70 dias de lactação. No período pré-parto, as dietas foram formuladas para conter cerca de 1,9% da matéria seca com a fonte suplementar de gordura com o objetivo de atingir uma ingestão de cerca de 200 g/d de ácidos graxos do suplemento. No período pós-parto, a adição a dieta foi de 1,5% da matéria seca para atingir uma ingestão de ácidos graxos da fonte suplementar de 350 g/dia. A produção de leite foi similar entre os dois tratamentos, mas a fonte de gordura contendo ácidos graxos trans reduziu a síntese de gordura pela glândula mamária e a produção de leite corrigido para gordura. A taxa de concepção após a primeira IA foi mais alta para as vacas alimentadas com a combinação de ácido graxos linolêico e trans (36.1 vs 28.1%; $P = 0.09$).

5 EFEITO DA NUTRIÇÃO SOBRE A TAXA DE FERTILIZAÇÃO E QUALIDADE EMBRIONÁRIA

5.1 VACAS NÃO SUPEROVULADAS

A literatura abrangendo os efeitos da nutrição sobre a qualidade de ovócitos é bastante escassa e poucos estudos reportaram efeitos detalhados de fatores nutricionais na características de ovócitos. McEvoy et al (1995) observou que a restrição alimentar aumentou a quantidade de ovócitos coletados de ovelhas considerados viáveis. Em bovinos, a restrição alimentar prévia ao abate dos animais e coleta dos ovários aumentou o desenvolvimento *in vitro* de ovócitos colhidos de folículos pequenos (McEvoy et al., 1997).

Estudos conduzidos na Irlanda com novilhas observaram que o fornecimento de dietas com alta energia à vontade reduziu a qualidade e o desenvolvimento *in vitro* de ovócitos (Nolan et al., 1998a; Nolan et al., 1998b; Yaakub et al., 1999). Nolan et al. (1998a) forneceram uma dieta considerada de baixo valor nutricional (1 kg/d de concentrado e 3 kg/d de feno) ou uma dieta considerada de alto valor nutricional (7 kg/d de concentrado e feno à vontade). Ovócitos foram coletados via transvaginal por aspiração durante várias semanas. Foi observado que o fornecimento da dieta de alto valor nutricional aumentou o número de folículos aspirados por coleta, mas reduziu as porcentagens de ovócitos apresentando divisão (estágio de 2 células) e de blastocistos obtidos pelo cultivo de ovócitos (Tabela 11).

Dados preliminares de Lozano et al. (2000) demonstraram que quando vacas de leite receberam diferentes quantidade de concentrados (3,5 kg/d vs 6,5 kg/d) o número de ovócitos coletados via aspiração transvaginal e a porcentagem de ovócitos que progrediram para o estágio de duas células não foi diferente. No entanto, quando esses ovócitos foram fertilizados *in vitro*, a porcentagem que progrediu para o estágio de

duas células foi maior para o grupo alimentado com quantidade reduzida de concentrados. Um dos problemas com os dados obtidos pelo grupo de pesquisadores da Irlanda é a falta de uma descrição mais detalhada do consumo total de nutrientes pelos animais experimentais. Todos esses experimentos não oferecem valores de consumo total de energia metabolizável e de proteína. Além disso, as alterações feitas nas dietas não só alteraram o consumo total de matéria seca, mas também alterou a composição nutricional da ração fornecida, o que dificulta a interpretação dos dados. Vale também salientar que, na maioria dos estudo, o animal utilizado foi a novilha ou ovelha e não a vaca em lactação. Vacas em lactação submetidas a restrição alimentar sofreriam de balanço negativo de nutrientes, o que é sabido afetar o seu desempenho reprodutivo.

Kendrick et al. (1999) observou que o balanço de energia líquida no início da lactação pode afetar a qualidade de ovócitos coletados por aspiração transvaginal. Vacas em lactação recebendo uma dieta com menor concentração energética e em maior balanço negativo de energia produziram menos ovócitos considerados de boa qualidade. Apesar desses dados não esclarecerem completamente como a nutrição afeta os ovócitos, está claro que o consumo de energia pode influenciar a qualidade de ovócitos em novilhas em crescimento e vacas em lactação.

Tabela 11. Efeito do tipo de dieta sobre o número de folículos e a taxa de formação de blastocistos *in vitro*.

| Item | Dieta | | P < |
|--|-------|------|------|
| | Baixa | Alta | |
| Novilhas, n | 16 | 16 | |
| Número de coletas | 72 | 72 | |
| Número de folículos aspirados por coleta | 6,4 | 7,5 | 0,05 |
| Número de ovócitos recuperados por coleta | 2,2 | 2,3 | NS |
| % ovócitos apresentando divisão | 73,0 | 61,8 | 0,05 |
| % blastocistos obtidos por ovócito cultivado | 24,1 | 12,7 | 0,01 |

Adaptado de Nolan et al. (1998a).

5.1.1 ÁCIDOS GRAXOS

A adição de gordura a dieta de vacas em lactação tem, geralmente, efeito positivo sobre o desempenho reprodutivo. Parte desse efeito pode ser atribuído a um aumento na densidade energética da dieta, mas mesmo quando o consumo de energia não é alterado, alterações metabólicas e endócrinas são observadas, o que sugere que os ácidos graxos possam também ser os mediadores desse benefício. De fato, um dos achados mais consistentes com a suplementação com gordura é o aumento nas concentrações sanguíneas de progesterona, independente do consumo de energia.

Devido aos efeitos distintos de fontes de ácidos graxos no metabolismo uterino e taxa de concepção de vacas em lactação, nós avaliamos o efeito da fonte de ácido graxo na forma de sabão de Ca na taxa de fertilização e qualidade embrionária de vacas de leite em início de lactação (Cerri et al., 2004). Cerca de 154 vacas holandesas foram alocadas a uma das duas dietas que diferiam apenas na fonte de ácidos graxos: uma rica em ácidos graxos saturados e monosaturados proveniente de óleo de palma (OP) e a outra rica em ácido linoléico e uma mescla de ácidos graxos monoenoicos com 18 C na configuração trans (ALT). As dietas foram fornecidas dos 25 dias antes do parto aos primeiros 70 dias de lactação. Após a sincronização da ovulação com o programa Ovsynch, as vacas foram inseminadas e os uteros lavados 5 dias após a IA. Um total de 161 ovulações foram observadas e 14 (18,7%) e 12 (15,2%) das no grupos OP and

ALT, respectivamente, tiveram dupla ovulação na IA. O número de estruturas coletadas foi de 45 e 41 para o OP e ALT, respectivamente, e a taxa de recuperação (número de estruturas/número de corpos lúteos) foi similar para ambos tratamentos (53,4%). O número de espermatozóides acessórios na zona pelúcida foi superior ($P < 0.001$) para o grupo ALT que OP (34.3 vs 21.5), o que pode explicar a maior ($P = 0.10$) taxa de fertilização para as vacas que receberam ALT (87,2 %) que para as vacas que receberam OP (73,3%). As vacas que receberam ALT também tiveram embriões de melhor qualidade já que uma maior proporção ($P = 0.06$) deles foi classificadas com excelentes ou bons (73.5% para ALT vs 51.5% para OP). Além disso, o número total de blastômeros/embrião foi superior ($P = 0.13$) para as vacas na dieta suplementada com ALT que OP (19.4 vs 14.0) e a proporção de blastômeros vivos também foi maior para ALT que OP (94.2 vs 85.3%; $P = 0.09$). Estes resultados indicam que a manipulação na fonte suplementar de gordura oferecida para vacas no final da gestação e início de lactação influencia a taxa de fertilização e qualidade embrionária. É provável que esses efeitos positivos tenham sido mediados por uma melhora na qualidade dos ovócitos dessas vacas.

5.2 VACAS SUPEROVULADAS

Alguns pesquisadores têm sugerido que reduções drásticas no consumo de alimento por período limitado de tempo podem melhorar a qualidade embrionária, apesar de poder reduzir a resposta superovulatória. Yaakub et al. (1999b) alocou 76 novilhas à quatro tratamentos utilizando um delineamento fatorial de 2x2. Os tratamentos consistiram de dois concentrados, um à base de cevada e outro à base de polpa cítrica e de beterraba, com consumo restrito ou à vontade. As novilhas alimentadas com concentrado restrito (3 kg/d) receberam silagem de gramínea à vontade. Já as novilhas recebendo concentrado à vontade, receberam apenas 1 kg (matéria seca) da mesma silagem de gramínea. As novilhas foram superovuladas com tratamentos com FSH e os embriões coletados após o abate das novilhas nos entre os dias 6 e 8 após a inseminação. As novilhas recebendo quantidade restrita de concentrado produziram mais embriões e estes eram de melhor qualidade (Tabela 12).

Tabela 12. Efeito da quantidade de concentrado consumido sobre a resposta superovulatória e a qualidade embrionária em novilhas de corte.

| Item | Concentrado | | |
|---------------------------|-------------|-----------|-------|
| | 3,0 kg/d | À vontade | $P <$ |
| Novilhas, n | 38 | 38 | |
| Corpos lúteos | 15,5 | 12,3 | 0,06 |
| Estruturas recuperados | 9,5 | 6,5 | 0,05 |
| Embriões grau 1 e 2 | 2,7 | 1,0 | 0,001 |
| Embriões grau 3 | 2,1 | 1,8 | NS |
| Embriões transferíveis | 4,8 | 2,8 | 0,001 |
| Ovócitos não fertilizados | 1,2 | 0,9 | NS |

Adaptado de Yaakub et al. (1999b)

Nesse mesmo experimento (Yaakub et al., 1999b), o tipo de concentrado também afetou a qualidade embrionária (Tabela 13).

Tabela 13. Efeito do tipo de concentrado consumido sobre a resposta superovulatória e a qualidade embrionária em novilhas de corte.

| Item | Concentrado | | <i>P</i> < |
|---------------------------|-------------|------------------------------|------------|
| | Cevada | Polpa cítrica e de beterraba | |
| Novilhas, n | 39 | 37 | |
| Corpos lúteos | 13,4 | 14,4 | NS |
| Estruturas recuperados | 7,9 | 8,1 | NS |
| Embriões grau 1 e 2 | 1,3 | 2,40 | 0,05 |
| Embriões grau 3 | 1,5 | 2,3 | NS |
| Embriões transferíveis | 2,9 | 4,8 | 0,05 |
| Ovócitos não fertilizados | 1,4 | 0,7 | NS |

Adaptado de Yaakub et al. (1999b)

Esses dados demonstram que a quantidade e fonte de carboidratos na dieta de novilhas doadoras de embriões afetam a resposta superovulatória e qualidade embrionária. É possível que o efeito deletério do alto consumo de concentrados na produção embrionária esteja relacionada à alterações nos perfis hormonais como aumento excessivo de insulina e IGF-I, e redução nas concentrações de proteínas ligadoras à IGF, como IGFBP-2 e IGFBP-4 (Armstrong et al., 2001). Em seres humanos, concentrações elevadas de insulina e IGF-I estão associadas com a síndrome do ovário policístico e aumento na incidência de abortos expontâneos. O aumento nas concentrações de IGF-I no meio de cultivo de embriões de ratos com 2 células reduziu a taxa de implantação uterina (Pinto et al., 2002). Da mesma forma, o uso de implantes de IGF-I no corno uterino de ratos reduziu a taxa de implantação de embriões no dia 14,5 após o acasalamento (Pinto et al., 2002). Portanto, é plausível especular que a ingestão de quantidades excessivas de energia possam resultar em aumentos nas concentrações de insulina e IGF-I que possam ser deletérios ao desenvolvimento embrionário e manutenção da gestação.

5.2.1 ÁCIDOS GRAXOS

Foi observado que vacas consumindo dietas suplementadas com gordura possuem um maior número de folículos de tamanho médio (3 a 10 mm). Portanto, seria esperado que o fornecimento de gordura à dieta de novilhas submetidas à superovulação beneficiaria a resposta superovulatória já que um maior número de folículos seriam recrutados. Em estudo conduzido por Ryan et al. (1992) a suplementação da dieta de vacas de corte com gordura polinsaturada não afetou a taxa de fertilização e a recuperação embrionária após o tratamento superovulatório. Thomas e Williams (1996) observaram que o fornecimento de dietas isocalóricas mas com diferentes fontes de energia (controle sem gordura, gordura animal e óleo de soja) tiveram apenas um pequeno efeito sobre o número de folículos de tamanho médio, mas não afetaram o número de corpos lúteos ou a concentração de progesterona sérica. Em ovinos, a

adição de 3 ou 6% de óleo de peixe à dieta de ovelhas submetidas a superovulação resultou num aumento na concentração plasmática de estradiol no momento da inseminação, a qual foi associada com um aumento no número de folículos com mais de 8 mm, mas retardou o desenvolvimento embrionário mensurado através da contagem de células (núcleos) nos blastocistos coletados. Não se sabe o porquê da redução no desenvolvimento embrionário quando óleo de peixe foi adicionado à dieta, mas é possível que os ácidos graxos polinsaturados presentes nesse tipo de fonte de gordura inibam a proliferação celular à nível de gene, afetando a transcrição genética e a síntese protéica. Esses dados demonstram que o fornecimento de gordura na dieta de animais doadores de embriões parece não afetar a resposta superovulatória ou a qualidade embrionária.

5.2.2 PROTEÍNA

Muito tem se discutido sobre os efeitos da quantidade e tipo de proteínas oferecidas nas dietas de vacas de leite sobre a taxa de concepção e a viabilidade embrionária. Vários estudos mencionados por Butler (1998) estabeleceu uma relação entre a concentração plasmática de nitrogênio uréico e taxas de concepção em vacas de leite de alta produção. De acordo com esses dados, vacas com nitrogênio uréico acima de 19 mg/dl apresentam taxas de concepção mais baixas do que aquelas com mais baixo nitrogênio uréico sanguíneo. Foi sugerido que o efeito negativo do excesso de proteína bruta ou de proteína degradável no rúmen na dieta poderia afetar a reprodução de fêmeas bovinas através de um aumento nas concentrações sanguíneas de nitrogênio uréico. Novilhas alimentadas com dietas com excesso de proteína degradável no rúmen apresentaram níveis mais altos de nitrogênio uréico plasmático e uma redução na taxa de concepção. O decréscimo na taxa de concepção foi atribuído à alterações à nível endometrial, já que o pH uterino foi reduzido no dia 7 após a inseminação. Blanchard et al. (1990) estudaram os efeitos da degradabilidade da proteína na dieta de vacas de leite sobre a resposta superovulatória e qualidade embrionária. Eles observaram que aumentando a quantidade de proteína degradável no rúmen de 64 para 73% da proteína bruta da dieta (PB = 16%), reduziu a porcentagem de ovócitos fertilizados e a porcentagem de embriões transferíveis. Outro estudo similar, mas utilizando vacas não lactantes e com quantidade extremas de proteína bruta e degradável no rúmen (Garcia-Bojalil et al., 1994) não observou efeitos deletérios da proteína sobre a viabilidade embrionária (Tabela 14).

Tabela 14. Efeito da proteína bruta (PB) e degradável no rúmen (PDR) sobre a qualidade embrionária em vacas superovuladas.

| PB (PDR), % | Vacas | Emбриões transf. | Emбриões não transf. | Estruturas não fertilizadas | Emбриões transf. % | DAPI ¹ negativo % | Referência |
|----------------|-------|---------------------|----------------------------|-----------------------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 12,3 (59,7) | 22 | 4,0 | 1,6 | 1,8 | 49,7 | 53,1 ^b | Garcia-Bojalil et al., 1994 |
| 27,4 (70,7) | 22 | 4,9 | 2,0 | 1,8 | 54,0 | 66,7 ^a | |
| 16,0 (73,0) | 19 | 4,5 | 4,0 | 3,1 | 44,2 ^b | ND ² | Blanchard et al., 1990 |
| 16,1 (64,0) | 19 | 5,5 | 3,3 | 2,3 | 66,9 ^a | ND | |

^{a, b}Médias são diferentes ($P < 0,10$)

¹Coloração vital de 4,6-diamidino-2-fenilindole; ² Não disponível

Em novilhas, altas concentrações de amônia e uréia no plasma sanguíneo durante os períodos pré- and pós-antral de desenvolvimento folicular foram associados com redução na taxa de clivagem após a maturação e fertilização *in vitro*, e uma redução na taxa de desenvolvimento a blastocisto (Sinclair et al., 2000a; Sinclair et al., 2000b). Nesses estudos, o metabolismo de glicose e de amino ácidos (³⁵S metionina) foram aumentados nos embriões que sobreviveram, sugerindo um possível estresse metabólico. Portanto, é possível que a alta ingestão de proteína e resultante aumento nas concentrações de uréia e amônia no sangue possam alterar o metabolismo embrionário e seu subsequente desenvolvimento.

5.2.3 GOSSIPOL

Dois experimentos foram conduzidos para avaliar o efeito da ingestão de gossipol e da concentração plasmática de gossipol sobre a qualidade embrionária (Coscioni et al., 2003b, Villaseñor et al., 2003). Em ambos experimentos, novilhas foram alimentadas com dietas sem gossipol, com um nível intermediário de gossipol e um nível alto de gossipol livre na dieta. A adição de gossipol a dieta aumentou a concentração de gossipol plasmático nas novilhas em ambos experimentos.

No primeiro estudo (Coscioni et al., 2003b), 75 novilhas foram alimentadas com 0, 20 ou 40 mg de gossipol livre/kg de peso vivo (controle, médio e alto gossipol, respectivamente) por 60 dias antes da superovulação e coleta de embrião. O número de estruturas coletadas foi similar para os três grupos e foram, respectivamente, 9,4, 8,4 e 8,8 ($P=0,88$). O número de estruturas consideradas excelentes e boas foi similar para os três tratamentos ($P = 0,87$) e foram 3,5, 3,6 e 3,3 para o controle, médio e alto gossipol, respectivamente. No entanto, novilhas recebendo a dieta com alto gossipol tiveram um maior número (5,8) de embriões de grau 3 e degenerados ($P < 0,01$) que as novilhas nos grupos controle (3,6) e médio (3,2). O alto consumo de gossipol retardou o desenvolvimento embrionário no dia 7 e mais embriões foram classificados como mórulas no grupo alto que no controle e médio ($P < 0,02$).

Quando embriões foram coletados no dia 5 após a IA (Villasenor et al., 2003), o número de células para o controle, médio e alto diferiu (22,1, 24,2 e 17,0) e foi menor para o grupo recebendo a alta concentração de gossipol na dieta ($P < 0,01$). Quando embriões foram cultivados *in vitro*, o desenvolvimento foi retardado quando provenientes de novilhas que receberam a alta concentração de gossipol na dieta (Figura 9).

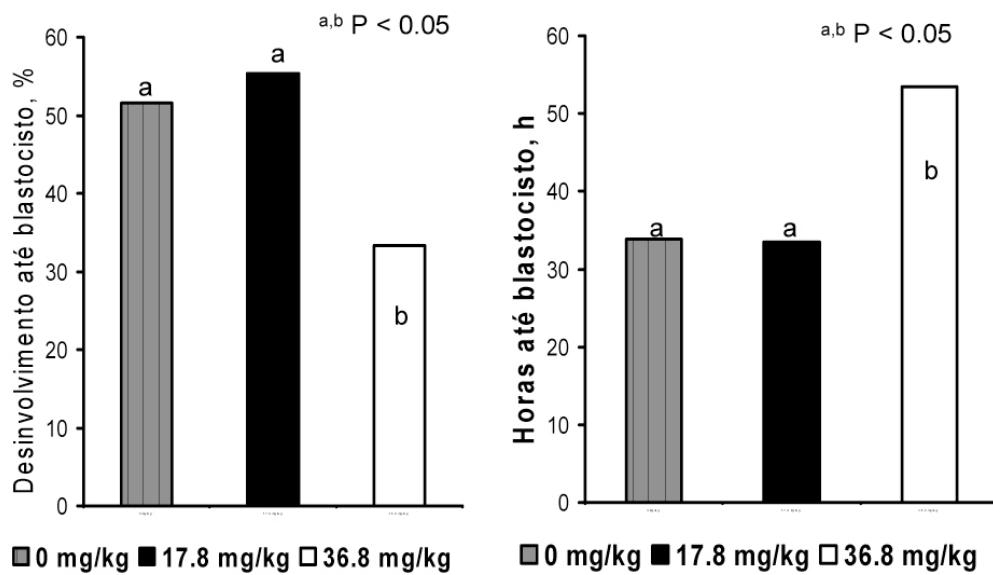


Figura 9. Desenvolvimento in vitro de embriões coletados no dia 5 após a IA de novilhas alimentadas com vários níveis de gossipol (Villasenor et al., 2003).

Portanto, o consumo de mais de 36,0 mg de gossipol livre/kg de peso vivo resulta em redução na qualidade e desenvolvimento embrionário in vivo e in vitro. De fato, a ingestão de quantidades excessivas de gossipol aumentou a sua concentração plasmática e não só reduziu a taxa de concepção em vacas de leite, mas também aumentou a perda de prenhez após os 45 dias de gestação (Santos et al., 2003). Além disso, embriões provenientes de novilhas alimentadas com gossipol reduziram a taxa de prenhez quando transferidos para vacas em lactação (Figura 10; Galvão et al., 2006).

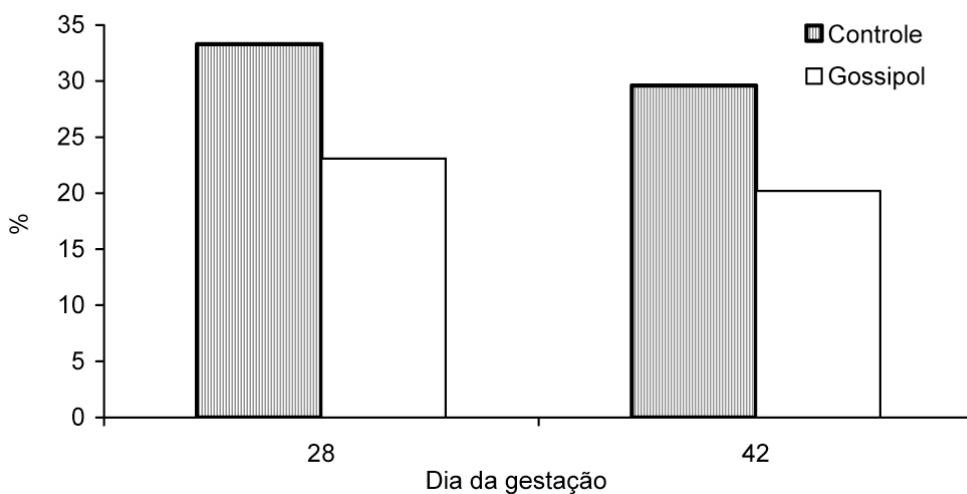


Figura 10. Taxa de prenhez em vacas de leite em lactação após a transferência de embriões provenientes de novilhas alimentadas ou não com gossipol. Gossipol rediziu a taxa de prenhez ao dia 28 ($P = 0,04$) e dia 42 ($P = 0,06$) de gestação (Villasenor et al., 2003).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARMSTRONG, D.G., T.G. MCEVOY, G. BAXTER, J.J. ROBINSON, C.O. HOGG, K.J. WOAD, R. WEBB, AND K.D. SINCLAIR. 2001. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. *Biol. Reprod.* 64: 1624-1632.
- BLANCHARD, T., J. FERGUSON, L. LOVE, T. TAKEDA, B. HENDERSON, J. HASLER E W. CHALUPA. 1990. Effect of dietary crude protein type on fertilization and embryo quality in dairy cattle. *Am. J. Vet. Res.* 51(6):905-908.
- BONCZECK, R.R., C.W. YOUNG, J.E. WHEATON, AND K.P. MILLER. 1998. Response of somatotropin, insulin, prolactin, and thyroxine to selection for milk yield in Holsteins. *J. Dairy Sci.* 71:2470-2478.
- BUTLER, S.T., A.L. MARR, S.H. PELTON, R.P. RADCLIFF, M.C. BUTLER, AND W.R. BUTLER. 2003. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J. Endocrinol.* 176: 205-217.
- BUTLER, W.R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61:449-457.
- BUTLER, W.R. 1998. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 81:2533-2539.
- BUTLER, W.R AND R.D. SMITH. 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function. *J. Dairy Sci.* 72:767-783.
- BILUCA, D. F. 2005. Efeito da suplementação com monensina no pré e pós-parto nas concentrações plasmáticas de AGNE, IGF-1, no diâmetro do maior folículo e na sua capacidade ovulatória a um estímulo com GnRH de vacas Nelore. Tese de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.
- CERRI, R.L.A., R.G.S. BRUNO, R.C. CHEBEL, K.N. GALVÃO, H. RUTGLIANO, S.O. JUCHEM, W.W. THATCHER, D. LUCHINI, AND J.E.P. SANTOS. 2004. Effect of fat sources differing in fatty acid profile on fertilization rate and embryo quality in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87(Suppl. 1): 297 (Abstr.).
- COSCIONI, A.C., M. VILLASEÑOR, K.N. GALVÃO, R. CHEBEL, J.E.P. SANTOS, J.H. KIRK, B. PUSCHNER, AND L.M.C. PEGORARO. 2003. Effect of gossypol intake on plasma and uterine gossypol concentrations and on embryo quality and development in superovulated Holstein dairy heifers. *J. Dairy Sci.* 86(Suppl. 1):240 (Abstr.).
- CULLENS, F. 2005. Effects of the timing of initiation of fat supplementaion on productive and reproductive responses of periparturient dairy cows during summer. Master of Science Thesis, Department of Animal Science, University of Florida, Gainesville, FL.
- DUFFIELD, T., R. BAGG, L. DESCOTEAUX, E. BOUCHARD, M. BRODEUR, D. DUTREMBLAY, G. KEEFE, S. LEBLANC, AND P. DICK. 2002. Prepartum monensin for the reduction of energy associated disease in postpartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:397-405.
- DUFFIELD, T.F., K.E. LESLIE, D. SANDALS, K. LISSEMORE, B.W. MCBRIDE, J.H. LUMSDEN, P. DICK, AND R. BAGG. 1999. Effect of a monensin-controlled release capsule on cow health and reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 82: 2377-2384.
- FERGUSON, J.D., D. SKLAN, W.V. CHALUPA, AND D.S. KRONFELD. 1990. Effects of hard fats on in vitro and in vivo rumen fermentation, milk production, and reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73: 2864-2879.
- FERREL, C.L. 1991. Nutritional influences on reproduction. In P.T. Cupps. "Reproduction in Domestic Animals".4th Edition. Academic Press, Inc. pp: 577-603.
- GALVÃO, K.N., J.E.P. SANTOS, A.C. COSCIONI, S.O. JUCHEM, R.C. CHEBEL, W.M. SISCHO, AND M. VIALLASEÑOR. 2006. Embryo survival from gossypol-fed heifers after transfer to lactating cows treated with human chorionic gonadotropin. *J. Dairy Sci.* 89: 2056-2064.
- GARCIA-BOJALIL, C.M., C.R. STAPLES, W.W. THATCHER E M. DROST. 1994. Protein intake and development of ovarian follicles and embryos of superovulated nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 77:2537-2548.

- GONG, J.G., W.J. LEE, P.C. GARNSWORTHY, AND R. WEBB. 2002. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction* 123:419-427.
- GRANT, R.J. E J.L. ALBRIGHT. 1995. Feeding behavior and management factors during the transition period in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 73:2791.
- HEUER, C., Y.H. SCHUKKEN, L.J. JONKER, J.I. WILKINSON, AND J.P. NOORDHUIZEN. 2001. Effect of monensin on blood ketone bodies, incidence and recurrence of disease and fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:1085-97.
- HILEMAN S.M., L.S. LUBBERS, H.T. JANSEN, AND M.N. LEHMAN. 1999. Changes in hypothalamic estrogen receptor-containing cell numbers in response to feed restriction in the female lamb. *Neuroendocrinology*. 69: 430-437.
- JUCHEM, S.O., R.L.A. CERRI, M. VILLASEÑOR, K.N. GALVÃO, R. BRUNO, H.M. RUTIGLIANO, A.C. COSCIONI, E.J. DEPETERS, W.W. THATCHER, D. LUCHINI, AND J.E.P. SANTOS. 2004a. Effect of feeding Ca salts of palm oil (PO) or of a blend of linoleic and monoenoic trans fatty acids (LTFA) on lactation and health of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 87(Suppl. 1): 95-96 (Abstr.).
- JUCHEM, S.O., R.L.A. CERRI, R. BRUNO, K.N. GALVÃO, E.W. LEMOS, M. VILLASEÑOR, A.C. COSCIONI, H.M. RUTIGLIANO, W.W. THATCHER, D. LUCHINI, AND J.E.P. SANTOS. 2004b. Effect of feeding Ca salts of palm oil (PO) or of a blend of linoleic and monoenoic trans fatty acids (LTFA) on uterine involution and reproductive performance in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 87(Suppl. 1): 310 (Abstr.).
- JUCHEM, S.O., J.E.P. SANTOS, R.L.A. CERRI, R.C. CHEBEL, K.N. GALVAO, E.J. DEPETERS, F.T. SILVESTRE, W.W. THATCHER. Reproduction and uterine prostaglandin secretion of dairy cows fed calcium salts of fish oil. *J. Dairy Sci.* (no prelo).
- KENDRICK, K.W., T.L. BAILEY, A.S. GARST, A.W. PRYOR, A. AHMADZADEH, R.M. AKERS, W.E. EYESTONE, R.E. PEARSON, AND F.C. GWAZDAUSKAS. 1999. Effects of energy balance on hormones, ovarian activity, and recovered oocytes in lactating Holstein cows using transvaginal follicular aspiration. *J. Dairy Sci.* 82: 1731-1740.
- LALMAN, D.L., M.K. PETERSON E R.P. ANSOTEQUI. 1993. The effect of ruminally undegradable protein, propionic acid, and monensin on puberty and pregnancy in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 71:2843-2852.
- LANNA, D.P.D. 1996. Fatores condicionantes e predisponentes da puberdade e da idade de abate. In Anais do 4º Simpósio Sobre Pecuária de Corte: Produção do Novilho de Corte. Ed. A. M. Peixoto, J.C. Moura e V.P. Faria. FEALQ, Piracicaba, SP. pp: 41-78.
- LOZANO, J.M., D.P. NATION, F.A. WARD, E D. O'CALAGHAN. 2000. Effect of nutrition on oocyte developmental capacity in dairy cows. *Theriogenology* 53(1):284.(Abstr.)
- MCCARTOR, M.M., R.D. RANDEL, AND L.H. CARROLL. 1979. Dietary alteration of ruminal fermentation on efficiency of growth and onset of puberty in Brangus heifers. *J. Anim. Sci.* 48: 488-494.
- MCEVOY, T.G., J.J. ROBINSON, R.P AITKEN, P.A. FINDLAY, R.M. PALMER E I.S. ROBERTSON. 1995. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent *in vivo* and *in vitro* development of ova. *Anim. Reprod. Sci.* 39: 89-107.
- MOSELEY, W.M., T.G. DUNN, C.C. KALTENBACH, R.E. SHORT, AND R.B. STAIGMILLER. 1982. Relationship of growth and puberty in beef heifers fed monensin. *J. Anim. Sci.* 55: 357-362.
- NOLAN, R. P. DUFFY, M. WADE, D. O'CALLAGHAN E M.P. BOLAND. 1998a. Effect of quantity and type of diet and frequency of trans-vaginal ovum aspiration on *in-vitro* embryo development in heifers. *Theriogenology* 49:402 (Abstr.).
- NOLAN, R. D. O'CALLAGHAN, R.T. DUBY, P. LONERGAN E M.P. BOLAND. 1998b. The influence of short-term nutrient changes on follicle growth and embryo production following superovulation in beef heifers. *Theriogenology* 50:1263-1274.
- PINTO, A.B., A.L. SCHLEIN, AND K.H. MOLEY. 2002. Preimplantation exposure to high insulin-like growth factor I concentrations results in increased resorption rates *in vivo*. *Hum. Reprod.* 17: 457-462.
- RABIEE, A.R., I.J. LEAN, J.M. GOODEN, B.G. MILLER, AND R.J. SCARAMUZZI. 1997. An evaluation of transovarian uptake of metabolites using arterio-venous difference methods in dairy cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 48: 9-25.

- REYNOLDS, C.K., B. DURST, B. LUPOLI, D.J. HUMPHRIES, AND D.E. BEEVER. 2004. Visceral tissue mass and rumen volume in dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. *J. Dairy Sci.* 87:961-971.
- RHOADS, R.P., J.W. KIM, B.J. LEURY, L.H. BAUMGARD, N. SEGOALE, S.J. FRANK, D.E. BAUMAN, AND Y.R. BOISCLAIR. 2004. Insulin increases the abundance of the growth hormone receptor in liver and adipose tissue of periparturient dairy cows. *J. Nutr.* 134: 1020-1027.
- RYAN, D.P., R.A. SPOON E G.L. WILLIAMS. 1992. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high fat diets and treated with follicle-stimulating hormone. *J. Anim. Sci.* 70:3505-3513.
- SÁ FILHO, M.F. 2006. Comunicação pessoal. Tulare, CA.
- SANGSRITAVONG, S., D.K. COMBS, R. SARTORI, L.E. ARMENTANO, AND M.C. WILTBANK. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85:2831-2842.
- SANTOS, R.M. 2005. Efeito da quantidade de concentrado da dieta de vacas holandesas não-lactantes na progesterona plasmática, composição do fluido folicular e produção de prostaglandina pelo endométrio. Tese de Doutoramento, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP.
- SANTOS, J.E.P., S.O. JUCHEM, R.L.A. CERRI, K.N. GALVÃO, R.C. CHEBEL, W.W. THATCHER, C. DEI, AND C. BILBY. 2004. Effect of bST and reproductive management on reproductive and lactational performance of Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87: 868-881.
- SANTOS, J.E.P., M. VILLASEÑOR, E.J. DEPETERS, P.H. ROBINSON, AND C.H. HOLMBERG. 2003. Type of cottonseed and gossypol in diets of lactating dairy cows: Plasma gossypol, reproduction, and health. *J. Dairy Sci.* 86: 892-905.
- SANTOS, J.E.P., J.T. HUBER, C.B. THEURER, C.M. NUSSIO, L.G. NUSSIO, M. TARAZON, AND D. FISH. 2000. Effects of grain processing and bovine somatotropin on metabolism and ovarian activity of dairy cows during early lactation. *J. Dairy Sci.* 83:1004-1015.
- SCHILLO, K. K. 1992. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *J. Anim. Sci.* 70: 1271-1282.
- SINCLAIR, K.D., M. KURAN, F.E. GEBBIE, R. WEBB, T.G. MCEVOY. 2000a. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: II. Development of oocytes recovered from heifers offered diets differing in their rate of nitrogen release in the rumen. *J. Anim. Sci.* 78:2670-2680.
- SINCLAIR, K.D., L.A. SINCLAIR, AND J.J. ROBINSON. 2000b. Nitrogen metabolism and fertility in cattle: I. Adaptive changes in intake and metabolism to diets differing in their rate of energy and nitrogen release in the rumen. *J. Anim. Sci.* 78:2659-2669.
- SOUZA, E. M., J. C. MILAGRES, M. A. SILVA, A. J. REGAZZI E A. G. C. CASTRO. 1995. Influências genéticas e de meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir leiteiro. *R. Soc. Bras. Zootec.* 24(6): 926-935.
- STAPLES, C.R., J.M. BURKE, AND W.W. THATCHER. 1998. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J. Dairy Sci.* 81:856-871.
- THEURER C.B., J.T. HUBER, A. DELGADO-ELORDUY, AND R. WANDERLEY. 1999. Invited review: summary of steam-flaking corn or sorghum grain for lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82:1950-9.
- THOMAS, M.G. E G.L. WILLIAMS. 1996. Metabolic hormone secretion and FSH-induced superovulatory responses of beef heifers fed dietary supplements containing predominantly saturated or polyunsaturated fatty acids. *Theriogenology* 45:451-458.
- TORRES, L.F.T. 1996. Inseminação artificial em rebanhos comerciais de gado de corte. *In Anais do 4º Simpósio Sobre Pecuária de Corte: Produção do Novilho de Corte.* Ed. A. M. Peixoto, J.C. Moura e V.P. Faria. FEALQ, Piracicaba, SP. pp: 129-159.
- VILLA-GODOY, A., T.L. HUGHES, R.S. EMERY, T.L. CHAPLIN, AND R.L. FOGWELL. 1988. Association between energy balance and luteal function in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71:1063-1069.
- VILLASEÑOR, M., A.C. COSCIONI, K.N. GALVÃO, S.O. JUCHEM, J.E.P. SANTOS, AND B. PUSCHNER. 2003. Effect of gossypol intake on plasma and uterine gossypol concentrations and on embryo development and viability *in vivo* and *in vitro*. *J. Dairy Sci.* 86(Suppl. 1):240 (Abstr.).

- YAAKUB, H., D.O'CALLAGHAN E M.P. BOLAND. 1999a. Effect of roughage type and concentrate supplementation on follicle numbers and in vitro fertilisation and development of oocytes recovered from beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 55:1-12.
- YAAKUB, H., D.O'CALLAGHAN E M.P. BOLAND. 1999b. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. *Theriogenology* 51:1259-1266.
- WILTBANK, J.N., S. ROBERTS, J. NIX E L. ROWDEN. 1985. Reproductive performance and profitability of heifers fed to weigh 272 or 318 kg at the start of the first breeding season. *J. Anim. Sci.* 60:25-34.
- WADE, G.N., AND J.J. JONES. 2004. Neuroendocrinology of nutritional infertility. *Am. J. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287: 1277-1296.

FOLICULOGÊNESE EM BOVINOS

José Buratini Junior¹

INTRODUÇÃO

A maioria dos oócitos presentes no ovário ao nascimento não atinge a ovulação (Yang et. al., 1998). Portanto, técnicas de reprodução assistida como a superovulação/TE e MIV/FIV têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas a fim de maximizar o potencial reprodutivo de fêmeas superiores ou ameaçadas de extinção. Em bovinos, protocolos hormonais que controlam o desenvolvimento folicular e a função lútea permitem IA em momento pré-determinado e sincronização de receptoras para TE, potencializando a eficiência reprodutiva (Barros & Ereno, 2004; Bó et al, 2004). Contudo, avanços nas técnicas de reprodução assistida requerem melhor entendimento da fisiologia ovariana. Apesar da enorme quantidade de informações produzidas durante as duas últimas décadas, o entendimento completo dos mecanismos controladores do desenvolvimento folicular ainda não foi atingido. A regulação do desenvolvimento folicular é complexa e envolve fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, que são orquestrados de maneira estágio-específica a fim de controlar vários processos incluindo proliferação e diferenciação de células foliculares, esteroidogênese, angiogênese/vascularização, remodelagem da membrana basal e matriz extracelular e atresia/apoptose (Webb et al., 2003; Silva & Price et al., 2000; Acosta & Miyamoto, 2004; Rodgers et al., 2003; Fortune et al., 2004). O objetivo desta revisão é sumarizar os principais mecanismos reguladores do desenvolvimento folicular pré-antral e antral.

DESENVOLVIMENTO FOLICULAR PRÉ-ANTRAL

O papel das gonadotrofinas no controle do desenvolvimento folicular pré-antral é controverso. Receptores de FSH (FSHR) podem ser detectados em folículos primários bovinos (Wandji et al., 1992) e estimulação do desenvolvimento folicular pré-antral pode ser alcançado pela adição de FSH ao meio de cultura. Entretanto, considera-se que o FSH desempenha um papel permissivo ao invés de regulador neste estágio de desenvolvimento (Gutierrez et al., 2000; McNatty et al., 1999; Webb et al, 2003). Alternativamente, o início e a regulação do desenvolvimento folicular pré-antral são predominantemente conduzidos por fatores produzidos localmente (McNatty et al., 1999). O oócito tem um papel ativo na coordenação da proliferação e diferenciação das células da granulosa ao seu redor (Gilchrist et al., 2004). Comunicação intercelular é proporcionada por processos citoplasmáticos trans-zonais (TZP), que são extensões das células da granulosa que penetram através da zona pelúcida e atingem a membrana do oócito, onde junções do tipo gap permitem transporte bidirecional de íons, metabólitos, aminoácidos e pequenas moléculas reguladoras (Albertini et al., 2001). Interessantemente, este tipo de comunicação entre o oócito e células somáticas parece ser regulada durante o desenvolvimento, uma vez que as TZPs retraem quando o folículo atinge o estágio antral, o que se acredita ser, pelo menos em parte, um efeito da ação do FSH (Albertini et al., 2001).

A comunicação entre o oócito e as células somáticas também ocorre por sinalização parácrina. Dentre vários fatores de crescimento produzidos pelo oócito ou células da granulosa, o fator de células tronco (SCF; também conhecido como kit-ligante) e

¹Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, UNESP – Botucatu. (buratini@ibb.unesp.br)

membros da família dos fatores de crescimento transformantes- β (TGF- β), particularmente o fator de crescimento diferencial-9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15, também conhecida como GDF-9B) têm concentrado maior atenção recentemente. Em ovelhas, o receptor do KL, conhecido como c-kit, está localizado em oócitos de folículos em crescimento, enquanto que o KL é produzido por células da granulosa de folículos primordiais e primários (McNatty et al., 1999). Em camundongos, a imunização contra o c-kit aboliu a transição de folículos primordiais a primários e uma mutação no gene c-kit comprometeu a ativação de folículos primordiais (Kissel et al., 2000; Yoshida et al., 1997), o que destaca o absoluto requerimento da interação c-kit/KL para o desenvolvimento folicular pré-antral. Interessantemente, o KL estimula a síntese de DNA em células da granulosa, o que se acredita ser mediado por mitógenos de origem oocitária, uma vez que as células da granulosa não expressam o receptor c-kit (Yoshida et al., 1997; Otsuka & Shimasaki, 2002). Assim, sob estímulo do KL, o oócito dispararia um sinal bastante precoce para promover a proliferação das células da granulosa. Além disso, o sistema c-kit/KL também pode estar envolvido na diferenciação de células do estroma em células da teca, já que o receptor c-kit é expresso por células da teca e a expressão do KL aumenta em células da granulosa no momento da formação da camada da teca (Parrot & Skinner, 2000).

Na maioria das espécies, o GDF-9 e BMP-15 ovarianos são exclusivamente expressos pelo oócito (revisado por Juengel et al., 2004 e Shimasaki et al., 2003), embora ambos tenham sido detectados por PCR em células da granulosa de folículos antrais em cabras (Silva et al., 2005). A expressão do GDF-9 é detectável a partir do estágio primordial (em ruminantes; Bodensteiner et al., 1999) ou primário (em camundongos; McGrath et al., 1995) do desenvolvimento folicular e é essencial para o desenvolvimento de folículos secundários, uma vez que camundongos com deleção do gene mostraram-se inférteis e com desenvolvimento folicular interrompido no estágio primário (Dong et al., 1996). Além disso, o GDF-9 estimulou o crescimento folicular pré-antral de ratas *in vivo*, provavelmente pela potencialização da proliferação das células da granulosa (Vitt et al., 2000ab). Como o GDF-9, a BMP-15 também estimula a proliferação das células da granulosa e é crucial para o desenvolvimento folicular pré-antral, já que ovelhas imunizadas contra a BMP-15 tiveram os folículos bloqueados no estágio primário (Otsuka et al., 2000; Juengel et al., 2002). Mutações espontâneas em ovelhas têm contribuído para esclarecer o papel da BMP-15. Ovelhas Inverdale com um único gene BMP-15 inativo são férteis e mostram taxa ovulatória aumentada, enquanto que ovelhas homozigotas para a mutação inativadora são estéreis e apresentam desenvolvimento folicular bloqueado no estágio primário (Galloway et al., 2000). Foi sugerido que níveis reduzidos de BMP-15 em ovelhas heterozigotas potencializariam o desenvolvimento folicular devido a um aumento na sensibilidade ao FSH. De fato, demonstrou-se que a BMP-15 suprime a expressão de receptores para FSH (FSHR) e de genes responsivos ao FSH incluindo a StAR (proteína reguladora aguda da esteroidogênese), P450scc (P450 clivadora de cadeia lateral), 3 β -HSD (3 β -hidroxi-esteróide desidrogenase), LHR e inibina (Otsuka et al. 2001; Shimasaki et al., 2003).

Uma alça de “feedback” negativo pode existir entre a BMP-15 e o KL. A BMP-15 estimula a expressão do KL, que, por sua vez, inibe a expressão da BMP-15. Contudo, a interrupção da sinalização c-kit/KL num sistema de co-cultivo (células da granulosa com oócitos) supriu a proliferação das células da granulosa induzida pela BMP-15, sugerindo que a interação entre a BMP-15 e o KL é importante para o crescimento folicular (Otsuka & Shimasaki, 2002; Shimasaki et al., 2003). Distintamente, o GDF-9 inibiu a expressão do KL em células da granulosa de camundongos (Joyce et al., 2000). Embora os padrões temporais de secreção desses fatores de crescimento

sejam ainda desconhecidos, propôs-se a hipótese de que o desenvolvimento folicular inicial seria conduzido pela interação do KL com a BMP-15, enquanto que o GDF-9 seria secretado um pouco mais tarde por oócitos inteiramente crescidos para promover proliferação das células da granulosa e modular a função do KL (Shimasaki et al., 2003).

O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) também parece contribuir para a regulação do crescimento folicular pré-antral por meio de mecanismos endócrinos. Apesar do IGF-I e II não estarem expressos em folículos pré-antrais, eles expressam receptores de IGF (tipo 1) e proteínas ligantes de (IGFBP-2 e 3), que se acredita regularem a biodisponibilidade de IGFs extra-ovarianos (Webb et al., 2003). Os efeitos dos IGFs sobre o desenvolvimento folicular pré-antral têm variado com o sistema de cultivo, mas estimulação foi obtida quando doses de insulina próximas às fisiológicas foram utilizadas (Gutierrez et al., 2000; Fortune et al., 2004). Além disso, a importância dos IGFs para os estágios iniciais do desenvolvimento folicular foi claramente demonstrada por experimentos em que o nocaute do gene resultou em comprometimento severo da foliculogênese pré-antral e antral inicial em camundongos (Elvin & Matzuk, 1998).

Vários outros fatores de crescimento estão envolvidos na sinalização parácrina pré-antral incluindo ativina, folistatina, inibina, fator de crescimento (EGF) e FGFs (McNatty et al., 1999). O FGF-2 (FGF básico) é certamente o FGF investigado mais extensivamente com relação ao desenvolvimento folicular. No ovário bovino, o FGF-2 foi localizado nos oócitos de folículos primordiais e primários e em células da granulosa e da teca de folículos pré-antrais em crescimento e antrais (Van Wezel et al., 1995). Estudos de ligação revelaram que os receptores para FGF-2 estão principalmente localizados na camada de células da granulosa (Wandji et al., 1992). Demonstrou-se que o FGF-2 é capaz de estimular a ativação de folículos primordiais em culturas de fragmentos de ovários de ratas e de promover proliferação de células da granulosa (Nilsson et al., 2001; Gospodarowicz et al., 1989).

DESENVOLVIMENTO FOLICULAR ANTRAL

Diferentemente do estágio pré-antral, o desenvolvimento folicular antral é criticamente dependente do suporte das gonadotrofinas. Em várias espécies domésticas, os folículos antrais são recrutados e crescem simultaneamente em uma onda folicular sob o controle das gonadotrofinas (Fortune et al., 2001; Ginther et al., 2001). Em bovinos, os intervalos interovulatórios apresentam 2 ou 3 ondas foliculares, sendo que a ocorrência de 1 ou 4 ondas constitui casos raros (Sirois & Fortune, 1988; Figueiredo et al., 1997). Além da ação das gonadotrofinas, também se tornou evidente que fatores de crescimento produzidos localmente constituem moléculas estimuladoras e reguladoras chave para os folículos antrais, atuando por meio de mecanismos parácrinos e endócrinos (Fortune et al., 2004; Ginther et al., 2001; Web et al., 2003). Uma elevação nas concentrações plasmáticas de FSH estimula o recrutamento folicular e a emergência da onda folicular (Adams et al., 1992; Fortune, 1994). Em espécies monovulatórias como a bovina, um folículo é selecionado do grupo de recrutados e adquire capacidade ovulatória, enquanto os folículos subordinados entram em atresia. O folículo selecionado é conhecido como folículo dominante e desempenha um papel ativo na supressão do crescimento dos subordinados pela secreção de estradiol e inibina (Fortune, 1994; Ginther et al., 1996). Em bovinos, os folículos podem atingir o diâmetro de 8mm independentemente do suporte do LH, mas o crescimento além de 9mm requer LH endógeno ou FSH exógeno (Gong et al., 1996). Portanto, os folículos

são considerados dependentes de FSH até a ocorrência da dominância, após o que eles se tornam dependentes de LH (reviewed by Fortune et al., 2001, Ginther et al., 2001).

Os receptores de LH (LHR) das células da granulosa parecem estar relacionados à dominância folicular. A comparação dos padrões de expressão gênica observados por hibridização *in situ* em folículos antrais bovinos recrutados e selecionados indicou que a seleção está associada ao início da expressão do gene LHR em células da granulosa (Bao & Garverick, 1998). Isto é apoiado pelo aumento dos níveis de RNAm do LHR detectado por RT-PCR em células da granulosa de futuros folículos dominantes comparados com seus subordinados, que ocorre no momento ou imediatamente antes do desvio (Beg 2001). Contudo, isto contradiz o relato de níveis indetectáveis de LHR à hibridização *in situ* em células da granulosa durante a seleção folicular (Evans & Fortune, 1997) e de níveis constantes de ligação do hCG a células da granulosa durante o ciclo estral (Ireland & Roche, 1983). Há também certa controvérsia sobre quando o LHR aparece em células da granulosa. O RNAm do LHR foi detectado por RT-PCR em células da granulosa de folículos com diâmetro entre 7 e 8mm (Beg et al., 2001) e em células da granulosa de folículos <5mm (Robert et al., 2003), mas não foi detectado antes dos 9mm de diâmetro por hibridização *in situ* (Xu et al., 1995). Recentemente, em nosso laboratório a expressão do LHR foi detectada em células da granulosa de folículos antrais ≥8mm e de apenas um de seis folículos de 7mm analisados (Nogueira et al., 2005). Considerando-se que os folículos utilizados neste experimento foram predominantemente obtidos de fêmeas Nelore e que o desvio folicular ocorre aos 6mm de diâmetro nesta raça (Sartorelli et al., 2005), nós assumimos que a expressão do gene LHR nas células da granulosa foi detectada após a seleção do folículo dominante em nossos estudos.

Há fortes evidências de que o sistema IGF desempenha um papel crítico na seleção do folículo dominante. Os IGFs são sinérgicos ao FSH na promoção de crescimento folicular e produção de estradiol (Fortune et al., 2004). Apesar da expressão gênica do IGF-I e -II ter sido localizada em células da granulosa e da teca, respectivamente, o IGF-II tem sido apontado como o principal IGF intraovariano, enquanto que o IGF-I atua de uma maneira endócrina (Armstrong et al., 2000; Yuan et al., 1998, Webb et al., 1999). O IGF-I e -II ativam os receptores de IGF tipo I e II, ambos presentes em células da granulosa e da teca (Spicer et al., 2004). Os níveis de IGF total não foram diferentes no fluido folicular de folículos dominantes em relação a folículos subordinados (de la Sota et al., 1996), mas os níveis de IGF-I livre foram maiores no fluido folicular do maior folículo comparado ao segundo maior da mesma onda, antes da observação de diferenças na concentração de estradiol ou diâmetro (Beg et al., 2002). Esta observação está de acordo com um papel regulador para as IGFBPs mediante modulação da biodisponibilidade de IGF. A IGFBP-2, -3, -4 e -5 estão presentes no fluido folicular bovino e a expressão gênica da IGFBP-2 e -4 foi localizada em células da granulosa e da teca, respectivamente (revisado por Fortune, et al. 2001 e Webb et al., 1999). Níveis reduzidos da IGFBP-4 foram encontrados em folículos dominantes bovinos comparados com os dois maiores folículos subordinados apenas 1,5 dias após a emergência da onda (Mihm et al. 2000). Há fortes evidências sugerindo que a redução dos níveis de IGFBP-4 no folículo selecionado é consequência de um aumento da degradação proteolítica das IGFBPs pela proteína plasmática associada à gestação (PAPP-A), recentemente detectada no folículo (Mazerbourg et al., 2001). De fato, a degradação não apenas da IGFBP-4, mas também da IGFBP-5, foi mais alta no maior folículo antes do momento esperado do desvio folicular (Fortune et al., 2004). Por outro lado, os níveis intra-foliculares de IGFBP-2 parecem diminuir com o desenvolvimento do folículo dominante, mas posteriormente em relação à IGFBP-4 e -5

(Fortune et al., 2004). Distintamente da IGFBP-4 e -5, as concentrações de IGFBP-2 parecem ser reguladas no nível transcrional pelo FSH, uma vez que o RNAm da IGFBP-2 não foi detectado em células da granulosa de folículos dominantes grandes e o FSH inibiu a expressão gênica da IGFBP-2 em células da granulosa bovinas cultivadas (Armstrong et al., 1998; Webb et al., 2003).

Contudo a ovulação do folículo dominante selecionado requer condições endócrinas favoráveis. Se a regressão luteal ocorre ainda durante a fase de crescimento do folículo dominante, a queda dos níveis de progesterona permite o aumento da freqüência dos pulsos de LH, estimulado pelo aumento da produção de estradiol do folículo dominante. O aumento da pulsatilidade do LH culmina então no pico de LH necessário à ovulação e à maturação oocitária com retomada da meiose que havia sido interrompida no início do desenvolvimento folicular. Caso não ocorra luteólise enquanto o folículo dominante permanece viável, ele regride e deixa de inibir a secreção de FSH, possibilitando a emergência de uma nova onda folicular (Monniaux et al., 1997).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA TJ, MIYAMOTO A. Vascular control of ovarian function: ovulation, corpus luteum formation and regression. *Anim. Reprod. Sci.* v. 82-83, p. 127-140, 2004.
- ADAMS GP, MATTERI RL, KASTELIC JP, KO JCH, GINTHER OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* v. 94, p. 177-188, 1992.
- ALBERTINI DF, COMBELLES CMH, BENECHI E, CARABATSOS MJ. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*. v. 121, p. 647-653, 2001.
- ARMSTRONG DG, BAXTER G, GUTIERREZ CG, HOGG CO, GLAZYRIN AL, CAMPBELL BK, BRAMLEY TA, WEBB R. Insuline-like growth factor binding protein-2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and development status. *Endocrinology*. v. 139, p. 2146-2154, 1998.
- BAO B, GARVERICK HA. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J. Anim. Sci.* v. 76, p. 1903-1921, 1998.
- BARROS CM, ERENO RL. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 32, p. 23-34, 2004.
- BEG MA, BERGFELT DR, KOT K, GUINTHER OJ. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. *Biol. Reprod.* v. 66, p. 120-126, 2002.
- BÓ GA, MORENO D, CUIATA L, BARUSELLI PS, REIS EL. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 32, p. 1-22, 2004.
- BODENSTEINER KJ, CLAY CM, MOELLER CL, SAWYER HR. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. *Biol. Reprod.* v. 60, p. 381-386, 1999.
- DE LA SOTA RL, SIMMEN FA, DIAZ T, THATCHER WW. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. *Biol. Reprod.* v. 55, p. 803-812, 1996.
- DONG J, ALBERTINI DF, NISHIMORI K, KUMAR TR, LU N, MATZUK MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*. v. 383, p. 531-535, 1996.
- ELVIN JA, YAN C, MATZUK MM. Oocyte-expressed TGF-beta superfamily members in female fertility. *Mol. Cell. Endocrinol.* v. 25, p. 1-5, 2000.
- FIGUEIREDO RA, BARROS CM, PINHEIRO OL, SOLER, JMP. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v. 47, p. 1489-505, 1997.
- FORTUNE JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol. Reprod.* v. 50, p. 225-232, 1994.

- FORTUNE JE, RIVERA GM, EVANS ACO, TURZILLO AM. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol. Reprod.* v. 65, p. 648-654, 2001.
- FORTUNE JE, RIVERA GM, YANG MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.* v. 82-83, p. 109-126, 2004.
- GALLOWAY SM, MCNATTY KP, CAMBRIDGE LM, RITVOS O. Mutation in an oocyte derived growth factor gene (BMP-15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat. Genet.* v. 25, p. 279-283, 2000.
- GILCHRIST RB, RITTER LJ, ARMSTRONG DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim. Reprod. Sci.* v. 82-83, p. 431-446, 2004.
- GINTHER OJ, WILTBANK MC, FRICKE PM, GIBBONS JR, KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* v. 55, p. 1187-1194, 1996.
- GINTHER OJ, BEG MA, DONADEU FX, BERGFELT DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim. Reprod. Sci.* v. 78, p. 239-257, 2003.
- GONG JG, CAMPBELL BK, BRAMLEY TA, GUTIERREZ CG, PETERS AR, WEBB R. 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.* v. 55, p. 68-74, 1996.
- GOSPODAROWICZ D, PLOUET J, FUJII DK. Ovarian germinal epithelial cells respond to basic fibroblast growth factor and express its gene: implications for early folliculogenesis. *Endocrinology.* v. 125, p. 1266-1276, 1989.
- GUTIERREZ CG, RALPH JH, TELFER EE, WILMUT I, WEBB R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol. Reprod.* v. 62, p. 1322-1328, 2000.
- HERRLICH A, KÜHN B, GROSSE R, SCHMID A, SCHULTZ G, GUDERMANN T. Involvement of G_s and G_i proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. *J. Biol. Chem.* v. 271, p. 16764-16772, 1996.
- JOYCE IM, CLARK AT, PENDOLA FL, EPPIG JJ. Comparison of recombinant growth factor-9 and oocyte regulation of Kit ligand messenger ribonucleic acid expression in mouse ovarian follicles. *Biol. Reprod.* v. 63, p. 1669-1675, 2000.
- JUENGEL JL, HUDSON NL, HEATH DA, MCNATTY, KP. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biol. Reprod.* v. 67, p. 1777-89, 2002.
- JUENGEL JL, BONDENSTEINER DA, HEATH NL, HUDSON NL, MOELLER CL, SMITH P, GALLOWAY SM, DAVIS GH, SAWYER HR, MACNATTY KP. Physiology of GDF9 and BMP15 signaling molecules. *Anim. Reprod. Sci.* v. 82-83, p. 447-460, 2004.
- KISSEL H, TIMOKHINA I, HARDY MP, ROTHSCHILD G, TAJIMA Y, SOARES V, ANGELES M, WHITLOW SR, MANOVA K, BESMER P. Point mutation in kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signaling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other kit responses. *Embo J.* v. 19, p. 1312-1326, 2000.
- MAZERBOURG S, OVERGAARD TM, OXVIG C, CHRISTIAMSSEN M, CONOVER AC, LAURENDEAU I, VIDAND M, TOSSER-KLOPP G, ZAPF J, MONGET P. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine and equine ovarians follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development. *Endocrinology.* v. 142, p. 5243-5253, 2001.
- MCGRATH SA, ESQUELA AF, LEE S. Oocyte-specific expression of growth differentiation factor 9. *Mol. Endocrinol.* v. 9, p. 131-136, 1995.
- MCNATTY KP, HEATH DA, LUNDY T, FIDLER AE, QUIRKE L, O'CONNELL A., SMITH P, GROOME N, TISDALL DJ. Control of early ovarian follicular development. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* v. 54, p. 3-16, 1999.
- MIHM M, AUSTIN EJ, GOOD TEM, IRELAND JLH, KNIGHT PG, ROCHE JF, IREALND JJ. Identification of potential intrafollicular factors involved in selection of dominant follicles in heifers. *Biol. Reprod.* v. 63, p. 811-819, 2000.
- MIHM M, CROWE MA, KNIGHT PG, AUSTIN EJ. Follicle Wave Growth in Cattle. *Reprod. Domest. Anim.* v. 37, p. 191-200, 2002.

- MONNIAUX D, HUET C, BESNARD N, CLEMENT F, BOSC M, PISSELET C, MONGET P, MARIANA JC. Follicular growth and ovarian dynamics in mammals. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl. 51, p. 3-23, 1997.
- NILSSON E, PARROTT JA, SKINNER MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.* v. 175, p. 123-130, 2001.
- NILSSON E, SKINNER MK. Cellular interactions that control primordial follicle development and folliculogenesis. *J. Soc. Gynecol. Invest.*, v. 8, p. 17-20, 2001.
- NOGUEIRA MFG, PINTO MLG, RAINHO CA, AVELLAR MCW, PRICE CA, BURATINI JR J, BARROS CM. Expressão das isoformas do gene codificador do receptor de LH em células da teca e da granulosa de folículos antrais bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2005a (resumo aceito).
- NOGUEIRA MFG, BURATINI JR J, BARROS CM. Tratamento com hcg e lh, como indutores da ovulação em doadoras superestimuladas da raça nelore, não altera a produção embrionária ou a taxa de prenhez. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2005b (resumo aceito).
- OTSUKA F, YAO Z, LEE T, YAMAMOTO S, ERICKSON GF, SHIMASAKI S. Bone morphogenetic protein-15: identification of target cells and biological functions. *J. Biol. Chem.* v. 275, p. 39523-8, 2000.
- OTSUKA F, YAMAMOTO S, ERICKSON GF, SHIMASAKI S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *J. Biol. Chem.* v. 276, p. 11387-11392, 2001.
- OTSUKA F, SHIMASAKI S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein-15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 89, p. 8060-8065, 2002.
- SARTORI R, FRICKE PM, FERREIRA JCP, GINTHER OJ, WILTBANK MC. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol. Reproduction*. v. 65, p. 1403-1409, 2001.
- SARTORELLI E, CARVALHO L, BERGFELT D, GINTHER O, BARROS C. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*. v. 63, p. 2382-2394, 2005.
- SILVA JM, PRICE CA. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome P450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *J. Endocrinol.* v. 174, p. 499-507, 2002.
- SILVA JR, VAN DEN HURK R, VAN TOL HT, ROELEN BA, FIGUEIREDO JR. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol. Reprod. Dev.* v. 70, 2005. Abstract.
- SIROIS J, FORTUNE JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction*, v. 39, p. 308-17, 1988.
- SHIMASAKI S, MOORE RK, ERICKSON GF, OTSUKA F. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reproduction*. v. 61, p. 323-337, 2003.
- SPICER LJ. Proteolytic degradation of insulin-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. *Biol. Reprod.* v. 70, p. 1223-1230, 2004.
- VAN WEZEL IL, UMAPATHYSIVAM K, TILLEY WD, RODGERS RJ. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol. Cell. Endocrinol.* v. 115, p. 133-140, 1995.
- VITT UA, MCGEE EA, HAYASHI M, HSUEH AJW. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*. v. 141, p. 3814-3820, 2000a.
- VITT UA, HAYASHI M, KLEIN, C, HSUEH, A.J.W. Growth differentiation factor-9 stimulates proliferation but suppresses the follicle stimulating hormone-induced differentiation of cultured granulosa cells from small antral and preovulatory rat follicles. *Biol. Reprod.* v. 62, p. 370-377, 2000b.
- WANDJI SA, PELLETIER G, SIRARD MA. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I-labeled basic fibroblast growth factor and ¹²⁵I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. *Biol. Reprod.* v. 47, p. 807-813, 1992.
- WEBB R, NICHOLAS B, GONG JG, CAMPBELL BK, GUTIERREZ CG, GARVERICK HA, ARMSTRONG DG. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reprod. Suppl.* v. 61, p. 71-90, 2003.

YANG X, KUBOTA C, SUZUKI H, TANEJA M, BOLS PEJ, PRESICCE, GA. Control of oocyte maturation in cows - biological factors. *Theriogenology*. v. 49, p. 471-482, 1998.

YOSHIDA H, TAKAKURA N, KATAOKA H, KUNISADA T, OKAMURA H, NISHIKAWA S. Stepwise requirement of c-Kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev. Biol.* v. 184, p. 122-37, 1997.

YUAN W, BAO B, GARVERICK HA, YOUNGQUIST RS, LUCY MC. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Domes. Anim. Endocrinol.* v. 15, p. 55-63, 1998.

ANESTRO PÓS-PARTO EM BOVINOS: A SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEOS VEGETAIS PODE SER ÚTIL PARA ENCURTÁ-LO?

Ed Hoffmann Madureira¹; Raquel Helena Rocha Fernandes²; Luis Augusto Ferreira Rossa³; José Rodrigo Valim Pimentel⁴; Fernando do Amaral Braga⁵; Fernando José Delai Pardo⁵

INTRODUÇÃO

O Brasil, atualmente um dos maiores produtores de carne bovina, possui o maior rebanho comercial do mundo. Entretanto, o potencial para produção de carne ainda tem muito a ser explorado. A cadeia produtiva da carne tem carência de pessoal qualificado. Assim, ainda hoje, deficiências básicas de manejo limitam a produção em maior escala. No sistema extensivo de criação de gado de corte nos Estados Unidos, da mesma forma que no Brasil observa-se que 50% das vacas estão em anestro no início da estação de monta (Gasser et al., 2003; Lucy et al., 2001). Em vacas de corte, a duração do anestro pós-parto (pp) é afetada por vários fatores incluindo: a nutrição, baixa condição corporal (Hess et al. 2005); a amamentação (Wettemann et al. 2003); incidência de “ciclos curtos” (Madureira et al., 2004), o número de paríções e outros (Yavas e Walton, 2000b).

ANESTRO PÓS-PARTO EM VACAS DE CORTE

Para um rebanho comercial obter máxima produtividade, o ideal seria cada vaca produzir um bezerro por ano (Baruselli et al. 2001). Com um período de gestação de 290 dias, as vacas zebuínas têm que estar prênhes no máximo em 75 dias pp para que o IEP seja de 12 meses. Todavia, na maioria das vezes estas entram em anestro e não concebem neste período (Yavas e Walton, 2000). A presença de ovários pequenos, com ausência de corpo lúteo, é um sinal que caracteriza o anestro pp (Wiltbank et al. 2002).

Os mecanismos de controle do anestro pp envolvem uma complexa relação entre hipotálamo, hipófise, ovários e útero (Nett, 1987). A produção de grandes quantidades de esteróides placentários, especialmente o estradiol e a P₄, durante a fase final de gestação, tem forte efeito negativo sobre o hipotálamo o que resulta em baixa liberação de GnRH (Short et al. 1990). Entre 15 e 30 dias pp, os receptores de E₂ na hipófise se restabelecem, normalizando a responsividade do hipotálamo ao E₂ (Nett et al. 1988). Assim, no pp, os estoques de LH e FSH da hipófise anterior estão reduzidos devido ao “feedback” negativo que o E₂ e a P₄ exercem no hipotálamo no final da gestação. Entretanto, após o parto, as concentrações de FSH aumentam rapidamente o que permite o recrutamento e a seleção do folículo dominante (Williams, 1990; Wettemann et al. 2003). Este folículo só irá ovular quando houver restabelecimento da freqüência dos pulsos de LH (Mihm, 1999). Normalmente, o anestro é consequência de uma série de folículos dominantes que falham em ovular, devido a baixas concentrações de LH (Roche et al. 1992; Jolly et al. 1995). Decorridos cerca de 30 dias pp, há aumento das descargas de GnRH e, consequentemente, de pulsos de LH (Garcia-Winder et al.

¹ Prof. Dr. do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (VRA/FMVZ-USP)

² Doutorandos do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

³ Bioxen - Pesquisa e Desenvolvimento em Medicina Veterinária

⁴ Médico Veterinário, mestre em reprodução animal

⁵ Mestrando do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

1986). O aumento da amplitude dos pulsos de LH faz com que os folículos passem a dominantes e secretem grandes quantidades de E₂ ativando o “feedback” positivo no hipotálamo.

A hipófise, de vacas em anestro, apresenta concentrações de gonadotrofinas semelhantes à de vacas cíclicas aproximadamente 30 dias pp, respondendo normalmente ao GnRH exógeno. Assim, pesquisadores estão concentrando esforços para identificar sinais metabólicos e endócrinos que influenciam os mecanismos centrais que atuam sobre a secreção de LH (Lucy, 2003; Wettemann et al. 2003).

CONDIÇÃO CORPORAL BOVINA E DURAÇÃO DO ANESTRO

A condição corporal, método de avaliação das reservas corporais de gordura subcutânea e massa muscular, em bovinos de corte ou leite é eficaz e comum entre técnicos e produtores, sendo uma forma prática de avaliação da condição do animal. Fêmeas de corte devem ser manejadas para parir com uma adequada condição corporal e alimentadas com a finalidade de minimizar as perdas de reservas corporais durante o início da lactação (Hess et al. 2005). O balanço energético negativo que ocorre no pp reduz a disponibilidade de glicose e aumenta a mobilização de colesterol e triglicerídeos gerando energia (Grimard et al. 1995; Guedon et al. 1999).

Connor et al. (1990) correlacionaram positivamente a boa condição corporal com a disponibilidade de LH até os 30 dias pp e Ryan et al. (1994), seguindo a mesma linha de pesquisa, com aumento na freqüência de pulsos de LH. Crowe et al. (1993) relataram que vacas de corte em boa condição corporal possuem um intervalo “parto-primeira ovulação” entre 27 e 37 dias pp. Vacas de corte, com condição corporal ruim, costumam ovular entre 60 e 120 dias pp (Stagg et al. 1995). Para Grimard et al. (1995) e Guedon et al. (1999) as vacas primíparas, por ainda estarem em crescimento, apresentam menor amplitude de pulsos de LH no pp e o período de anestro prolonga-se por 1 a 4 semanas se comparado ao de vacas multíparas.

Vacas com comprometimento nutricional parecem mais sensíveis aos efeitos de “feedback” negativo do E₂ (Wettemann et al. 2003), permanecendo acíclicas por 100 dias (Williams, 1990) ou mais em decorrência da baixa amplitude e freqüência da secreção de LH (Schillo, 1992).

SUPLEMENTAÇÃO PRÉ-PARTO E PÓS-PARTO

O uso de suplementação pré e pp pode resultar em menor período anovulatório pp. Bellows et al. (2001), ao suplementarem no período pré-parto vacas de primeira cria com diferentes sementes oleaginosas, observaram maior taxa de gestação nos animais tratados (91,7 vs. 79%). Este mesmo grupo, em um segundo experimento, forneceu dieta com semente de girassol e o controle com 6,5 e 2,2% de gordura respectivamente, por 68 dias no pré-parto, entretanto a taxa de prenhez subsequente foi semelhante. Após estimativa da quantidade e qualidade da forrageira disponível, concluiu-se que a ausência de efeito, no segundo experimento pela alta qualidade e a abundância de forrageira disponível, que mascarou qualquer possível efeito da suplementação.

Wehrman et al. (1991) suplementaram vacas paridas, ECC=4, com caroço de algodão e observaram um aumento de até 18% no número de vacas que estavam ciclano, quando se iniciou a estação de monta, 30 dias após o início do período de suplementação. A resposta foi mais evidente quando as condições experimentais

resultaram em perda de condição corporal, durante o período pp, à despeito da suplementação.

No período pp, ocorre um declínio nos teores séricos de GH e segundo Thomas et al. (1997) o consumo de gordura é capaz de evitá-lo. Não se sabe ao certo a importância deste efeito sobre os incrementos reprodutivos que se observam, mas vale lembrar que os receptores para o hormônio de crescimento são abundantes no corpo lúteo (Lucy et al. 1993). O uso de suplementação com grão de arroz, 5,2% de E.E. na dieta experimental e 3,7% de E.E na dieta controle, por 50 dias pós- parto mostrou tendência a melhorar a taxa de prenhez nos animais do tratamento com gordura (De Fries et al. 1998). Gong, (2002) demonstrou que o uso de dietas que aumentam a insulina circulante, em vacas leiteiras em início de lactação, pode adiantar a primeira ovulação, pp, e aumentar a taxa de concepção no primeiro serviço. Entretanto, para alguns autores a suplementação energética, no período pp, mostrou-se muito dispendiosa e muitas vezes ineficaz para estimular a ciclicidade e com isso, reduzir o intervalo entre partos. Filley et al. (2000), forneceram 0,23kg/d de gordura protegida para novilhas, com ECC=5, durante 30 dias após o parto e não encontraram diferença na taxa de prenhez, nem no número de dias para o primeiro serviço. Grant et al. (2003) ao fornecerem suplementação com altas quantidades, de ácido linolêico na forma de sementes cártamo durante o pp de vacas de corte, observaram aumento no metabólito da PGF do dia 25 ao dia 80 pp e tendência à diminuição na taxa de concepção ao primeiro serviço.

O efeito benéfico da suplementação de lipídeos sobre a reprodução, em geral, não parece estar associado simplesmente a um aumento do consumo energético. Pode haver um efeito extracalórico da gordura, mais especificamente de certos ácidos graxos, na reprodução (Grummer, 2004). Os principais metabólitos que indicam a variação no metabolismo lipídico são colesterol total, triglicerídeos e lipoproteínas de baixa e alta densidade (Mancio et al. 1999). Na busca por respostas, que sinalizem a modulação da capacidade reprodutiva pela nutrição, a insulina é um dos hormônios metabólicos que chama grande atenção (Hess et al. 2005).

A indisponibilidade de glicose reduz a liberação de GnRH hipotalâmico (Wetteman et al. 2003). A associação de glicose e insulina estimulou a liberação de GnRH hipotalâmico (Arias et al. 1992). O aumento da insulina, associado ao decréscimo de GH, é uma relação importante para avaliar o impacto nutricional sobre a reprodução (Hawkins et al. 2000). A relação funcional entre a insulina e o GH, no que diz respeito à reprodução, parece ser de natureza anabólica. A via somatotrófica parece estar relacionada em mediar o status metabólico centralmente. Segundo Lucy et al. (1999), os folículos ovarianos não possuem receptores para GH apesar deste atuar diretamente sobre as células luteínicas. O GH interage com a insulina para controlar a produção hepática de IGF-I (Molento et al. 2002). Vacas em anestro pp, com restrição energética, não apresentaram aumento nas concentrações de IGF-I, diferentemente de animais que haviam voltado a ciclar (Roberts et al. 1997). Hess et al. (2005) concluíram que independentemente da origem deste hormônio, este age positivamente no eixo hipotálamo-hipófise-ovariano.

Williams e Stanko, (1999) demonstraram que o uso de óleo vegetal poliinsaturado aumentou a concentração de insulina e GH no soro de vacas leiteiras e de corte. Bottger et al. (2002), em novilhas de corte primíparas, suplementadas com semente oleoginosa, contendo alta quantidade de ácido oléico ou linolêico, não encontraram efeito sobre a concentração de glicose, ácidos graxos não esterificados (AGNE), GH, IGF-I, insulina, e proteínas ligadas ao IGF-I. Da mesma forma, Bellows et al. (2001) relataram que as concentrações de IGF-I, glicose, AGNE eram semelhantes entre os animais que receberam ou não suplementação, ao alimentarem fêmeas de corte

primíparas, com sementes de girassol no período pré-parto. Staples et al. (1998) ao revisarem a suplementação de gordura em vacas leiteiras encontraram vários trabalhos que relatavam baixa concentração de insulina em animais suplementados com gordura. Foi relatado que os AGNE normalmente encontram-se aumentados em vacas suplementadas com gordura, entretanto, a concentração de glicose raramente é influenciada pela adição de gordura à dieta. A ingestão de óleos vegetais aumenta a concentração basal de insulina, este hormônio pode mediar os efeitos sobre a dinâmica folicular, diretamente em seus próprios receptores (Thomas e Williams, 1996), ou indiretamente, pela modulação da produção de IGF-1 nas células da granulosa (Yoshimura et al. 1994).

As células luteínicas ovarianas utilizam o colesterol como precursor para a síntese de progesterona, através de um “pool” de lipoproteínas (Williams e Stanko, 1999). A adição de gordura à dieta aumenta os teores circulantes de colesterol (Staples et al. 1998) e progesterona (Lammoglia et al. 2000; Ahmadzadeh, 2004) assim como o tempo de vida do corpo lúteo induzido em bovinos (Williams e Stanko, 1999) e possivelmente melhorar a fertilidade (Ahmadzadeh, 2004). As dietas para fêmeas bovinas, com adição de gordura acima do recomendado alteram o metabolismo dos lipídios, aumentando o nível de colesterol plasmático, disponibilizando maior quantidade de precursores para a esteroidogênese ovariana (Williams, 1989). Segundo Bao et al. (1995), dietas com elevado teor de lipídeos aumentam as concentrações séricas da lipoproteína de alta densidade (HDL) que estimula: a produção de IGF-1 pelas células luteínicas e da granulosa, e ainda talvez possam interferir na função ovariana cíclica por alterar a quantidade do principal substrato (HDL) para síntese de esteróides ovarianos (Grummer e Carroll, 1988). O aumento da concentração de colesterol, proveniente da suplementação com gordura pode ainda reduzir sua taxa de “clearance” sanguínea (Williams e Stanko, 2000) assim como a utilização celular.

As melhores respostas relacionadas à dinâmica folicular foram atingidas pela administração de óleos vegetais que são ricos em ácido linoléico. Muñoz-Gutiérrez (2002), ao estudar a foliculogênese e a expressão da aromatase em ovelhas, observaram que os suplementos energéticos modificaram o recrutamento (2-3 mm e 3-4 mm) e a seleção de folículos (>6 mm), entretanto tais autores não relataram relação entre os suplementos (glicose, glucosamina ou lupus) e a concentração de FSH.

Em vacas leiteiras lactantes, o retorno ao padrão normal de secreção de FSH, logo após o parto, não foi considerado fator limitante (Gong et al. 2002). Alterações severas e prolongadas no padrão nutricional podem alterar o pulso de LH em bovinos, entretanto, alterações por curtos períodos não afetam a secreção pulsátil de LH (Boland et al. 2001). Alterações nutricionais apresentam um efeito direto sobre a foliculogênese (Muñoz-Gutiérrez, 2002).

A adição de gordura à dieta estimula o crescimento programado do folículo pré-ovulatório, aumenta a quantidade de folículos e aumenta o tamanho do folículo pré-ovulatório (Mattos et al. 2000). A ovulação de folículos maiores pode levar à formação de corpo lúteo de maior tamanho com capacidade esteiroideogênica aumentada. Lammoglia et al. (1996) verificaram que o número de folículos classificados como grandes (≥ 8 mm) também aumentou quando vacas Brahman foram suplementadas com farelo de arroz no pp. Mancio et al. (1999), demonstraram correlação positiva entre as concentrações de progesterona, HDL e colesterol ao utilizarem dietas hiperlipídicas. O uso de gordura na dieta normalmente aumenta o tamanho do folículo dominante.

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. Entretanto, antes de se recomendar o uso de progestágenos é essencial entender que uma boa condição corporal é pré-requisito para um menor anestro pp.

Com a finalidade de testar a suplementação com óleos vegetais no desempenho reprodutivo de vacas Nelore submetidas ao programa de IATF, foi realizado um experimento com 200 vacas Nelore, recém paridas. Estes animais foram divididos em dois grupos, o primeiro suplementado apenas com caroço de algodão, o segundo foi suplementado com grão de milho moído associado ao farelo de algodão. Respectivamente, a quantidade diária de lipídeos fornecida foi 175g e 40g, as quantidades de proteína bruta e nutrientes digestíveis totais fornecidas diariamente foram semelhantes. Todas as vacas foram sincronizadas com emprego de progestágeno 12 dias antes do início da estação de monta. Para sincronização dos animais foi utilizado implante auricular contendo 3 mg de norgestomet e aplicada uma injeção (im) de 5 mg de valerato de estradiol + 3 mg de norgestomet (Crestar®). Na retirada do implante, após 10 dias, estes animais foram novamente divididos em dois grupos para administração ou não de 500 UI de eCG. Vinte e quatro horas após a retirada do implante foi aplicado benzoato de estradiol (1mg) em todos os animais, sendo realizada a IATF 54 h após a retirada do implante. A taxa de prênhes e a concentração de progesterona plasmática foram estatisticamente semelhantes entre os grupos. Entretanto, a taxa de prenhez encontrada na IATF foi de aproximadamente 65%, um valor extremamente interessante quando comparado aos índices nacionais. Desta forma, o possível efeito extracalórico da gordura, mais especificamente de certos ácidos graxos, na reprodução não foi evidenciado por este experimento. Aparentemente a ausência de efeito foi resultado da boa condição corporal dos animais, qualidade do concentrado oferecido assim como pela abundância de forrageira disponível. Devemos lembrar que a quantidade de concentrado fornecido era capaz de elevar o teor de proteína diária fornecido aos animais em quantidades adequadas para viabilizar a ingestão adequada de matéria seca sugerindo que um possível efeito extracalórico da gordura sobre a reprodução pode ter sido mascarado pelas boas condições encontradas.

Além dos efeitos nutricionais sobre o anestro pós-parto e a taxa de prenhez, vale lembrar que estes também sofrem influência da amamentação e ainda dos “ciclos curtos” maiores detalhes sobre a influencia destes fatores sobre o anestro pós-parto podem ser encontrados em Madureira et al. 2004.

CONCLUSÃO

Vários fatores atuam sobre o anestro pp e que para a melhor eficiência reprodutiva do rebanho nacional deve-se observar a condição nutricional dessas fêmeas, assim como o sistema de amamentação ao qual este animal está submetido. Nutrição e amamentação são fatores limitantes à reprodução atuando conjuntamente. Os mecanismos endógenos pelos quais a nutrição e a amamentação retardam a atividade reprodutiva em bovinos estão sendo estudados, desta forma, no futuro serão descobertas ferramentas que auxiliem na redução do impacto do período de anestro sobre o desempenho reprodutivo. Programas de IATF associados à suplementação estratégica podem aumentar a taxa de prenhez e diminuir o intervalo entre partos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAZADEH, A. Effects of nutrition on reproduction in dairy cows. <http://www.dasc.vt.edu/nutritioncc/9655.html> acessado em 26/07/04.
- ARIAS, P.; RODRIGUEZ, M.; SZWARCFARB, B.; SINAY, I.R.; MOGUILAEVSKY, J.A. Effect of insulin on LHRH release by perfused hypothalamic fragments. *Neuroendocrinology*, v. 56, p. 415-418, 1992.
- BAO, B.; THOMAS, M.G.; GRIFFITH, M.K.; BURGHARDT, R.C.; WILLIAMS, G.L. Steroidogenic activity, insulin-like-growth factor I production, and proliferation of granulosa and theca cells obtained from dominant preovulatory and nonovulatory follicles during the bovine estrous cycle: effects of low-density and high-density lipoproteins. *Biology of Reproduction*, v. 53, p. 1271-1279, 1995.
- BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; MARQUES, M.O. Programas de inseminación artificial a tiempo fijo en Bos indicus. *Taurus*, n. 12, p. 15-25, 2001.
- BELLOWS, R.A.; GRINGS, E.E.; SIMMS, D.D.; GEARY, T.W.; BERGMAN, J.W. Effects of feeding supplemental fat during gestation to first-calf beef heifers. *Professional Animal Scientist*, v. 17, p. 81-89, 2001.
- BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, V. 55, P. 1323-1340, 2001.
- BOTTGER, J.D.; HESS, B.D.; ALEXANDER, B.M.; HIXON, D.L.; WOODARD, L.F. FUNSTON, R.N.; HALFORD, D.M.; MOSS, G.E. Effects of supplementation with high linoleic or oleic cracked safflower seeds on postpartum reproduction and calf performance of primiparous beef heifers. *Journal of Animal Science*, v. 80, p. 2023-2030, 2002.
- 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 hypotalamic opioidis in beef cows. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 7, n. 3, p. 403-411, 1990.
- 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, p. 551-555, 1993.
- DE FRIES, C.A.; NEUENDORFF, D.A.; RANDAL, R.D. Fat supplementation influences post partum reproductive performance in Brahman cows. *Journal of Animal Science*, v. 76, p. 864-870, 1998.
- FILLEY, S.J.; TURNER, H.A.; STORMSHAK, F. Plasma fatty acids, prostaglandin F2 α metabolite, and reproductive response in postpartum heifer fed rumen by-pass fat. *Journal of Animal Science*, v. 78, p. 139-144, 2000.
- GARCIA-WINDER, M.; LEWIS, P.E.; DEAVER, D.R.; INSKEEP, E.K. Endocrine profiles associated with life span of induced corpora lutea in post partum beef cows. *Journal of Animal Science*, v. 62, p. 1353-1362, 1986.
- 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.
- GONG, J.G.; LEE, W.J.; GARNSTWORTHY, P.C.; WEBB, R. Effect of dietary induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction*, v. 123, p. 419-427, 2002.
- GRANT, M.H.J.; HESS, B.W.; BOTTGER, J.D.; HIXON, D.L.; VAN KIRK, B.M.; ALEXANDER, T.M.; NETT, T.M.; MOSS, G.E. Effect of feeding high-linoleate safflower seeds on reproductive endocrine dynamics in postpartum beef cows. *Proceedings of Western Section American Society of Animal Science*, v. 53, p. 436-439, 2003.
- GRIMARD, B.; HUMBLOT, P.; PONTER, A.A.; MIALOT, J.P.; SAUVANT, D.; THIBIE R, 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*, v. 104, p. 173-9, 1995.

- GRUMMER, R.R. Gordura na dieta: Fonte energética e/ou regulador metabólico? Novos enfoques na produção e reprodução de Bovinos. p. 83-94. 2004.
- GRUMMER, R.R.; CARROLL, D.J. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: Importance to ovarian function. *Journal of Animal Science*, v. 66, p. 3160-, 1988.
- GUEDON, L.; SAUMANDE, J.; DESBALS, B. Relationships between calf birth weight, prepartum concentration of plasma energy metabolites and resumption of ovulation postpartum in Limousine suckled beef cows. *Theriogenology*, v. 52, p. 779-89, 1999.
- HAWKINS, D.E.; PETERSEN, M.K.; THOMAS, M.G.; SAWYER, J.E.; WATERMAN, R.C. Can beef heifers and young postpartum cows be physiologically and nutritionally manipulated to optimize reproductive efficiency? www.asas.org/JAS/symposia/proceedings0928.pdf.acessado....
- HESS, B.W.; LAKE, S.L.; SCHOLLJEGERDES, E.J.; WESTON, T.R.; NAYIGIHUGU, V.; MOLLE, J.D. C.; MOSS, G.E. Nutritional controls of beef cow reproduction. *Journal of Animal Science*, v. 83, p. 90-106, 2005.
- JOLLY, P.D.; MCDOUGALL, S.; FITZPATRICK, L.A.; MACMILLAN, K.L.; ENTWISTLE, K.W. Physiological effects of under nutrition on postpartum anoestrus in cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 49, p. 477-92., 1995.
- 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.
- LAMMOGLIA, M.A.; BELLOWS, R.A.; GRINGS, E.E.; BERGMAN, J.W.; BELLOWS, E.; SHORT, R.E.; HALLFORD, D.M.; RANDAL, R.D. Effects of dietary fat and sire breed on puberty, weight, and reproductive traits of F1 beef heifers. *Journal of Animal Science*, v. 78, p. 2244-2252, 2000.
- LUCY, M.C. Mechanisms linking nutrition and reproduction in postpartum cows. *Reproduction Supplement*, v. 61, p. 415-427, 2003.
- LUCY, M.C.; BILBY, C.R.; KIRBY, C.J.; YUAN, W.; BOYD, C.K. Role of growth hormone in development and maintenance of follicles and corpora lutea. *Journal Reproduction Fertility Suplement*, v. 54, p. 49-59, 1999.
- LUCY, M.C.; KITCHELL, R.J.; DIBNER, J.J. HAUSER, S.D.; KRIVI, G.G. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. *Biology of Reproduction*, v. 48, p. 1219-27, 1993.
- 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 PGF_{2α} 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.
- MANCIO A.B.; LONDOÑO HERNÁNDEZ, F.I.; FONSECA, F.A.; ANGULO L.M. Fontes lipídicas dietéticas associadas ou não à gonadotrofina coriônica humana (hCG) na função reprodutiva e no metabolismo de lípidos de novilha. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, V. 51 no. 2, p. 163-170, 1999.
- MATTOS, R.C.; STAPLES, C.R.; THATCHER, W.W. Effects of dietary fatty acids on reproduction in ruminants. *Rev. Reproduction*, v. 5, p. 38-45, 2000.
- MADUREIRA, E.H; PIMENTEL, J.R.V.; ALMEIDA, A.B.; ROSSA, L.A.F. Sincronização com progestágenos. In: Anais do Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, 2004
- MIHM, M. Delayed resumption of cyclicity in postpartum dairy and beef cattle. *Reproduction Domestic Animal*, v. 34, p. 277-284, 1999.
- MOLENTO, C.F.M; BLOCK, E.; CUE, R.I.; PETICLERC, D. Effects of insulin, recombinant bovine somatotropin, and their interaction on insulin-like growth factor I secretion on milk production in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. v. 85, p. 738-747, 2002.
- MUÑOZ-GUTIÉRREZ, M.; BLANCHE, D.; MARTIN, G.B.; SCARAMUZI, R.J. Folliculogenesis and ovarian expresión of RNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction*, v. 124, p. 721-731, 2002.

- NETT, T. M. Function of the hypothalamic-hypophyseal axis during the postpartum period in ewes and cows. In: G.D. NISWENDER (Ed.) Reproduction in Domestic Ruminants. 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 gonadotrophins in beef cows II. Domestic Animal Endocrinology, v. 5, p. 81-89, 1988.
- ROBERTS, A.J.; NUGENT, R.A.; KLINDT, J.; JEKINS, T.G. Circulating insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding proteins, growth hormone, and resumption of estrus in postpartum cows subjected to dietary energy restriction. Journal of Animal Science, v. 75, p. 1909-1917, 1997.
- ROCHE, J.F.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P. Postpartum anoestrus in dairy and beef cows. Animal Reproduction Science, v. 38, p. 371-8, 1992.
- RYAN, D.P.; SPOON, R.A.; GRIFFITH, M.K.; WILLIAMS, G.L. Ovarian follicular recruitment, granulose cellsteroidogenic potential, growth hormone/insulin-like growth factor-1 relationships in beef cows consuming high lipid diets: Effects of graded differences in body condition maintained during the puerperium. Domestic Animal Endocrinology, v. 11, p. 161-174, 1994.
- SCHILLO, K.K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. Journal of Animal Science, v. 7081, p. 1271-1282, 1992.
- SHORT, R.E.; BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B.; BERARDINELLI, J.G.; CUSTER, E.E. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. Journal of Animal Science, v. 68, p. 799-816, 1990.
- STAGG, K.; DISKIN, M.G.; SREENAN, J.M.; ROCHE, J.F. Follicular development in long-term anoestrous suckler beef cows fed two levels of energy postpartum. Animal Reproduction Science, v. 38, p. 49-61371-8, 1995.
- STAPLES, C.R.; BURKE, J.M.; THACTHER, W.W. Influence of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. Journal of Dairy Science, v. 81, p. 856-871, 1998.
- THOMAS, M.G.; BAO, B.; WILLIAMS, G.L. Dietary fats varying in their fatty acid composition differentially influence follicular growth in cows fed isoenergetic diets. Journal of Animal Science, v. 75, p. 2512-9, 1997.
- THOMAS, M.G.; WILLIAMS, G.L. Metabolic hormone secretion and FSH-induced superovulatory responses of beef heifers fed dietary fat supplements containing predominantly saturates or polyunsaturated fatty acids. Theriogenology, v. 45, p. 451-8, 1996.
- WEHRMAN, M.E.; WELSH, T.H.; WILLIAMS, G.L. Diet induced hyperlipidemia in cattle modifies the intrafollicular cholesterol environment, modulated ovarian follicular dynamics, and hasten the onset of postpartum luteal activity. Biology of Reproduction, v. 45, p. 504-514, 1991.
- WETTEMANN, R.P.; LENTS, C.A.; CICCIOLI, N.H.; WHITE, F.J.; RUBIO, I. Nutritional and suckling mediated anovulation in beef cows. Journal of Animal Science, v. 81, p. 48-59, 2003.
- WILLIAMS, G.L. Modulation of luteal activity in postpartum beef cows through changes in dietary lipid. Journal of Animal Science, v. 67, p. 785-93, 1989.
- WILLIAMS, G.L. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. Journal of Animal Science, v. 68, p. 831-52, 1990.
- WILLIAMS, G.L.; STANKO, R.L. Dietary fats as reproductive nutraceuticals in beef cattle. Proceedings of the American Society of Animal Science. 1999N. Acesso 19/05/2005 Internet: www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0915.pdf
- 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. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. Theriogenology, v. 54, p. 25-55, 2000b.

SINCRONIZACION DE LA EMERGENCIA DE LA ONDA FOLICULAR Y LA OVULACIÓN EN ANIMALES TRATADOS CON PROGESTAGENOS Y DIFERENTES ESTERES DE ESTRADIOL

Gabriel A. Bó¹, M.G. Colazo², M.F. Martínez², J.P. Kastelic² y R.J. Mapletoft²

RESUMEN

Sabemos que la dinámica de las ondas foliculares puede afectar la sincronía del celo después de un tratamiento con prostaglandina y la respuesta superovulatoria después de un tratamiento de gonadotropina. Pueden utilizarse progestágenos para controlar la fase luteal del ciclo estral pero la sincronía del celo y la ovulación después de la remoción depende del control del desarrollo folicular. Se ha demostrado que los estrógenos administrados en la fase de elevados niveles de progesterona inducen la regresión folicular y la emergencia de una onda folicular sincrónica, mientras que la administración en la fase de bajos niveles de progesterona induce liberación de LH y la ovulación. De los estrógenos probados, el Estradiol (E) -17 β fue el de acción más corta. Hubo emergencia de la onda folicular aproximadamente 4 d después de la administración de 5 mg de E-17 β en animales tratados con dispositivos con progestágenos. El benzoato de estradiol (EB) es un éster de acción algo más prolongada. Luego de la administración de 5 mg de EB, la emergencia de la onda folicular ocurrió aproximadamente a los 5 d con cierta variabilidad. Sin embargo, la administración de 2,5 mg de EB resultó en la emergencia de la onda folicular en 4 d con poca variabilidad. El estradiol-17 β y el benzoato de estradiol han sido utilizados indistintamente en programas de IA a tiempo fijo (IATF). El valerato de estradiol (EV) es de acción más prolongada. La administración de una dosis de 5 mg de EV resultó en la emergencia de una onda folicular en aproximadamente 5,5 d con una variabilidad considerable. Sin embargo dosis de 2 mg han resultado en una relativa menor variabilidad como para ser utilizado en sincronización de celos. El cipionato de estradiol (ECP) es de acción muy prolongada. A pesar de que, en promedio, la emergencia de la onda folicular ocurrió 4 d después de la administración de 1 mg de ECP, tuvo una variabilidad de 2 a 7 d. Sin embargo tiene una gran utilidad como inductor de la ovulación. Se revisarán varios estudios que utilizaron estos estrógenos en varios programas de superestimulación e IA a tiempo fijo, en un intento por simplificar la programación de vacas donantes y receptoras en un programa de transferencia de embriones.

INTRODUCCION

Durante los últimos años, el uso de nuevas tecnologías, especialmente las relacionadas con reproducción animal, han adquirido gran importancia para mejorar la producción agrícola en el mundo. Entre las nuevas tecnologías, aquellas relacionadas con la transferencia de embriones han sido utilizadas durante casi treinta años para reproducir y mejorar buena genética. En la actualidad, la transferencia de embrones es muy utilizada en todo el mundo y se transfieren más de 500.000 embrones por año (Thibier, 2003). Sin embargo, la variabilidad en la respuesta a los tratamientos hormonales, el tiempo y los esfuerzos necesarios para realizar tratamientos y detección

¹Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), J.L. de Cabrera 106 (X5000 GVD) Córdoba, Argentina

²Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada

de celo limitan tanto la aplicación generalizada como el éxito de esta tecnología. Los protocolos diseñados para controlar la función luteal y folicular permiten iniciar tratamientos de superestimulación en un momento arbitrariamente determinado y brindan muy buenas posibilidades para la sincronización de celo sin la necesidad de detectarlo en las receptoras. En esta presentación revisaremos el uso de estradiol- (E) 17 β y ésteres de estrógeno específicos y discutiremos cómo éstos pueden afectar a la efectividad y a la aplicación de programas de transferencia de embriones e IATF.

A pesar de que hace décadas que se conocen los efectos de sincronización de los tratamientos que combinan progestágenos y estradiol, recién con los últimos descubrimientos de los efectos del estradiol sobre el desarrollo folicular se logró comprender completamente el motivo de dichos efectos. En una serie de experimentos, se encontró que el estradiol suprime el desarrollo del folículo antral (Bo et al., 1994, 1995a) y que dicha supresión es mayor cuando la aplicación se da después de la inserción de un implante de norgestomet en la oreja (Bo et al., 1995b). El mecanismo responsable de la supresión del crecimiento folicular inducida por estrógeno ser más sistémica que local (Bo et al., 2000) e incluyó la supresión de la FSH (Bo et al., 1994). Una vez que el estradiol fue metabolizado, hubo un pico de FSH en la circulación y emergió una nueva onda folicular. A la administración de 5 mg de E-17 β en animales implantados siguió la emergencia de una nueva onda folicular en un promedio de $4,3 \pm 0,2$ d más tarde (Bo et al., 1995a) sin importar la fase del desarrollo folicular al momento del tratamiento. Otros estudios evaluaron el efecto de diferentes ésteres de estradiol sobre el desarrollo de la onda folicular. El benzoato de estradiol (EB; Caccia y Bo, 1998) y el valerato de estradiol (EV; Mapleton et al., 1999) en una dosis de 5 mg y el cipionato de estradiol (ECP) en una dosis de 1 mg (Thundathil et al., 1997) dieron como resultado un tiempo menos predecible de emergencia de onda. Sin embargo, la administración de 2 mg de EB combinado con 50 mg de progesterona tuvo como resultado la emergencia de una onda folicular en $4,1 \pm 0,1$ d con una variabilidad de 3,5 a 5 d (Moreno et al., 2001) y las dosis de 2 mg de EV ha resultado en un comienzo de la onda 2 a 5 días después (Colazo et al., 2004). Una dosis de 0,5 mg de ECP tuvo como resultado un intervalo más prolongado a la emergencia de la onda folicular (Thundathil et al., 1997)

EL ESTRADIOL Y SUS ÉSTERES

Los estrógenos naturales son esteroides con 18 átomos de carbono y un anillo fenólico A (anillo aromático con un grupo hidrófilo carbono 3) y un grupo hidrófilo β cetónico en el carbono 17 del anillo D. El anillo fenólico A es la estructura responsable de la alta afinidad ligada a receptores de estrógeno. El estradiol-17 β es el más potente de los principales estrógenos que se encuentran tanto en humanos como en animales. Es el principal producto secretado por el ovario y se oxida fácilmente y se transforma en estrona en el hígado y está ligado en más del 50% a proteínas plasmáticas. Los estrógenos están distribuidos en todo el cuerpo y se acumulan en el tejido adiposo. La eliminación de estrógenos esteroides se da principalmente a través del metabolismo hepático. El estradiol-17 β estrona o estriol son eliminados como conjugados de glucurónido o sulfato. Los estrógenos y sus metabolitos son eliminados principalmente a través de la orina pero además son eliminados a través de la bilis donde la mayoría son reabsorbidos desde el tracto intestinal. Debido su baja solubilidad en agua, los ésteres de estradiol se absorben en un intervalo prolongado.

Los estrógenos en soluciones oleosas son absorbidos rápidamente, aunque la absorción puede continuar durante varios días después de su administración

intramuscular. Los estrógenos esterificados poseen absorción retardada después de su administración intramuscular. Dichos ésteres son absorbidos desde el lugar de inyección y el E-17 β activo es liberado después de la hidrólisis. El estradiol-17 β es la hormona activa que resulta del clivaje de los ésteres de estradiol. Un éster es una cadena compuesta principalmente por átomos de carbono están típicamente adheridos a la hormona esteroide matriz en la posición del carbono 17. La esterificación del grupo hidróxilo de 17 β de estradiol-17 β lleva a la protección de este grupo contra el ataque metabólico y prolongan el efecto. Por lo tanto, el cipionato de estradiol ($C_{26}H_{36}O_3$; PM 396,6) producido por la esterificación del estradiol con ácido ciclopentanopropionico, tiene una actividad biológica mucho más sostenida que el estradiol-17 β ($C_{18}H_{24}O_2$; PM 272,4). Por otra parte, el benzoato de estradiol ($C_{25}H_{28}O_3$; MW 376,5) se produce por la esterificación del carbono de la posición 3 y tiene un periodo de acción más corto. El valerato de estradiol ($C_{23}H_{32}O_3$; MW – 356,5) es de acción inmediata. Cuanto más larga es la cadena del éster, más baja es la solubilidad en agua y más demorará en absorberse la dosis completa. Una vez en la circulación, el éster es clivado por una enzima estearasa (lo hidroliza) y la actividad biológica vuelve a ser la del E-17 β normal. Por lo tanto la duración de la acción depende de la absorción y no del metabolismo.

LOS EFECTOS DEL ESTRADIOL Y SUS ÉSTERES

El efecto del estradiol y/o la progesterona al momento de la inserción de un dispositivo con progesterona en vacas ovariectomizadas.

Las concentraciones de estradiol y FSH en plasma luego de la administración de 5 mg de E-17 β , benzoato de estradiol o valerato de estradiol en vacas ovariectomizadas se muestran en la Figura 1. Las concentraciones de estradiol en plasma mostraron consistentemente un pico 6 h después del tratamiento con E-17 β y disminuyeron gradualmente a niveles basales a las 36 h (Martinez, 2002). También se ha informado que las concentraciones de estradiol aumentaron drásticamente a las 2 (Bo et al., 2000) y 6 h (Bo et al., 1994) después del tratamiento con E-17 β . Las concentraciones de estradiol en plasma aumentaron más rápidamente y alcanzaron un pico más elevado tras el tratamiento con E-17 β que con tratamientos con EB o EV. Además, el estradiol en plasma no regresó a niveles basales hasta las 96 h en vacas ovariectomizadas tratadas con EB y con EV (Martinez, 2002), tal como describimos anteriormente (Bo et al con EV en vaquillonas intactas.(1990) describieron un descenso bifásico de las concentraciones de estradiol después del pico en animales tratados con EB. Una fase de eliminación de aproximadamente 48 h siguió a una fase inicial de distribución de aproximadamente 48 h. Vynckier et al. (1990) también mostraron que las concentraciones de estradiol en plasma durante el estro inducido con PGF llegó a 14 ± 2 pg/mL (rango, 11 a 28 pg/mL), similar a lo que sucedió después de una inyección de 1 mg de EB. Por otra parte, las concentraciones de estradiol en plasma durante la preñez avanzada duplican o triplican las alcanzadas después de una inyección de 5 mg de EB o EV.

Los picos en las concentraciones de estradiol después de la inyección de 5 mg de E-17 β , EB o EV dependieron del estrógeno utilizado. Por lo tanto, cada forma de estradiol tendrá diferentes efectos sobre las concentraciones de gonadotropina y los folículos ováricos. Las concentraciones de estradiol en plasma después de las inyecciones de EB o EV no aumentaron tan rápidamente como con E-17 β sino que alcanzaron un pico y disminuyeron más lentamente (Martinez, 2002). Vynckier et al., (1990) informaron que luego de una inyección de 10 mg, los niveles de los picos fueron menores y más prolongados con ECP que con EB.

El aumento en las concentraciones de estradiol circulante provocó una disminución en las concentraciones de FSH en plasma. El tratamiento con 5 mg de E-17 β en vacas ovariectomizadas resultó en una disminución de las concentraciones de FSH en plasma en 6 a 48 h (Martinez, 2002). En animales intactos, la supresión de concentraciones de FSH en plasma por este intervalo resultaría en la supresión de los folículos antrales. En experimentos anteriores, la inyección de 5 mg de E-17 β en animales intactos resultó en la supresión de FSH durante aproximadamente 36 a 48 h, seguida por un aumento durante las 36 a 48 h siguientes y la emergencia sincrónica de una onda folicular 1 d más tarde sin importar el estadio de la onda folicular al momento del tratamiento (Bo et al.). En vacas ovariectomizadas, las concentraciones de FSH en plasma aumentaron antes y alcanzaron mayores concentraciones en el grupo con E-17 β que en los con EB o EV (Martinez, 2002). Mientras la FSH regresó a las concentraciones previas al tratamiento a las 60 h después del tratamiento en el grupo con E-17 β , en los grupos con EB y con EV, la FSH en plasma comenzó a aumentar 12 a 24 h más tarde que en el grupo con E-17 β . Esto resultaría en la emergencia de una onda folicular 1 d más tarde (es decir, un intervalo de 3 a 4 d en animales tratados con E-17 β y de 4 a 5 d en animales tratados con EB o EV). El retraso en el incremento de las concentraciones de FSH en plasma puede servir para explicar tanto la demora como la variabilidad en la emergencia de la onda folicular que se observa en animales intactos tratados con dosis de 5 mg de EB (Bo et al., 1996) o EV (Bo et al., 1993; Mapletoft et al., 1999). Sin embargo, después de la administración de 1 mg de EB, las concentraciones de FSH en plasma tuvieron un patrón de disminución similar al posterior a los 5 mg de E17 β (Martinez, 2002) y la emergencia de onda folicular ocurrió en 4 d (Martinez et al., 2002). Los resultados indican que la secreción y la liberación de FSH dependen de la dosis de estradiol y que diferentes ésteres de estradiol suprimen la liberación de FSH por intervalos variables que dependen del tiempo que el estradiol permanece en altas concentraciones en la circulación.

La administración intramuscular de 5 mg de EB, 24 horas después de la inserción de un CIDR, resultó en la emergencia de una nueva onda folicular 5,4 días después del tratamiento mientras que cuando se administró la misma dosis mediante una cápsula intravaginal hubo una mayor variabilidad en la respuesta (Bó et al., 1996). Cuando la dosis de 2,5 mg de EB fue usada por vía intramuscular en vacas Hereford, el intervalo desde el tratamiento a la emergencia de la nueva onda folicular fue más corto y menos variable que cuando se usó una dosis mayor (5 mg; Bó y Caccia 1998). El intervalo desde tratamiento a la emergencia de la nueva onda folicular fue de 4 días (mediana) en vacas a las que se les insertó CIDR al momento de tratarlas con EB. Lo mismo sucedió en vaquillas cruda de Hereford, Simmental y Charolais cuando 1 mg de EB fue usado (Martinez et al., 2005). La comparación directa entre dosis de 1 y 5 mg de E-17 β con EB favoreció el uso de 5 mg de E-17 β o de 1 mg de EB, en especial en vaquillas en las cuales la nueva onda folicular comenzó $3,4 \pm 0,5$ y $3,7 \pm 0,6$ días para 5 mg de E-17 β o de 1 mg de EB, respectivamente (Martinez et al., 2005). Moreno et al. (2001) demostraron que el uso de 2 mg de EB combinados con 50 mg de progesterona en vacas para carne indujo una sincronización de la onda folicular menos variable que sin la progesterona adicional. El cipionato de estradiol (ECP) en dosis de 5 y 1 mg, respectivamente, han resultado en intervalos a la emergencia de la onda folicular más largos y variables que E-17 β . En el caso de ECP, varios experimentos fueron realizados en los años 1990. Mediante ensayos en vacas de cría, una dosificación de 0,5 mg ECP pareció ser marginalmente eficaz ya que no existieron diferencias con los controles sin tratamiento (Thundathil et al., 1999). En experimentos más recientes comparando la eficacia de ECP con E-17 β , la emergencia de la onda folicular fue más variable ($P<0.01$) en las vaquillas que recibieron ECP ($n=30$) que en aquellas que

recibieron E-17 β ($n=28$; $4,0 \pm 0,4$ días vs. $3,3 \pm 0,1$ días). Por lo que se confirmó la ineficiencia del ECP en la sincronización de ondas foliculares. Sin embargo, ECP puede ser usado para la sincronización de la ovulación, tal como se verá más adelante.

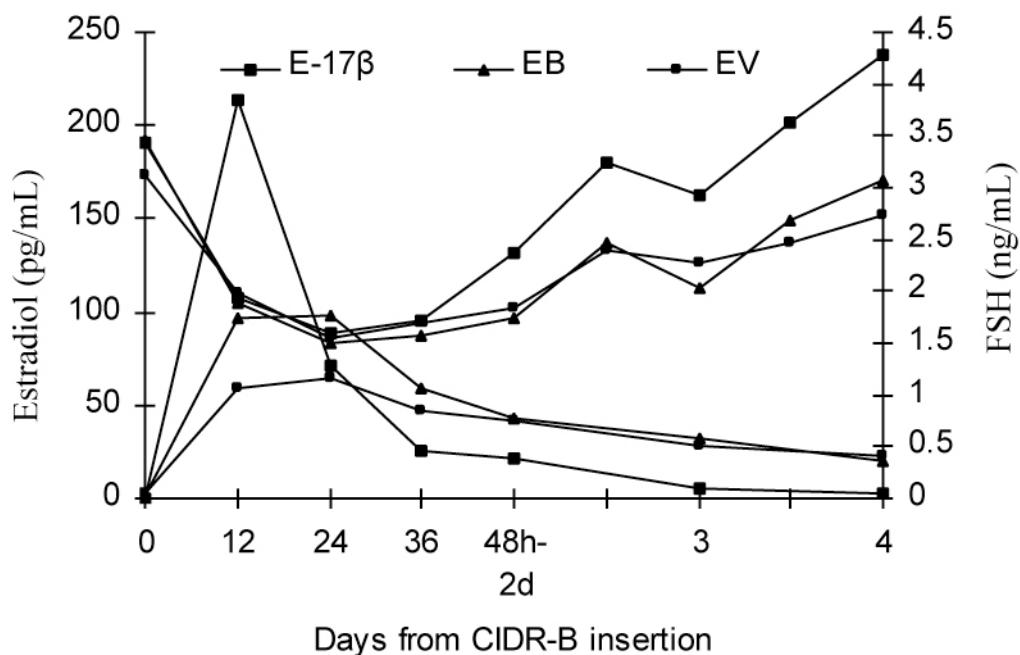


Figura 1. Las concentraciones plasmáticas de estradiol y FSH en vacas de carne ovariectomizadas a las que se les colocó un dispositivo CIDR el Día 0 y 5 mg de E-17 β , EB o EV más 100 mg de progesterona en ese momento.

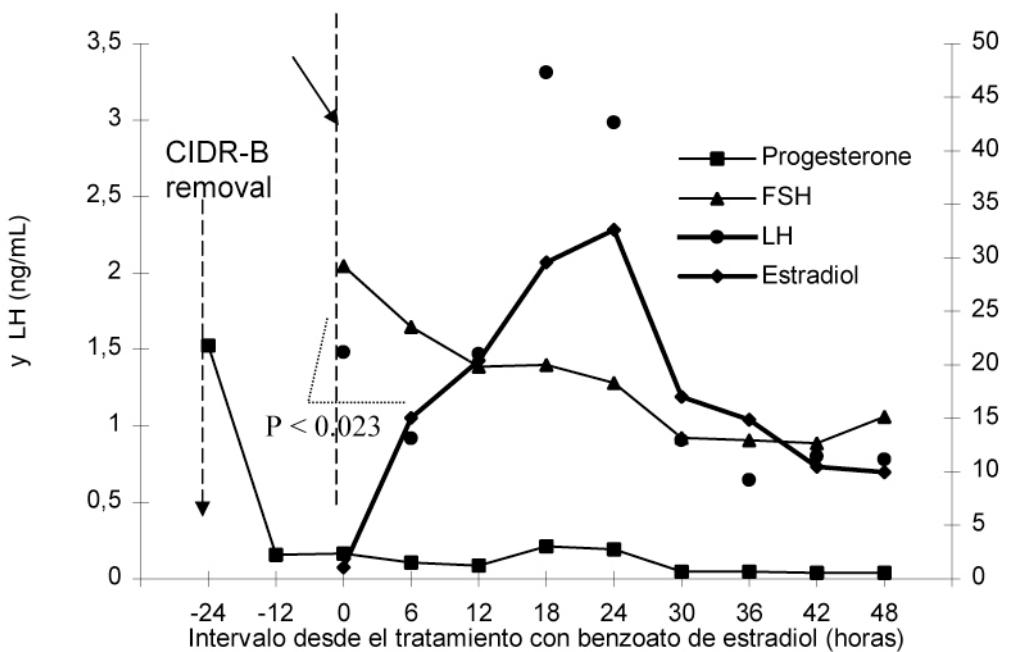


Figura 2. Las concentraciones de progesterona, estradiol, FSH y LH en plasma después del tratamiento con 1 mg de EB 24 h después de la remoción del CIDR en vacas de carne ovariectomizadas ($n = 16$).

EL USO DE ESTRADIOL EN PROGRAMAS DE SINCRONIZACIÓN DE LA OVULACION

Se diseñó una serie de experimentos para investigar los efectos de un estrógeno de acción corta, el E-17 β , sobre la dinámica de las ondas foliculares. En vaquillonas implantadas con SMB, el folículo dominante detuvo su crecimiento 1 d después del tratamiento con 5 mg de E-17 β , lo cual resultó en la emergencia temprana de la siguiente onda folicular, en promedio, 4,3 d más tarde (Bo et al., 1994; 1995). Además, al inyectar E-17 β en presencia de un progestágeno, hubo una supresión de FSH y un pico de FSH precedió a la nueva onda folicular 4 a 5 d más tarde. En vaquillonas no implantadas con SMB, la respuesta fue menos predecible.

Todavía está en discusión la necesidad de aplicar 50 ó 100 mg de progesterona junto con el EB al momento de la inserción de un dispositivo con progesterona. A pesar de que la aplicación de 2 mg de EB y 50 mg de progesterona al momento de la inserción del dispositivo resultó en una emergencia de onda folicular más sincronizada que el tratamiento con sólo 2 mg de EB (Moreno et al., 2001), la administración de una inyección de 50 mg de progesterona además de estradiol y el dispositivo con progesterona en un protocolo de IA a tiempo fijo no resultó en un aumento en las tasas de preñez (Bo et al., 2000a; Whittaker et al., 2002) Sin embargo, el segundo tratamiento con EB (1 mg) administrado 24 h después de la remoción del dispositivo fue crítico ya que resultó en una ovulación más sincrónica (Cutaia et al., 2001) y en mayores tasas de preñez (Colazo et al., 1999; revisado por Mapletoft et al., 2003) que cuando no se utilizó EB después de la remoción del dispositivo.

Se han utilizado cada vez más tratamientos con estradiol y progestágenos/progesterona durante los últimos años en programas de sincronización de celo en ganado de carne y leche (Revisado por Bo et al., 2002). Los tratamientos consisten en la inserción de un dispositivo de progestágeno/progesterona y en la administración de estradiol el Día 0 (para sincronizar la emergencia de la onda folicular), PGF al momento de la remoción del dispositivo los Días 7, 8 o 9 (para asegurar la luteólisis) y la subsiguiente aplicación de una dosis menor de estradiol 24 h más tarde o GnRH/LH 48 a 54 h más tarde para sincronizar la ovulación (revisado por Bo et al., 2002). Las tasas de preñez en una sola IATF fueron similares a las esperadas luego de la detección espontánea de celo (Revisado en Bo et al., Mapletoft et al., 2003)

USO DEL CIPIONATO DE ESTRADIOL

Se realizaron experimentos para investigar la utilización de ECP para sincronizar d la emergencia de la onda folicular y la ovulación en vaquillonas de carne tratadas con un dispositivo CIDR (Colazo et al., 2002). En el primer experimento se investigó la eficacia de ECP para la inducción de la ovulación del folículo dominante de una onda folicular sincronizada. El Día 0 se administró un CIDR y 5 mg de E-17 β a vaquillonas puberales. El Día 7 se quitaron los CIDR y se administró PGF. Se dividió a las vaquillonas en tres grupos: uno no sería tratado (control), otro recibiría 0,5 mg de ECP al momento de la remoción del CIDR (ECP0) y otro 24 h más tarde (ECP24). Se realizó ecografía dos veces al día desde el Día 7 hasta la ovulación. Las vaquillonas que recibieron ECP tuvieron un intervalo más corto desde la remoción del CIDR hasta la ovulación que las vaquillonas del grupo control ($81,6 \pm 5,0$ h, $86,4 \pm 3,5$ h y $98,4 \pm 5,6$ h en ECP0, ECP24 y el grupo Control, respectivamente), pero las varianzas no fueron diferentes entre los grupos. Diecinueve de veinte vaquillonas en los grupos con ECP ovularon entre 72 y 96 h después de la remoción del CIDR. Además se ha informado que puede utilizarse

ECP para sincronizar la ovulación en programas con GnRH para programas de IA a tiempo fijo (revisado en Thatcher et al., 2001).

Se diseñó otro experimento para determinar los efectos de ECP sobre la emergencia de la onda folicular y la tasa de preñez con IA a tiempo fijo. El Día 0, se insertó un CIDR a las vaquillonas ($n = 58$), 5 mg de E-17 β y 100 mg de progesterona o 1 mg de ECP más 100 mg de progesterona. Los Días 7 (E-17 β) o 9 (ECP), se quitaron los CIDR y se administró PGF a las vaquillonas. Luego se asignaron las vaquillonas a tres grupos para administrarles 0,5 mg de ECP al momento de la remoción del CIDR o 24 h más tarde o 1 mg de EB 24 h después de la remoción del CIDR. Se inseminó a todas las vaquillonas alrededor de 58 h luego de la remoción del CIDR. Se realizó ecografía diaria desde el Día 0 hasta la ovulación para monitorear los cambios ováricos y 28 d después de la IA para detectar preñez. Aunque no difirió el día medio de la emergencia de la onda folicular, fue más variable en vaquillonas que recibieron ECP que en aquellas que recibieron E-17 β . El tamaño de folículo dominante al momento de la remoción del CIDR fue mayor en vaquillonas tratadas con ECP ($11,3 \pm 2,1$ mm) que en vaquillonas tratadas con E-17 β ($9,8 \pm 1,5$ mm). Sin embargo, no hubo diferencia en las tasas de preñez entre los grupos (media general: 71%).

Se diseñó un tercer experimento para comparar ECP, además de una fuente comercial de progesterona con GnRH en un programa de IATF. El Día 0, se administró a las vaquillonas ($n = 979$) un CIDR y 100 μ g de GnRH ($n = 491$) o 1 mg de ECP además de 50 mg de progesterona (Progesterona 5%, Vétoquinol N-A Inc., Lavaltrie, QC, Canadá; $n = 488$). Se quitaron los CIDR y se administró PGF los Días 7 y 8,5 en los grupos con GnRH y con ECP respectivamente. Luego se subdividió a las vaquillonas para administrarles 0,5 mg de ECP al momento de quitar el CIDR, o 24 h más tarde (con IA 58 a 60 h después de quitar el CIDR), o una segunda inyección de GnRH al momento de la IA (52 a 54 h después de quitar el CIDR). No hubo diferencia en las tasas de preñez entre grupos tratados con GnRH (276/491, 56%) o con ECP (277/488, 57%) el Día 0. Sin embargo, la tasa de preñez fue mayor ($P < 0,01$) en vaquillonas que recibieron ECP 24 h después de quitar el CIDR (216/331, 65%) que al momento de quitar el CIDR (168/320, 52%) o GnRH al momento de la IA (169/328, 51%).

A pesar que el ECP no es efectivo para sincronizar la emergencia de una nueva onda folicular, puede ser utilizado para reducir el número de veces que las hembras tienen que pasar por la manga. Giacusa et al. (2005) usaron este tipo de estradiol para la sincronización de la ovulación al momento de retirar el dispositivo con progesterona ó 24 h más tarde en vacas con cría en condiciones pastoriles de Argentina. Este protocolo resultó en tasas de preñez de por encima del 50%. El ECP administrado al tiempo del retiro del dispositivo con progesterona resultó en una tasa de preñez del 52% y las vaquillas que recibieron ECP 24 h después de quitar el CIDR tuvieron una tasa de preñez del 65% (Colazo et al., 2003). Por lo tanto, se demostró que el ECP es muy eficaz en inducir la ovulación del folículo dominante de una onda previamente sincronizada con E-17 β . A pesar de que el tratamiento con ECP resulta en muy bajos niveles de estradiol circulante comparado con otros estradioles, incrementaría la concentración de estradiol por adición a aquella producida por el folículo preovulatorio en forma suficiente como para estimular la liberación de LH. Cuando se comparó ECP con EB administrados 24 h después del retiro del dispositivo con progesterona para sincronizar celos y ovulaciones, el porcentaje de preñez a la IATF no se vio afectado (en promedio, 69%; $P > 0,2$; Colazo et al., 2004). El uso de este estradiol en la inducción del estro y la ovulación mostró ser eficaz y, por lo tanto, fue investigado más en detalle. Cutaia et al. (2005) no encontraron diferencias cuando el EB o ECP fueron dados 0 o 24 h después de la remoción del DIB (Tabla 1). Similares resultados se han encontrado recientemente en animales Nelore en Brasil (Baruselli et al., 2005).

Tabla 1. Efecto de la aplicación de EB o ECP al momento de retirado un dispositivo con progesterona ó 24 h más tarde sobre los porcentajes de preñez en vacas y vaquillonas afectadas a protocolos de sincronización para IATF.

| Referencia | EB 0 h | EB 24 h | ECP 0 h | ECP 24 h | P |
|--|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|-------|
| Colazo et al., 2002 (vaq. <i>Bos taurus</i>) | | 65/103 (63,1%) | 62/98 (63,3%) | 64/99 (64,6%) | >0,7 |
| Colazo et al., 2003 (vaq. <i>Bos taurus</i>) | | | 168/320 ^a (52,5%) | 216/331 ^b (65,3%) | <0,01 |
| Cutaia et al., 2005 (vaq. crusa cebú) | 42/98 ^a (42,8%) | 45/98 ^a (45,9%) | 46/95 ^a (48,2%) | 62/98 ^b (63,2%) | <0,05 |
| Giacusa et al., 2005 (vacas con cría sin eCG) | | | 26/51 (50,9%) | 25/52 (49,1%) | >0,1 |
| Giacusa et al., 2005 (vacas con cría con eCG) | | | 27/54 (50,0%) | 27/50 (54,0%) | >0,1 |

Los autores citados en la tabla son provenientes de la revisión de Bó et al., 2005.

P : valor de la probabilidad

NUEVOS TRATAMIENTOS CON DOSIS REDUCIDAS DE VALERATO DE ESTRADIOL

Una pequeña dosis de EV puede tener un efecto similar al de una pequeña dosis de EB en la liberación de gonadotropinas y en la emergencia de la onda folicular. Más recientemente, se llevaron a cabo dos experimentos con el objetivo de reducir la dosis del EV (en forma similar a los experimentos de dosis de EB). Los objetivos más específicos fueron la evaluación de los efectos de EV en la dinámica folicular y luteal, los intervalos al celo y la ovulación. El primer experimento comparó la eficacia de dos tipos de implantes de norgestomet (Cestar y el Syncro-Mate B; SMB) por 9 días (con prostaglandina al momento de remover el implante), combinado con 5 mg de estradiol-17 β y 100 mg de progesterona (EP) o con 5 mg de EV y 3 mg de norgestomet (EN) im en el momento de colocar el implante. No hubo el efecto del tipo de implante. El diámetro del CL fue afectado negativamente por el EV. La emergencia de la onda folicular ocurrió más temprano y fue menos variable en vaquillas del grupo EP ($3,6 \pm 0,1$ d) que en el grupo EN ($5,7 \pm 0,2$ d). Los intervalos desde la remoción del implante al celo y a la ovulación fueron más cortos en vaquillas del grupo EN ($45,7 \pm 11,7$ y $74,3 \pm 12,6$ h) que en las vaquillas del grupo EP ($56,4 \pm 14,1$ y $83,3 \pm 17,0$ h). En el segundo experimento, se comparó el efecto de 0, 1, 2, 5 mg de EV im en vacas de cría tratadas al mismo tiempo con un CIDR (n=43). La emergencia de la onda folicular ocurrió dentro de 7 días en 7/10 (70%) vacas Control y 31/32 (97%; P<0,04) vacas tratadas con EV. El intervalo desde el tratamiento a la emergencia de la próxima onda folicular fue más largo (P<0,03) en aquellas vacas tratadas con 5 mg de EV ($4,8 \pm 1,2$ d) que en aquellas tratadas con 1 mg ($3,2 \pm 0,9$ d) ó 2 mg ($3,4 \pm 0,8$ d) de EV, mientras que en vacas Control fue $3,8 \pm 2,0$ días. Estos resultados sugieren que ésteres de estradiol, tales como EV y EB pueden ser usados para la sincronización de la emergencia de onda folicular en el ganado bovino.

Recientemente se diseñaron dos experimentos para comparar las tasas de preñez en

receptoras de embriones que fueron tratadas con valerato de estradiol administrado en diferentes dosis al comienzo de un tratamiento con progestágenos. Se utilizaron 300 vacas que recibieron un implante detrás de la oreja (Cestar, Intervet, Brasil; Día 0) y fueron asignadas al azar en 4 grupos de tratamiento, para recibir en el mismo momento 2 mg de EB más 50 mg de progesterona (Grupo EB/8D), 5 mg de valerato de estradiol (EV) más 3 mg de norgestomet (Cestar porción inyectable, Intervet, Brasil; Grupo 5 mg EV/9D) o 2 mg de EV y 1,2 mg de norgestomet (Grupos 2 mg EV/8D y 2 mg EV/9D). En el Día 5 las receptoras del grupo 2 mg EB/8D y 2 mg EV/8D recibieron 400 UI de eCG (Folligon 5000, Intervet, Brasil) más 150 µg de D (+) cloprosteno im (PGF; Preloran, Intervet, Brasil). En el Día 6, todas las vacas del grupo 5 mg EV/9D y 2 mg EV/9D recibieron también 400 UI de eCG más PGF. Los implantes fueron retirados en el Día 8 (Grupos 2 mg EB/8D, 2 mg EV/8D) o en el Día 9 (Grupos 2 mg EV/9D y 5 mg EV/9D) y todas las vacas recibieron 24 h después de la remoción 1 mg de EB. A los 7 días de la inyección de 1 mg de EB las receptoras fueron examinadas por ultrasonografía y aquellas con un CL >256 mm² de área recibieron al día siguiente, un embrión congelado/descongelado en eltilen glicol 1.5 M por transferencia de directa en el cuerno ipsilateral al CL. Los resultados se encuentran en la Figura 3. Las tasas de aprovechamiento fueron numéricamente menores en el grupo de receptoras tratadas con 5 mg de EV. A su vez las vacas tratadas con 2 mg EV pero en el cual se removió el dispositivo en el Día 9 tuvo una menor ($P<0,05$) tasa de preñez que los grupos tratados con 2 mg de EB o EV pero en los cuales los Cestar fueron removidos en el Día 8. A su vez, no hubo diferencias entre el uso de 2 mg de EB o 2 mg EV en los protocolos de 8 días.

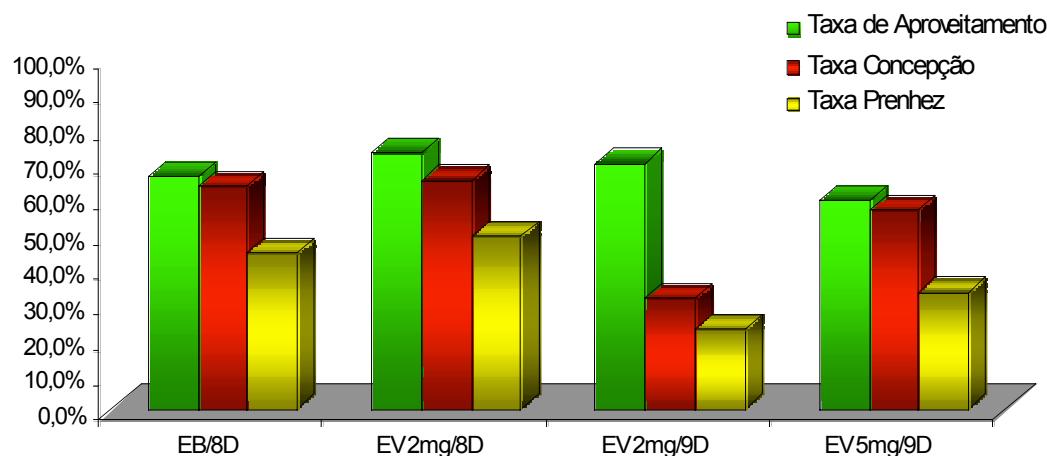


Figura 3. Tasas de aprovechamiento, concepción y preñez en receptoras de embriones tratadas con Crestar y diferentes dosis de Valerato de Estradiol (EV) o Benzoato de Estradiol (EB). Las tasas de preñez fueron menores ($P<0,05$) en el grupo EV 2mg/9D que en los grupos EB/8D y EV 2 mg/8D. Las tasas de preñez en el grupo EV 5 mg/9D fueron intermedias y no son diferentes a los otros grupos.

Para confirmar estos resultados se realizó un segundo experimento utilizando 200 vacas del mismo campo y con las mismas características de las anteriores y que fueron tratadas con los dos grupos que dieron resultados superiores (2 mg EB/8D y 2 mg EV/8D; Peres et al. 2006, datos no publicados). Como se puede ver en la Figura 4, no hubo diferencias significativas entre los grupos demostrando que la dosis reducida de

EV se comporta de forma equivalente a la dosis de 2 mg de EB en programas de sincronización de receptoras a tiempo fijo.

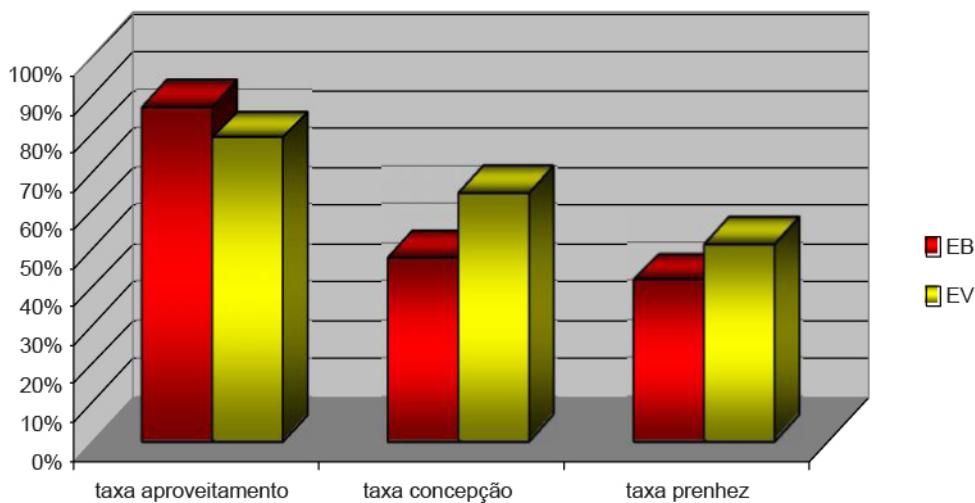


Figura 4. Tasas de aprovechamiento, concepción y preñez en receptoras de embriones tratadas con Crestar y 2 mg de Valerato de Estradiol (EV) o Benzoato de Estradiol (EB). Las tasas de preñez no son diferentes entre a los grupos ($P>0,6$).

CONTROL DEL DESARROLLO DE ONDA FOLICULAR PARA SUPERESTIMULACIÓN

El protocolo convencional de iniciación de superestimulación ovárica durante la mitad del ciclo, se basó en un principio en información experimental y anecdotica en la que se informaba una mayor respuesta superovulatoria al comenzar los tratamientos de superestimulación 8 a 12 d después del estro (revisado por Bo et al., 1995b). Sin embargo, ninguno de estos primeros estudios evaluó el estado folicular específico de los animales al comenzar con los tratamientos de superestimulación. A través de información obtenida por ecografía se conoce que de 8 a 12 d después del celo (equivalente a los Días 7 a 11 después de la ovulación) sería el momento aproximado de emergencia de la segunda onda folicular en ciclos de dos o tres ondas (Ginther et al., 1989) y alrededor de ese momento se encontraría una cohorte de folículos en crecimiento. Sin embargo, se ha observado que el día de emergencia de la segunda onda folicular es diferente entre ciclos de dos y tres ondas (1 o 2 d antes en ciclos de tres ondas) como así también entre animales individuales (Ginther et al., 1989). En este aspecto hemos mostrado claramente que las respuestas superovulatorias son mayores cuando se inician los tratamientos superestimuladores al momento de la emergencia de la onda folicular y no más tarde (Adams et al., 1994; Nasser et al., 1993). El comienzo de tratamientos con gonadotropina a sólo 1 d de la emergencia de onda resultó en respuestas superovulatorias menores si se compara con el comienzo de los tratamientos el día de emergencia de la onda folicular. Según la duración de las fases de desarrollo del folículo dominante en intervalos interovulatorios de dos y tres ondas, la probabilidad en cualquier momento de que el folículo dominante no sea funcionalmente dominante (fase estática tardía o regresiva) es de aproximadamente el 30% (6 de 20 d) para vaquillonas de dos ondas y el 35% (8 de 23 d) para vaquillonas de tres ondas. Más importante aún, sólo durante alrededor del 20% (4 ó 5 d) del ciclo

estral es posible comenzar el tratamiento al momento de la emergencia folicular. Por lo tanto, el 80% del ciclo estral no es conductor para una respuesta superovulatoria óptima. La necesidad de esperar hasta el ciclo medio para comenzar un tratamiento superestimulador implica la detección de celo y una demora obligatoria. Un enfoque alternativo para evitar estos problemas es comenzar los tratamientos de superestimulación después del control de la emergencia de la onda folicular.

Los métodos para el reclutamiento activo de folículos para superestimulación han sido orientados hacia el control de la dinámica de la onda folicular para contar con un grupo mayor y con respuesta más uniforme al momento de comenzar tratamientos con gonadotropina. Se ha demostrado que es posible imitar los efectos del folículo dominante y suprimir el desarrollo de todos los folículos antrales. Se espera que las gonadotropinas administradas en determinados momentos después de terminar con los tratamientos de supresión folicular estimulen el desarrollo de una cohorte de folículos al retomar su crecimiento.

Existen varias alternativas para controlar el desarrollo folicular en ganado bovino. Se ha alterado en forma experimental la emergencia de onda folicular por medio de la ablación folicular mecánica o por medio de tratamientos hormonales. La aspiración folicular por medio de ecografía (utilizada para la obtención de ovocitos en programas de IVF) ha sido utilizada como método de ablación folicular (Baracaldo et al., 2000; Bergfelt et al., 1994a; 1994b) y los tratamientos con estradiol y progesterona (para suprimir hormonalmente el desarrollo folicular) han sido ampliamente investigados en nuestro laboratorio (Bergfelt et al., 1997; Bo et al., 1995b; 1996). Dedicaremos el resto de este trabajo a mostrar cómo puede utilizarse estos enfoques para controlar el desarrollo folicular y su aplicación en programas de superovulación.

Nuestro tratamiento preferido para la sincronización de la emergencia de la onda folicular para superestimulación incluye el tratamiento con 5 mg de E-17 β y 100 mg de progesterona al momento de la inserción de un progestágeno, seguido de FSH 4 d más tarde (Bo et al., 1996). La información obtenida de experimentos (revisado por Bo et al., 1995b) y programas comerciales de superovulación (revisado por Bo et al., 2002) ha demostrado que la respuesta superovulatoria de las donantes tratadas con E-17 β y progesterona en estadios desconocidos del ciclo estral es comparable a la de las donantes superestimuladas 8 a 12 d después del celo detectado.

El estradiol-17 β no está comercialmente disponible en muchos países. Por lo tanto, investigamos la posibilidad de utilizar otros ésteres de estrógeno disponibles en el mercado como EB o EV. El tratamiento con 2,5 mg de EB y 50 mg de progesterona administrados al momento de la inserción del CIDR-B, resultó en la emergencia sincronizada de una nueva onda folicular 3 a 4 d más tarde (Caccia et al., 1998). Los tratamientos superestimuladores iniciados 4 d después del tratamiento con 2,5 mg de EB y 50 mg de progesterona resultaron en respuestas superovulatorias comparables con aquellos iniciados 4 d después del tratamiento con 5 mg de E-17 β y 50 mg de progesterona o 2,5 mg de E-17 β y 50 mg de progesterona o aquellos iniciados 8 a 12 d después del estro (revisado por Bo et al., 2002). El tratamiento con 5 mg de EV y 3 mg de norgestomet resultó en la emergencia menos sincronizada de una onda folicular y una respuesta superovulatoria menor que la de 5 mg de E-17 β y 100 mg de progesterona en vacas con dos implantes de SMB (Mapletoft et al., 1999). Lamentablemente todavía no hemos probado dosis más bajas de EV en programas de superovulación. Todos estos estudios demostraron que el control exógeno de la emergencia de la onda folicular tiene la ventaja de iniciar tratamientos superestimuladores en un momento óptimo para el reclutamiento de folículos, sin importar el estadio del ciclo estral. El tratamiento es práctico, fácil de seguir para el personal del campo y lo que es más importante, se elimina la necesidad de detectar

celo u ovulación y esperar de 8 a 12 d para iniciar tratamientos de gonadotropina. Es importante resaltar que en estudios relacionados con superestimulación coincidente con emergencia de onda folicular, la respuesta a una única inyección de FSH no hubo diferencias con la respuesta a un programa de inyecciones múltiples (Bergfelt et al., 1997; Bo et al., 1996). El nadir entre los picos de FSH no permite la emergencia de una nueva onda folicular (Bergfelt et al., 1994b). La administración de FSH exógena durante el período de nadir en FSH puede impulsar el crecimiento de pequeños folículos antes del tiempo esperado de la emergencia de la nueva onda (es decir que la FSH exógena inhibió los efectos de la supresión del folículo dominante). Esto puede contribuir a explicar como grandes dosis de FSH exógeno en programas convencionales de superestimulación pueden superar el ritmo endógeno y tapar el efecto de la onda sobre la respuesta ovárica. Si se administra un tratamiento superestimulatorio durante un intervalo suficientemente largo se notará el reclutamiento folicular sin importar el estado de la onda folicular al momento del tratamiento con gonadotropina. Sin embargo, el reclutamiento asincrónico puede llevar a una mayor variabilidad en la respuesta folicular ovárica y a reducir la calidad de los embriones colectados (revisado por Bo et al, 2002).

RESUMEN Y CONCLUSIONES

La variabilidad en la respuesta sigue siendo uno de los principales problemas asociados con los programas de sincronización de celo y superovulación en ganado bovino. La incorporación de técnicas diseñadas para el control de la dinámica de la onda folicular como las que se discuten en el presente trabajo reducirá la variabilidad al tratar vacas en diferentes estadios del ciclo estral. Los programas de sincronización del celo que controlan tanto el aspecto luteal como el folicular del ciclo estral brindan posibilidades para la IA y la Transferencia de Embriones a tiempo fijo, eliminando la necesidad de detectar celo. A pesar de que la mayoría de los trabajos de sincronización del desarrollo folicular se han realizado con estradiol-17 β , benzoato de estradiol y valerato de estradiol, la información indica que el cipionato de estradiol puede utilizarse eficientemente para inducir la ovulación. Los protocolos con sincronización de la emergencia de onda folicular tienen la ventaja de poder iniciar rápidamente tratamientos superestimulatorios en un momento arbitrariamente determinado sin la necesidad de detectar celo y sin sacrificar resultados.

REFERENCIAS

- ADAMS GP, NASSER LF, BO GA, MAPLETOFT RJ, GARCIA A, DEL CAMPO MR. Superstimulatory response of ovarian follicles of wave 1 versus wave 2 in heifers. *Theriogenology* 1994; 42: 1103-1113.
- BARACALDO MI, MARTINEZ M, ADAMS GP, MAPLETOFT RJ. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* 2000; 53: 1239-1250.
- BARUSELLI PS, BÓ GA, REIS EL, MARQUES MO, SÁ FILHO MF. Introdução da IATF no manejo reproductivo de rebanhos bovinos de corte no Brasil. Proc VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, June 24-26 2005, Córdoba, Argentina, pp 151-176.
- BERGFELT DR, LIGHTFOOT KC, ADAMS GP. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology* 1994a; 42: 895-907.
- BERGFELT DR, PLATA-MADRID H, GINTHER OJ. Counteraction of inhibitory effect of follicular fluid by administration of FSH in heifers.

BERGFELT DR, BO GA, MAPLETOFT RJ, ADAMS GP. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. *Anim Reprod Sci* 1997; 49: 1-12.

BO GA, ADAMS GP, NASSER LF, PIERSON RA AND MAPLETOFT RJ. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology* 1993; 40: 225-239.

BO GA, ADAMS GP, PIERSON RA, TRIBULO HE, CACCIA M, MAPLETOFT RJ. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology* 1994; 41: 1555-1569.

BO 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* 1995a; 39: 193-204.

BO GA, ADAMS GP, PIERSON RA, MAPLETOFT RJ. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* 1995b; 43: 31-40.

BO GA, CACCIA M, MARTINEZ M, MAPLETOFT RJ. Follicular wave emergence after treatment with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices in beef cattle. 13th International Congress on Animal Reproduction, Sydney, Australia, 1996; 7: 22 abstr.

BO GA, ADAMS GP, PIERSON RA, MAPLETOFT RJ. Effect of progestogen plus E-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology* 1996; 45: 897-910.

BO GA, ADAMS GP, PIERSON RA, MAPLETOFT RJ. Local versus systemic effects of exogenous estradiol on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen ear implants. *Anim Reprod Sci* 2000; 59: 141-157.

BO GA, BARUSELLI, PS, MORENO D, CUTAIA L, CACCIA M, TRIBULO R, TRIBULO H, AND MAPLETOFT RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 2002; 57: 53-72.

BÓ GA, CUTAIA L, CHESTA P, BALLA E, PINCINATO D, PERES L, MARAÑA D, AVILÉS M, MENCHACA A, VENERANDA G, BARUSELLI PS. Implementación de programas de inseminación artificial en rodeos de cría de Argentina. Resúmenes del VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina 2005; 97-128.

BURKE CR, MACMILLAN KL, BOLAND MP. Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomized cows. *Anim Reprod Sci* 1996; 45: 13-28.

Ovarian responses to progesterone and oestradiol benzoate administered intravaginally during dioestrus in cattle. *Anim Reprod Sci* 1999; 55:23-33.

COLAZO MG, MARTINEZ MF, WHITTAKER PR, KASTELIC JP AND MAPLETOFT RJ. Estradiol cypionate (ECP) in CIDR-B-based programs for fixed-time AI in beef heifers. *Theriogenology* 2002; 57: 371 abstr.

COLAZO MG, KASTELIC JP, MAPLETOFT RJ. Estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-B-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology* 2003; 60: 855-865.

COLAZO MG, KASTELIC JP, MARTÍNEZ MF, WHITTAKER PR, WILDE R, AMBROSE JD, CORBETT R, MAPLETOFT RJ. 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* 2004; 61: 1115-1124.

COLAZO MG, MARTINEZ MF, SMALL JA, KASTELIC JP, BURNLEY CA, WARD DR, MAPLETOFT RJ. Effect of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. *Theriogenology* 2005; 63: 1454-68.

CUTAIA L, MORENO D, VILLATA ML AND BO GA. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 hours later. *Theriogenology* 2001; 55: 244 abstr.

CUTAIA, L., BALLA, E., BÓ, G.A. Efecto del momento de la administración de benzoato o cipionato de estradiol para inducir la ovulación en vaquillonas tratadas con DIB e inseminadas a tiempo fijo. VI Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina, 2005; 394 abstr.

- GINTHER OJ, KNOPF L AND KASTELIC JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fert* 1989; 87: 223-230.
- KESNER JS, PADMANABHAN V, CONVEY EM. Estradiol induces and progesterone inhibits the preovulatory surges of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in heifers. *Biol Reprod* 1982; 26: 571-578.
- MACMILLAN KL, THATCHER WW. Effects of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod* 1991; 45: 883-889.
- MACMILLAN KL, PETERSON AJ. A new intravaginal progesterone-releasing device for cattle (CIDR-B) for estrus synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrus. *Anim Reprod Sci* 1993; 33: 1-25.
- MAPLETOFT RJ, MARTINEZ MF, ADAMS GP, KASTELIC J, BURNLEY CA. The effect of estradiol preparation on follicular wave emergence and superovulatory response in norgestomet-implanted cattle. *Theriogenology* 1999; 51: 411 abstr.
- MARTÍNEZ MF, COLAZO MG, KASTELIC JP, AND MAPLETOFT RJ. Effects of estradiol-17 β or estradiol benzoate on follicular dynamics in CIDR-B-treated beef heifers. *Theriogenology* 2002; 57: 382 abstr.
- MARTINEZ MF. Synchronization of follicular wave dynamics and ovulation for fixed-time artificial insemination in cattle. PhD thesis, University of Saskatchewan 2002; Chapter 5
- MARTÍNEZ MF, KASTELIC JP, BÓ GA, CACCIA M, AND MAPLETOFT RJ. Effects of oestradiol-17 β and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim Reprod Sci* 2005; 86: 37-52.
- MORENO D, CUTAIA L, VILLATA ML, ORTISI F, BO GA. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* 2001; 55: 408 abstr.
- NATION DP, BURKE CR, PARTON G, STEVENSON R, MACMILLAN KL. Hormonal and ovarian responses to a 5-day progesterone treatment in anoestrous dairy cows in the third week post-partum. *Anim Reprod Sci* 2000; 63: 13-25.
- NASSER L, ADAMS GP, BO GA, MAPLETOFT RJ. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* 1993; 40: 713-724.
- PERES L.C. Tratamientos de sincronización de la ovulación y factores que afectan las tasas de preñez en receptoras de embriones bovinos congelados en etilenglicol y transferidos a tiempo fijo. Tesis de Maestría, Universidad Nacional de Córdoba. 2005/06.
- THATCHER WW, MOREIRA F, SANTOS JEP, MATTOS RC, LOPEZ FL, PANCARCI SM, RISCO CA. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 2001; 55: 75-90.
- THUNDATHIL J, KASTELIC JP, MAPLETOFT RJ. Effect of estradiol cypionate administration on ovarian follicular wave dynamics in cattle. *Can J Vet Res* 1997; 61: 314-316.
- THIBIER, M. More than half a million bovine embryos transferred in 2002. *Embryo Transfer Newsletter, IETS*, 2003; 12-19.
- WHITTAKER PR, COLAZO MG, MARTÍNEZ, M.F, KASTELIC JP, AND MAPLETOFT RJ. New and used CIDR-B devices and estradiol benzoate, with or without progesterone, for fixed-time AI in beef heifers. *Theriogenology* 2002; 57: 391 abstr.

PROGESTERONE AND FERTILITY

George E. Mann¹

ABSTRACT

Fertility in the modern dairy cow is currently low and appears to be declining. Poor fertility is due to a number of factors, one of which is inadequate progesterone secretion by the mother during early pregnancy. While the reasons for poor progesterone secretion are still to be fully elucidated a number of factors have been implicated. Treatment with progesterone can yield improvements in pregnancy rate but it is important to ensure that treatment is administered at an appropriate time and targeted at those cows that actually need it.

INTRODUCTION

In the wild ancestors of the modern dairy cow fertility is high, with first service pregnancy rates approaching 90% leading to most cows calving within an 8 week period. Despite continued efforts to improve fertility, these figures represent little more than a dream to the modern dairy farmer. Poor fertility is a major problem and in many countries is approaching a level where sustainability of the industry is seriously threatened. Increased infertility means increased involuntary culling and hence an increased requirement for replacement heifers. In many situations, fertility has fallen to a level where the demand for these replacement heifers cannot be met within a herd. Furthermore, the problem is getting worse. While the aim of this review is to discuss the importance of progesterone concentrations during early pregnancy it is critically important to remember that fertility in the modern dairy cow is a complex multi-factorial problem. It depends on physiological capabilities, her health status, how she is fed and how she is managed.

THE DECLINE IN FERTILITY

Over the past 20 years, in the UK, calving rate to first service has fallen from around 60% to 40% (Royal et al., 2000), a decline of 1% per year. Similar declines have been seen in USA (Lucy, 2001). However, calving rate is only half the story: in order to conceive the cow must first present for mating. Current estimates put heat detection rates at little over 50%. This heat detection rate of 50% coupled with a calving rate of only 40% means that once a decision has been made to start mating, only 20% of potential mating opportunities result in a successful pregnancy. This decline in conception rate has been accompanied by an increase in the incidence of reproductive problems. For example, in the UK, the incidence of cows with reproductive cycle problems during the post partum period has risen from 32% to 44% over the past 20 years (Royal et al., 2000).

By combining a number of reports of conception rate collected from a number of countries a steady decline can clearly be seen (Figure 1). By fitting a line through these estimates, we can see that the situation is becoming critical, future predictions painting

¹University of Nottingham, School of Biological Sciences
Division of Animal Physiology, Sutton Bonington Campus
Loughborough, LE12 5RD, UK

a grim picture. Over the last 50 years, the rate of decline appears to be in the order of 0.6% per annum. This decline has been linked to a number of changes within the dairy industry including increased milk yield, increased herd size, change in breed structure and changes in management strategy.

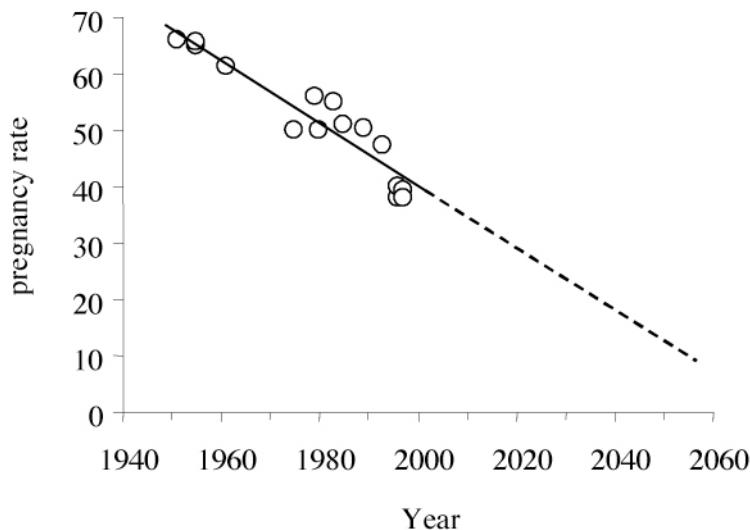


Figure 1. The decline in pregnancy rate over the past 50 years and predictions for the future. The fitted line shows a decline in pregnancy rate of 0.6% per annum. Each point represents an estimate of pregnancy rate from a study of lactating dairy cows (based on Mann, 2002).

THE TIMING OF LOSSES DURING EARLY PREGNANCY

The timing and extent of pregnancy losses has been reviewed extensively (Peters, 1996). However, while it is clear that in a typical dairy herd only 40% of cows calve to a particular service, it is less clear at what stage the 60% losses occur. Actual fertilisation rate is thought to be quite high (around 85 - 95%) indicating that in many animals an embryo does begin to develop. It is thought that around 5% of embryos are lost due to gross chromosomal abnormalities preventing development. This suggests that in some 80% of cows a potentially viable embryo is developing during the first week of pregnancy. However, by the end of the third week of pregnancy around 50% of cows recycle and come on heat again indicating a rate of early embryo loss of around 30%. Late embryo loss and abortion accounts for the loss of a further 10% of pregnancies resulting in a final calving rate of 40%. Some of the early embryo loss will result from a direct failure of embryo to develop but the majority of this loss appears to result from a failure of the embryo to prevent luteolysis. This is supported by our recent studies in which we have flushed the uteri of mated cows on day 16, immediately prior to the potential onset of luteolysis. In these studies, we have found that around 85% of cows can have a developing embryo in the uterus at this time (Mann, 2001).

The establishment of pregnancy

In the cow the establishment of pregnancy depends on the effective functioning of an endocrine communication system between the mother and the embryo. This system underpins the decision, by the cow, to either maintain the corpus luteum and thus the pregnancy or to undergo luteolysis and reovulate, generating a new opportunity to become pregnant. In cyclic cows, luteolysis results from the release of luteolytic

episodes of uterine PGF_{2α}, from the uterine endometrium, triggered by the development of oxytocin receptors. During early pregnancy in the cow, the embryo must inhibit this oxytocin stimulated PGF_{2α} release. The embryo achieves this by producing a protein, interferon tau, which acts locally within the uterus to inhibit PGF_{2α} secretion. This interferon tau protein is first detected in significant quantities in uterine flushes between days 14 - 16, when embryos have begun elongation (Robinson et al., 2006). To prevent luteolysis the embryo must be sufficiently well developed to allow the secretion of sufficient interferon - τ to prevent luteolytic PGF_{2α} secretion. Poor embryo development is associated with low interferon-τ production, failed inhibition of luteolysis and embryo loss (Mann & Lamming, 2001). A full understanding of the control of embryo development and interferon-τ production is therefore, of paramount importance in determining strategies to reduce the high level of early embryo mortality experienced in dairy cattle. The principle hormone controlling this process is progesterone.

PROGESTERONE AND THE OUTCOME OF INSEMINATION

A number of studies have revealed a close association between progesterone concentrations in the mother and the adequacy of early embryo development (for reviews see Mann and Lamming 1999; Mann et al., 1999). Further use of milk progesterone analysis has revealed that during the postovulatory progesterone rise in mated cows there is a close relationship between progesterone levels on fertility. In a survey monitoring milk progesterone concentrations on day 5 in over 1400 cows, low progesterone concentration was associated with low pregnancy rates (Starbuck et al., 2001). Cows with adequate milk progesterone (>3 ng/ml) had pregnancy rates of around 50 - 55% while cows with poor milk progesterone had pregnancy rates as low as <10% in cows with milk progesterone levels of <1ng/ml (Figure 2).

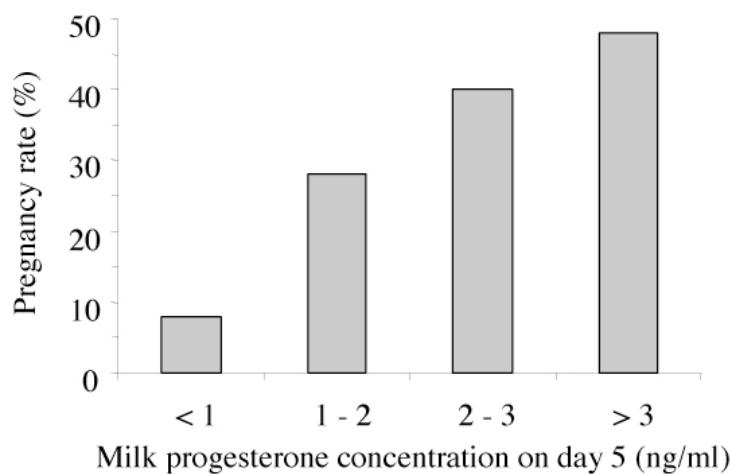


Figure 2. The effect of milk progesterone concentration on day 5 on pregnancy rate in dairy cows (based on Starbuck et al., 2001).

Further studies in inseminated cows have revealed close associations between plasma progesterone concentrations in the mother and development and interferon tau production by the embryo. For example, in a study in which cows were inseminated and blood sampled and then slaughtered on day 16 to collect embryos and assess interferon tau production, the presence of well developed embryos producing high levels

of interferon tau was preceded by elevated progesterone concentrations compared to cows with poorly developed embryos (Figure 3).

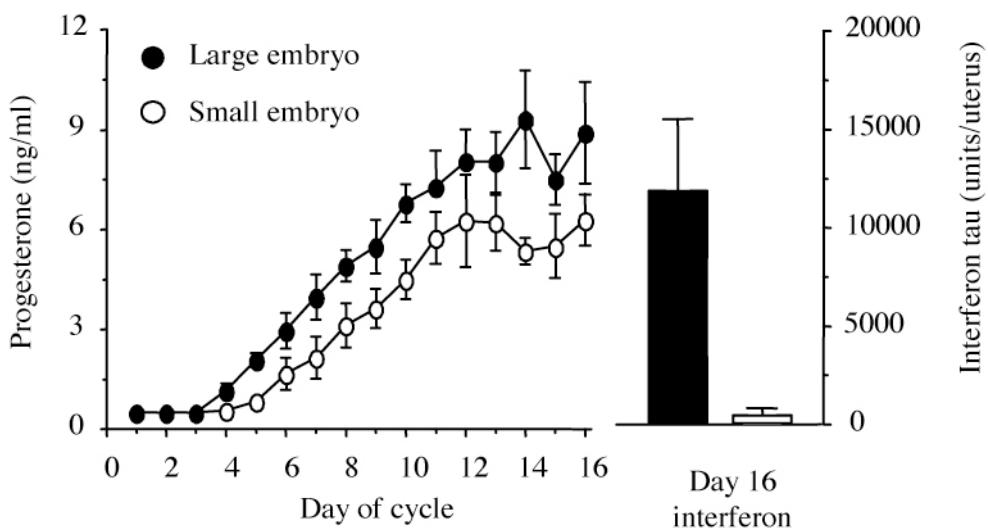


Figure 3. Plasma progesterone concentrations and uterine concentrations of interferon tau on day 16 in inseminated cows with large well developed or small poorly developed embryos (based on Mann et al., 1999).

In cattle, treatment with progesterone from day 2 - 5 has been shown to result in a 10 fold increase in conceptus elongation on day 14 (Garrett et al. 1988). Later increases in progesterone have failed to cause any marked increase in embryo development (Kerbler et al. 1997). In a further study we found that administration of progesterone from day 5 - 9, but not from day 12 - 16 resulted in a significant increase in interferon tau production on day 16 (Mann et al. 2006). Thus it would appear that it is the time at which progesterone secretion is initiated that is the critical factor in the control of early embryo development rather than the level to which progesterone rises.

FACTORS AFFECTING PROGESTERONE

While the detrimental effects of poor progesterone secretion, particularly during the postovulatory progesterone rise, have been established the causes of poor progesterone secretion are less clear. There is some evidence to suggest that plasma progesterone concentrations can be influenced by nutrition. Studies in beef heifers have demonstrated an increase in plasma progesterone in animals fed calcium soaps of long chain fatty acids to raise serum lipids (Hawkins et al., 1995), perhaps due to a reduced rate of progesterone clearance from the circulation. Moderate increases in progesterone concentrations have also been reported in dairy cows (Carroll et al., 1990), though with no associated increases in fertility. Feeding of supplemented fats from other sources has also been shown to increase circulating concentrations of progesterone (Talavera et al., 1985).

Rather than find a definitive cause of poor progesterone secretion, the current conclusions from a range of studies at Nottingham is that this phenomenon is a multi factorial issue with no simple causes. However, our studies have revealed a modest association between low concentrations of progesterone on day 5 of pregnancy and reduced body condition score and plasma leptin concentrations and an increased

incidence of sub clinical ketosis. This suggests poor energy status as, at least, a partial cause of poor postovulatory progesterone secretion.

Recent studies have reported reduced progesterone concentrations in high yielding dairy cows while others have found no relationship (Strong et al., 2005). In our studies at Nottingham we have found no relationship between milk yield and milk progesterone concentrations 5 days after mating (Figure 4).

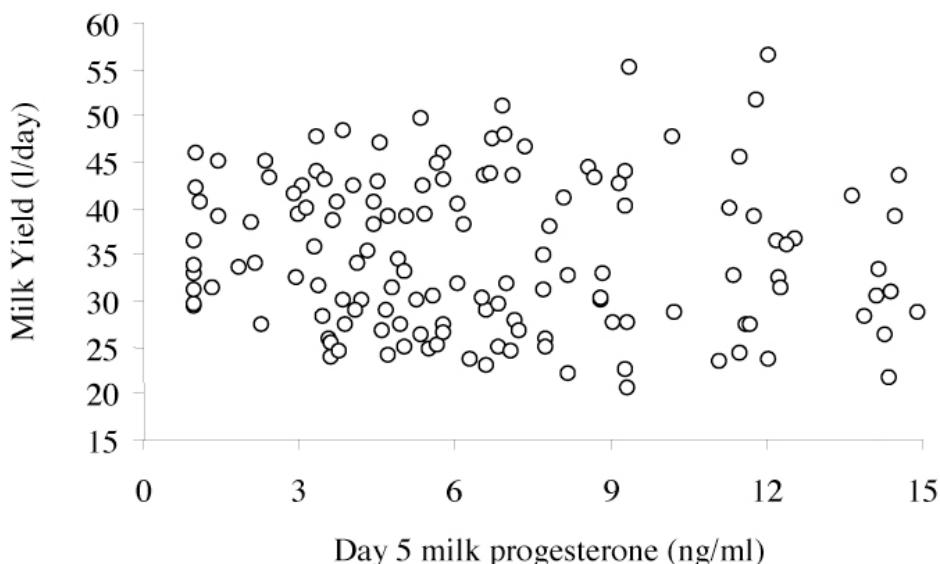


Figure 4. Relationship between milk yield and milk progesterone concentration 5 days after 1st insemination in Holstein Friesian dairy cows.

A number of diseases have a major effect on reproduction in the cows. One disease of particular importance is bovine viral diarrhoea virus (BVDV). This disease is a major cattle pathogen responsible for a spectrum of symptoms, including reproductive failure. For example, infection during oestrus can reduce conception rates by as much as 50% (McGowan et al., 1993) and BVDV can infect all the major cell types within the reproductive tract. However, the mechanism/s underlying its adverse effect on fertility has not yet been elucidated. One possible mechanism of action is through the disruption of ovarian function as studies have demonstrated that infection with BVDV can lead to a reduction in progesterone concentrations, the hormone essential for successful embryo development and establishment of pregnancy.

In a recent study in dairy cows we have shown no effect of BVD status per se on conception rate. However, an analysis of 70 dairy cows from the University herd has revealed lower day 5 milk progesterone concentrations and reduced conception rate to 1st AI (12.5% compared with 48.4%) in cows that underwent seroconversion during the insemination period. Thus seroconversion may be the key factor in establishing the effects of BVDV on fertility. This finding may also apply to other diseases.

THE NEED TO TARGET PROGESTERONE TREATMENT

As early as the 1950s studies were being carried out to investigate progesterone supplementation as a means to improving conception rates. Since then, numerous studies have examined the effects of progesterone supplementation on pregnancy rate in cattle (for review see Mann & Lamming, 1999). In these studies, a range of different cows have been treated with different progesterone therapies over a range of different

time periods. While many of these studies have demonstrated improvements in pregnancy rate, others have not. Furthermore, in many studies animal numbers are not sufficient to allow meaningful statistical analysis to be undertaken. In an overall analysis of 17 such studies (Mann & Lamming, 1999), we found a modest, though highly significant, 5% enhancement of overall pregnancy rate following progesterone supplementation. However, further analysis revealed that the timing of progesterone supplementation and the initial fertility of the animals being treated are both critical factors in determining the outcome of treatment (Figure 6). Earlier supplementation results in increased pregnancy rates compared to later treatment while treatment of cows with a problem yields better results than treatment of cows with good initial fertility. If studies are arbitrarily split into those in which initial fertility was "good" (conception rate over 50%) and those in which it was "poor" (conception rate under 50%), treatment was only of benefit in cows with "poor" fertility where increases in conception rate of almost 20% were observed.

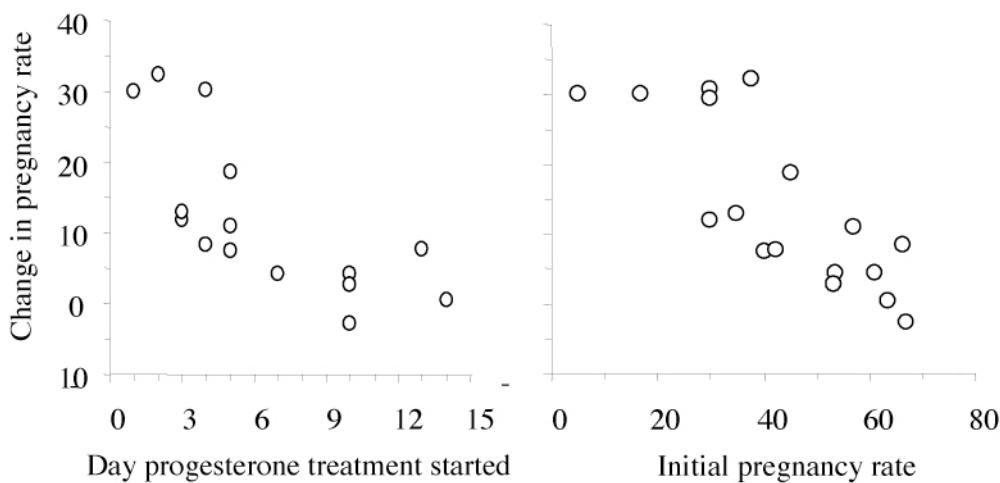


Figure 5. Both the first day of progesterone treatment and the initial fertility of the treated cows can affect the improvement in pregnancy rate achieved in progesterone supplementation studies. (Based on data reviewed in Mann and Lamming, 1999).

In a study using milk progesterone analysis was on day 5 following mating to target progesterone supplementation to specific cows with a specific progesterone deficiency (Starbuck et al., 2001), pregnancy rate was increased from 29% to 58% in cows with specifically targeted progesterone deficiencies. Thus by targeting progesterone treatment at an appropriate time to cows with a particular problem large benefits can be achieved. While blanket treatment does incur some benefit, the relatively small improvement in fertility does not warrant the effort and expense involved.

CONCLUSIONS

Dairy cow fertility is currently low and appears to be declining. A large body of evidence suggests that adequate progesterone production is critical to successful early embryo development and the production of adequate quantities of interferon tau to successfully establish pregnancy. Without sufficient progesterone secretion the pregnancy is likely to

fail and the cow recycle. Supplementation with progesterone can reverse this problem, but only if progesterone is administered at the correct time.

FUTURE PERSPECTIVE

Dairy cow fertility is a complex problem, controlled by a variety of factors including the cows inherent physiological capabilities, how she is fed and how she is managed and what health problems she is exposed to. There are no definitive causes of poor fertility: for every cause identified there are cows exhibiting extreme forms of the particular problem and good fertility. In addressing fertility problems a number of approaches have provided some small-scale gains, but many have failed to deliver any improvement in fertility at a national level. To achieve gains at this level requires a co-ordinated, multidisciplinary approach to the problem.

REFERENCES

- CARROLL DJ, JERRED MJ, GRUMMER RR, COMBS DK, PEIRSON RA, HAUSER ER (1990). Effects of fat supplementation and immature alfalfa to concentrate ratio on plasma progesterone, energy balance and reproductive traits of dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 73, 2855-2863.
- FRAY MD, MANN GE, CLARKE MC, CHARLESTON B (1999). Bovine viral diarrhoea virus: its effects on oestradiol, progesterone and prostaglandin secretion in the cow. *Theriogenology* 51, 1533-1546.
- GARRETT JE, GEISERT RD, ZAVY MT, MORGAN GL (1988). Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *Journal of Reproduction & Fertility* 84, 437-446.
- HAWKINS DE, NISWENDER KD, OSS GM, MOELLER CL, ODDE KG, SAWYER HR, NISWENDER GD (1995). An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters disappearance rate of progesterone in cows. *Journal of Animal Science* 73, 541-545.
- KERBLER TL, BUHR MM, JORDAN LT, LESLIE KE, WALTON JS (1997). Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon- τ synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47, 703-714.
- LUCY MC (2001). Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will It End? *Journal of Dairy Science* 84, 1277-1293.
- MANN GE (2001). Conception rates during experimentation in dairy cows. *The Veterinary Journal* 161, 301-305.
- MANN GE (2002). Reproduction-mating management. In: *Encyclopaedia of Dairy Sciences* pp1770 - 1777. Eds JW Fuquay and PF Fox. Academic Press, San Diego, USA.
- MANN GE, LAMMING GE (1999). The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 34, 269-274.
- MANN GE, LAMMING GE (2001). Relationship between the maternal endocrine environment, early embryo development and the inhibition of the luteolytic mechanism in the cow. *Reproduction* 121, 175-180.
- MANN GE, LAMMING GE, ROBINSON RS, WATHES DC (1999). The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 54: 317-328.

MCGOWAN MR, KIRKLAND PD, RICHARDS SG, LITTLEJOHNS IR (1993). Increased reproductive losses in cattle infected with bovine pestivirus around the time of insemination. Veterinary Record 133, 39-43.

PETERS AR (1996). Embryo mortality in the cow. Animal Breeding Abstracts 64, 587-598.

ROBINSON RS, FRAY MD, WATHES DC, LAMMING GE, MANN GE (2006). In vivo expression of interferon tau mRNA by the embryonic trophoblast and uterine concentrations of interferon tau protein during early pregnancy in the cow. Molecular Reproduction and Development 73, 470-474.

ROYAL MD, MANN GE AND FLINT APF (2000). Strategies for reversing the trend towards subfertility in dairy cattle. The Veterinary Journal 160: 53-60.

STRONGE AJH, SREENAN JM, DISKIN MG (2005). Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows Theriogenology 64, 1212-1224.

STARBUCK GR, DARWASH AO, MANN GE, LAMMING GE (2001). The detection and treatment of post insemination progesterone insufficiency in dairy cows. In: Fertility in the high yielding dairy cow, British Society for Animal Science Occasional Publication No 26 volume 2.

TALAVERA F, PARK, SC, WILLIAMS GL (1985). Relationships among dietary lipid intake, serum cholesterol and ovarian function in Holstein heifers. Journal of Animal Science 60, 1045-1051.

CONCEITOS E APLICAÇÕES DE ESTRATÉGIAS ANTILUTEOLÍTICAS VISANDO O INCREMENTO DA TAXA DE CONCEPÇÃO EM BOVINOS

Mario Binelli¹, Rui Machado, Marco A.C.M. Bergamaschi, Julio C. Barbosa da Silva, Bruna Trentinaro Ibiapina e Rafael Sisconêto Bisinotto

INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva é o fator que, isoladamente, mais afeta a produtividade e a lucratividade de um rebanho. No caso dos bovinos, a mortalidade pré-natal, embrionária e fetal, é uma das maiores causas de falhas reprodutivas, conforme revisado por Santos et al. (2004b) e Sartori (2004). De fato, Humblot (2001) reportou a ocorrência de 20,5 a 43,6% de mortalidade embrionária até o dia 25 pós-inseminação em rebanhos franceses, 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, e Kunz et al. (2002) encontraram taxas de mortalidade entre 20% e 40% até os dias 21 e 22 pós-inseminação em vacas de corte.

A mortalidade embrionária que ocorre nos primeiros sete dias pós-inseminação está associada às falhas de fertilização, defeitos genéticos e falhas no desenvolvimento embrionário que ocorrem até o estágio de blastocisto. Tal mortalidade normalmente é inferior a 10%, mas pode ultrapassar 40% em vacas de leite sob estresse calórico (Sartori et al., 2002; Sartori, 2004).

Na segunda e na terceira semanas de gestação, a mortalidade embrionária foi medida diretamente apenas em um número limitado de trabalhos. Por exemplo, Diskin e Sreenan (1980) verificaram que a mortalidade embrionária em vacas taurinas de corte atingiu aproximadamente 30% entre os dias 8 e 16 da prenhez. Este período coincide com o reconhecimento materno da prenhez, que é o processo pelo qual o conceito sinaliza sua presença para a unidade materna, bloqueando o mecanismo de síntese da prostaglandina-F_{2 α} (PGF_{2 α}) e, consequentemente, a luteólise (Thatcher et al., 1995). Por sua vez, a habilidade do embrião em sinalizar sua presença intra-uterina e inibir a síntese de PGF_{2 α} relaciona-se à secreção de fatores parácrinos, como o interferon- τ (Binelli e Thatcher, 1999). O bloqueio da luteólise, provavelmente, depende da quantidade total de interferon- τ secretada e da área do lúmen uterino ocupada pelo conceito (Mann et al., 1999). Dessa forma, o sucesso no estabelecimento na gestação depende de um delicado equilíbrio entre os mecanismos luteolíticos, desencadeadores da luteólise, e os mecanismos antiluteolíticos, orquestrados pelo conceito, para bloquear os primeiros.

Estratégias antiluteolíticas são manipulações farmacológicas, mecânicas, nutracêuticas e de manejo que objetivam incrementar a probabilidade de sucesso da gestação pela interferência no processo de reconhecimento materno. Tais estratégias visam tanto a diminuição da capacidade luteolítica da unidade maternal quanto o aumento do estímulo antiluteolítico induzido pelo conceito. As mesmas podem envolver manipulações nas funções folicular, luteínica, uterina e do conceito e manipulações do ambiente. Binelli e colaboradores (2001) propuseram uma série de estratégias para: (1) estimular o crescimento e/ou diferenciação do folículo pré-ovulatório para gerar um CL com maior capacidade de produzir progesterona, (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 conceito e (6) diminuir a

¹Departamento de Reprodução Animail – FMVZ – USP - Pirassununga

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.

ESTRATÉGIAS PARA AUMENTAR CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA

A progesterona controla o funcionamento das glândulas uterinas (Spencer et al., 2004). As secreções glandulares que compõe o ambiente uterino são importantes para a nutrição e crescimento do conceito (Geisert et al., 1988; Mann et al., 1999). Além disso, em diversos relatos, concentrações mais elevadas de progesterona nas primeiras três semanas de gestação estavam associadas a taxas de prenhez mais elevadas. Por exemplo, 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 luteína estavam relacionadas com a presença de embriões mal desenvolvidos.

Estratégias para aumentar as taxas de prenhez baseadas no aumento das concentrações de progesterona foram revisadas por Thatcher et al. (2001), Binelli et al. (2001) e Binelli et al. (2005). Estratégias incluem a suplementação de progesterona pela inserção de dispositivos intravaginais (Marques, 2002) e a indução de corpos lúteos acessórios pela ovulação do folículo dominante da primeira onda com injeções de GnRH (Marques, 2002), LH (Goisis et al. 2004; Kastelic e Ambrose 2004) e hCG (Schmitt et al., 1996; Santos et al., 2001) ou combinações desses hormônios (Bergamaschi et al., 2006; Machado et al., 2006a; Machado et al., 2006b).

Mais recentemente examinou-se a possibilidade de manipular o folículo pré-ovulatório objetivando a formação de um corpo lúteo melhor diferenciado e com maior habilidade de produzir progesterona. Mantovani et al. (2005) induziram folículos pré-ovulatórios persistentes e que, consequentemente, originaram maiores corpos lúteos com maior capacidade de produção de progesterona em novilhas receptoras de embrião. Contudo, as taxas de concepção foram menores para novilhas do grupo tratado em comparação ao grupo controle (38,9 vs. 59,1%, respectivamente). 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, tenham resultado em ambiente uterino desfavorável para a manutenção da prenhez. Visando aumentar a taxa de crescimento final de folículos pré-ovulatórios, Vasconcelos e colaboradores (2000) adiantaram em um dia a injeção de PGF em vacas de leite submetidas ao protocolo OvSynch. Houve maior número de vacas ovulando à segunda injeção de GnRH, provavelmente por conterem folículos dominantes de maior diâmetro, mais responsáveis ao GnRH e, dessa forma, com maior probabilidade de formar um CL com maior capacidade esteroidogênica em comparação às vacas submetidas ao protocolo de OvSynch tradicional. 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 protocolo semelhante com dispositivos contendo progestágenos, Bergamaschi et al. (2005) demonstraram 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 para vacas que receberam 400 vs. 0 UI de eCG no dia da retirada do implante.

ESTRATÉGIAS PARA REDUZIR AS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE ESTRADIOL

Binelli e colaboradores (2001) sugeriram a atenuação dos estímulos luteolíticos como estratégia para diminuir a mortalidade embrionária precoce. Por exemplo, sabe-se que os folículos ovarianos produzem quantidades crescentes de estradiol, a medida que aumentam de tamanho e se tornam dominantes (Komar et al., 2001) e este hormônio tem papel central na produção de PGF_{2α} e luteólise (Villa-Goddoy et al., 1985; Salfen et al., 1999; Thatcher et al., 1986) por meio de um mecanismo de ação ainda desconhecido. Assim, estratégias que resultem na ausência de folículos dominantes, ou na diminuição da sua capacidade esteroidogênica, no período de reconhecimento materno da gestação devem ampliar as probabilidades de sobrevivência do conceito e as taxas de prenhez. Para atingir tal fim, nosso laboratório utilizou abordagens farmacológicas (Machado et al., 2004; Machado et al., 2006a; Machado et al., 2006b; Bergamaschi et al., 2005; Bergamaschi et al., 2006) e mecânicas (Bisinotto et al., 2006; Ibiapina et al., 2006).

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-17β no dia 12 de um ciclo estral sincronizado. Confirmado 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 crítico, 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. Ainda testando o conceito de reprogramar o crescimento folicular visando a redução do estímulo luteolítico causado pelo estradiol folicular durante o período crítico (dias 15 a 19 pós-estro), Machado e colaboradores (2006a) sincronizaram vacas da raça Red Angus e administraram GnRH no dia 5 e hCG no dia 13 do ciclo estral sincronizado. Almejava-se que a injeção de GnRH causasse ovulação do folículo dominante da primeira onda de desenvolvimento folicular e originasse um corpo lúteo acessório. Além disso, haveria emergência síncrona e antecipada da segunda onda. Devido a tal sincronização, o folículo dominante da segunda onda teria diâmetro suficiente para ser ovulado no dia 13, quando os animais receberam a injeção de hCG. A hCG causaria ovulação do folículo

dominante da segunda onda, gerando um segundo corpo lúteo acessório, proveria estímulo luteotrófico aos corpos lúteos pré-existentes e ainda sincronizaria a emergência da terceira onda de crescimento folicular de forma que seria minimizado o número de dias durante o período crítico com a presença de folículos de alta capacidade esteroidogênica. De fato, vacas que receberam tal combinação de tratamentos tiveram a duração da fase luteínica aumentada de 19 para 25 dias. O mesmo protocolo foi testado a campo em receptoras de embrião produzidos *in vitro* (Machado et al., 2006b). As taxas de prenhez aos 30 dias foram 50,0 vs. 40,5% para os animais tratados e controle, respectivamente na estação da seca ($P<0,1$) e 60% para ambos os grupos na estação das águas. Contudo, no geral, a perda de gestações entre os diagnósticos realizados nos dias 30 e 60 foi numericamente menor nos animais tratados em relação aos animais controle (6,2 vs. 17,6%, respectivamente). Concluiu-se que a combinação dos tratamentos propostos foi efetiva em retardar a luteólise e prolongar a duração da fase luteínica. Tal efeito resultou em aumento nas taxas de prenhez, mas tal aumento foi dependente da estação do ano. Por fim, vale ressaltar que a combinação GnRH-hCG causou elevação nas concentrações plasmáticas de progesterona, que como discutido acima, também tem efeito benéfico do desenvolvimento do conceito e na sobrevivência embrionária.

OUTRAS ESTRATÉGIAS

A síntese de PGF é o resultado final de uma complexa cascata de ocorrências intracelulares altamente coordenadas. Essa cascata envolve a ativação seqüencial da proteína acopladora do GTP, da fosfolipase-C, da proteína quinase-C, da fosfolipase-A₂ 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. Recentemente, Guzeloglu et al. (2005) trataram novilhas da raça Holandesa com Flunixin Meglumine nos dias 15 e 16 pós-inseminação artificial e observaram maiores taxas de prenhez nos dias 29 (76,9 vs. 50%; $P<0,04$) e 65 de gestação (69,2 vs. 46,2%; $P<0,09$) para os animais que receberam o anti-inflamatório em relação aos animais controle. Possivelmente o tratamento com Flunixin Meglumine inibiu temporariamente a liberação de PGF de forma a favorecer o estabelecimento dos mecanismos antiluteolíticos do conceito (i.e., produção de interferon-tau), o que resultou em menor mortalidade embrionária. Pesquisas objetivando o entendimento dos mecanismos de ação de anti-inflamatórios,

seus efeitos na gestação e o refinamento de protocolos para sua utilização visando o aumento das taxas de gestação são necessários e urgentes.

Finalmente, estratégias visando estimular o crescimento do conceito 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 conceito (Mann et al., 1999). 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.

CONCLUSÃO

No período do reconhecimento materno da gestação ocorrem estímulos antagônicos que objetivam a ocorrência ou a inibição da luteólise. O emprego de estratégias anti-luteolíticas almeja que a luteólise seja devidamente inibida e, consequentemente, a gestação mantida. 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 conceito pode levar ao desenvolvimento de novas estratégias visando a inibição da luteólise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BERGAMASCHI MACM, MACHADO R, FIGUEIREDO RA, BARBOSA RT, DE OLIVEIRA CA, GIASSETTI MI, BINELLI M. 2006. Otimização da função luteínica em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) suplementadas com GnRH e hCG. Acta Scientiae Veterinariae 34 (supl. 1): 343.
- BERGAMASCHI MACM, VICENTE WRR, BARBOSA RT, MACHADO R, BARUSELLI PS, ALENCAR M, BINELLI M. 2005. Estratégias hormonales para optimizar la función luteínica de vacas nelore posterior a la sincronización del estro. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE BUIATRÍA, 12.; JORNADAS CHILENAS DE BUIATRÍA, 7., 2005, Valdivia, Chile. Anais... p.154.
- BISINOTTO RS, IBIAPINA BT, PONTES EO, FEDOZZI F, BERGAMASCHI MACM, BERTAN CM, BINELLI M. 2006. Aspiração follicular no periodo peri-luteólise em bovinos: efeitos no crescimento follicular e duração do ciclo estral. Acta Scientiae Veterinariae 34 (supl. 1): 274.
- BINELLI M, MACHADO R, BERGAMASCHI MACM, BERTAN CM, BARUSELLI PS. 2005. Estratégias para inibir a luteólise e aumentar a fertilidade em bovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. Anais... p. 1-6.

- BINELLI M, THATCHER WW. 1999. Conceptus-stimulated signal transduction pathway in the endometrium to maintain pregnancy. *Annual Review of Biomedical Sciences* 1: 59-85.
- 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 synthesis in bovine endometrium: roles of phospholipases C and A2. *Domest Anim Endocrinol* 14: 181-191.
- 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 F2 α (PGF2 α) release in cattle. *Anais do 15th International Congress on Animal Reproduction*, 2004, Porto Seguro, Brazil, p. 125.
- GUZELOGLU A, ERDEM H, SARIBAY MK, THATCHER WW, TEKELI T. 2005. Effect of timely flunixin meglumine treatment on pregnancy rates in Holstein heifers. *Reproduction, Fertility and Development* 18: 183.
- 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.
- IBIAPINA BT, BISINOTTO RS, PONTES EO, FEDOZZI F, BERTAN CM, BERGAMASCHI MACM, BINELLI M. 2006. Aspiração follicular no período peri-luteólise em bovinos: efeitos nas características da fase luteínica. *Acta Scientiae Veterinariae* 34 (supl. 1): 301.
- 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.
- KOMAR CM, BERDNDTSON AK, EVANS ACO, FORTUNE J. 2001. Decline in circulating estradiol during the periovulatory period is correlated with decreases in estradiol and androgen, and in messenger RNA for p450 aromatase and p450 17a-hydroxylase, in bovine preovulatory follicles. *Biology of Reproduction* 64: 1979-1803.
- KUNZ TL, GAMBARINI ML, OLIVEIRA FILHO BD, GALINDO ADS. 2002. Mortalidade embrionária em bovinos: inter-relações embrião-patógenos. *Revista CFMV* 8: 27-36.
- 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.
- MACHADO R, DA SILVA JCB, BARBOSA RT, BISINOTTO RS, SIQUEIRA AFP, BINELLI M. 2006a. Remoção farmacológica ou mecânica do folículo dominante como estratégia anti-luteolítica em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae* 34 (supl. 1): 344.
- MACHADO R, DA SILVA JCB, BARBOSA RT, NIEMEYER C, BINELLI M. 2006b. Taxas de prenhez em receptoras após suplementação com GnRH e hCG. *Acta Scientiae Veterinariae* 34 (supl. 1): 533.
- MANN GE, LAMMING GE, FISHER PA. 1998. Progesterone control of interferon- τ production during early pregnancy in the cow. *J Reprod Fertil Abstract Series* 21: (abstract 37).

- MANN GE, LAMMING GE, ROBINSON RS, WATHES DC. 1999. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 54: 317-328.
- 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, GACEK F, BÓ GA, BARUSELLI PS, BINELLI M. 2005. Prolonged use of a progesterone-releasing intravaginal device (CIDR) for induction of persistent follicles in bovine embryo recipients. *Animal Reproduction* 2: 272-277.
- 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.
- 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.
- 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.
- SARTORI, R. 2004. Fertilização e morte embrionária em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae* 32 (supl.): 35-50.
- SARTORI R, SARTOR-BERGFELT R, MERTENS SA, GUENTHER JN, PARRISH JJ, WILTBANK MC. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *Journal of Dairy Science* 85: 2803-2812.
- 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.
- SHAHAM-ALBALANCY A, FOLMAN Y, KAIM M, ROSENBERG M. 2001. Delayed effect of low progesterone concentrations on bovine uterine PGF2 α secretion in the subsequent oestrous cycle. *Reproduction* 122: 643-648.
- SPENCER TE, BURGHARDT RC, JOHNSON GA, BAZER FW. 2004. *Animal Reproduction Science* 82-83: 537-550.
- THATCHER WW, MEYER MD, DANET-DESNOYERS G. 1995. Maternal recognition of pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility* 49 (supl.): 15-28.
- THATCHER WW, MOREIRA FA, SANTOS JEP, MATTOS RC, LOPES FL, PANCARCI SM, RISCO CA. 2001. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55: 75-89.

THATCHER WW, TERQUI M, THIMONIER J, MAULEON P. 1986. Effect of estradiol-17 β on peripheral plasma concentration of 15-keto-13,14-dihydro PGF2a and luteolysis in cyclic cattle. Prostaglandins 31: 745-756.

VASCONCELOS JLM, ARAUJO TPB, CERRI RLA, VALARELLI RL, WECHSLER FS. 2000. Ovulation and synchronization rates in Holstein and crossbred lactating dairy cows when receiving the PGF2 α injection on d 6 or 7 of the Ovsynch protocol. In: Joint Meeting ADSA and ASAS, 2000 Baltimore. Abstracts. *Journal Dairy Science* 83 (Suppl.1): 214.

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.

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.

PUBERDADE E MATURIDADE SEXUAL DE NOVILHAS *BOS INDICUS*

Guilherme de Paula Nogueira¹

INTRODUÇÃO

A reprodução na fêmea envolve um complexo processo fisiológico e molecular com vários níveis de regulação, a integração do eixo hipotálamo-hipófise-gônada é fundamental para o início da puberdade e para o controle espacial e temporal dos eventos que controlam a gametogênese nos mamíferos.

O hipotálamo pode ser identificado como uma interface entre o sistema nervoso central e o sistema endócrino, sendo que a secreção do GnRH é governada por gerador de pulsos, após secretado este age na hipófise estimulando a secreção de gonadotrofinas. A variação na freqüência dos pulsos de GnRH interfere no tipo de gonadotrofina secretada pela hipófise alternando entre o FSH e o LH. Basicamente um aumento na freqüência de pulsos de secreção estimula a secreção de LH enquanto baixas freqüências de pulsos permitem a secreção de FSH. Os esteróides podem agir diretamente na hipófise ou indiretamente no hipotálamo alterando o padrão de pulsos de secreção de GnRH, com ação positiva ou negativa dependendo o estado fisiológico da fêmea (Evans et al., 1995, Shupnik, 1996).

As gonadotrofinas secretadas pela hipófise vão agir nas gônadas regulando o desenvolvimento folicular, esteroidogênese e ovulação na fêmea (Vésper et al., 2006). O desenvolvimento de ferramentas parácrinas (célula-célula: esteróides gonadais, IGFs e membros da superfamília dos TGFs-transforming growth factors) que sensibilizam os folículos para o FSH e o LH é crucial para a emergência de um único folículo dominante em cada ciclo. O FSH age nas células da granulosa estimulando a proliferação e diferenciação, o folículo mais responsável no início do ciclo será o primeiro a produzir estrógeno e expressar LHR (receptores para LH) nas células da granulosa. Sinais parácrinos ativados pelo LH e FSH mantém o crescimento folicular e a secreção de estrógeno até que um pico de LH liberado pela hipófise induza a ovulação. O pico de LH reprograma a função das células da granulosa provocando a luteinização, ruptura da parede do folículo e liberação do óvulo (Hillier, 2001).

Para o desenvolvimento folicular e ovulação, a novilha precisa secretar FSH para a emergência da onda e posteriormente LH para manter o crescimento folicular e deflagrar a ovulação.

CONTROLE HORMONAL DA PUBERDADE

Para a fêmea diferente do macho, o processo reprodutivo demanda muito gasto de energia e nutrientes. Após a fecundação terá que garantir ingerir o suficiente para sua manutenção e para o crescimento do novo indivíduo e anexos por 9 meses. Ao mesmo tempo terá que preparar a glândula mamária para produzir leite garantindo a sobrevivência da cria. Após o parto, além de toda perda de material gerado (sangue e placenta) a fêmea terá que produzir leite para garantir a sobrevivência do produto por pelo menos mais 6 meses.

Após o nascimento mecanismos endócrinos garantem que a bezerra não ative o sistema reprodutivo até que possua um desenvolvimento somático compatível com a reprodução, próximo de 65-70% do peso adulto (Semmelmann et al., 2001) que

¹Curso de Medicina Veterinária - Laboratório de Endocrinologia - UNESP - Araçatuba - 16050-680 (gpn@fmva.unesp.br)

sinalize que o gasto de energia com o crescimento e desenvolvimento está diminuindo, permitindo todo o gasto com gestação, parto e lactação.

Diferentes mecanismos evitam que o sistema endócrino reprodutivo seja ativado antes do tempo permitindo a continuidade do crescimento e desenvolvimento do animal. Basicamente existem dois padrões de supressão da atividade gonadal pós-natal que assume maior ou menor importância dependendo da espécie. Em primatas e eqüinos a supressão da atividade gonadal é de origem central, isto é, independente das gônadas a secreção de gonadotrofinas (principalmente LH) é suprimida, por inibição direta do SNC (conseqüência de um aumento da atividade gabaérgica) sobre a secreção de GnRH (Terasawa, Fernandez, 2001; Nogueira, Ginther, 2000). Nos ratos, bovinos e ovinos a inibição da atividade reprodutiva acontece por uma sensibilidade excessiva do hipotálamo ao estradiol (Day et al., 1987, Ramirez, McCann, 1963) há uma exacerbação da retroalimentação negativa do estradiol sobre o hipotálamo.

Durante a maturação hipotalâmica na novilha podem acontecer mudanças no tipo de receptores para estradiol no hipotálamo. Existem dois subtipos de receptores para estradiol (ER α e ER β) e aparentemente o ER α é mais importante para estimular a secreção de gonadotrofinas que o ER β . Animais que não expressam o ER α são inférteis enquanto que a falta dos receptores ER β tornam as fêmeas subférteis (Couse and Korach, 1999).

Outra possível explicação para o aumento da secreção de LH durante a maturação sexual na novilha, seria a mudança na quantidade de receptores de estradiol em diferentes áreas do hipotálamo. Foi demonstrado na ovelha que o estradiol age no hipotálamo médio-basal estimulando a secreção de GnRH e na área pré-optica medial inibindo a secreção de LH (Caraty et al., 1998). Assim se a quantidade de receptores de estradiol aumentar no hipotálamo médio-basal e diminuir na área pré-optica medial o hipotálamo passaria a responder positivamente ao estradiol, ao invés de negativamente. No entanto trabalhos anteriores utilizando radioimunoensaio detectaram diminuição do número de receptores para estradiol tanto no hipotálamo anterior quanto no hipotálamo médio-basal e hipófise durante a maturação sexual na novilha (Day et al, 1987), estudos mais específicos poderão ser feitos.

Foi aventada também a possibilidade de interação entre os dois mecanismos, central e periférico durante a maturação sexual das novilhas. Sabe-se que o glutamato, age no hipotálamo modulando vários fatores de liberação (incluindo GnRH) que estimulam a secreção de hormônios da hipófise anterior (incluindo LH e FSH; Brann, Mahesh, 1997). Um estudo com novilhas de corte (desmamadas com 21 semanas) concluiu que a ativação de receptores de glutamato (NMDA) em diferentes idades estimulou a secreção de LH e FSH, atingindo um máximo de resposta próximo da primeira ovulação, no entanto não existe uma evidência clara de que o aumento da resposta do LH ao NMDA possa estar envolvido no aumento da freqüência de pulsos que provocam a primeira ovulação (Honaramooz et al., 1998).

É possível que o tratamento com glutamato possa exercer algum efeito sobre a puberdade em bovinos. A administração de glutamato exógeno mimetiza a ação da ivermectina que age nos canais de cloro que respondem ao glutamato fazendo com que os mesmos permaneçam abertos despolarizando as células musculares (Feng et al., 2002). O tratamento de novilhas pré-púberes, com ivermectina diminuiu a idade à puberdade e os autores discutem a possibilidade de uma ação direta sobre os ovários uma vez que a concentração plasmática de LH não foi alterada (Lacau-Mengido, et al. 2000).

Como no bloqueio central (em primatas e eqüinos) a contenção da atividade gonadal no período pré-puberal acontece por excesso de atividade gabaérgica, foi estudado o efeito da inibição gabaérgica, através da administração de picrotoxina em novilhas

Nelore. Houve aumento no número de picos e a área total dos picos de secreção de LH somente aos 10 meses de idade. Esta resposta pontual da secreção de LH ao bloqueio de receptores gabaérgicos nos leva a supor uma participação gabaérgica no período anterior a desmama (Nogueira, Oliveira, 2006). De fato Evans et al. (1992) estudando a puberdade em bezerras, observaram que a inibição por opióides sobre a secreção de gonadotrofinas está presente por volta do 1º mês de vida e diminui posteriormente, permitindo um aumento na concentração de LH por volta do 3º mês de idade. A contenção da atividade gonadal que sucede o nascimento da bezerra diminui após a aquisição de um percentual do desenvolvimento somático. Basicamente a diminuição da sensibilidade do hipotálamo ao estradiol permite o aumento da concentração de LH, porém vários neurotransmissores podem interferir na secreção de GnRH/LH nesse período.

IDADE Á PUBERDADE

A baixa idade à puberdade das novilhas zebuínas é um fator que compromete a produtividade e é um ponto a ser considerado quando se busca maior rendimento desses animais. É difícil considerar normal uma novilha ter a primeira ovulação aos dois anos de idade e o primeiro parto depois dos 3 anos (Nogueira, 2004). Vários fatores que interferem na idade à puberdade serão discutidos a seguir.

FATORES RELACIONADOS AO CRESCIMENTO E AO PESO CORPORAL

Para que as novilhas possam atingir a puberdade mais cedo a nutrição adequada é importante. A restrição de nutrientes diminuiu a freqüência de pulsos de LH e atrasou a puberdade em novilhas de corte, foi observado que um balanço energético positivo após um período de restrição alimentar pode estimular a puberdade (Yelich et al., 1996).

Mais importante que o peso corpóreo *per se* é a direção da mudança da massa corpórea, refletindo no status metabólico do animal. Um estudo com novilhas de corte (com 14,3 meses e ovariectomizadas), constatou novilhas com o mesmo peso corporal atingido com variações da massa corpórea em direções opostas (ganho de peso x perda de peso) apresentaram diferente secreção hipotalâmica. O aumento do ganho de peso provocou aumento na freqüência e diminuição na amplitude dos pulsos de LH (Tabela 1.-Roberson et al 1991).

Tabela 1- Peso corporal, concentração de glicose, característica pulsátil da secreção de LH e concentração média de FSH em novilhas alimentadas para atingir um peso corporal equivalente com diferentes direções de mudança de peso corpóreo. (Adaptado de Roberson et al 1991).

| <i>Idade</i> | <i>16 meses</i> | | <i>18 meses</i> | |
|---|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| | Ganho | Perda | Ganho | Perda |
| Tipo da dieta, com relação ao peso corporal | | | | |
| Peso corpóreo (kg) | 241,7 ^b | 307,8 ^c | 280,5 ^b | 278,7 ^b |
| Escore corporal | 3,1 ^b | 5,4 ^c | 4,3 ^b | 4,1 ^b |
| Glicose plasmática (mg/dl) | 45,5 ^b | 57,2 ^c | 58,2 ^b | 52,1 ^c |
| Freqüência de pulsos de LH (8h) | 8,1 ^b | 10,7 ^c | 9,7 ^b | 9,1 ^b |
| Amplitude dos pulsos de LH (ng/ml) | 3,7 ^b | 2,0 ^c | 1,6 ^b | 3, ^{gc} |
| Resposta da hipófise à GnRH (ng/ml) | 6,4 ^b | 3,5 ^c | 2,2 ^b | 4,0 ^c |
| FSH médio (ng/ml) | 8,0 ^b | 5,6 ^c | 6,2 ^b | 8,5 ^c |

Além de reduzir a secreção de LH, a restrição prolongada da ingestão de alimento diminuiu também as concentrações de IGF-I resultando em menor produção de estradiol e interrupção da ovulação. A realimentação de animais em anestro nutricional modifica o sinal metabólico, restabelecendo a secreção pulsátil de LH aumentando o diâmetro do folículo dominante e permitindo a ovulação (Wettemann; Bosis, 1999).

Baixa oferta de pasto afeta o consumo diário de MS e o desempenho animal. A redução da carga animal pós-demame de 300 kg de peso vivo/ha para 200 kg/ha melhorou a eficiência reprodutiva de novilhas de corte aos 18 meses de idade (Barcelos et al 2000). No entanto há que se considerar o fator custo, a suplementação alimentar pós desmama para novilhas cruzadas só é economicamente viável quando o preço pago pelo quilo de suplemento fica entre 0,05 a 0,07 do pago por quilo de peso vivo, se comparado aos animais criados exclusivamente a pasto (Pilau et al., 2003).

Como a puberdade normalmente acontece quando a novilha atinge 65 a 70% do peso adulto (Semmelmann et al., 2001), a seleção de vacas para maior peso pode aumentar a idade à puberdade. Existe o conceito de que animais com maior peso adulto necessitam de mais energia de manutenção e atingem a puberdade mais tarde que animais mais leves, portanto aumento de massa é uma característica indesejável para um rebanho em reprodução (Owens et al., 1993). De fato existe a recomendação para vacas Nelore de menor porte, que além de possuírem uma menor exigência nutricional apresentam a puberdade mais cedo (Vale et al., 1998). Mercadante et al., (2003), porém estudando novilhas Nelore selecionadas para alto peso corpóreo constataram que esses animais não apresentaram prejuízo no desempenho reprodutiva, recomendando esse critério de seleção para a raça.

Outro problema que os animais enfrentam a pasto pode ser o parasitismo. Foi observado que o tratamento de novilhas com ivermectina (0,2 mg/kg a cada 14 dias até 150 kg e depois um bolus intraruminal de 1,72g a cada 4 meses até a primeira ovulação), diminuiu o número de ovos de parasitas nas fezes e antecipou a puberdade de 39,7 para 29,3 semanas, quando comparado com os animais controle. Foi possível observar uma correlação positiva entre o número de ovos de nematódeos por grama de fezes e a concentração de prolactina sugerindo que o estresse provocado pela infestação possa estar envolvido no atraso da puberdade (Diaz-Torga et al., 2001).

Um possível sinalizador do status metabólico para o início da puberdade pode ser a leptina, produzida pelos adipócitos sinaliza a disponibilidade de energia no meio interno, desde a vida fetal (McMillen et al., 2006). A leptina exerce um importante papel sinalizando o status nutricional para o eixo reprodutivo central e pelo menos parece exercer um papel permissivo no início da puberdade, entretanto a leptina é incapaz de aumentar a freqüência de pulsos de LH em novilhas pré-púberes (Zieba et al, 2005). Da mesma forma a administração crônica de leptina em novilhas de corte próximo do momento esperado para a puberdade não induziu a puberdade ou alterou a característica endócrinas (Maciel et al, 2004).

Foi sugerida a participação do GH no desenvolvimento pubertal, uma vez que foram constatadas mudanças na concentração média e na amplitude de pulsos de GH (hormônio do crescimento) antes da puberdade (Yelich et al., 1996). Porém em outra pesquisa (Diaz-Torga et al., 2001) não foi possível observar relação entre a concentração de GH e a primeira ovulação em novilhas.

O fator nutricional possui uma importante participação na expressão do potencial de puberdade precoce. Mais importante que o peso é o fato do animal estar ganhando ou perdendo peso, o que interfere na secreção de gonadotrofinas e no desenvolvimento folicular. Além das gonadotrofinas outros hormônios como o GH, IGF1 e leptina participam da maturação sexual na novilha.

EXCESSO DE PESO

Vários criadores de Nelore de elite que tem como o objetivo levar os animais para exposições agropecuária ou leilões buscam alimentar as novilhas mais do que adequadamente para que atinjam o peso necessário para a reprodução o mais rapidamente possível. No entanto esses criadores e seus veterinários têm enfrentado um problema inesperado, as novilhas com peso adequado antes do tempo para a reprodução apresentam dificuldades reprodutivas. Inserimos este tópico com o objetivo de discutir possíveis explicações para esse fato.

A composição corpórea e a dieta (nível de alimentação) interferem no desenvolvimento pós fertilização de óócitos recuperados por aspiração ovariana. A interferência do nível da dieta sobre a qualidade oocitária depende da condição corpórea do animal. Altos níveis de alimentação foram benéficos para os animais com baixa condição corporal, mas prejudiciais para animais com condição corporal moderada ou elevada. Como foi observado que uma alta taxa de animais gordos alimentados com altos níveis de dieta estavam hiperinsulinêmicos, isso pode ter prejudicado a qualidade dos óócitos (Adamiak et al 2005).

Recentemente foram publicados os resultados de uma pesquisa que estudou a influência do ganho de peso pré-desmama (do nascimento aos 7 meses de idade) em bezerras de corte e seu reflexo sobre o desempenho desses animais quando vacas. As bezerras foram divididas em grupos de ganharam menos que 350g/dia ou mais que 350 g/dia, e acompanhadas depois quando vacas. Foi constatado que as bezerras que ganharam menos que 350 g/dia produziram maior quantidade de leite, bezerros com maiores ganho de peso e maior peso à desmama. Acredita-se que elevado ganho de peso no período pré-desmama aumentou a quantidade de tecido adiposo no úbere e diminui a quantidade de células na glândula mamária (Tabela 2- Restle et al., 2005).

Tabela 2. Medias para as características de desempenho de bezerros de acordo com a taxa média de ganho de peso da vaca em seu período pré-desmame e com o tipo de pastagem durante a lactação (Adaptado de Restle et al., 2005).

| | <i>Taxa de ganho de peso quando bezerra</i> | |
|---|---|-------------------|
| | Moderada | Baixa |
| Peso ao nascer do bezerro (kg) | 32,3 ^a | 33,4 ^b |
| Peso do bezerro ao desmame (kg) | 161 ^a | 189 ^b |
| Ganho médio diário do nascimento à desmama (kg) | 617 ^a | 717 ^b |

Um conceito que ultimamente tem ganhado destaque no estudo de variações de genótipo e fenótipo, consiste na modulação epigenética. Em síntese a modulação epigenética refere-se à variação de fenótipo com controle acima do genético, o prefixo epi significa acima em posição superior, a interferência epigenética na expressão gênica ocorre principalmente através da metilação do DNA. As enzimasDNA (citosina-5) metiltransferase (DNMTs) promovem a metilação do DNA e com isso o silenciamento gênico. Anormalidades de metilação afetam o crescimento, a função placentária, processos comportamentais além de induzir alguns tipos de câncer (Lopes et al., 2006). O que estes estudos sugerem é que paralelo ao controle genético o controle epigenético pode interferir na expressão gênica modulando o metabolismo do animal. Em outras palavras, o melhoramento genético deve ser acompanhado por modificações epigenéticas, e em algumas situações onde o melhoramento genético aconteceu de forma muito acelerada ou abrupta este poderia não necessariamente estar acompanhado de mudanças epigenéticas suficientes. Usando como exemplo o Nelore, um animal selecionado até o século passado na Índia para ser resistente e

sobreviver com baixa disponibilidade de nutrientes. Em pouco mais de 100 anos sofreu uma pressão de seleção para aumentar o crescimento e produtividade e no caso de animais de elite, ser criado com excesso de energia e proteína, uma condição diferente da realidade de onde o mesmo foi selecionado. Isso pode gerar alterações metabólicas (de origem epigenética) que interferem na reprodução, e tem que ser estudadas para maior compreensão.

SAZONALIDADE

A estação do ano exerce um efeito significante na idade e peso à puberdade (Tabela 3. Getzewich, 2005), o fotoperíodo altera a concentração de LH em novilhas pré-púberes (Critser et al, 1987). Há uma teoria de que o efeito da estação sobre a puberdade é mais pronunciado no segundo semestre de vida. Novilhas cruzadas foram criadas sob condições naturais até os 5 meses de idade, depois dos 6 meses as novilhas foram para câmaras climáticas que simularam as 4 estações do ano. Novilhas que nasceram no outono atingiram a puberdade mais cedo que as novilhas que foram expostas primeiro à primavera e depois ao outono. A estação do ano, durante os primeiros 6 meses de idade não interferiu no peso corpóreo. A exposição dos animais à câmaras climáticas possivelmente afetou a idade à puberdade por interferir na maturação do sistema de retroalimentação negativa do estradiol, mas não afetou o crescimento (Schillo et al., 1983).

Tabela 3. Efeito da estação do ano do nascimento na idade e peso à puberdade, para quatro estações diferentes (Adaptado de Getzewich, 2005).

| Estação do ano de nascimento | Idade à puberdade (semanas) | Peso à puberdade (kg) |
|------------------------------|-----------------------------|-----------------------|
| Outono | 41,8 ^b | 236,8 ^b |
| Primavera | 46,6 ^c | 275,8 ^c |
| Verão | 42,9 ^{bc} | 240,3 ^b |
| Inverno | 42,7 ^{bc} | 242,0 ^b |

Os achados de Honamarooz et al. (1999) estudando novilhas pré-púberes sob condições naturais, não sob fotoperíodo ou estação do ano simulada, contrasta com os trabalhos anteriores de Schillo et al. (1983), o peso e a idade à puberdade não diferiram entre animais nascidos na primavera ou no outono, entretanto a variação da idade e peso à puberdade foi maior nas novilhas nascidas no outono. A diferença entre os experimentos pode ser influenciada pelas diferenças entre raças, clima e práticas de manejo (Honamarooz et al., 1999). A possível participação da variação no fotoperíodo sobre a puberdade foi evidenciada pela administração de melatonina exógena por 5 semanas no início do verão, que antecipou a puberdade de novilhas nascidas no final do inverno (Tortonese, Inskeep, 1992).

Como o desenvolvimento corporal interfere na puberdade a época de nascimento influencia a taxas de crescimento de bezerros Nelore, em especial o crescimento pós-desmame (Figura 1, Silva et al., 2004), é possível que estação do nascimento interfira sobre a taxa de crescimento modifique a idade à puberdade.

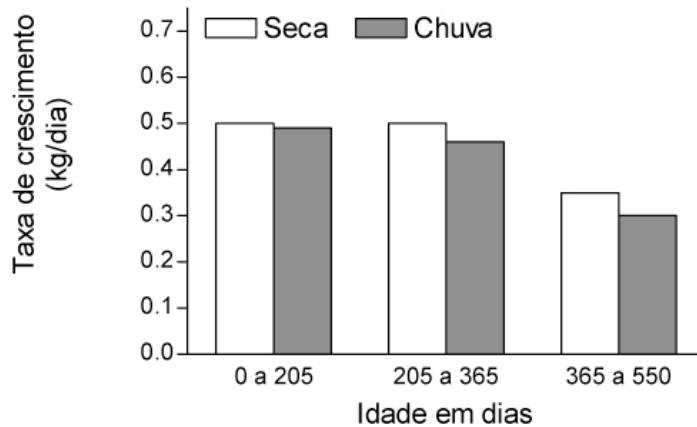


Figura 1. Efeito da época de nascimento sobre o crescimento do gado Nelore (Adaptado de Silva et al., 2004).

EFEITO TOURO

Os bovinos vivem em grupo onde a interação entre os animais provê muitos estímulos sociais que podem modificar processos fisiológicos e comportamentais, incluindo os relacionados à reprodução (Martin, 2002). O sistema de criação que separa machos de fêmeas pode suprimir o “efeito macho” presente nos grupos mistos de animais, a formação de grupos mistos em períodos estratégicos pode ser importante para estimular o desempenho reprodutivo.

Em um experimento com novilhas cruzadas com 24,5 meses de idade, 30 novilhas foram expostas a rufões Jersey com desvio lateral de pênis por 50 dias antes da estação de monta (início em 16/8) em uma proporção de 26 fêmeas por rufão (havia outros animais no pasto), a ovulação foi determinada por quantificação de progesterona. A bioestimulação aumentou a taxa de novilhas cíclicas antes da temporada reprodutiva ($p=0,06$), bem como a taxa de prenhez ($p=0,07$). A presença do macho determinou maiores percentuais acumulados de novilhas inseminadas, sem alterar a data média de concepção. A resposta das novilhas ao estímulo da presença do macho foi dependente da idade e do desenvolvimento corporal (Figura 2, Quadros; Lobato, 2004).

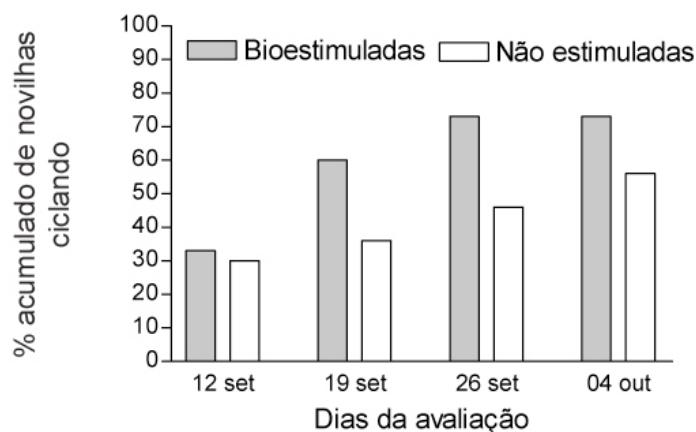


Figura 2. Efeito da bioestimulação por 50 dias (início em 16/08) sobre a ciclicidade de novilhas criadas para corte. (Adaptado de: Quadros; Lobato, 2004).

TRATAMENTO HORMONAL PARA INDUZIR A PUBERDADE

Uma alternativa para antecipar a puberdade em novilhas é o tratamento com hormônios. O tratamento com progesterona (por 10 dias) aumentou o número de novilha de 200 dias de idade que atingiram a puberdade (89%) se comparado com novilhas que não receberam implante (71%) (Grings et al., 1998).

Como a progesterona interrompe o anestro pré-puberal? O pico de LH nos ruminantes acontece por um aumento da secreção de GnRH em resposta à elevação das concentrações circulantes de estradiol (Karsh et al 1997). O estradiol atua nas células do hipotálamo médio-basal ativando receptores (ER α) (Couse, Korach, 1999). Camundongos sem o ER α possuem grandes folículos anovulatórios resultado da interrupção da retroalimentação positiva na indução do aumento do GnRHH /LH que é mediado pelos ER α hipotalâmicos. (Lydon et al, 1995). Por outro lado camundongos sem receptor para progesterona também apresentam grandes folículos pré-ovulatórios, apesar de possuírem concentrações normais de estradiol (Chappell et al., 1997). Na verdade o estradiol é necessário para induzir a produção de receptores de progesterona que quanto estimulados (pela progesterona) aumentam a expressão de receptores para estradiol (Lydon et al, 1995).

A contenção da atividade gonadal a qual os animais pré-púberes estão submetidos é de certa forma semelhante ao anestro sazonal. O anestro sazonal na ovelha é caracterizado por um padrão episódico de secreção de LH inadequado para estimular o crescimento folicular e a ovulação. Ovelhas no anestro sazonal respondem melhor ao GnRH quando expostas à progesterona, sendo capazes de responder à doses menores de GnRH exibindo estro e função luteínica normal (McLeod et al, 1982).

Da mesma forma a primeira ovulação após período de anestro por restrição alimentar apresenta um corpo lúteo com meia vida curta, sem a exteriorização de estro antes do primeiro ciclo normal (Wettemann; Bosis, 1999), este ciclo curto como é chamado também antecede o primeiro ciclo extra nas novilhas Nelore pré-púberes (Nogueira, 2004), evidenciando a necessidade da exposição prévia à progesterona para a ocorrência de um ciclo normal .

SELEÇÃO PARA PUBERDADE PRECOCE

Seleção para menor idade à puberdade e aumento da circunferência escrotal leva a um aumento da taxa de gestação sugerindo que a seleção dentro de uma raça pode ser capaz de forma lenta de melhorar as características reprodutivas como a taxa de gestação (Morris et al 2000).

O acompanhamento por 10 anos de um programa de seleção para precocidade em uma grande agropecuária, contendo dados de 30.802 novilhas Nelore, permitiu concluir que para selecionar novilhas quanto à precocidade sexual, é necessário expor todas as fêmeas em idades jovens à reprodução. A mensuração da taxa de prenhez por meio da prenhez aos 16 meses é indicada, uma vez que esta característica apresenta variabilidade genética alta e deve responder eficientemente à seleção, com possibilidades de rápido ganho genético (Silva, Dias, Albuquerque, 2005). A herdabilidade estimada para idade ao primeiro parto utilizando dados de 5.222 novilhas Nelore foi de 0,15 segundo Gunski et al.(2001).

Para novilhas recomenda-se iniciar e terminar a estação de monta, pelo menos quatro semanas antes da estação de monta das vacas, com duração que não deve ultrapassar 45 dias (Vale et al., 1998). O estabelecimento de um período restrito de cobertura é uma das primeiras práticas a serem implantadas. Além de proporcionar a

concentração dos nascimentos na época mais adequada, ela disciplina as demais atividades de manejo da propriedade, facilitando a identificação dos animais de elevadas “performances” reprodutiva e produtiva. Como consequência, além do aumento em produtividade, haverá uma maior oferta de produto de melhor qualidade, contribuindo para aumentar nossa competitividade no mercado mundial de carne. (Vale et al., 1998).

A produtividade à desmama dos rebanhos bovinos de corte pode ser aumentada pelo uso de fêmeas cruzadas quando comparadas às zebuínas (Perotto et al, 2001).

CONCLUSÃO

Para que a novilha zebuína possa expressar o potencial genético é necessário que disponha de alimentação adequada e bom manejo sanitário. O nascimento em época do ano adequada e a exposição ao touro próximo ao período da puberdade (após os 12 meses) podem contribuir para antecipar a idade à puberdade. Um manejo recomendado é utilizar o estímulo do touro e aproveitar para selecionar as que ficaram prenhas até os 16 meses de idade, o que funciona como um bom critério de seleção com alta herdabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMIAK S.J., MACKIE K., WATT R.G., WEBB R., SINCLAIR K.D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. *Biol. Reprod.*, v. 73, p. 918–926, 2005.
- BARCELLOS, J.O.J.; PRATES, E.R.; OSPINA, H.P.; LOPEZ, J.; MUHLBACH, P.R.F.; FREITAS, T.S. Carga animal pós-desmame e desempenho reprodutivo de novilhas de corte acasaladas aos 18 meses de idade. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2000, Viçosa. XXXVII Reunião Anual da SBZ. Viçosa : UFV, 2000. v. 1. p. 1-4.
- BRANN, D.W., MAHESH, V.B. Excitatory amino acids: evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocrine Reviews*, v.18, n.5, p. 678–700, 1997.
- CARATY A., FABRE-N.Y.S.C., DELALEU B., LOCATELLI A., BRUNEAU G., KARSCH F. J., HERBISON. A. Evidence that the mediobasal hypothalamus is the primary site of action of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology*, v. 139, p. 1752–1760, 1998.
- CHAPPELL PE, LYDON JP, CONNEELY OM, O'MALLEY BW, LEVINE JE. Endocrine defects in mice carrying a null mutation for the progesterone receptor gene. *Endocrinology*; v. 138, p. 4147–4152, 1997.
- COUSE JF, KORACH KS. Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev.*, v. 20, p. 358–417, 1999.
- CRITSERT, J.K.; BLOCK, T.M.; FOLKMAN, S.; HAUSER, E.R. Effect of photoperiod on LH, FSH, prolactin and melatonin patterns in ovarioectomized prepubertal heifers. *J.Reprod. Fert.*, v. 81, p. 29-39, 1987.
- 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.
- DIAZ-TORGA G.S., MEJIA M.E., GONZATLEZ-IGLESIAS A., FORMIA N., BECU-VILLALOBOS D., LACAU-MENGIDO I.M. Metabolic cues for puberty onset in free grazing Holstein heifers naturally infected with nematodes. *Theriogenology*, v. 56, p. 111-122, 2001.
- EVANS, N.P., DAHL G.E., MAUGER D.T., PADMANABAHA V., THRUN L.A., KARSCH F.J. Does estradiol induce the preovulatory gonadotropin-releasing hormone (GnRH) surge in the ewe by inducing a progressive change in the mode of operation of the GnRH neurosecretory system? *Endocrinology* v. 136, p. 5511-5519, 1995.

- FENG, X. J. HAYASHI, R.N. BEECH, R.K. Prichard. Study of the nematode putative GABA type-A receptor subunits for modulation by ivermectin. *Journal of Neurochemistry*, v. 83, p. 870–878. 2002.
- GETZEWICH, KAREN ELIZABETH. Hormonal regulation of the onset of puberty in purebred and crossbred Holstein and Jersey heifers. *Thesis* submitted to the faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Dairy Science July 19, 2005 Blacksburg, VA, USA.
- GRINGS E. EHALL., J. B., BELLOWS R. A., SHORT R. E., BELLOWS S. E., STAIGMILLER R. B. Effect of Nutritional Management, Trace Mineral Supplementation, and Norgestomet Implant on Attainment of Puberty in Beef Heifers. *J. Anim. Sci.* v. 76, p. 2177–2181, 1998.
- GUNSKI R.J., GARNERO A.V, BEZERRA, L.A.F., CORRADO, M.P., LOBO, R.B. Idade ao primeiro parto período de gestação e peso ao nascimento na raça Nelore. *Ciência Agronômica*, v. 32, n. 1/2, 2001.
- HILLIER S.G. Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 179, p. 39–46, 2001.
- HONARAMOOZ, A., CHANDOLIA, R.K., BEARD, A.P., RAWLINGS, N.C. Excitatory amino acid regulation of gonadotropin secretion in prepubertal heifer calves. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 1124–1130, 1998.
- HONARAMOOZ, A., CHANDOLIA, R.K., BEARD, A.P., RAWLINGS, N.C. Effects of season of birth on the prepubertal pattern of gonadotropin secretion and age at puberty in beef heifers. *Theriogenology*. v. 52, p. 67-79, 1999.
- KARSCH FJ, BOWEN JM, CARATY A, EVANS NP, MOENTER SM. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. *Biol Reprod*; v. 56, p. 303–309, 1997.
- LACAU-MENGIDO I. M., MEJIA M. E., DIAZ-TORGA G. S., GONZALEZ IGLESIAS A., FORMIA N., LIBERTUN C., BECU-VILLALOBOS D. Endocrine studies in ivermectin-treated heifers from birth to puberty. *J. Anim. Sci.*. v. 78,p. 817–824, 2000.
- LOPES F.L.; FORTIER A.; LA SALLE S.; LUCÍFERO, D., TRALER, J.M. Epigenética do desenvolvimento: da gametogênese a embriogênese. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, Supl.1, p. 243-244, 2006.
- LYDON JP, DEMAYO FJ, FUNK CR, MANI SK, HUGHES AR, MONTGOMERY JR CA, SHYAMALA G, CONNEELY OM O'MALLEY BW. Mice lacking progesterone receptor exhibit pleiotropic reproductive abnormalities. *Genes & Development*, v. 9, p. 2266-2278, 1995.
- MACIEL M. N., ZIEBA D. A., AMSTALDEN M., KEISLER D. H., NEVES J. P., WILLIAMS G. L. Chronic administration of recombinant ovine leptin in growing beef heifers: Effects on secretion of LH, metabolic hormones, and timing of puberty. *J. Anim. Sci.*, v. 82, p. 2930–2936, 2004.
- MARTIN, G.B. Social-sexual signs and reproduction in mammals – an overview. In: CURSO INTERNACIONAL SOBRE FEROMONAS Y BIOESTIMULACIÓN SEXUAL, 1., 2002. Anais... Universidad Nacional Autonoma de Mexico, 2002. p.11-28.
- MCLEOD BJ, HARESIGN W, LAMMING GE. Response of seasonally anoestrous ewes to small-dose multiple injections of Gn-RH with and without progesterone pretreatment *J. Reprod Fertil*. v. 65, p. 223-230, 1982.
- MCMILLEN I.C., EDWARDS L.J., DUFFIELD J., MUHLHAUSLER B.S. Regulation of leptin synthesis and secretion before birth: implications for the early programming of adult obesity. *Reproduction*, v. 131, p. 415–427, 2006.
- MERCADANTE M. E. Z., PACKER I. U., RAZOOK A. G., CYRILLO J. N. S. G., FIGUEIREDO L. A. Direct and correlated responses to selection for yearling weight on reproductive performance of Nelore cows *J. Anim. Sci.*, v. 81, p. 376–384, 2003
- MORRIS, CA, WILSON, J.A., BENNET, G.L., CULLEN, N.G., HICKEY, S.M., HUNTER, J.C. Genetic parameters for growth, puberty and beef cow reproductive traits in a puberty selection experiment. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, v. 43, p. 83-91, 2000.
- 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.
- NOGUEIRA GP. Puberty in South American Bos Indicus. *Anim. Repro. Sci.*, v. 82-83, p. 361-372, 2004.

- NOGUEIRA, G.P., OLIVEIRA, D.J.C. GABA inhibition on LH secretion in prepubertal Nelore heifers. In: **International Ruminant Reproduction Symposium**, Wellington, New Zealand, 4th, 2006. Anais. P. 124.
- OWENS F. N., DUBESKI P., HANSONT C. F. Factors that Alter the Growth and Development of Ruminants. **J. Anim. Sci.** v. 71, p. 3138-3150, 1993.
- PILAU, A., ROCHA, M.G., SANTOS, D.T. Análise econômica de sistemas de produção para recria de bezerros de corte. **R. Bras.Zootec.**, v. 32, n. 4, p. 966-976, 2003.
- POMPOLO S., PEREIRA A., ESTRADA K. M., CLARKE I. J. Colocalization of kisspeptin and gonadotropin-releasing hormone in the ovine brain **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 804-810, 2006.
- QUADROS S.A.F., LOBATO J.F.P. Bioestimulação e comportamento reprodutivo de novilhas de corte. **R. Bras. Zootec.**, v. 33, n. 3, p. 679-683, 2004.
- 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.
- RESTLE, J., PACHECO, P.S., PADUA J.T., MOLETTA, J.L., ROCHA M.G., SILVA J.H.S., FREITAS, A.K. Efeito da taxa de ganho de peso pré-desmama de bezerros de corte e do nível nutricional do pasto, quando vacas, sobre a produção e composição do leite e do desempenho de bezerros. **R. Bras.Zootec.**, v. 34, n. 1, p. 197-208, 2005.
- ROBERSON M. S., STUMPF T. T., WOVE M. W., KITTOK R. J., KINDER I. E. Influence of direction of body weight change on pattern of gonadotropin secretion in ovariectomized beef heifers of equivalent body weight. **J. Anim. Sci.**, v. 69, p. 1616-1625, 1991.
- SCHILLO, K.K., HANSEN, P.J., KAMWANJA, L.A., DIERSCHKE, D.J., HAUSER, E.R. Influence of season on sexual development in heifers: Age at puberty as related to growth and serum concentrations of gonadotropins, prolactin, thyroxine and progesterone. **Biol Reprod.** v. 28, p. 329-341, 1983.
- SEMMELMANN, C.E.N., LOBATO, J.F., ROCHA, M.G. Efeito de sistemas de alimentação no ganho de peso e desempenho reprodutivo de novilhas Nelore acasaladas aos 17/18 meses. **R. Bras. Zootec.**, v. 30, n. 3, p. 835-843, 2001.
- SEMPERE M.T. GPR54 and kisspeptin in reproduction. **Human Reproduction Update** v. 12 n. 5, p. 631-639, 2006.
- SHUPNIK MA. Gonadotropin gene modulation by steroids and gonadotropin-releasing hormone. **Biol Reprod.** v. 54, p. 279 – 286, 1996.
- SILVA J. A. II .V., DIAS L. T., ALBUQUERQUE L.G. Estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore, **R. Bras. Zootec.**, v.34, n. 5, p. 1568-1572, 2005.
- SILVA N.A.M., AQUINO, L.H., SILVA F.F., OLIVEIRA A.I.G. Curvas de crescimento e influência de fatores não genéticos sobre as taxas de crescimento de bovinos da raça Nelore. **Ciênc. agrotec.**, v. 28, n. 3, p. 647-654, 2004.
- TERASAWA, E.; FERNANDEZ D.F. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 1, p. 111–151, 2001.
- TORTONESE D. J., INSKEEP E. K. Effects of melatonin treatment on the attainment of puberty in heifers. **J. Anim. Sci.** v. 70, p. 2822-2827, 1992.
- TURGEON J.L., WARING D W. Luteinizing Hormone secretion from wild-type and progesterone receptor knockout mouse anterior pituitary cells. **Endocrinology**, v. 142, p. 3108–3115, 2001.
- VESPER A.H; RAETZMAN L.T.; CAMPER S.A. Role of prophet of Pit1 (PROP1) in gonadotrope differentiation and puberty. **Endocrinology**, v. 147, n. 4, p. 1654-1663, 2006.
- WETTEMANN, R.P., BOSSIS, I. 1999. Energy intake regulates ovarian function in beef cattle. **Proc. Am. Soc. Anim. Sci.**, 1999. Available at: <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/filename>. Accessed {30/08/2006}.
- 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. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 13, n. 4, p. 325-338, 1996.
- VALLE, E.R.; ANDREOTTI, R.; THIAGO, L.R.L. DE S. Estratégias para aumento da eficiência reprodutiva e produtiva em bovinos de corte. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998. 80p. (EMBRAPA-CNPGC. Documentos, 71).

ZIEBA D.A., AMSTALDEN M., WILLIAMS G.L. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, p. 166–185, 2005.

IMPACTO DA IATF NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM BOVINOS DE CORTE

Pietro S. Baruselli¹, Henderson Ayres¹, Alexandre H. Souza¹, Claudiney M. Martins¹, Lindsay U. Gimenes¹, José R.S. Torres-Júnior¹

INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é composto por 192 milhões de animais (FAO, 2005), com predominância de *Bos indicus* (80%), pela maior adaptabilidade às condições climáticas de altas temperaturas e umidade. No entanto, para que a bovinocultura brasileira atinja elevados níveis de produtividade com qualidade a eficiência reprodutiva e o melhoramento genético são áreas que merecem destaque.

O melhoramento genético, baseado na seleção de indivíduos com maior desenvolvimento ponderal, rendimento de carcaça, produção leiteira, capacidade de conversão alimentar, precocidade, entre outros, possibilita o aumento da produtividade de carne e de leite. Assim, a eficiente multiplicação de animais superiores por biotécnicas da reprodução proporciona maior retorno econômico à atividade. Entretanto, a multiplicação e distribuição desse material genético só é possível com adequado manejo e sem comprometer a eficiência reprodutiva do rebanho.

Desta forma, elevados índices de produção, associados à alta eficiência reprodutiva, devem ser metas que norteiam os técnicos e criadores a alcançarem maior produtividade.

O objetivo dessa revisão é apresentar de forma resumida informações sobre as técnicas de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo, analisando seu impacto na eficiência reprodutiva em bovinos de corte.

EFICIÊNCIA REPRODUTIVA

IMPACTO DO INTERVALO ENTRE PARTOS E DO PERÍODO DE SERVIÇO NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM BOVINOS DE CORTE

Segundo o Anualpec de 2004, o rebanho bovino brasileiro é composto por 73.429.856 de vacas e novilhas com idade superior à 24 meses. Nesse mesmo ano a produção de bezerros foi de 42.335.147, representando taxa de desmama de 57,6%. Levando em conta uma taxa de mortalidade de bezerros de 8%, a taxa de nascimento do rebanho brasileiro é de 65%, o que resulta em intervalo entre partos de 18 meses (540 dias). Projeta-se, também, um período de serviço (parto/concepção) de 8,5 meses (255 dias). Estes dados são indicativos de que o rebanho brasileiro apresenta baixa eficiência reprodutiva com comprometimento na produtividade.

Com um hipotético aumento de 10% na eficiência reprodutiva, ou seja, com a elevação da taxa de nascimento de 65 para 75%, o intervalo entre partos passaria para 16 meses (480 dias) e o período de serviço (parto/concepção) para 6,5 meses (195 dias). Com essa melhora na eficiência reprodutiva seria possível produzir 6.513.099 de bezerros a mais, totalizando 48.848.246 de bezerros produzidos por ano. Esse aumento na produção representa significativo incremento na produtividade e rentabilidade do rebanho bovino brasileiro.

Trenkle & Wilham (1977) demonstraram que do ponto de vista econômico, o desempenho reprodutivo de um rebanho é cinco vezes mais importante que

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Rua Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brasil.
(e-mail: barusell@usp.br)

crescimento ponderal e 10 vezes mais importante que a qualidade da carcaça de seus indivíduos. Assim, um programa de inseminação artificial, que tecnicamente procura introduzir material genético superior para aumentar o crescimento ponderal e a qualidade da carcaça, não deve comprometer a eficiência reprodutiva do rebanho.

VANTAGENS DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA)

A utilização da IA apresenta inúmeras vantagens como a padronização do rebanho, o controle de doenças sexualmente transmissíveis, a organização do trabalho na fazenda, a diminuição do custo de reposição de touros, etc. No entanto, 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. Outra vantagem 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 em países tropicais para obter, com sucesso, os ganhos do cruzamento entre *Bos taurus* e *Bos indicus*.

Entretanto, para serem obtidos elevados índices reprodutivos com o uso da IA é necessário compreender as limitações do emprego desta biotecnologia. Entre as principais limitações para se obter 1 bezerro/vaca/ano em rebanhos de corte que empregam a IA, podem-se ressaltar: 1. falhas na detecção de cio; 2. anestro pós-parto e 3. puberdade tardia.

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.

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 (Heat-watch) em vacas Nelore, Angus e Nelore x Angus criadas a pasto nas mesmas condições de manejo (Mizuta, 2003). Os resultados 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*).

Ainda, em outro estudo para avaliar o momento de ocorrência do cio ao longo do dia, verificou-se que 53,8% dos cios começam durante a noite, e que 30,7% começam e terminam durante a noite (Barros et al., 1998).

Como o Brasil as fêmeas bovinas em reprodução possuem prevalência de 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.

Logo, a detecção do estro (cio) é fator limitante para o emprego da IA.

ANESTRO PÓS-PARTO

A duração do anestro pós-parto é influenciada por inúmeros fatores (condição nutricional, interação vaca/bezerro, idade, estação de parição, entre outros). Em dois estudos (Baruselli et al., 2002; Marques et al., 2003a) foi verificado baixo percentual de vacas de corte lactantes ciclando entre 60 a 70 dias pós parto [24,3% (52/214 vacas Nelore) e 14,0% (7/50 vacas Nelore/Angus), respectivamente]. Ainda, Ruiz-Cortez e Oliveira-Angel (1999) verificaram que fêmeas zebuínas lactantes criadas a pasto restabeleceram a ciclicidade ovariana somente entre 217 e 278 dias pós-parto, apresentando um IEP de 17 a 19 meses.

Deve ser salientado que para a obtenção de satisfatória eficiência reprodutiva é indispensável o bom manejo da propriedade, uma vez que as características reprodutivas são de baixa herdabilidade e, consequentemente, influenciadas pelo meio e, principalmente, pelo manejo nutricional (Vasconcelos, 1999). Estima-se que aproximadamente 80% da variação na fertilidade são devidos aos fatores ambientais, dos quais mais de 50% são explicados pela nutrição (Lothammer, 1991).

Logo, a baixa taxa de ciclicidade (anestro) no pós-parto é fator limitante para o emprego da IA.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)

Uma questão importante para o estabelecimento de um programa de IA é: existe a possibilidade de produzir 1 bezerro por vaca por ano por inseminação artificial? Ou seja, obter intervalo entre partos próximos a 12 meses, período de serviço entre 70 e 80 dias e concepção no início da estação de monta? É possível obter eficiência reprodutiva com melhoramento genético? Na atualidade existe tecnologia disponível para que essas questões sejam respondidas positivamente, empregando métodos de sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

Os protocolos de sincronização para IATF objetivam induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, controlar a duração do crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório, sincronizar a inserção e a retirada da fonte de progesterona exógena (implante auricular ou dispositivo intravaginal) e endógena (prostaglandina F_{2α}) e induzir a ovulação sincronizada em todos os animais simultaneamente.

COMPARAÇÃO ENTRE PROGRAMAS DE IATF E DE IA CONVENCIONAL

A sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo possibilita que as vacas sejam inseminadas e se tornem gestantes no início da EM, diminuindo o período de serviço e aumentando a eficiência reprodutiva do rebanho. Estudos realizados com vacas Brangus lactantes 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 com IA 12 horas após). Após 45 dias de EM 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 do próximo ano (Baruselli et al., 2002).

SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO PARA IATF E SEU IMPACTO NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA

Em experimento utilizando 397 vacas Brangus, paridas há $69,7 \pm 22,1$ dias, e mantidas a pasto, foi comparada a eficiência da IA convencional e dos protocolos que empregam progesterona, progestágenos e GnRH/PGF_{2α}/GnRH (Ovsynch; Baruselli et al., 2002). 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 após o tratamento de sincronização da ovulação.

Verificou-se que os tratamentos com progesterona e progestágenos possibilitam empreñhar 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. Essa antecipação possibilita alcançar melhores índices de fertilidade devido aos animais iniciarem a estação de monta do próximo ano paridos há mais tempo. Entretanto, o protocolo "Ovsynch" apresentou baixa eficiência, não sendo indicado para IATF em vacas Zebuínas lactantes nas condições brasileiras de manejo.

Em estudo recente, Penteado et al. (2005) avaliou o efeito de diferentes tipos de manejo durante a estação monta (EM) sobre a performance reprodutiva de vacas Nelore. Um total de 594 vacas lactantes, com intervalo entre parições de 15 dias (55 a 70 dias antes do início da estação de monta), foi subdividida em 4 grupos: 1) somente touro durante toda a EM (Grupo controle); 2) IA 12 horas após a detecção do cio por 45 dias seguido touro até o final da EM (Grupo IA-convencional); 3) IATF no início da EM seguido touro até o final da EM; 4) IATF no início da EM, seguido de IA 12 horas após a detecção do cio por 45 dias e seguido de touro até o final da EM. Os dados estão apresentados no Gráfico 1.

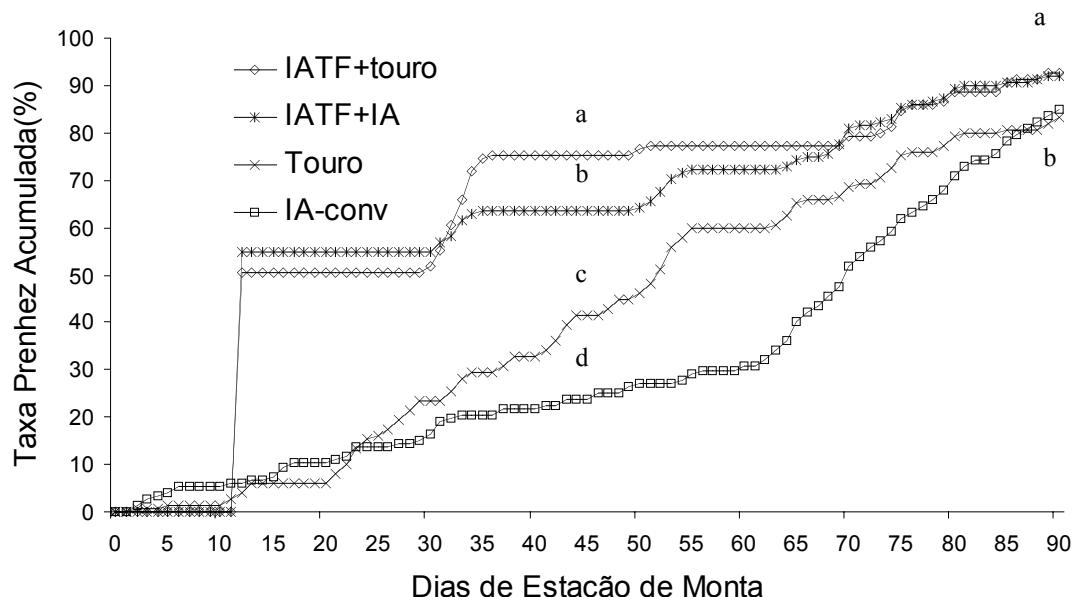


Gráfico 1. Taxa de prenhez acumulativa de vacas Nelore submetidas a diferentes manejos durante a estação de monta.

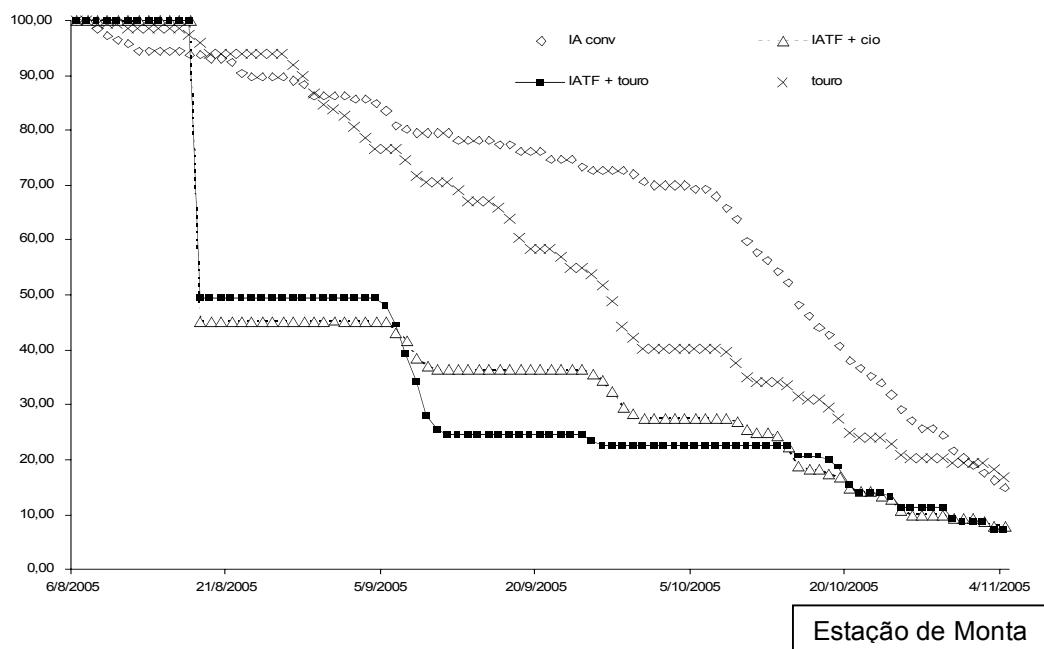


Gráfico 2. Estimativa dos partos no ano subsequente de vacas Nelore submetidas a diferentes manejos durante a estação de monta.

Analizando o gráfico dos partos no ano subsequente a sincronização, observa-se que 86% das vacas sincronizadas já tinham parido antes do início da estação de monta, enquanto que no grupo com observação de cio apenas 62%

Os resultados são indicativos de que o uso estratégico da IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes como ferramenta de manejo reprodutivo promove antecipação da concepção (aproximadamente 1 mês) e incremento ao redor de 8% na taxa de prenhez ao final da EM, além de aumentar o número de vacas prenhas por IA.

SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM PROGESTERONA E PROGESTÁGENO

Existem atualmente no mercado produtos eficientes que liberam progesterona (dispositivos intravaginais) e progestágenos (implantes auriculares) com finalidade de sincronização do estro e da ovulação. Estes produtos são utilizados por um período de 7 a 12 dias, dependendo do protocolo estabelecido. A finalidade deste tratamento é manter altos os níveis de progesterona para suprimir a liberação endógena do hormônio luteinizante (LH), simulando a fase luteínica do ciclo estral. A regressão luteínica é alcançada pela aplicação de estradiol no início do tratamento ou pela administração de prostaglandinas no momento da remoção do implante.

O Crestar é um implante auricular subcutâneo, utilizado para sincronização do crescimento folicular e da ovulação por um período de aproximadamente 9 dias. A finalidade deste implante é manter altos os níveis sanguíneos de progestágenos para suprimir a liberação do pico endógeno do hormônio luteinizante (LH), simulando a fase luteínica do ciclo estral. A regressão luteínica é alcançada pela aplicação de Valerato de estradiol (VE) no início do tratamento ou pela aplicação de prostaglandinas no momento da remoção do implante.

Os implantes auriculares de progestágenos contêm Norgestomet (17α -acetoxi- 11β -metil-19-norpreg-4-en-3,20-diona), que apresenta potência cerca de 200 vezes superior

à da progesterona natural. Assim, o implante silástico de Crestar possui 3 mg de Norgestomet. O implante de silicone provoca a liberação do progestágeno de forma homogênea e linear (Kesler et al., 1995).

Bó et al.(1991) observaram que a administração 5 mg de VE no momento da inserção de um implante do Norgestomet resultou na regressão dos folículos presentes no momento do tratamento e na emergência de uma nova onda de crescimento folicular. Além da sincronização do crescimento folicular, o VE apresenta ação luteolítica (Wiltbank e Kasson, 1968), dispensando a administração de prostaglandina na retirada do implante em vacas de corte.

Assim como VE, o E-17 β e o EB, em doses apropriadas, induzem eficientemente a emergência de uma nova onda de crescimento folicular (Martínez et al., 2004). Entretanto, devido ao menor tempo de permanecia destes fármacos na circulação, os mesmos possuem menor eficácia como agente luteolítico, necessitando desta forma que seja administrado prostaglandina ao protocolo.

No entanto, existem trabalhos que relatam efeito negativo de elevadas concentrações de estradiol encontradas em animais tratados com Norgestomet + Valerato de estradiol (Wherman et al, 1993; Cavalieri et al., 1997), principalmente em novilhas *Bos indicus*. Verificou-se atraso e dispersão no início da onda de crescimento folicular quando novilhas Nelore foram tratadas com Valerato do que com Benzoato de estradiol (Sá Filho et al., 2006). Assim, pode-se supor que novilhas *Bos indicus* tratadas com 5 mg de Valerato de estradiol podem estar apresentando comprometimento no protocolo de sincronização da ovulação.

Moura et al. (2003) avaliaram o efeito da administração de Benzoato de estradiol (BE) 24 horas após a retirada do Crestar novo ou reutilizado em 326 vacas *Bos indicus* e *Bos taurus x Bos indicus*, paridas há $68,5 \pm 26,8$ dias. No experimento 1, as vacas receberam no Dia 0 um Crestar e a administração de 5 mg de Valerato de estradiol (Grupos 1; n=82 e 2; n=75). No Dia 9, retiraram-se os implantes e foram administradas 400 UI de eCG. Após 24 horas da remoção do implante (Dia 10) apenas os animais do Grupo 2 receberam 1 mg de BE. No Experimento 2, as vacas dos Grupos 3 e 4 (n=83 e 86, respectivamente) receberam no Dia 0 um Crestar previamente utilizado por 9 dias e a administração de 2 mg de BE. No Dia 8, retiraram-se os implantes e foram administrados 400 UI de eCG IM e 150 μ g de d-cloprostenol. Após 24 horas da remoção do implante (Dia 9), apenas os animais do Grupo 4 receberam 1 mg de BE.

Os resultados dos experimentos estão detalhados na Tabela 1 e indicam que a administração de BE 24 horas após a remoção dos implantes não apresentou efeito positivo na taxa de concepção à IATF de vacas tratadas com Valerato de estradiol no momento da inserção do Crestar (protocolo tradicional). Entretanto, em vacas submetidas ao protocolo com implantes reutilizados de Crestar associado ao BE no início do tratamento (Experimento 2), a administração de 1 mg de BE (24 horas após a retirada dos implantes) determinou aumento significativo na taxa de concepção (sem BE 32,5% vs com BE 51,2%). O resultado concorda com os de outros pesquisadores que sincronizaram vacas com dispositivos intravaginais de progesterona (Cutaia et al., 2001; Colazo et al., 1999; Macmillan et al., 1993) e verificaram maiores taxas de concepção quando se administrou BE 24 horas após a retirada dos dispositivos. As taxas de concepção dos demais Grupos apresentaram resultados semelhantes, indicando viabilidade da reutilização do implante de Norgestomet para sincronização da ovulação e IATF em vacas de corte lactantes.

Tabela 1. Taxa de concepção (IATF) e de prenhez (IATF + touro) de vacas lactantes Nelore e $\frac{1}{2}$ sangue Nelore x Simmental ou Angus tratadas com VE+NOR+CRESTAR+eCG e BE+CRESTAR reutilizado+eCG+PGF_{2 α} associado ou não ao Benzoato de estradiol 24 horas após a retirada do implante. Cascavel – PR, 2002.

| Grupos | Número de animais | Taxa de concepção a IATF (%) |
|---|-------------------|------------------------------|
| Experimento 1 | | |
| VE+NOR + CRESTAR + eCG | 82 | 51,2 (42/82) |
| VE+NOR + CRESTAR + eCG+BE | 75 | 50,6 (38/75) |
| Experimento 2 | | |
| BE + CRESTAR +eCG+PGF _{2α} | 83 | 32,5 ^b (27/83) |
| BE + CRESTAR +eCG+PGF _{2α} +BE | 86 | 51,2 ^a (44/86) |

a ≠ b; p<0,05

USO DA ECG NOS PROTOCOLOS DE IATF

A 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). A 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). Pesquisa realizada com 215 vacas Nelore paridas (75 ± 19 dias pós-parto) mantidas a pasto no Estado de Mato Grosso do Sul (Baruselli et al., 2003a) indicou que o grupo que recebeu eCG no momento da retirada do dispositivo apresentou maior taxa de concepção após a IATF (38,9 vs 55,1%). Quando foi avaliada a condição ovariana dos animais tratados, constatou-se que o efeito positivo da eCG aumentou conforme aumentou o grau de anestro. Os resultados positivos da utilização da eCG conforme o grau de ciclicidade também foram constatados em pesquisa realizada na Argentina (Cutaia et al., 2003). Rodrigues et al. (2004) verificaram aumento significativo na taxa de concepção de vacas Nelore tratadas com Crestar e 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 outro experimento (SILVA et al., 2004) também foi verificado aumento na taxa de concepção com o uso de Crestar associado ao eCG na retirada Crestar em um grande número de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo [33,8 (101/299) vs. 51,7% (155/300); Tabela 2]. Nesse mesmo experimento também foi observado aumento na taxa de concepção com a administração de GnRH (Fertagyl®) 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) foi verificado maior sincronização da ovulação 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), indicando que administração de GnRH no momento da IATF aumenta a taxa de ovulação sincronizada e a taxa de concepção em animais tratados com Crestar.

Tabela 2. Taxa de concepção de vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes tratadas com implante auricular contendo Norgestomet (Crestar), com ou sem eCG na retirada do implante e com ou sem GnRH no momento da IATF.

| Tratamento | N | Taxa de Concepção (%) |
|------------|-----|-----------------------------|
| 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 da eCG em programas de IATF utilizando Crestar, analisou-se a dinâmica folicular de vacas Nelore (*Bos indicus*) em anestro sincronizadas com Crestar 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 3 e Gráfico 3).

Tabela 3. Dinâmica folicular de vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes em anestro tratadas ou não com eCG no momento da retirada do Crestar.

| | Com eCG (n=26) | Sem eCG (n=24) | P |
|--|---------------------------|---------------------------|------|
| Taxa de ovulação (%) | 73,1 (19/26) ^a | 50,0 (12/24) ^b | 0,04 |
| Diâmetro máximo do folículo dominante (mm) | 1,22 ± 0,06 | 1,04 ± 0,07 | 0,04 |
| 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 |

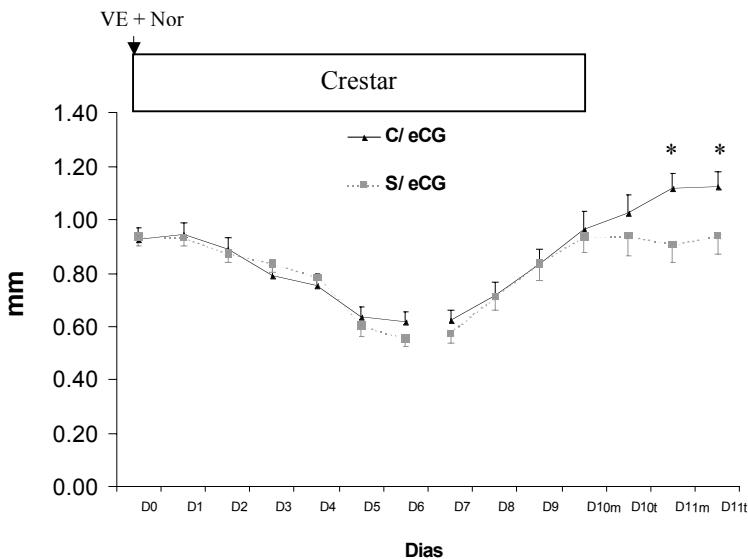


Gráfico 3. Dinâmica folicular de vacas Nelore em anestro tratadas com protocolo Crestar associado ou não a 400 UI de eCG no momento da retirada do implante auricular (dia 9).

Verificou-se que o tratamento com eCG no momento da retirada do Crestar aumentou o diâmetro máximo do folículo dominante (Gráfico 4), além de aumentar as taxas de ovulação e de concepção em vacas Nelore em anestro pós parto.

Em outra investigação, Marques et al. (2003) objetivou verificar os efeitos da eCG em primíparas lactantes (60 dias pós-parto) meio sangue Nelore x Angus. Observou-se que os animais que receberam eCG apresentaram maiores concentrações plasmáticas de progesterona ($P<0,05$) 12 dias após o tratamento. Nesse experimento, o tratamento com eCG aumentou 16% a taxa de ovulação, entretanto não se verificou diferença significativa. Esses dados foram confirmados por outras pesquisas com novilhas Nelore, verificando significativo aumento ($P < 0,05$) na taxa de ovulação (76 vs 50%) e nas concentrações plasmáticas de progesterona ($4,3\pm0,6$ vs. $2,2\pm0,2$ 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 após a ovulação, conforme descrito por Mann et al (1999). No Brasil, Reis et al. (2004) também verificaram correlação positiva entre a concentração plasmática de progesterona e a taxa de concepção em receptoras de embrião bovino.

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.

Baruselli et al. (2004c) verificaram 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 IATF's realizadas em vacas Nelore tratadas ou não com eCG no momento da retirada do dispositivo de progesterona. Os autores verificaram efeito positivo do tratamento com eCG somente nos animais com $ECC \leq 3$. Em animais com condição corporal (> 3) não foi verificado efeito positivo do tratamento com eCG na taxa de concepção. A condição corporal está 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 demonstrado por nossas pesquisas e já discutido anteriormente.

Em outro experimento realizado recentemente (Ayres et al., 2006, dados não publicados), foi verificado efeito positivo da eCG quando utilizada em animais inseminados no período pós-parto precoce (30 a 59 dias; Gráfico 4). Observa-se aumento na taxa de concepção tanto em animais com alto quanto com baixo escore de condição corporal, principalmente quando a IATF é realizada entre 30 e 60 dias pós-parto. Assim, quando o tratamento de sincronização da ovulação para IATF é realizado antes de 60 dias pós-parto recomenda-se a utilização de eCG em todos os animais, independentemente da condição corporal. Penteado et al. (2006) confirmaram que é possível obter satisfatórias taxas de concepção em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo no pós-parto precoce (40 a 60 dias). Após a análise de 2489 IATF's, verificou-se semelhantes taxas de concepção, independentemente do período pós-parto no qual foi realizada a IATF (Gráfico 5). É importante ressaltar que todos animais foram tratados com eCG na retirada do Crestar.

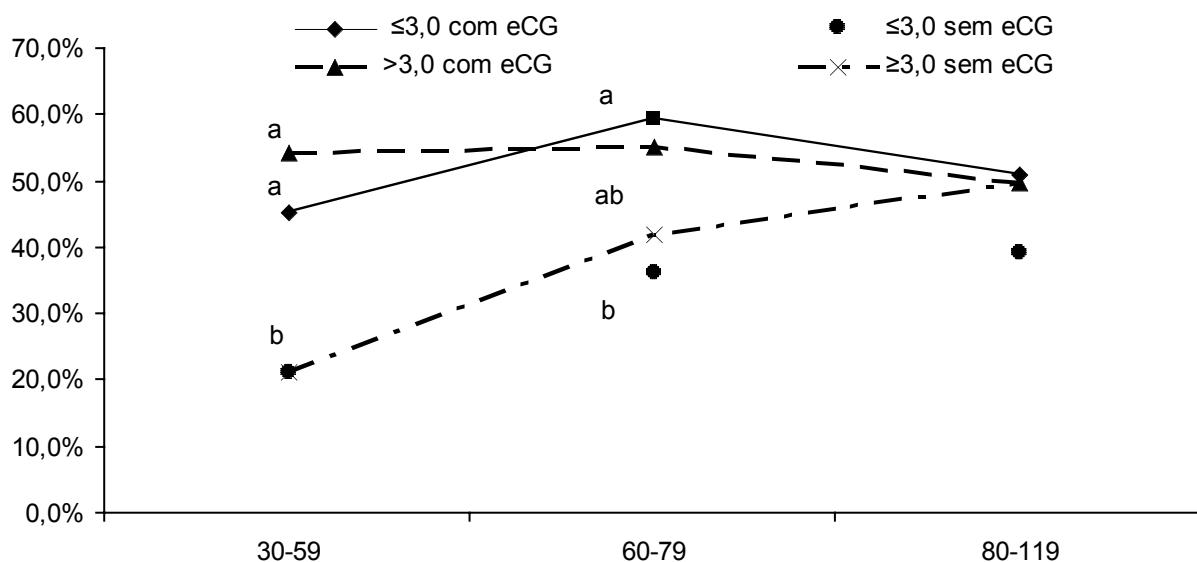


Gráfico 4. Distribuição da taxa de concepção conforme o período pós-parto, o escore de condição corporal e o tratamento com eCG em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo (n=617).

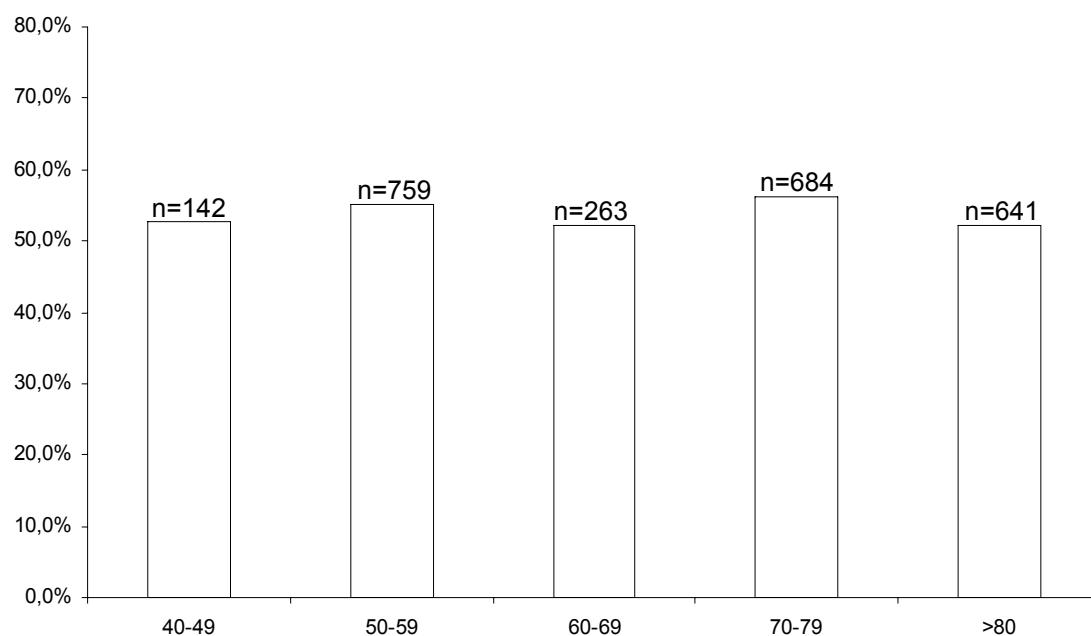


Gráfico 5. Distribuição da taxa de concepção conforme o período pós-parto (2489 inseminações) em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo.

NÚMERO DE TRATAMENTOS PARA SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO E IATF

Com o objetivo de diminuir o número de vezes (4 vezes) que os animais são manejados no protocolo de sincronização para IATF que emprega Crestar reutilizado, Ayres *et al.* (2006a) realizaram estudo para avaliar o efeito da substituição do BE 24 horas após a retirada do Crestar (4 manejos para IATF) pelo CE (Cipionato de estradiol) no momento da retirada (3 manejos para IATF). Um total de 361 vacas Nelore (60-75 dias pós-parto) receberam um Crestar previamente utilizado associado a 2mg de BE no Dia 0. No Dia 8, realizou-se a remoção do Crestar, a administração de uma dose de prostaglandina e de eCG. A partir deste momento, as fêmeas foram distribuídas homogeneamente em três grupos: Grupo 1mgBE ($n=122$), administração de 1 mg de BE, i.m. 24 horas após a remoção do Crestar, Grupo 0,5mgCE ($n=120$) ou Grupo 1mgCE ($n=119$), administração de 0,5 ou 1mg de CE i.m. (ECP[®]) no momento da retirada do Crestar, respectivamente. As fêmeas foram inseminadas em tempo fixo (IATF) 52 a 56 horas após a remoção do Crestar.

Tabela 4. Efeito da administração de Cipionato de estradiol (0,5 ou 1,0mg) no momento da retirada do implante ou de BE (1mg) 24h após, como indutores de ovulação, na taxa de concepção à IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com Crestar.

| TRATAMENTO | N | Tx. Concepção (%) |
|----------------------------|-----|-------------------|
| 0,25 ml de ECP (D8) | 120 | 36,7 (44/120) |
| 0,50 ml de ECP (D8) | 119 | 47,1 (56/119) |
| Benzoato de Estradiol (D9) | 122 | 46,7 (57/122) |

Este resultado é indicativo que o Cipionato de estradiol na dose de 1mg pode ser utilizado como indutor de ovulação em programas de IATF em vacas Nelore e possibilita a redução do número de vezes que os animais necessitam ser manejados (de 4 para 3 vezes). Também, facilita a administração de Cipionato de estradiol pelo maior volume de fármaco utilizado (0,5ml), sem comprometer a eficiência do tratamento de sincronização.

INTERVALO ENTRE A RETIRADA DO CRESTAR E A IATF

Na tentativa de melhorar o manejo da IATF, Ayres et al. (2006b) objetivaram estudar o efeito do momento da inseminação artificial (manhã vs tarde) em vacas de corte lactantes. Utilizaram-se 274 vacas lactantes (*Bos indicus* e *Bos indicus x Bos taurus*) com período pós-parto entre 40 e 65 dias. No Dia 0, os animais receberam 5 mg de Valerato de estradiol (i.m.) e um Crestar®. No Dia 9, o implante foi removido e foram administradas 400 UI de eCG. A partir deste momento, os animais foram divididos homogeneamente em dois grupos. Um grupo (n=142) foi inseminado 48 horas após a remoção do implante e o outro (n=132) 54 horas (Tabela 5).

Com o mesmo intuito do experimento anterior foi realizado outro estudo (Ayres et al., 2006c) com 277 vacas lactantes (*Bos indicus* e *Bos indicus x Bos taurus*) com o mesmo período pós-parto do experimento anterior. No Dia 0, os animais receberam 2 mg de Benzoato de estradiol e um Crestar previamente utilizado por 9 dias. No Dia 8, o implante foi removido e foram administradas 400 UI de eCG, 1,0 mg de Cipionato de Estradiol e uma dose de prostaglandina. A partir deste momento, os animais foram divididos homogeneamente em dois grupos, inseminados 48 horas após a remoção do implante (n=136) ou 54 horas (n=136; Tabela 5).

Tabela 5. Taxa de concepção em vacas sincronizadas com Crestar e Valerato ou Benzoato de estradiol, de acordo com o momento da inseminação artificial em tempo fixo (48 ou 54h da retirada do implante).

| Grupos | Número de animais | Taxa de Concepção a IATF (%) |
|-----------------------------------|-------------------|------------------------------|
| Experimento 1 | | |
| VE + CRESTAR (IATF de manhã; 48h) | 142 | 67,6 (96/142) |
| VE + CRESTAR (IATF à tarde; 54h) | 132 | 68,2 (90/132) |
| Experimento 2 | | |
| BE + CRESTAR (IATF de manhã; 48h) | 136 | 67,6 (92/136) |
| BE + CRESTAR (IATF à tarde; 54h) | 136 | 62,4 (88/141) |

Os resultados são indicativos de que tanto a inseminação artificial 48 quanto 54 h da retirada do implante apresentam semelhantes taxas de concepção à IATF em protocolos com Crestar associado ao Benzoato de Estradiol ou ao Valerato de estradiol no dia 0.

UTILIZAÇÃO DE PROTOCOLOS PARA IATF EM NOVILHAS NELORE (*BOS INDICUS*)

Como discutido anteriormente, os programas de sincronização da ovulação apresentam resultados satisfatórios e possibilitam o emprego da IATF em vacas zebuínas (BARUSELLI et al., 2004). Contudo, estes programas apresentam comprometimento quando utilizado em novilhas zebuínas, caso não seja levado em

consideração algumas particularidades na resposta à sincronização dessa categoria. Estudos demonstraram que novilhas *Bos indicus* submetidas a tratamentos com dispositivos intravaginais de progesterona apresentam baixa taxa de ovulação (34%) ao final do tratamento (BARUSELLI et al., 2001), o que indica reduzida eficiência desse protocolo de sincronização nessa espécie. No entanto, novilhas *Bos taurus* têm apresentado satisfatórias taxas de ovulação e de prenhez quando sincronizadas com dispositivos intravaginais de progesterona (BO et al., 2002; CUTAIA et al., 2003, CARVALHO et al., 2004). Existem diferenças na fisiologia reprodutiva entre *Bos taurus* e *Bos indicus*, o que podem determinar a resposta à sincronização. Uma das diferenças marcantes está relacionada aos níveis de progesterona durante o ciclo estral. RANDEL (1977) discute que fêmeas *Bos indicus* apresentam níveis de progesterona circulantes inferiores a fêmeas *Bos taurus*. Na literatura existem referências de que altas concentrações de progesterona diminuem a freqüência de liberação de LH e o crescimento folicular (BERGFELD et al., 1995; 1996; BURKE et al., 1996). Possivelmente novilhas *Bos indicus* respondem de forma diferente aos níveis circulantes de progesterona liberados pelos dispositivos intravaginais que contém esse hormônio..

Recentemente, procurou-se avaliar a dinâmica folicular e as concentrações plasmáticas de progesterona durante o tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus* (Carvalho et al., 2004). O estudo também avaliou o efeito do tratamento com prostaglandina no dia da inserção do dispositivo (Dia 0), com o objetivo de provocar antecipadamente a luteólise e diminuir as concentrações sanguíneas de progesterona durante o tratamento. Os resultados desse experimento foram indicativos de que o tratamento com prostaglandina no Dia 0 aumenta a taxa de crescimento folicular, o diâmetro do folículo dominante no dia da retirada do dispositivo (Dia 8), o diâmetro máximo do folículo dominante e a taxa de ovulação em novilhas. Esses resultados sugerem que o tratamento com PGF no dia do início da sincronização (Dia 0) pode aumentar a taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas. No entanto, verificou-se que novilhas *Bos indicus* apresentaram comprometimentos na taxa de crescimento do folículo dominante, que culminou na diminuição do diâmetro máximo e da taxa de ovulação, indicando baixa resposta ao tratamento de sincronização com dispositivo intravaginal com 1,9g de progesterona.

Verificou-se também, que novilhas *Bos indicus* apresentaram maiores níveis circulantes de progesterona durante o tratamento e que a administração de PGF_{2α} no início do tratamento foi eficiente para reduzir esses níveis. Possivelmente, em novilhas *Bos indicus* tratadas com dispositivo intravaginal que liberam elevadas quantidades de progesterona estaria ocorrendo diminuição da freqüência de liberação de LH e afetando o crescimento folicular e a ovulação, comprometendo o emprego da IATF nessa categoria com o emprego dessa metodologia de sincronização.

Visando compreender melhor o efeito da concentração plasmática de progesterona no crescimento folicular, Mantovani et al. (2004) avaliou a dinâmica folicular e as concentrações plasmáticas de progesterona durante o tratamento com dispositivos intravaginais de progesterona novos ou reutilizados e tratados com prostaglandina em diferentes momentos (dia 5 ou dia 8 do início do tratamento com CIDR). Verificou-se que as novilhas que receberam prostaglandina no dia 5 do início do tratamento apresentaram diminuição das concentrações plasmáticas de progesterona comparado com as que receberam prostaglandina no dia 8. As novilhas expostas a menores concentrações de progesterona apresentaram aumento no diâmetro do folículo dominante e da taxa de ovulação, apesar da taxa de ovulação não ter apresentado diferença estatisticamente significativa. Os resultados são sugestivos de que a é

possível aumentar a eficiência dos protocolos de sincronização da ovulação em novilhas *Bos indicus* x *Bos taurus* empregando técnicas que diminuam a concentração de progesterona durante a fase de crescimento do folículo ovulatório.

Em outro experimento, Sá Filho et al., (2005c) avaliaram o efeito da fonte de progesterona (P4; CIDR) ou de progestágeno (Crestar) na resposta folicular de 48 novilhas Nelore cíclicas. Os resultados podem ser observados nos Gráficos 7 e Tabela 8.

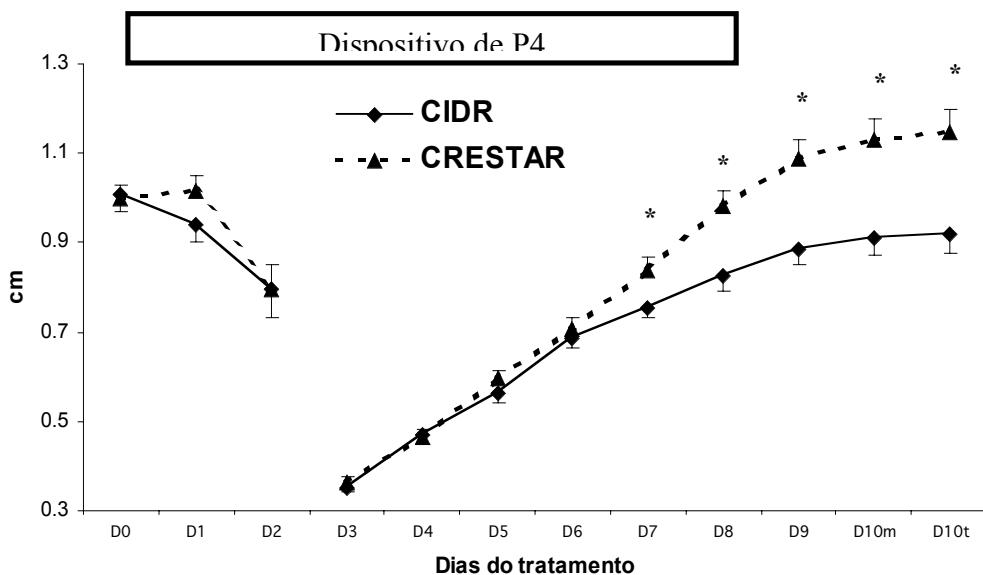


Gráfico 6. Dinâmica folicular de novilhas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante auricular de Norgestomet ou com dispositivo intravaginal de progesterona.

Tabela 8. Dinâmica folicular de novilhas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante auricular de Norgestomet (Crestar) ou com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR).

| | CIDR | Crestar | Efeitos (valor de P) |
|--|--------------------------|--------------------------|----------------------|
| Número de animais | 21 | 24 | Implante |
| Diâmetro FL Dia 0 | 1.01±0.03 | 1.00±0.04 | 0.83 |
| Emergência Folicular | 3.1±0.15 | 2.9±0.13 | 0.38 |
| Diâmetro FD Dia 8 | 0.83±0.03 | 0.99±0.03 | <0.01 |
| Diâmetro FD na IATF | 0.92±0.05 | 1.15±0.05 | <0.01 |
| Diâmetro FL máximo | 0.97±0.04 | 1.17±0.04 | <0.01 |
| Diâmetro FL ovulatório | 1.06±0.05 | 1.22±0.04 | 0.02 |
| Taxa de crescimento folicular médio (cm/dia) | 0.10±0.01 | 0.13±0.01 | 0.01 |
| Taxa de ovulação (%) | 57.1 (12/21) | 83.3 (20/24) | 0.03 |
| Momento da ovulação (h) | 79.6±2.92 ^{a,x} | 73.2±0.83 ^{b,y} | 0,01 (*<0.01) |

O tratamento com Crestar aumentou diâmetro FD no dia 8, diâmetro FD na IATF, diâmetro FL máximo, diâmetro FL ovulatório, taxa de crescimento folicular médio (cm/dia), taxa de ovulação (%), momento da ovulação (h; $p<0,05$). Sabe-se que o bloqueio do LH promovido durante os tratamentos de sincronização varia em função da fonte de progesterona utilizada, visto que os progestágenos promovem menor supressão na freqüência de LH (Kojima et al., 1992). Com isto, pode-se concluir que é possível obter satisfatórias taxas de ovulação sincronizada em novilhas Nelore cíclicas tratadas para sincronização da ovulação com implante auricular de Norgestomet associado ao Benzoato de estradiol no início do tratamento.

Em outro experimento foi verificado que a administração Valerato de estradiol junto com um implante do Norgestomet resultou na regressão dos folículos antrais (Bó et al., 1991), e foi atribuído à supressão prolongada de concentrações do plasma FSH (Bó et al., 1993). Em novilhas, estrógenos de permanência mais prolongada na corrente sanguínea (Valerato de estradiol) têm atrasado e desincronizado o início da nova onda de crescimento folicular e comprometido a eficiência dos tratamentos (Sá Filho et al., 2006). Rodrigues et al., (2003) observaram que novilhas *Bos indicus* X *Bos taurus* tratadas com Crestar associado ao Valerato de estradiol no início do tratamento apresentaram menor taxa de ovulação e diâmetro do CL após a sincronização que novilhas tratadas com Benzoato de estradiol. Assim, recomenda-se utilizar BE no início do tratamento com Crestar em novilhas *Bos indicus*.

Assim, um experimento foi realizado para avaliar a dinâmica folicular de novilhas Nelore tratadas com Benzoato de estradiol (em substituição ao tratamento com Valerato de estradiol e Norgestomet, I.M.), associados ou não à progesterona injetável no início do tratamento com Crestar (Sá Filho et al., 2005a). Foram utilizadas 18 novilhas Nelore, subdivididas em dois tratamentos (BE ou BE+P4 no dia 0). Nesse estudo não foi verificado diferença na emergência da onda de crescimento folicular ($3,3 \pm 0,3$ vs $2,7 \pm 0,2$ dias), no diâmetro do folículo dominante no dia da retirada do Crestar (dia 8; $0,86 \pm 0,07$ vs $1,01 \pm 0,07$ cm), no diâmetro máximo do folículo ovulatório ($1,05 \pm 0,05$ vs $1,26 \pm 0,06$ cm), na taxa de ovulação [100,0% (8/8) vs 77,7% (7/8)] e no intervalo retirada implante-ovulação ($73,7 \pm 1,7$ vs $72,0 \pm 0,0$ h). Assim, não é necessária a administração de P4 juntamente com o BE no início do tratamento com Crestar.

Em um segundo experimento (Torres-Júnior et al., 2005) avaliou-se o efeito da adição de uma dose de prostraglandina no momento da inserção do implante em novilhas cíclicas tratadas com Crestar e Benzoato de estradiol. Um total de 22 novilhas Nelore (*Bos indicus*) foram pré-sincronizados com duas doses de PGF_{2α}, com intervalos de 14 dias, antes do início do tratamento (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito da administração de PGF_{2α} no início do tratamento com Crestar e Benzoato de estradiol em novilhas Nelore (*Bos indicus*).

| | c/ PGF _{2α} D0 | s/ PGF _{2α} D0 |
|--|-------------------------|-------------------------|
| Número de animais | 11 | 11 |
| Diâmetro folicular no Dia 0 (cm) | $0,97 \pm 0,07$ | $1,05 \pm 0,05$ |
| Diâmetro do FD no Dia 8 (cm) | $0,98 \pm 0,05$ | $1,02 \pm 0,05$ |
| Diâmetro máximo do folículo dominante (cm) | $1,17 \pm 0,07$ | $1,26 \pm 0,05$ |
| Momento da ovulação (horas) | $72,0 \pm 0,0$ | $72,0 \pm 0,0$ |
| Taxa de ovulação (%) | 90,9 (10/11) | 81,8 (9/11) |
| Taxa de concepção (%) | 45,5 (5/11) | 45,5 (5/11) |

A hipótese inicial, de que a administração de PGF_{2 α} no início do protocolo de sincronização (D0) diminui as concentrações plasmáticas de progesterona e aumenta o tamanho do folículo e a taxa de ovulação, foi rejeitada. Isto, provavelmente, é decorrente do menor bloqueio na pulsatilidade do LH proporcionada pelo implante de Norgentomet, contrariamente ao verificado quando se utilizou implantes intravaginais contendo 1,9g de progesterona.

Os dos dois experimentos citados reforçam que é possível obter satisfatórias taxas de ovulação que justificam o emprego da IATF em novilhas Nelore tratadas com Crestar e Benzoato de estradiol no dia 0.

Dando continuidade aos estudos, Sá Filho et al., (2005b) avaliaram o efeito da aplicação de 400 UI de eCG no momento da retirada do Crestar em novilhas Nelore cíclicas e não cíclicas. Um total de 177 animais foi selecionado de acordo com a presença ou ausência de CL no dia do início do tratamento. A partir dessa avaliação, os animais foram novamente subdivididos em dois grupos (Fatorial 2 x 2) de acordo com a ciclicidade e o tratamento com eCG. Os resultados podem ser observados nas Tabelas 7.

Tabela 7. Efeito da ciclicidade e do tratamento com eCG na dinâmica folicular, função luteínica e taxa de prenhez em novilhas Nelore tratadas com Crestar e Benzoato de estradiol e inseminadas em tempo fixo.

| | Não Ciclando (n=53) | Ciclando (n=124) | sem eCG (n=87) | com eCG (n=90) | <i>P Value</i> (<i>F test</i>) | |
|--|------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------------|--------|
| | | | | | Cicl. | eCG |
| Diâmetro Folicular no D8 (cm) | 0.89±0.02 | 0.82±0.02 | 0.82±0.02 | 0.86±0.02 | 0.04 | 0.28 |
| Diâmetro Folicular no D10 (cm) | 1.02±0.03 | 1.00±0.02 | 0.95±0.02 | 1.06±0.02 | 0.58 | <0.001 |
| Taxa de Ovulação (%) | 88.7 (47/53) | 82.2 (102/124) | 73.6 (64/87) | 94.4 (85/90) | 0.28 | <0.001 |
| Diâmetro do CL no D15 (cm) | 1.42±0.04 | 1.50±0.03 | 1.39±0.03 | 1.55±0.03 | 0.04 | <0.001 |
| Concentração Sérica de P4 no D15 (ng/mL) | 5.02±0.92 | 5.16±0.80 | 3.64±0.73 | 6.56±0.99 | 0.91 | 0.02 |
| Taxa de Prenhez (%) | 30.2 (16/53) | 49.2 (61/124) | 36.8 (32/87) | 50.0 (45/90) | 0.02 | 0.04 |
| Taxa de Prenhez nas ovuladas (%) | 34.0 (16/47) | 59.8 (61/102) | 50.0 (32/64) | 52.9 (45/85) | 0.004 | 0.71 |

O tratamento com eCG aumentou o diâmetro folicular, a taxa de ovulação, o diâmetro do CL e a taxa de prenhez à IATF. Novilhas Nelore não cíclicas apresentaram menor diâmetro do CL e menor taxa de prenhez que novilhas ciclando. Portanto, essa informação demonstra a necessidade de se avaliar a ciclicidade das novilhas antes de iniciar um protocolo de IATF. Os resultados indicam que é possível obter satisfatórias taxas de concepção à IATF em novilhas *Bos indicus* que já atingiram a maturidade sexual (ciclando).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA (ANUALPEC), 2004

AYRES, H.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PENTEADO, L.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Efeito do momento da inseminação e do tratamento com GnRH na IATF sobre a taxa de concepção de vacas de corte lactantes sincronizadas com Norgestomet e Valerato de estradiol. *Acta Scienciae Veterinariae* 34 p.408, 2006a.

AYRES, H.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PENTEADO, L.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Efeito do momento da inseminação e do tratamento com GnRH na IATF sobre a taxa de concepção de vacas de corte lactantes sincronizadas com Norgestomet e Benzoato de estradiol. *Acta Scienciae Veterinariae* 34 p.409, 2006b.

AYRES, H.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PENTEADO, L.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Taxa de concepção de vacas Nelore lactantes sincronizadas com implante auricular de progestágeno associado ao Benzoato ou ao Cipionato de estradiol. *Acta Scienciae Veterinariae* 34 p.410, 2006c.

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. 214.2003a.

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.; 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 Veterinariae* 32 (suplemento), p. 228, 2004c.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; BERBER, R.C.A.; VALENTIM, R.; CARVALHO FILHO, A.F.; COSTA NETO, W.P. Dinâmica folicular e taxa de prenhez em novilhas receptoras de embrião (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*) tratadas com o protocolo "Ovsynch" para inovação em tempo fixo. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.40, suppl 2. p. 96-106, 2003.

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.; 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.

BERGFELD, E. G. M.; KOJIMA, F. N.; CUPP, A. S.; WEHRMAN, M. E.; PETERS, K. E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KINDER, J. E. Changing dose of progesterone results in sudden changes in frequency of luteinizing hormone pulses and secretion of 17 β -oestradiol in bovine females. *Biology of Reproduction*, v. 54, p. 546-553, 1996.

BERGFELD, E. G. M.; KOJIMA, F. N.; WEHRMAN, M. E.; CUPP, A. S.; PETERS, K. E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KITTOK, R. J.; GARCIA-WINDER, M.; KINDER, J. E. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17 β -oestradiol concentration in cows is related to concentration of progesterone in circulation when the progesterone comes from either an endogenous or exogenous source. *Animal of Reproduction Science*, v. 37, p. 257-265, 1995.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. *Theriogenology*, v. 40, n. 2, p. 225-239, 1993.

BÓ, G. A.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants. *Theriogenology*, v. 36, n. 2, p. 169-183, 1991.

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

BURKE, C. R.; MACMILLAN, K. L.; BOLAND, M. P. Oestradiol potencies a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomised cows. *Animal of Reproduction Science*, v. 45, p. 13-28, 1996.

CARVALHO JBP. Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) em novilhas *B. indicus*, *B. indicus* x *B. taurus* e *B. taurus*. PhD Thesis, São Paulo: Universidade de São Paulo; 2004.

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. 801-814, 1997.

COLAZO, M.G., BÓ, G.A., ILLUMINANTI, H., MEGLIA, G., SCHMIDT, E.E., BARTOLOMÉ, J. Fixed-time artificial insemination in beef cattle using CIDR-B devices, progesterone and estradiol benzoate. *Theriogenology*, v. 51, p. 404, abstr., 1999.

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., MORENO, D., VILLATA, M.L., BÓ, G.A.. Syncrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 hours later. *Theriogenology*, v. 55, p. 408, abstr., 2001

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.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZA, FAO, 2005 disponível no site <http://faostat.fao.org/>, acessado em 02 de maio de 2005

GALINA, C.S.; ORIHUELA, A.; BUBIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. *Anim. Repr. Sci.*, V. 42, P. 465-470, 1996.

KESLER; D.J.; FAVERO, R.J. Estrus synchronization in beef females with norgestomet and estradiol valerate. Part 1: Mechanism of action. *Agri-Practice*, v. 16, p. 6-11, 1995.

KOJIMA N, STUMPF TT, CUPP AS, WERTH LA, ROBERSON MS, WOLFE MW, KITTOK RJ, KINDER JE. Exogenous progesterone and progestins as used in estrous synchrony regimens do not mimic the corpus luteum in regulation of luteinizing hormone and 17 beta-estradiol in circulation of cows. *Biol. Reprod.* 47(6):1009-17, 1992

LOTTHAMMER, K. H., Influence of nutrition on reproductive performance of the milking/gestating cow in the tropics, Feeding dairy cows in the tropics. Roma, IT FAO, 1991, p. 36-47

MACMILLAN, K.L.; PETERSON, A.J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for estrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. *Anim Reprod. Sci.* V. 33, p. 1-25, 1993.

MANN, G.E.; LAMMING, G.E; ROBINSON, R.S.; WATKINS, 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.

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*, 2006.

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.
- MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; KASTELIC, J. P.; BERGFELT, D. R.; MAPLETOFT, R.J. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogenology*, v. 54, n. 5, p. 757-769, 2000.
- MIZUTA, K. Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus x Bos taurus taurus*). 2003. 98 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade e São Paulo, São Paulo, 2003.
- MURPHY, B.D.; MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotrophin. *Endocrine Reviews*, v. 12, p. 27-44, 1991.
- PENTEADO, L.; MARQUES, M.O. ; SILVA, R.C.P.; AYRES, H.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Taxa de prenhez em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo em diferentes períodos pós parto. *Acta Scientiae Veterinariae* 34 p.402, 2006.
- PENTEADO, L; SÁ FILHO, M.F.; REIS, E.L.; TORRES-JÚNIOR, J.R.; MADUREIRA, E.H.; Baruselli, P.S. Eficiência reprodutiva em vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes submetidas a diferentes manejos durante a estação de monta Anais XVI Reunião do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005.
- 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.
- RANDEL, R.D., Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). *Theriogenology* v.21, p.170-1805, 1984.
- 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 inovação. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32: 88, 2004.
- RODRIGUES C.A., AYRES, H.; REIS, E.L.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Aumento da taxa de prenhez em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com o uso de eCG em diferentes períodos pós-parto.; *Acta Scientiae Veterinariae* v.32 (Suplemento), p. 220, 2004.
- SÁ FILHO MF, REIS EL, AYRES H, PERES AAC, CARVALHO, CAB, CARVALHO JB, ARAÚJO, CASC, BARUSELLI PS. Effect of oestradiol valerate or benzoate on induction of a new follicular wave emergence in *Bos indicus* cows and heifers treated with norgestomet implant. *Reprod Fertil Dev.* v.18(1,2) p.289, 2006.
- SÁ FILHO, M.F.; GIMENES, L.U.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S; CARVALHO, N.A.T.; KRAMER, M.P.S.; FARIA, M.H.; BARUSELLI, P.S. Emergência folicular conforme a dose e o momento de aplicação do Benzoato de Estradiol e de sua associação com progesterona injetável em vacas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona. IRAC, 2005a.
- 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.
- 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.
- TRENKLE, A. AND WILHAM, R.L. 1977. Beef production efficiency. *Science* 198:1009.
- TORRES-JÚNIOR JRS, SÁ FILHO MF, GIMENES LU, MADUREIRA EH, BARUSELLI PS. Efeito da

administração de PGF_{2α} no início do tratamento com implante auricular de Norgestomet na dinâmica folicular de novilhas nelore (*Bos indicus*). *Acta Scientiae Veterinariae*, 33(1):262, 2005.

VASCONCELOS, J.L., SILCOX, R.W., ROSA, G.J., 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*. 1999 Oct 15;52(6):1067-78.

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 nonesterified fatty acids in plasma of primiparous beef cows. *J. Anim. Sci.* v.76, p. 493-500, 1998.

WILTBANK JN, KASSON CW. 1968. Synchronization of estrus in cattle with an oral progestational agent and an injection of an estrogen. *J Anim Sci* 27: 113-116.

WEHRMAN, M.E.; ROBERSON, M.S.; CUPP, A.S.; STUMPF, T.T.; WERTH, L.A.; WOLFE, M.W. KITTO, R.J.; KINDER, J.E. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decrease endogenous 17 β -estradiol and increase conception in cow. *Biol. Reprod.*, v. 49, p. 214-220, 1993.

IMPACTO DA IATF NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM BOVINOS DE LEITE

Roberto Sartori¹

INTRODUÇÃO

Em fazendas leiteiras, a eficiência reprodutiva é um dos fatores que mais influenciam o sucesso econômico do empreendimento. Para se ter um bom desempenho produtivo e reprodutivo, há a necessidade da redução do intervalo entre partos (IEP) através da inseminação ou monta natural (MN) de vacas e consequente gestação o mais cedo possível após o período voluntário de espera (PVE) no pós-parto. Devido a problemas cada vez mais freqüentes de detecção de cio e queda nas taxas de concepção (TC) em vacas leiteiras, o IEP tem sido cada vez mais prolongado. Tem-se notado ao longo dos anos que vacas, especialmente as de elevada produção leiteira, têm apresentado um aumento gradativo em problemas reprodutivos, aparentemente devido a causas multifatoriais (Lucy, 2001). Uma dessas causas, e talvez a mais relevante, seja o próprio aumento na produção de leite associado ao aumento no consumo de alimento. Diversos trabalhos têm demonstrado uma correlação negativa entre o aumento da produção de leite e a eficiência reprodutiva em vacas leiteiras (Royal et al., 2000; Lucy, 2001; Washburn et al., 2002). Por exemplo, as TC em vacas lactantes apresentavam-se acima de 50% nos anos 40 e 50 (Barret & Casida, 1946; Casida, 1961; Mares et al., 1961), aproximadamente 50% nos anos 70 (Macmillan & Watson, 1975; Spalding et al., 1975; Washburn et al., 2002) e 40% nos anos 90 (Pursley et al., 1997; Schmitt et al., 1996; Washburn et al., 2002). Atualmente, a TC relatada tem sido abaixo de 40% (Negrão et al., 2002; López-Gatius, 2003; Vasconcelos et al., 2006a; Sartori et al., 2006). Associado à baixa TC em vacas com maior produção leiteira, observou-se um aumento nos problemas reprodutivos tais como cistos ovarianos (Jordan & Fourdraine, 1993; Garverick, 1997; López-Gatius et al., 2002; Wiltbank et al., 2002), ovulação pós-parto atrasada (Nakao et al., 1992; Lamming & Darwash, 1998; Royal et al., 2000), duração e/ou intensidade de estro reduzidos (Nebel et al., 1997; Dransfield et al., 1998; Lopez et al., 2004), ou gemelaridade (Nielen et al., 1989; Kinsel et al., 1998). Outra evidência da inter-relação entre nível de produção de leite e subfertilidade está no fato de que, ao longo dos anos, a TC em novilhas nulíparas não se alterou, permanecendo entre 60 e 70% (Foote, 1975; Spalding et al., 1975; Pursley et al., 1997; Xu & Burton, 1999), apesar de terem genótipo similar ao das vacas e serem inseminadas com o mesmo sêmen e pelos mesmos técnicos nas fazendas.

Uma alternativa de manejo reprodutivo que tem sido utilizada para tentar contornar o problema da baixa taxa de serviço no pós-parto é a inseminação artificial em tempo pré-determinado ou tempo fixo (IATF), sem a necessidade de observação de cio. Ao utilizar-se IATF a taxa de serviço pode chegar a 100% (Pursley et al., 1995), pois todas as vacas disponíveis para IA podem ser inseminadas, a menos que haja problemas sanitários (Tenhagen et al., 2004). Devido ao manejo concentrado e gastos adicionais com medicamentos e instalações, apesar de em geral apresentar uma melhora na eficiência reprodutiva, deve-se avaliar o custo-benefício do emprego desta ferramenta antes de começar a utilizá-la em larga escala.

A proposta desta revisão é discorrer sobre alterações na expressão de estro na vaca leiteira, apresentar algumas formas de manejo reprodutivo em novilhas e vacas utilizando-se sincronização de cio ou ovulação e comparar algumas estratégias de

¹Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, Brasil. (sartori@cenargen.embrapa.br)

manejo reprodutivo no que diz respeito ao incremento da eficiência reprodutiva e custos relativos ao manejo.

MANEJO REPRODUTIVO DE NOVILHAS

Novilhas taurinas leiteiras (principalmente holandesas), quando manejadas adequadamente, podem atingir a puberdade com menos de um ano de idade. Nesta fase, elas já devem estar pesando acima de 300 kg de peso vivo e estarem aptas a entrarem em um programa reprodutivo. Muitas vezes, entretanto, recomenda-se aguardar até que elas se desenvolvam um pouco mais para inseminá-las, contanto que a idade ao primeiro parto não ultrapasse os 24 meses. No caso de novilhas mestiças Holandês x zebu, a situação é um pouco diferente, pois elas atingem a puberdade mais tarde e geralmente são acasaladas apenas após os 20 meses de idade com peso corporal acima de 340 kg (Carvalho, 2005; Ruas et al., 2004). Consequentemente, a idade ao primeiro parto que tem sido observada em fêmeas F1 é entre 30 e 35 meses e peso vivo médio de 450 kg (Ruas et al., 2004).

Tanto para novilhas taurinas quanto para as mestiças, há diversas opções de manejo reprodutivo, tais como acasalamento com touros, observação diária de cio e inseminação artificial (IA), sincronização de cio e IA após detecção de cio, ou sincronização de ovulação e IATF. O acasalamento com touros é o menos recomendado, na maioria dos casos, por não utilizar reprodutores provados, aumentar o risco de acidentes com esses animais e poder ter índices reprodutivos insatisfatórios, caso haja problema de fertilidade no reprodutor. Além disso, as novilhas são as fêmeas com maior potencial genético da propriedade e, portanto, devem ser acasaladas com reprodutores de elevado mérito genético. Uma situação em que o uso de touros pode se justificar é no acasalamento de novilhas F1 com touros terminadores (zebu de corte) para a produção de bezerros e bezerras terminais de corte (Marcatti Neto et al., 2004).

A observação diária de cio e IA tem sido uma prática utilizada com muita freqüência nas granjas leiteiras. Como a duração média de cio em novilhas holandesas é de 11 horas e Jersey de 14 horas (Nebel et al., 1997), recomenda-se checar cio por 30 minutos pelo menos duas vezes ao dia com intervalo de 12 horas (Dransfield et al., 1998). Após a detecção de cio, pode-se inseminar seguindo o sistema Trimberger (1948), também conhecido como regra a.m.-p.m. (cio na manhã = IA à tarde; cio à tarde = IA de manhã) ou, baseado em estudos recentes, pode-se checar cio duas vezes ao dia e inseminar apenas em um período do dia, sem que haja comprometimento da fertilidade (Nebel et al., 1994; Sartori et al., 2002). Por exemplo, as novilhas detectadas em cio pela manhã, são inseminadas na mesma manhã e aquelas detectadas em cio à tarde, são inseminadas na manhã seguinte. O produtor também pode lançar mão de ferramentas auxiliares à detecção de cio, tais como o uso de rufiões com bucal marcador, Kamar®, Paintstick®, Show Heat®, Tattle Tale® e Heat Watch®.

Programas de sincronização de cio têm sido usados com muita eficácia em novilhas leiteiras, principalmente por facilitarem o manejo dos animais sem, entretanto comprometer significativamente sua fertilidade. Além disso, através da sincronização, as novilhas são inseminadas, e consequentemente emprenham mais cedo, gerando lucro para o produtor. Aplicações de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) ou seus análogos com intervalos de 11 a 14 dias são muito utilizadas devido ao baixo custo e eficiência satisfatória. Espera-se que as novilhas sejam detectadas em cio entre 2 e 7 dias após a injeção. Há, entretanto, a necessidade de que as fêmeas estejam ciclando (presença

de corpo lúteo [CL]) e pelo menos no sexto dia do ciclo estral para que a aplicação de PGF_{2α} surta efeito (Momont & Seguin, 1984). Como mencionado anteriormente, novilhas taurinas manejadas de forma adequada geralmente devem estar ciclando na época da primeira IA, e portanto, respondem bem ao tratamento com PGF_{2α}. Novilhas mestiças que atingem a puberdade mais tarde, geralmente necessitam da associação de implantes de progesterona (P₄) ou progestágenos adicionais à PGF_{2α} em programas de IA. Um dos protocolos utilizados com sucesso em novilhas mestiças consiste na colocação de implante de progestágeno no dia 0, remoção desse implante e aplicação de PGF_{2α} no dia 7 ou 8 e detecção de cio e IA posteriormente. O uso de implantes de P₄ ou progestágeno, além de sincronizar o estro com maior precisão nas novilhas, induz ciclicidade e previne a ocorrência de ciclo curto nas novilhas acíclicas (ausência de CL) após a IA.

Programas de IATF também têm sido empregados no manejo reprodutivo de novilhas e são utilizados principalmente em situações em que não se deseja ou não há condições adequadas de observação de cio. Para que o protocolo de IATF seja eficiente, há a necessidade da sincronização da onda folicular, regressão do CL e indução de ovulação de um folículo maduro ao final do protocolo. Os protocolos mais utilizados em novilhas são alterações do protocolo Ovsynch (Pursley et al., 1995) e baseiam-se em aplicações de estrógeno (E₂) ou GnRH associado à colocação de implante de progestágeno no início, aplicação de PGF_{2α} próximo ou no momento da remoção do implante e indução de ovulação com E₂ ou GnRH após a remoção do implante. A IA é realizada em todos os animais, em momento pré-determinado e sem observação de cio. Esses protocolos de IATF são também utilizados em vacas e serão discutidos com mais detalhe posteriormente.

ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE ESTRO DA VACA LEITEIRA

Após a luteólise, as concentrações sanguíneas de P₄ diminuem e as concentrações de E₂ aumentam em consequência do crescimento do folículo pré-ovulatório. A queda nos níveis de P₄ e o aumento em E₂ são responsáveis pelo comportamento estral. Estro é um evento de receptividade sexual que dura entre 30 minutos e 36 horas em vacas leiteiras (Dransfield et al., 1998; revisado por Stevenson, 2001) e entre 1,3 e 20 horas em vacas zebuínas (revisado por Bó et al., 2003). O início do estro coincide com o pico pré-ovulatório de GnRH/LH, seguido de ovulação 28 horas após. A duração e intensidade de estro em bovinos leiteiros estão diretamente relacionadas à categoria dos animais (novilha ou vaca lactante) e ao nível de produção leiteira. Estudos utilizaram o sistema de radiotelemetria HeatWatch que possibilita observação contínua durante 24 horas por dia e detecta estro com grande acurácia. O HeatWatch fornece os horários de início e final dos estros, os horários de monta e o número de montas e sua duração. Usando esse sistema, Nebel et al. (1997) compararam novilhas nulíparas e vacas lactantes das raças Holandesa e Jersey em relação às características de estro e observaram que as novilhas aceitaram mais montas por estro comparadas às vacas (Holandesa: 17 versus 7 aceites de monta; Jersey: 30 versus 10 aceites de monta) e tiveram maior duração de estro (Holandesa: 11 versus 7 horas; Jersey: 14 versus 8 horas). No mesmo estudo, foi observado que vacas multiparas, tanto da raça Holandesa como Jersey, aceitaram mais montas por estro no inverno do que no verão (Holandesa: 9 versus 4,5; Jersey: 12 versus 5). No Brasil, entretanto, estudando vacas Gir através de observação contínua, Ávila Pires et al. (2003) não detectaram diferenças entre inverno e verão na duração de estro (inverno: 12,3 horas; verão: 11,8 horas) ou número de montas por estro (inverno: 28; verão: 23), porém observaram duração e

intensidade de estro superiores aos relatados em vacas das raças Holandesa e Jersey. Esses resultados, provavelmente, devem-se ao fato das vacas Gir estudadas não estarem lactando. Assim como Nebel et al. (1997), outros estudos com HeatWatch em vacas de alta produção de leite observaram menos montas por estro e curta duração de estro em vacas lactantes mantidas em free-stalls (Dransfield et al., 1998; At-Taras & Spahr, 2001) ou a pasto (Dransfield et al., 1998; Xu et al., 1998). Trabalhando com novilhas holandesas nulíparas, Stevenson et al. (1998) relataram médias de 10 horas de estro e 17 aceitações de monta por estro. Em um estudo recente da Universidade de Wisconsin-Madison, avaliando a associação entre níveis de produção de leite e comportamento de estro, Lopez et al. (2004) observaram menor duração (6,2 versus 10,9 horas) e intensidade (6,3 versus 8,8 aceites de monta) de estro nas vacas de maior produção ($>39,5$ kg/dia) comparado às de menor produção ($<39,5$ kg/dia) de leite. Essas diferenças de comportamento estral entre categorias distintas de animais dentro da mesma raça, parecem estar relacionadas aos menores níveis circulantes de E₂ em vacas lactantes comparado às novilhas (Sartori et al., 2002; 2004) e menor E₂ em vacas de maior produção de leite comparado a vacas de menor produtividade, como demonstrado por Lopez et al. (2004). Neste estudo, vacas de alta produção (47 kg/d) produziram folículos maiores ($18,6 \pm 0,3$ versus $17,4 \pm 0,2$ mm de diâmetro), mas níveis mais baixos de E₂ ($6,8 \pm 0,5$ versus $8,6 \pm 0,5$ pg/mL) em comparação a vacas de baixa produção (32 kg/d).

MANEJO REPRODUTIVO DE VACAS EM LACTAÇÃO

Vacas leiteiras geralmente têm baixa eficiência reprodutiva, o que praticamente impossibilita a obtenção de um IEP ideal (13,5 meses para vacas de alta produção; Nebel, 2003). Intervalos entre partos curtos aumentam a produção de leite por dia de vida útil da vaca e resultam em maior número de bezerros nascidos. Principalmente em vacas mestiças, a diminuição do IEP é uma necessidade fundamental para a sustentabilidade da empresa, considerando-se que estas vacas têm uma persistência de lactação mais curta (275 dias; Vaz de Oliveira et al., 2004) quando comparadas a vacas taurinas (≥ 305 dias). Dentre as principais razões para IEP prolongados encontram-se baixa taxa de detecção de cio, como descrito acima, e conseqüentemente baixa taxa de serviço e baixa taxa de prenhez (TP). Taxa de prenhez é definida como o resultado da taxa de inseminação (percentual de vacas elegíveis inseminadas; equivalente à taxa de detecção do estro) multiplicada pela TC e determina a porcentagem de vacas que ficam gestantes a cada 21 dias, depois do PVE. Vacas taurinas leiteiras têm menor eficiência reprodutiva quando comparadas às mestiças pois, além da taxa de detecção de cio baixa, elas também têm TC muito baixa. Vacas mestiças têm TC aceitáveis, entretanto apresentam baixa TP devido a limitações na expressão e detecção de cio. Além disso, vacas mestiças têm maior atraso no retorno à ciclicidade pós-parto. Em um estudo realizado por Ruas et al. (2002), o primeiro cio pós-parto detectado em vacas mestiças ocorreu, em média, somente aos 70 dias de lactação. Outros estudos em vacas mestiças mantidas a pasto demonstraram um atraso ainda maior no retorno à ciclicidade.

Há diversos fatores que podem influenciar a TP de vacas leiteiras. Dentre eles destacam-se condição corporal (CC) ao parto e perda de CC no pós-parto, infecções e involução uterina, retorno à ciclicidade, estresse térmico, eficiência na detecção de cio, e manipulação hormonal do ciclo estral.

Vacas mestiças com pior CC ao parto apresentam menor porcentagem de retorno ao cio e menor fertilidade no pós-parto (Ruas et al., 2002). Similarmente, vacas

holandesas com maior perda de CC nas primeiras semanas de lactação apresentaram pior eficiência reprodutiva (Butler & Smith, 1989). Portanto, no manejo de vacas no pré e pós-parto, deve-se ter atenção especial com a nutrição desses animais, para que estejam com CC adequada ao parto e percam pouca condição durante o pós-parto.

Outra estratégia de manejo durante o período peri-parto deve focar na redução do estresse dos animais. Aumento do estresse nessa fase está correlacionado positivamente com aumento de incidência de doenças no pós-parto, principalmente retenção de placenta. Suplementação com níveis adequados de Vitamina E e Selênio também pode reduzir a incidência de retenção de placenta (revisado por Wiltbank., 2006). Além da retenção de placenta, atraso na involução uterina e infecções uterinas pós-parto estão relacionadas ao aumento no IEP em vacas (Sheldon et al., 2000). Tratamentos hormonais no pós-parto imediato podem acelerar potencialmente o restabelecimento uterino e consequentemente, elevar a eficiência reprodutiva das vacas. Um estudo recente (Zanchet, comunicação pessoal) que utilizou duas aplicações im de um análogo da PGF_{2α} com três dias de intervalo, sendo que a primeira foi realizada até 12 horas após o parto em vacas holandesas e Jersey (n = 213), observou uma antecipação de 13,3 dias no intervalo entre o parto e primeiro cio (45,6 ± 3,3 versus 58,9 ± 3,8 dias) e um incremento muito grande na TC à primeira IA (50,5% versus 23,7%) em relação ao grupo não tratado (n = 206).

Falhas na detecção de cio são problemas observados tanto em sistemas leiteiros intensivos com vacas de alta produção quanto em sistemas a pasto com vacas mestiças. As manifestações de cio, que naturalmente já são baixas em vacas leiteiras podem diminuir ainda mais devido a vários fatores complicadores. Fatores ambientais (principalmente estresse térmico) podem influenciar o número de montas e a duração e intensidade de cio (Nebel et al., 1997). Vacas alojadas em piso de concreto também mostram menor intensidade de cio quando comparadas às mantidas a pasto (Britt et al., 1986). Porém, em pastagens com capim muito alto, a observação de cio também é dificultada. Vacas acíclicas ou anovulatórias, comumente encontradas após o período voluntário de espera, também tendem a não manifestar cio. Além da reduzida manifestação de cio em vacas leiteiras, muitos fatores influenciam na rotina de observação de cio pelo pessoal incumbido de tal função. Portanto, uma reduzida expressão de cio pelas vacas leiteiras associada a falhas no manejo de observação e detecção de cio pode muitas vezes trazer resultados catastróficos na taxa de detecção de cio e de serviço ou IA, refletindo em baixa TP e aumento no IEP. Progressos na redução do impacto negativo da baixa eficiência de detecção de cio em vacas lactantes têm sido obtidos com o uso de protocolos de sincronização de ovulação e IATF. Esses protocolos aumentam a TP por aumentar o número de animais inseminados, sem necessariamente elevar a TC (Pursley et al., 1995; Tenhagen et al., 2004; Santos & Chebel, 2005).

A maioria dos protocolos de sincronização de ovulação para IATF em vacas baseia-se no princípio do protocolo Ovsynch (GnRH – 7 dias – PGF_{2α} – 2 dias – GnRH – 16 horas – IA). Para vacas de alta produção leiteira ciclando, o Ovsynch clássico tem apresentado resultados satisfatórios, entretanto há algumas modificações que potencialmente melhoram sua eficiência e/ou facilitam o manejo. Uma das alterações é a adição de um implante de P₄/progesterona ao protocolo, onde coloca-se o implante no momento da primeira aplicação de GnRH e remove-o junto da aplicação de PGF_{2α}, o que parece ser benéfico principalmente para as vacas anovulatórias (Stevenson et al., 2006). Outra possibilidade é a IA no momento da aplicação da segunda dose de GnRH (Cosynch). Entretanto, apesar de alguns estudos sugerirem taxas de concepção similares ou superiores com o uso do Cosynch (Portaluppi & Stevenson, 2005), um trabalho recente que comparou Cosynch com 48 ou 72 h após a PGF_{2α} versus

Ovsynch 56 (GnRH 56 h após PGF 2α e IA 16 h após GnRH) demonstrou menores TC quando foi utilizado Cosynch (Brusveen et al., 2006).

A substituição do GnRH por estrógenos também tem sido empregada, como é o caso do Heatsynch em que, ao invés de aplicar a segunda dose de GnRH, injeta-se ECP (1 mg) 24 horas após a PGF 2α e insemina-se 48 horas após o ECP. Apesar de apresentar TC similar ao Ovsynch (Pancarci et al., 2002), o Heatsynch tem a vantagem de ter um custo mais baixo e de manejar os animais sempre no mesmo horário do dia. Outros protocolos alternativos para IATF em vacas de média a alta produção menejadas a pasto estão muito bem descritos na revisão de Cavalieri et al. (2006).

Vacas mestiças têm atraso no retorno à ciclicidade, como citado anteriormente, e portanto, são recomendados protocolos de IATF que se utilizam de implantes de P₄ ou progestágenos. Com isso, aumenta-se a taxa de sincronização, previne-se a ocorrência de ciclos curtos após a IATF e induz-se ciclicidade nas vacas anêstricas. Outro aspecto importante na sincronização de vacas mestiças é a antecipação em um dia da aplicação de PGF 2α no protocolo Cidrsynch (GnRH e implante de P₄ – 6 dias – PGF 2α e retira implante – 2 dias GnRH – 0 a 24 horas – IA). Utilizando-se esse protocolo, a TC observada em vacas mestiças tem sido entre 40 e 50% (José L. M. Vasconcelos, comunicação pessoal). Aplicação de 200 UI de eCG no momento da retirada do implante do protocolo Cidrsynch parece melhorar ainda mais a fertilidade das vacas mestiças (Vasconcelos et al., 2005). Segundo Vasconcelos et al. (2006b), o uso do Heatsynch (ECPsynch) associado a um implante de P₄/progestágeno para vacas mestiças, foi favorável em vacas pluríparas. Nas primíparas, a TP cumulativa foi maior com o uso do Ovsynch associado ao implante.

A manipulação do desenvolvimento folicular antes do início do protocolo de IATF (Pré-sincronização) em vacas de alta produção leiteira tem demonstrado resultados positivos por permitir o início do protocolo em um momento ideal (entre os dias 5 e 10 do ciclo estral) (Vasconcelos et al., 1999). Nesse período, espera-se que a maioria das vacas tenha um folículo ovulatório que responda à primeira dose de GnRH do protocolo Ovsynch. Em geral, em vacas holandesas, apenas folículos com diâmetro maior ou igual a 10 mm respondem ao GnRH com ovulação (Sartori et al., 2001). Em um estudo descrito por Thatcher et al. (2001), houve aumento na TC à primeira IA pós-parto de 25 para 43% nas vacas cíclicas que foram pré-sincronizadas com duas injeções de PGF 2α com 14 dias de intervalo. Nesse programa, a segunda dose de PGF 2α foi aplicada 12 dias antes do início do protocolo Ovsynch. Uma limitação a esse tipo de pré-sincronização encontra-se na possibilidade de um elevado número de vacas estarem anovulatórias no momento da aplicação de PGF 2α . Nesse caso, a pré-sincronização não será eficiente. Uma alternativa viável é a utilização de um implante de progestágeno por 7 dias, com aplicação de PGF 2α no momento da retirada do implante (Sartori, 2002; Santos & Chebel, 2005). Doze a 14 dias depois se inicia protocolo de IATF. A vantagem deste programa é que potencialmente sincroniza vacas cíclicas e acíclicas. Além disso, vacas detectadas em cio após a remoção do implante, podem ser inseminadas tendo TC aceitável, contanto que tenham ultrapassado o PVE. Após a IA, é importante que as vacas sejam observadas para retorno ao cio e que seja realizado diagnóstico de gestação o mais precoce possível com o propósito de se detectar as vacas não gestantes e resincronizá-las o quanto antes, para com isso, elevar a TP do rebanho. Há diversos programas utilizados para resincronização de vacas. Para maiores detalhes sobre alguns desses programas, consultar a revisão de Santos et al. (2003).

CUSTO-BENEFÍCIO DA IATF

Quando devemos substituir a detecção do estro e IA ou MN pela sincronização de ovulação e IATF? A resposta a este questionamento parece óbvia, mas não é tão simples assim. Diversos fatores devem ser considerados na escolha do manejo reprodutivo de cada propriedade.

Há muito se sabe que, em geral, as TC quando se utiliza touros em MN, não são superiores àquelas obtidas com IA. Muito pelo contrário, corre-se o risco de serem mais baixas caso o touro tenha problemas de fertilidade, como mencionado anteriormente. Além disso, perde-se a oportunidade de incrementar o potencial genético do rebanho com a utilização de sêmen proveniente de touros testados. Surpreendentemente, entretanto, por questão de comodidade, cultura, ou falta de instrução e mão de obra adequada, a maioria das fazendas produtoras de leite ainda utiliza MN em larga escala. Além dos gastos com compra, exames andrológicos, alimentação, vacinas, etc. dos touros, há sempre a preocupação do risco de acidentes no manejo desses animais. Portanto, por pensarmos que, exceto em circunstâncias muito específicas, a MN em granjas leiteiras deva ser quase que completamente abolida, a seguir discutiremos apenas programas de manejo em que se utiliza a IA.

Os fatores determinantes da eficiência reprodutiva em vacas leiteiras são: a) ciclicidade das vacas, b) eficiência na detecção de cio, c) TC, e d) manutenção da gestação. Em termos gerais, fazendas com boas taxas de detecção de cio e de concepção, não devem se preocupar em utilizar IATF. Infelizmente, esta não é a realidade da grande maioria das propriedades leiteiras. A taxa de detecção média de cio nos EUA é abaixo de 50% (Nebel, 2003), e no Brasil, apesar de não haver estudos aprofundados, os índices não devem ser muito diferentes baseando-se em dados de diversas fazendas produtoras de leite proveniente tanto de vacas taurinas quanto mestiças.

Segundo revisão de Santos e Chebel (2005), de uma forma simplista, deve-se recomendar o uso da IATF em fazendas onde a taxa de detecção de cio seja abaixo de 50%. Acima disto, o uso da IATF pode ser inviável economicamente. Mas esta decisão deve ser baseada em outros fatores econômicos que oscilam ao longo do ano, tais como custos com mão de obra, alimentação, medicamentos e hormônios, preço do litro de leite e valor pago às vacas de descarte e novilhas de reposição.

O principal benefício econômico da IATF baseia-se na redução do IEP e no número de vacas descartadas por infertilidade (Pursley et al., 1995; Risco et al., 1998; LeBlanc, 2001). De fato, utilizando-se a IATF adequadamente, pode-se concentrar um maior número de vacas com um IEP ideal, ou seja, de 13 meses para vacas holandesas. Acima ou abaixo desse valor, aumenta o custo por vaca prenhe (Nebel., 2003; Wiltbank et al., 2006). Ainda segundo Wiltbank et al. (2006), os custos por vaca prenhe aumentam gradativamente à medida em que o IEP também aumenta. Em geral, a cada dia a mais que a vaca deixa de emprenhar após 110 dias em lactação, há uma perda que pode variar entre 1,00 e acima de 20,00 dólares por animal.

Um estudo muito interessante foi realizado na Alemanha (Tenhagen et al., 2004) em duas fazendas leiteiras comparando o desempenho reprodutivo e econômico entre IATF (Ovsynch) e IA após detecção de cio. A análise econômica incluiu custos associados com dias em aberto, descarte, IA, hormônios e outros produtos para sincronização, tratamentos, e exames ginecológicos. O uso de Ovsynch reduziu o intervalo para primeira IA e dias em aberto em ambas as fazendas e reduziu o descarte por infertilidade na fazenda 2. O Ovsynch mostrou-se inviável economicamente na fazenda 1 devido a 2 fatores: relativamente alta taxa de serviço com IA após o cio (55,6%) e uma menor TC com IATF (34,5%) quando comparado à IA após detecção de cio (45,1%). Na fazenda 2, apesar de também ter havido diferença na TC (IATF =

35,6% e IA com detecção de cio = 49,8%), a IATF foi superior devido à baixa taxa de detecção de cio (28,6%). Outros estudos, entretanto, têm mostrado que em geral não há diferenças, ou mesmo um aumento na TC com o uso da IATF versus IA após detecção de cio (Pursley et al., 1997; Risco et al., 1998; Jobst et al., 2000).

Fizemos uma simulação comparando três programas de manejo reprodutivo. Com exceção do programa de detecção diária de cio, os outros dois programas, descritos a seguir, seriam empregados após uma pré-sincronização com implante de P₄ por sete dias e aplicação de PGF_{2α} no momento da remoção do implante. Todas as vacas detectadas em cio após a retirada do implante receberiam IA, coincidindo com o final do PVE de 50 dias.

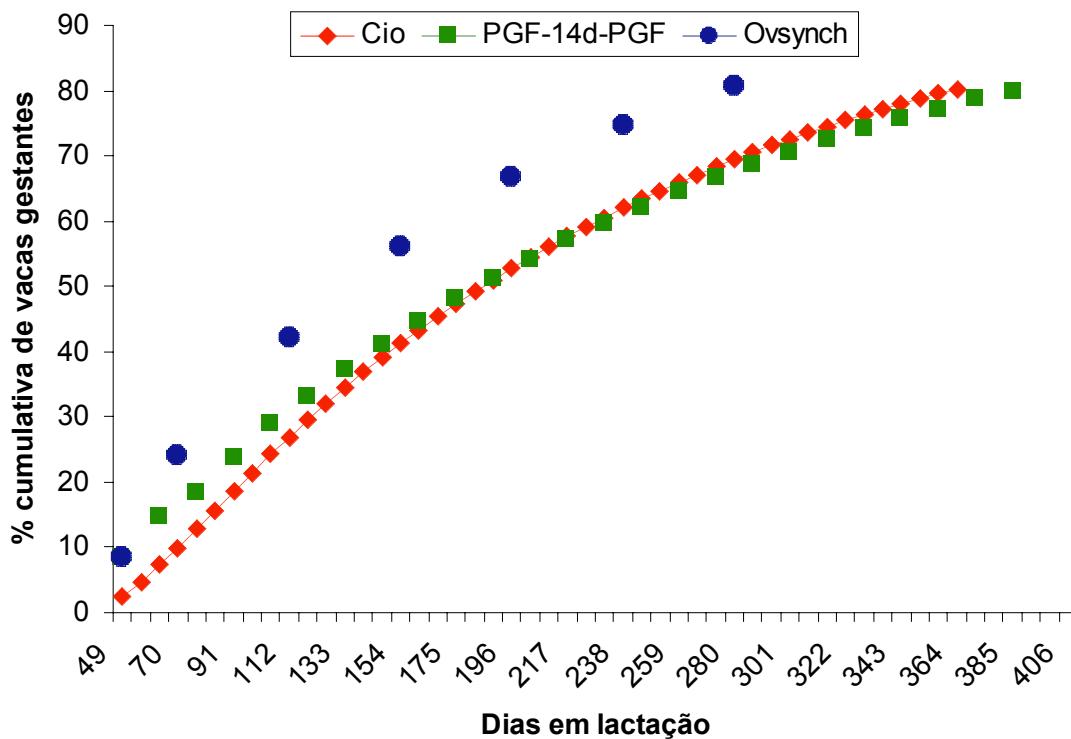
- 1) Detecção diária de cio e IA seguindo o sistema Trimberger e visitas periódicas do médico veterinário a cada 21 dias para exames ginecológicos e diagnóstico de gestação;
- 2) Aplicação de PGF_{2α} a cada 14 dias e IA após detecção de cio em vacas não inseminadas, ou vacas inseminadas diagnosticadas vazias e visitas periódicas do médico veterinário a cada 14 dias;
- 3) Uso de Ovsynch começando 12 a 14 dias após a pré-sincronização e resincronização com Ovsynch a cada 42 dias, após diagnóstico de não gestante aos 32 dias após IA. Portanto, as visitas do médico veterinário seriam a cada 42 dias.

As variáveis utilizadas nas avaliações foram: ciclicidade esperada em diversos períodos pós parto (60% e 70% no D50 para protocolo 1 e demais, respectivamente; e 90% acima do D90), taxa de detecção de cio, TC, mortalidade embrionária/fetal e custos com hormônios (Valor por dose em R\$: GnRH ou PGF_{2α} = 4,00; Implante de P₄ = 20,00), material (2,00 por IA), sêmen (50,00) e mão de obra (funcionário para detecção de cio e IA – diária = 30,00 e médico veterinário – diária = 350,00).

A meta principal dos programas foi obter uma taxa de descarte igual a 20%, ou seja, 80% das vacas teriam que estar prenhas ao final do programa.

Fixando-se para todos os programas a TC em 30%, taxa de detecção de cio em 50% e mortalidade embrionária em 20%, estimou-se um custo por vaca prenha apenas para as variáveis acima de R\$ 403,00 com o programa 1 (detecção de cio), R\$ 406,00 com o 2 (PGF_{2α} e detecção de cio) e R\$ 331,00 com o 3 (Ovsynch). Desta forma, o IEP foi de 13,9 meses para os programas 1 e 2 e 13,1 para o 3, demonstrando um benefício do uso da IATF, sem mesmo considerar os ganhos em produção de leite e outras variáveis.

A figura 1 ilustra a taxa cumulativa de prenhez dos três programas, de acordo com os resultados da simulação acima.



De acordo com nossa simulação, o programa com IA após detecção de cio só se igualaria ao de IATF caso a TC fosse superior (por exemplo, 40% versus 30%), ou se a taxa de detecção de cio subisse para 70%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A escolha do manejo reprodutivo a ser empregado em uma propriedade de produção leiteira depende do desempenho reprodutivo dos animais, eficiência de detecção de cio e custos associados com os tratamentos. Em fazendas com baixa eficiência de detecção de cio, é praticamente mandatório o uso de IATF. Entretanto, para a IATF ser economicamente viável em fazendas com boa taxa de detecção de cio, os custos com os tratamentos devem ser menores do que aqueles dispendidos especialmente com a mão de obra.

Com o propósito de aumentar ainda mais a eficiência do manejo reprodutivo em um programa de IATF, deve-se procurar utilizar a detecção de cio e IA em vacas que retornam ao estro após IATF, ou seja, não esperar até o diagnóstico negativo de gestação para re-sincronizar e re-inseminar os animais.

Para o emprego da IATF em vacas leiteiras ser bem sucedido, além de procurar contornar fatores que podem fugir ao controle do homem, deve-se ser rigoroso quanto as recomendações de dose e momento das aplicações e qualidade dos produtos utilizados nos protocolos de sincronização.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AT-TARAS EE, SPAHR SL. Detection and characterization of estrus in dairy cattle with an electronic heatmount detector and an electronic activity tag. *J Dairy Sci* 2001; 84:792-8.
- ÁVILA PIRES, M. F., ALVES, N. G., SILVA FILHO, J. M., CAMARGO, L. S. A., VERNEQUE, R. S. Comportamento de vacas da raça Gir (*Bos taurus indicus*) em estro. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2003; 55:187-196.
- BARRET GR, CASIDA LE. Time of insemination and conception rates in artificial breeding. *J Dairy Sci* 1946; 29:556 (Abstract).
- BÓ GA, BARUSELLI PS, MARTÍNEZ MF. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci* 2003; 78:307-26.
- BRITT JH, SCOTT RG, ARMSTRONG JD, WHITACRE MD. Determinants of estrous behavior in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 1986; 69:2195-2202.
- BRUSVEEN DJ, CUNHA AP, SILVA CD, CUNHA PM, STERRY RA, SILVA EPB, GUENTHER JN, WILTBANK MC. Effects on conception rates of lactating dairy cows by altering the time of the second GnRH and AI during Ovsynch. *J Dairy Sci* 2006; 89(Suppl. 1):150.
- BUTLER WR, SMITH RD. Inter-relationships between energy balance and postpartum reproductive function. *J Dairy Sci* 1989; 72:767-783.
- CARVALHO BC. Efeito da base genética materna, sistema de suplementação durante a recria e estação de parição sobre variáveis produtivas e reprodutivas de fêmeas primíparas holandês-zebu 2005. 98p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CASIDA LE. Present status of the repeat-breeder cow problem. *J Dairy Sci* 1961; 44:2323-2329.
- CAVALIERI J, HEPWORTH G, FITZPATRICK LA, SHEPHARD RW, MACMILLAN KL. Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology* 2006; 65:45-64.
- DRANSFIELD MB, 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.
- FOOTE RH. Estrus detection and estrus detection aids. *J Dairy Sci* 1975; 58:248-256.
- GARVERICK HA. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 1997; 80:995-1004.
- JOBST SM, NEBEL RL, MCGILLIARD ML, PELZER KD. Evaluation of reproductive performance in lactating dairy cows with prostaglandin $F_{2\alpha}$, gonadotropin-releasing hormone, and timed artificial insemination. *J Dairy Sci* 2000; 83:2366-2372.
- JORDAN ER, FOURDRAINE RH. Characteristics of the management practices of the top milk producing herds in the country. *J Dairy Sci* 1993; 76:3247-3256.
- KINSEL ML, MARSH WE, RUEGG PL, ETHERINGTON WG. Risk factors for twinning in dairy cows. *J Dairy Sci* 1998; 81:989-993.
- LAMMING GE, DARWASH AO. The use of milk progesterone profiles to characterize components of subfertility in milked dairy cows. *Anim Reprod Sci* 1998; 52:175-190.
- LEBLANC S. The OvSynch breeding program for dairy cows – A review and economic perspective. *Bov. Pract.* 2001; 35:13-22.
- LOPEZ H, SATTER LD, WILTBANK MC. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004; 81:209-223.
- LÓPEZ-GATIUS F, SANTOLARIA P, YANIZ J, RUTLLANT J, LÓPEZ-BEJAR M. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology* 2002; 57:1251-1261.
- LÓPEZ-GATIUS F. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in northeastern Spain. *Theriogenology* 2003; 60:89-99.
- LUCY MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci* 2001; 84:1277-1293.

- MACMILLAN KL, WATSON JD. Fertility differences between groups of sires relative to the stage of oestrus at the time of insemination. *Anim Prod* 1975; 21:243-249.
- MARCATTI NETO A, RUAS JRM, AMARAL R, MENEZES AC. Bezerros terminais de corte podem viabilizar sistemas de produção de leite. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 2004; 25:25-31.
- MARES SE, MENGE AC, TYLER WJ, CASIDA LE. Genetic factors affecting conception rate and early pregnancy loss in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 1961; 44:96-103.
- MOMONT HW, SEGUIN BE. Influence of day of estrous cycle on response to PGF_{2α} products: implications for AI programs for dairy cattle. In 10th Proc. Internat'l. Congr. Anim. Reprod. and AI, Urbana Champaign, IL. Univ. of Illinois, Urbana-Champaign, IL 1984. pp.336.1-336.3.
- NAKAO T, MORIYOSHI M, KAWATA K. The effect of postpartum ovarian dysfunction and endometritis on subsequent reproductive-performance in high and medium producing dairy-cows. *Theriogenology* 1992; 37:341-349.
- NEBEL RL. The key to a successful reproductive management program. *Advances in Dairy Technology* 2003; 15:1-16.
- NEBEL RL, JOBST SM, DRANSFIELD MBG, PANDOLFI SM, BAILEY TL. Use of a radiofrequency data communication system, Heat Watch, to describe behavioral estrus in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1997; 80:151.
- NEBEL RL, WALKER WL, MCGILLIARD ML. Timing of artificial insemination of dairy cows: fixed time once daily versus morning and afternoon. *J Dairy Sci* 1994; 77:3185-3191.
- NEGRÃO SL, CHIARI JR, DEMÉTRIO DGB, RODRIGUES CA. Therapeutic embryo in high production dairy cows with more than three artificial inseminations. *Theriogenology* 2002; 57:555.
- NIELEN M, SCHUKKEN YH, SCHOLL DT, WILBRINK HJ, BRAND A. Twinning in dairy cattle: A study of risk factors and effects. *Theriogenology* 1989; 32:845-862.
- PANCARCI SM, JORDAN ER, RISCO CA, SCHOUTEN MJ, LOPES FL, MOREIRA F, THATCHER WW. Use of estradiol cypionate in a pre-synchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2002; 85:122-131.
- PORTALUPPI MA, STEVENSON JS. Pregnancy rates in lactating dairy cows after presynchronization of estrous cycles and variations of the Ovsynch protocol. *J Dairy Sci* 2005; 88:914-921.
- PURSLEY JR, KOSOROK MR, WILTBANK MC. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci*. 1997; 80:301-306.
- PURSLEY JR, MEE MO, WILTBANK MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology* 1995; 44:915-923.
- RISCO CA, MOREIRA F, DELORENZO M, THATCHER WW. Timed artificial insemination in dairy cattle – Part II. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet. Food Anim.* 1998; 20:1284-1289.
- ROYAL MD, DARWASH AO, FLINT APF, WEBB R, WOOLLIAMS JA, LAMMING GE. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Anim Sci* 2000; 70:487-501.
- RUAS JRM, BORGES LE, MARCATTI NETO A, AMARAL R. Cria e recria de fêmeas F1: Holandês x Zebu para produção de leite. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 2004; 25:40-46.
- RUAS JRM, MARCATTI NETO A, AMARAL R, BORGES LE. Programa de bovinos da EPAMIG – pesquisa com animais F1: projetos e resultados preliminares. In: Encontro de produtores de gado leiteiro F1, 4., 2002, Belo Horizonte, Anais... Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, 2002, p. 60-68.
- SANTOS JEP, CHEBEL RC. Avaliação econômica de diferentes programas reprodutivos. In: Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos. 9, 2005, Uberlândia, Anais... Uberlândia, p. 137-150.
- SANTOS JEP, GALVÃO KN, CERRI RLA, CHEBEL R, JUCHEM SO. Controlled breeding programs for reproductive management. *Advances in Dairy Technology* 2003; 15:49-68.
- SARTORI, R. Ovarian function, circulating steroids, and early embryonic development in dairy cattle. In: Tese de doutorado. University of Wisconsin-Madison, WI, EUA. 2002, 171p.
- SARTORI R., FRICKE PM, FERREIRA JC, GINTHER OJ, WILTBANK MC. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod* 2001; 65:1403-1409.

- SARTORI R, GUMEN A, GUENTHER JN, SOUZA AH, CARAVIELLO DZ, WILTBANK MC. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2006; 65:1311-1321.
- SARTORI R, HAUGHIAN JM, SHAVER RD, ROSA GJ, WILTBANK MC. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 2004; 87:905-920.
- SARTORI R, SARTOR-BERGFELT R, MERTENS SA, GUENTHER JN, PARRISH JJ, WILTBANK MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002; 85:2803-2812.
- SCHMITT EJ, DIAZ T, DROST M, THATCHER WW. Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *J Anim Sci* 1996; 74:1084-1091.
- SHELDON IM, NOAKES DE, DOBSON H. The influence of ovarian activity and uterine involution determined by ultrasonography on subsequent reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 2000; 54:409-419.
- SPALDING RW, EVERETT RW, FOOTE RH. Fertility in New York artificially inseminated Holstein herds in Dairy herd improvement. *J Dairy Sci* 1975; 58:718-723.
- STEVENSON, J. S. A review of oestrous behaviour and detection in dairy cows. In: *Fertility in the high producing dairy cow*. Occ Publ Br Soc Anim Sci 2001; 26:43-62.
- STEVENSON JS, LAMB GC, KOBAYASHI Y, HOFMAN DP. Luteolysis during two stages of the estrous cycle: subsequent endocrine profiles associated with radiotelemetrically detected estrus in heifers. *J Dairy Sci* 1998; 81:2897-2903.
- STEVENSON JS, PURSLEY JR, GARVERICK HA, FRICKE PM, KESLER DJ, OTTOBRE JS, WILTBANK MC. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *J Dairy Sci* 2006; 89:2567-2578.
- TENHAGEN B-A, DRILLICH M, SURHOLT R, HEUWIESER W. Comparison of Timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: reproductive and economic considerations. *J Dairy Sci* 2004; 87:85-94.
- THATCHER WW, MOREIRA F, SANTOS JEP, MATTOS RC, LOPES FL, PANCARCI SM RISCO CA. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 2001; 55:75-89.
- TRIMBERGER GW. Breeding efficiency in dairy cattle from artificial insemination at various intervals before and after ovulation. *Nebraska Agric. Exp. Stn. Bull.* 1948; No.153, Lincoln.
- VASCONCELOS JL, DEMETRIO DG, SANTOS RM, CHIARI JR, RODRIGUES CA, SA FILHO OG. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology* 2006a; 65:192-200.
- VASCONCELOS JLM, PESCARA JB, CARDOSO BL. Efeito da inclusão de eCG em protocolos de IATF na concepção de vacas de leite mestiças. XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Goiânia, 2005.
- VASCONCELOS JLM, SANTOS RM, MARQUEZINI GHL. Impactos econômicos dos protocolos de sincronização com eliminação da observação do cio. Parte I: vacas mestiças mantidas a pasto. *Leite Integral* 2006b; 1:36-44.
- VASCONCELOS JL, SILCOX RW, ROSA GJ, PURSLEY JR, WILTBANK MC. 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* 1999; 52:1067-1078.
- VAZ DE OLIVEIRA HT, REIS RB, RIBEIRO DA GLÓRIA J. Comportamento da lactação de vacas mestiças F1 Holandês x Zebu. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 2004; 25:73-79.
- WASHBURN SP, SILVIA WJ, BROWN CH, McDANIEL BT, MCALLISTER AJ. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J Dairy Sci* 2002; 85:244-251.
- WILTBANK MC, GÜMEN A, SARTORI R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 2002; 57:21-52.
- WILTBANK MC. Prevenção e tratamento da retenção de placenta. In: *Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos*. 10, 2006, Uberlândia, Anais... Uberlândia, p. 61-70.

WILTBANK MC, WEIGEL KA, CARAVIELLO DZ, SOUZA A. Factors affecting reproductive efficiency in U.S. dairy herds. In: Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos. 10, 2006, Uberlândia, Anais... Uberlândia, p. 3-9.

XU ZZ, BURTON LJ. Reproductive performance of dairy heifers after estrus synchronization and fixed-time artificial insemination. J Dairy Sci 1999; 82:910-917.

XU ZZ, MCKNIGHT DJ, VISHWANATH R, PITI CJ, BURTON LJ. Estrus detection using radiotelemetry or visual observation and tail painting for dairy cows on pasture. J Dairy Sci 1998; 81:2890-96.

BULL SELECTION AND MANAGEMENT UNDER TROPICAL CONDITIONS RESULTS FROM STUDIES IN NORTHERN AUSTRALIA

Richard G. Holroyd¹, JD Bertram², VJ Doogan³, G Fordyce⁴ and JC Petherick¹

ABSTRACT

The key messages from our research working with bulls in multiple-sire herds in semi-extensive and extensive herds in the northern Australian pastoral industry are as follows:

- Veterinarians have reported that up to 20% of bulls fail a Bull Breeding Soundness Examination (BBSE).
- A BBSE will identify sub-fertile and infertile bulls.
- 2.5% bulls are adequate in multiple-sire matings providing these bulls have passed a BBSE.
- Sperm morphology is an important indicator of calf getting ability.
- Providing bulls are transported and given adequate nutrition post-relocation, the effects of relocation on bull fertility are minimal.

INTRODUCTION

Our work has been directed towards the management of *Bos indicus* or *Bos indicus* infused bulls that are mainly multiple-sire mated under pastoral conditions in northern Australia. Multiple joining of herd bulls represents in excess of 95% of all matings that occur in northern Australia. The objective of our work has been twofold. Firstly it looked at identifying premating predictors of bull fertility. In other words, what are the traits that can be measured in bulls prior to mating that are important for high calf output by individual bulls? Secondly it assessed management strategies that would maximise the calf output of bulls of desired genetics in northern Australian herds.

This paper focuses on the examination, selection and management of bulls for soundness in physical and reproductive traits. Obviously the selection of sires for herd genetic improvement for growth, carcase and other traits is important but is beyond the scope of this presentation.

THE DEFINITION OF FERTILITY IN BULLS

Historically, fertility means capable of producing offspring. Bulls are required to produce many offspring over a short period of time. Therefore the Australian Cattle Veterinarians (ACV) has adopted a definition more appropriate for cattle and is “***an animal is fertile when it is able to reproduce prolifically***”.

Fertility of bulls is a continuum ranging from very high to very low. Bulls can be classified as:

¹Department of Primary Industries and Fisheries, PO Box 6014, CQMC, Rockhampton, Qld 4702, Austrália (Richard.Holroyd@dpi.qld.gov.au)

²Department of Primary Industries and Fisheries, LMB 2, Goondiwindi, Qld 4390, Austrália

³Department of Primary Industries and Fisheries, Locked Bag 4, Moorooka, Qld 4104, Australia

⁴Department of Primary Industries and Fisheries, PO Box 976, Charters Towers, Qld, 4807, Australia

- **Fertile bulls.** As a guide, these bulls can impregnate, when joined to 50 cycling, disease-free females, at least 30 of these in the first 3 weeks of mating or at least 45 of these in the first 9 weeks of mating.
- **Sub-fertile bulls.** These bulls can achieve pregnancies by natural mating but not at the same rate as fertile bulls.
- **Infertile bulls** cannot achieve pregnancies.

Sub-fertility in bulls is a major issue as it is often difficult to detect in bulls in beef herds unless there is some detailed performance recording system. Cattle veterinarians regularly note that 10-20% of bulls fail a routine Bull Breeding Soundness Examination (BBSE). There have been cases where up to 50% of bulls fail a BBSE 3 months post-sale (Holroyd *et al.* 2005 p11). Very few bulls are infertile.

CALF OUTPUT OF BULLS IN MULTIPLE-SIRE HERDS

DNA typing for paternity confirmed what we believed, i.e. that the majority of calves are sired by the minority of bulls and that there is a large number of bulls in multiple-sire herds that contribute little. In a study of 235 bulls in multiple-sire matings, resolution of paternity averaged 97.7% across all sites and the non-resolution occurred in herds where closely related bulls were mated (Holroyd *et al.* 2002). However 11% of all calves were sired by unknown sires for reasons such as mixing groups of calves, not bleeding all potential sires and in a small number of cases, precocious bull calves. In this study, 14% of bulls sired over 30% of calves, 58% sired 10% or less and 6% of bulls did not sire any calves at all. The calf output of a bull is repeatable providing the bull keeps passing a BBSE and that there are no major changes in bulls in the mating group (Holroyd *et al.* 2002).

PRE-MATING PREDICTORS OF FERTILITY OF BULLS IN MULTIPLE-SIRE HERDS

These broadly fit into the following categories:

- Physical – Liveweight, body condition score, scrotal size, and physical normality of the testes, penis, sheath, feet, legs, gait and head.
- Semen – both as a crush-side assessment and a laboratory examination for sperm abnormalities.
- Serving assessment used to determine whether a bull is capable of serving normally.
- Behaviour such as social dominance and the social relationship between bulls in mating groups.

Which of these traits are linked to calf output? All of them are to some degree, although some are more important than others. In the study of Holroyd *et al.* (2002), multiple regression models relating pre-mating measurements of physical, seminal and behavioural traits to calf output were developed. Providing bulls have values in the normal range for feet, legs, gait, penis, sheath and testicular tone, these traits should not limit calf-getting ability. Sheath and testicular traits such as scrotal circumference and testicular tone were generally not related to calf output. Dominance hierarchy was difficult to measure but where measured, was not consistently related to calf output (Fordyce *et al.* 2002, Holroyd *et al.* 2002). Measures of sexual behaviours in a serving capacity test were somewhat related to calf output but this relationship was not consistent. For example, in Santa Gertrudis bulls, the number of displays of sexual

interest and mounts but not serves was related to calf output whilst in Brahmans, only the combined libido score was positively related to calf output. Assessment of semen crush-side gives some indication of semen quality, but motility of semen, whilst useful as an indicator of whether semen is suitable for artificial breeding, is not a good predictor of calf output. However, the percentage of normal sperm in an ejaculate was positively related to calf output in Santa Gertrudis and Brahman bulls.

Where social dominance was obvious such as where there were marked differences in bull size and age, it was an important factor contributing to calf output. Where bull groups were of similar age and size, social dominance was difficult to measure thus its impact on calf output of individual bulls could not be determined (Fordyce et al. 2002).

The multiple regression models used in this work explained 35-57% of the variation in calf output of individual bulls. Other factors such as mating behaviour in the paddock may have been contributing to this variation in calf output. The importance of mating bulls with satisfactory levels of normal sperm is demonstrated in Figure 1 (Holroyd et al. 2005, p 142). These bulls were single-sire mated to about 40 females each. Bulls with lower levels of normal sperm achieved fewer pregnancies and at a lower rate compared with bulls with higher levels of normal sperm. The relationship is not always absolute but can be used as a guide for the likelihood of a bull being sub-fertile.

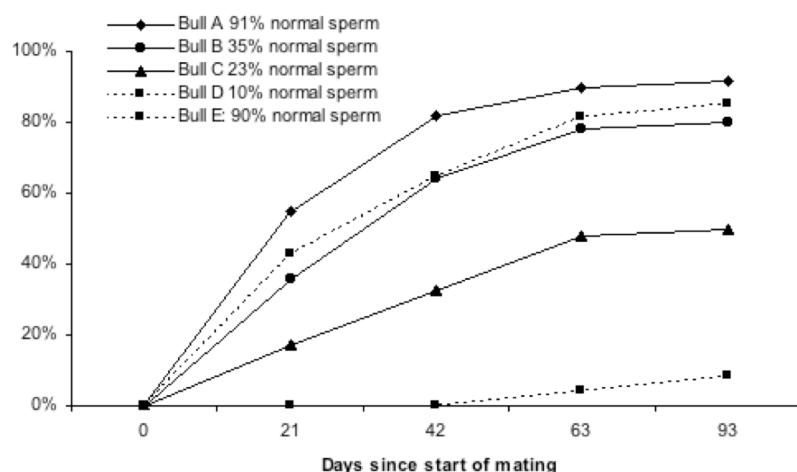


Figure 1. Cumulative pregnancy rates achieved by individual 2 yo (dotted line) and 3 yo (solid) line bulls.

Although the number of normal sperm in an ejaculate is an important indicator, no one single trait should be used as a predictor of calf output. Once traits such as scrotal circumference and percent normal sperm are above threshold levels, there may be little value in placing importance on selecting bulls with larger values of these traits to improve calf output. However, there are other reasons for selecting bulls with a large scrotal size as there is a genetic correlation with female age of puberty. Bulls with larger scrotal sizes sire daughters that have earlier puberty (Mackinnon et al. 1990).

Our studies and others have become the basis for the BBSE procedure and have been adopted by the ACV as the standard for the examination of bulls for reproductive function. A systematic BBSE will not identify the highly fecund bulls ('super bulls') but will identify sub-fertile and infertile bulls.

BULL BREEDING SOUNDNESS EXAMINATION (BBSE)

A BBSE is an examination of a bull for reproductive function. We conduct it using standards established by the ACV. These standards are based on scientific research that has related measures in bulls to calf-getting ability.

A full BBSE involves:

- Examining **Physical** traits with emphasis on body condition score, testes tone, penis, feet, legs, leg joints, gait and head;
- Palpation of the **Scrotum** and measurement of scrotal size;
- **Crush-side** assessment of **Semen** for concentration, contaminants such as blood and particularly for motility of sperm and suitability for laboratory evaluation;
- Laboratory evaluation of **Sperm Morphology** (shape). This involves high-magnification microscopy of a preserved semen sample by an accredited person to assess whether a random sample of 100 sperm is above thresholds for 8 categories of morphology; and
- **Serving** assessment to determine whether a bull is able to serve normally.

At the completion of a BBSE, the veterinarian will input the records into a computer program "Bull Reporter" to provide a certificate signed by the veterinarian and the owner/manager of the bull (Fordyce et al. 2006). This detailed certificate shows what measurements were undertaken and whether the bull met the fertility standards of the ACV.

Depending on the intended use of the bull or the requirements of various breed societies for sales, not all 5 categories (scrotum, physical, semen, sperm morphology and serving) are required. The more detailed the examination, the less the chance of mating a sub-fertile bull. Clients are advised to, at least, have bulls undergo a physical examination including palpation of the testes as a systematic physical examination of a bull is the foundation of a BBSE.

REASONS FOR UNDERTAKING A BBSE

BBSE establishes a baseline above which bulls can be regarded as having a high probability of being fertile. BBSE is a relatively quick and economic procedure to check that bulls are fertile either prior to sale or prior to mating. If fertile bulls are used, fewer bulls are required, thus enabling more females to be inseminated by high-value bulls; that is, genetic improvement can be accelerated. Accurate conduct and reporting of BBSE enables vets, buyers, owners and managers to make appropriate decisions on selection and management of bulls to maximise herd reproductive performance.

BBSE MEASUREMENTS AND STANDARDS (Entwistle and Fordyce 2003)

1. *Palpation of the Scrotum and measurement of scrotal size*

Palpation of scrotal contents will reveal abnormalities such as hernias, possible infections or one testicle being markedly different in size to the other. Measurement of scrotal size with a scrotal tape is a good indicator of daily and total sperm production. A bull will fail a BBSE, either if his scrotal contents are abnormal or, if his scrotal size is not within normal ranges (Table 1).

Table 1. Guidelines for minimal scrotal size (Entwistle and Fordyce 2003, p28)

| Age (months) | <i>Bos taurus</i> and <i>Bos indicus</i> cross bulls on moderate to good nutrition | <i>Bos indicus</i> bulls on moderate to good nutrition | Bulls on poor to marginal nutrition |
|-----------------|--|--|--|
| 12- 15 | 30 cm | 24 cm | 2 cm less |
| 18 | 32 cm | 28 cm | 2 cm less |
| ≥24 | 34 cm | 30 cm | 2 cm less |

2. Assessment of **Physical traits**

Body condition score is a visual assessment on a scale of 1-5 with bulls in very poor condition being 1 (Fail) and fat bulls being a 5. Ideally bulls should be in the range of 3 to 4. Tone of the testes is assessed during palpation and is a guide to the health of testicular tissue. Bulls with very soft or very hard tone fail a BBSE. The penis is assessed visually for any abnormalities by gently exteriorising it from the sheath, either during semen collection, or during a serving assessment. Feet, legs and leg joints are assessed both in a vet crush and whilst walking for any abnormalities such as elongated claws, sickle hocks and joint swellings. The head is examined from both the side and the front to determine any problems, particularly with the eyes, jaws and teeth. Gait is assessed either prior to entry into, or after release from the crush. Bulls are viewed from both the side and behind focussing on tracking and joints. Bulls with any abnormalities of the penis, feet, legs, gait and head, fail a BBSE.

3. **Crush-side assessment of Semen**

Semen is usually collected by electroejaculation, but in trained bulls, collection using an artificial vagina is possible. An estimate of concentration and motility of the ejaculate is made. Contamination of the semen by pus, blood or urine may indicate fertility problems. Bulls that have dilute semen, or have sperm motility less than 30% fail a BBSE. Bulls with sperm motility of at least 30% are deemed to be suitable for natural mating. If sperm motility is 60% or more, the bull may be suitable for both natural and artificial breeding.

4. **Laboratory evaluation of Sperm Morphology**

Semen always contains sperm with both normal and abnormal shape. The assessment for morphology is usually conducted in a laboratory because of the need for high magnification microscopy rather than in a cattle yard environment. A laboratory estimation of morphology is done as a wet-mount preparation on several drops of semen preserved usually in either PBS-glutaraldehyde, or buffered formal saline. The current procedure of the ACV is for sperm to be classified in 8 categories (Entwistle and Fordyce 2003 p78). These categories are based on the work of Barth and Oko (1989) and Barth (2000) and the maximum acceptable limits within each category to pass a BBSE is as follows; proximal cytoplasmic droplets (20%); mid-piece abnormalities (30%), tail abnormalities and loose heads (30%), pyriform heads (20%), knobbed acrosomes (30%); vacuoles and teratoids (20%) and swollen acrosomes (30%). The ACV has developed 2 threshold levels for a bull to pass a morphological examination as part of a BBSE. There is a prerequisite of 70% morphologically normal sperm for bulls to be highly likely to be fertile under natural mating (both multiple- and single-sire) and that there is a high probability that their semen can be frozen. Bulls with 50-69% morphologically normal sperm will have a high probability of being fertile under natural matings but caution should be exercised in mating them as single-sires or with high mating loads. Their semen may not be suitable for freezing.

For any morphology results to be certified using the Bull Reporter program, it must be performed by a morphologist who has been accredited through a process overseen by

the ACV. This accreditation process is designed to standardise the identification of various morphological abnormalities.

5. *Serving assessment*

To pass a BBSE where a serving assessment is required, a bull must exhibit at least one serve in a standard serving test of 10 minutes for *Bos taurus* bulls and 20 minutes for *Bos indicus* bulls. He must also show no other abnormalities, especially of his penis, that may indicate impaired fertility. Brahman and Santa Gertrudis bulls can perform in serving capacity tests providing attention is paid to managing the bulls, particularly to getting them sexually aroused (Bertram et al. 2002). Generally how bulls performed in a serving capacity test was not a good indication of their calf getting ability (Holroyd et al. 2002). The value of some form of serving assessment is useful to demonstrate that bulls have the ability to serve, rather than trying to determine how many serves a bull can do which is not a good indicator of calf output

ARE THESE PHYSICAL AND SEMEN TRAITS REPEATABLE?

Scrotal size ($r = 0.70 - 0.96$) and sheath size ($r = 0.61 - 0.70$) are moderately repeatable. Sperm morphology (% normal sperm) is generally moderately repeatable ($r = 0.69 - 0.75$) once bulls have reached sexual maturity (Holroyd et al. 2005). If bulls experience some form of stressful process such as trauma, illness or even relocation to harsher climates, this may impair spermatogenesis with a resultant decline in levels of normal sperm. This is usually transient, but may persist for many months

TIMING OF A BBSE

New bulls should pass a BBSE and then be checked on an annual basis. Whenever a problem is suspected, bulls can undergo a full BBSE. Ideally bulls should have a BBSE as close as possible to the start of the mating period, but still allowing time to replace a bull should it fail a BBSE. Even in extensive herds, where animals are handled maybe only twice yearly, bulls should have at least a quick physical examination whenever bulls come through the yards. With sale bulls a BBSE must be conducted a maximum of 28 days prior to sale to meet the standards of the ACV.

SELECTION OF BULLS AS WEANERS AND YEARLINGS

Selection should be based on a number of birth, growth, carcase, temperament, physical and reproductive traits. Comments here will be confined to physical and reproductive traits. Obviously bulls should have 2 normal testicles but the condition of unilateral hypoplasia where one testicle is markedly smaller than the other, is hard to detect in the weaner bull. If possible, select 25-50% more animals than anticipated for sale or mating as this allows some latitude for culling at a later date on traits such as growth, carcase and temperament.

In weaner and yearling bulls, physical traits such as scrotal size and sheath size are at least moderately to highly correlated with later life values from 10 months onwards (Holroyd et al. 2005). However trying to select yearling bulls on semen quality traits is not as clear-cut. In some instances there has been a good relationship between semen quality as a yearling compared with that found when bulls have reached sexual maturity

and in other cases the relationship has been poor (Holroyd et al. 2005) for reasons we don't understand.

MANAGING YOUNG BULLS FROM WEANING TO MATING

Puberty is reached when bulls are capable of siring progeny, albeit small numbers. As a general rule puberty is reached when scrotal size reaches 25-27 cm, regardless of breed. However semen quality at puberty is generally poor. In *Bos indicus* x *Bos taurus* composites, the average age and weight at puberty in bulls grazing pasture is about 15 months (330 kg) and in Brahmans about 17 months (340 kg). Age at puberty can be reduced by better nutrition (Holroyd et al. 2005).

Having reached puberty, bulls undergo a period of reproductive development until they reach sexual maturity. There are increases in scrotal size and improvement in both the quality and quantity of an ejaculate and increases in sexual behaviours of seeking, mounting and serving. Sexual maturity is reached in most composite bulls by 17 months of age and by 21 months in Brahman bulls (Holroyd et al. 2005)

Avoid excessive feeding of concentrates to young bulls as overfatness is one of the main reasons of bulls having poor reproductive performance. We have demonstrated that feeding moderate amounts of concentrates (6kg/day of commercial bull pellets through self feeders) to Brahman weaner bulls increased both liveweight and scrotal size but have little effect on semen quality. However, there are some detrimental effects. Flight speed (a measure of "temperament") increased making bulls more difficult to handle and there is a risk of acidosis and lameness. Any advantages in liveweight and scrotal size in fed bulls were lost after 12 months on pasture (Holroyd et al. 2005).

From a management point of view, it makes good sense to run groups of young bulls together. This is more efficient for vaccination programs, parasite control, supplementation and feeding strategies. The optimum size of bull groups is generally a compromise of grazing conditions, handling and husbandry requirements. Providing there is no great weight range between animals, there appear to be few problems either from bullying, trauma or homosexual activity of grazing young bull groups of 200-300. Sound fencing, in most cases will keep animals confined. In addition, running bulls in larger groups provides an opportunity to more effectively conduct genetic analyses as the effect of different managements can be reduced.

PURCHASING BULLS AND RELOCATING THEM TO THEIR NEW HOME

There are continuing reports in northern Australia that a varying proportion of bulls are either sub-fertile or infertile in their first season after being relocated to a new environment. Invariably these relocated bulls are newly-purchased. In most cases this depression in fertility is not recognised until bulls have been resident on their new properties for 12 months or more. Our studies in relocation of bulls are reported in Holroyd et al. (2005). In one experiment, 50% of bulls failed a BBSE up to 3 months after a sale and relocation. This appeared to be independent of breed, age and property of origin. Most of these BBSE failures were from changes in semen quality. Most bulls subsequently passed a BBSE after being provided with favourable nutrition and management. Experimentally we showed that for bulls relocated under favourable conditions (loaded with familiar bulls, minimum transport times and good nutrition on arrival both in the yard and paddock) there were minimal effects on semen quality.

Bulls undergoing a more stressful relocation process such as through sale yards and mixing with unfamiliar bulls may be more prone to semen quality changes post-relocation.

Ideally relocating bulls at a young age and allowing an adaptation period prior to mating is desirable. Purchasing bulls then immediately relocating them to a new environment and expecting top reproductive performance might be an unrealistic expectation. When purchasing bulls, make sure that they have passed a BBSE. Insist on that they be free of campylobacteriosis, trichomoniasis and pestivirus and that they have been vaccinated for campylobacter and pestivirus.

HOW MANY BULLS TO USE?

In most cases mating 2.5% bulls (1 bull to 40 females) has been found to be adequate in a number of herd sizes and different types of country (Holroyd *et al.* 2005). We could not demonstrate any reductions in subsequent number of calves or differences in calving times with lowered bull percentages. The proviso is that these bulls have passed a BBSE. Caution should be exercised with smaller mating groups: e.g. if mating 250 females, 6 bulls are required and with 80 females, 2 bulls are needed. If one bull is lost out of the 6 then it is not a disaster, but if one bull is lost out of the 2, this may well interfere with pregnancy rates. Less bull injuries were recorded when bulls were mated at 2.5% as opposed to 6%.

MATING AGES OF BULLS

As a general rule, bulls should be mated as young as possible. There is no reason why bulls should not be used initially at 2 years of age. Keeping a bull until it is older is a waste of its peak reproductive life and decreased genetic progress. It is a myth that bulls have to be in prime condition to be joined. If possible, bulls should be mated in groups of similar age and weight. Young bulls are far easier to handle than older bulls. Once bulls have reached 6 years of age, they are more prone to injury and reproductive problems. As well, they are more likely to be carriers of the venereal diseases, vibriosis and trichomoniasis. Culling bulls after several matings should accelerate genetic improvement in the herd if bulls are being purchased on genetic differences.

Few yearling bulls (14-16 months of age) will pass a BBSE, but providing they do pass, mating bulls as yearlings is possible. Based on our studies, pregnancy rates will be reduced if yearling Brahman bulls are used (Holroyd *et al.* 2005).

MATING NEW BULLS

If introducing new bulls and mating them as multiple sires, try and mate all of the new bulls together, rather than putting them into established bull groups, as invariably the new bull will get bullied and be at the bottom of the peck order. This effect may be greater when high (>4%) bull to female mating ratios are used. This recommendation of introducing new bulls is based on anecdote but appears to be supported by science according to the review of Petherick (2005).

VACCINATION PROGRAMS FOR BULLS

Vaccination is good insurance for optimising reproductive performance of bulls. Vaccines can be given simultaneously with, possibly, the exception of tick fever. The following vaccinations are recommended.

- Vibriosis (*Campylobacter*) causes fertilisation failure and foetal loss. Vaccinate initially with 2 doses, 4-6 weeks apart with the second dose 4 – 6 weeks prior to mating. Thereafter an annual vaccination is recommended. Bull vaccination alone is the most appropriate strategy in extensive northern herds.
- Bovine ephemeral fever (BEF) is an enzootic viral disease transmitted by biting insects including species of *Aedes*, *Anopheles* and *Culicoides*. Bulls are prone to BEF, showing fever and lameness, and may not be able to stand. Bulls may die from exposure and dehydration. Recovered bulls have transient semen defects for several months (Burgess and Chenoweth 1975). Initial vaccinations are done 2-4 weeks apart and then annually.
- Pestivirus (BVDV) is a highly contagious viral disease causing embryonic and foetal losses in females and calves that are poor doers and susceptible to other diseases. Whilst pestivirus usually has little effect in bulls, insist that purchased bulls are free of pestivirus. Bulls can be vaccinated as part of a herd vaccination program.
- All breeds have varying susceptibility to the various tick fevers (babesiosis and anaplasmosis). Use of current tick fever vaccines appears to pose little risk of reactions particularly when bulls are vaccinated as weaners. One vaccination gives lifetime immunity.
- Bulls should be vaccinated annually against botulism and the common clostridial diseases with a 5 in 1 vaccine.

FUTURE PERSPECTIVES AND ISSUES RESEARCH

1. Early life predictors of fertility.

CRCs or Cooperative Research Centres are partially funded by the Australian Government and address issues that one research organisation alone can not solve. Current work within the CRC for Beef Genetic Technologies is exploring whether bull reproductive traits can be used to identify early life predictors of fertility both phenotypically (his fertility as reflected by improved calf output) and genetically (his female and male progeny's fertility such as age at puberty) as well as improving lifetime reproductive performance of females. Observations will be made on 3500 young bulls produced by sires selected from BREEDPLAN® herds recording reproductive data such as scrotal size and days to calving. The aim is to develop breed-specific (Brahman and Composite) heritabilities from about 80 sires with 20 progeny per sire per breed. Genetic correlations will be estimated using approximately 1500-2000 dam/son pairs per breed. These bulls will be studied from weaning until 24 months of age. The study commenced in April 2005 and will be completed in November 2011.

2. Other areas of research.

- High energy diets. Whilst there have been some reduction in levels of high-energy diets fed to bulls, feeding bulls for sale is an entrenched practice in the beef cattle industry particularly the stud sector. There appears to be very few reproductive benefits of this feeding, apart from possibly increasing the onset of puberty and it is used mainly as a marketing tool for the sale of bulls. There is considerable interest

from bull sellers on cost effective levels to feed bulls to maximise growth but without compromising physical and reproductive traits and sale price.

- Relocation. Industry feedback still indicates that some relocated bulls have impaired fertility. Our studies found 50% of relocated bulls fail a BBSE within 3 months of relocation and this failure appears not to be related to genotype, age, location and prior feeding. Measurements are required on bulls that have been exposed to larger insults than those imposed in our experiments, such as following bulls through sale yards as part of the relocation process.
- Reproductive behaviour. The multiple regression models in our studies only explained 35-57% of the variation in calf output of individual bulls. Further research into cattle reproductive behaviour may provide some valuable key concepts in developing more efficient and profitable mating management of bulls.

EXTENSION

There is on-going education of veterinarians and cattle producers in the conduct and value of a BBSE. A video on "Bull selection and using the BBSE measures with confidence" has been developed and a CD on "Structure, semen and sperm abnormalities" is now part of the teaching material of some of our Agricultural Colleges. There is ad-hoc training for veterinarians in the use of Bull Reporter.

ISSUES

Two issues being considered by the ACV are in the competency of conducting a BBSE and timing of a BBSE prior to sale:

- *Competency to conduct BBSE*

The ACV is currently assessing the feasibility of a scheme to demonstrate competence in the use of the ACV standards for the conduct and reporting of BBSE by veterinarians. It will be based upon an open book examination, a declaration of experience in the assessment of at least 100 bulls and demonstrated competence in the use of Bull Reporter.

- *Timing of BBSE prior to sale*

The current recommendation by many breed societies and sale agents is that a BBSE must be conducted a maximum of 28 days prior to sale. This period puts pressure on bull owners, veterinarians and laboratories to have testing done within what is generally a 1-2 week period given turn around times for paperwork and samples to laboratories. There are moves to extend this period to 70 days before sale as an indicator of bull fertility at the point of sale. By 70 days prior to sale, bulls are usually well advanced in their pre-sale nutritional program. Any defects in semen quality are likely to be evident at that time. Regression in either physical or scrotal traits is very unlikely during the next 2 months, although there may be a temporary effect on hooves. The main issue is in potential changes in sperm morphology that can occur even when evaluation is within 28 days of sale.

REFERENCES

- BARTH AD (2000) Bull Breeding Soundness Evaluation Manual, 2nd Ed. The Western Canadian Association of Bovine Practitioners 75 pages.
- BARTH AD AND OKO RJ (1989) Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Iowa State University Press, Ames.
- BERTRAM JD, FORDYCE G, MCGOWAN MR, JAYAWARDHANA GA, FITZPATRICK LA, DOOGAN VJ, DE FAVERI J AND HOLROYD RG. (2002) Bull selection and use in northern Australia 3. Serving capacity tests. *Animal Reproduction Science* 71: 51-66.
- BURGESS GW AND CHENOWETH PJ (1975) Midpiece abnormalities in bovine semen following experimental cases of bovine ephemeral fever *Br Vet J* 131: 536-543.
- ENTWISTLE K AND FORDYCE G (2003) Evaluating and Reporting Bull Fertility. Published by Australian Association of Cattle Veterinarians (eoaacv@bigpond.net.au) ISBN 0-9585654-4-9.
- FORDYCE G, ENTWISTLE K, NORMAN S, PERRY V, GARDINER B AND FORDYCE P (2006) Standardising bull breeding soundness evaluations and reporting in Australia *Therio* (accepted).
- FORDYCE G, FITZPATRICK LA, COOPER NJ, DOOGAN VJ, DE FAVERI J AND HOLROYD RG (2002) Bull selection and use in northern Australia 5. Social behaviour and management. *Anim Reprod Sci* 71: 81-99.
- HOLROYD RG, DOOGAN VJ, DE FAVERI J, FORDYCE G, MCGOWAN MR, BERTRAM JD, VANKAN DM, FITZPATRICK LA, JAYAWARDHANA GA AND MILLER RG (2002) Bull selection and use in northern Australia 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. *Anim Reprod Sci* 71: 67-79.
- HOLROYD RG, BERTRAM JD, DOOGAN VJ, FORDYCE G, PETHERICK JC AND TURNER LB (2005) Final Report NAP3.117: Bullpower, Delivery of adequate normal sperm to site of fertilisation. Published by Meat and Livestock Australia, Locked Bag 991. North Sydney, NSW 2059.
- MACKINNON MJ, TAYLOR JF AND HETZEL DJS (1990). Genetic variation and covariation in beef cow and bull fertility *J Anim Sci* 68: 1208-1214.
- PETHERICK JC (2005) A review of some factors affecting the expression of libido in beef cattle, and individual bull and herd fertility. *Appl Anim Behav Sci* 90: 185-205.

INFLUÊNCIA DA QUALIDADE DO SÊMEN NOS RESULTADOS DE PRENHEZ EM PROGRAMAS DE IATF E TETF

Rubens Paes de Arruda¹; Eneiva Carla Carvalho Celeghini¹; André Furugen Cesar de Andrade¹; Cláudia Fernandes Raphael¹; Karen Regina Peres¹; Luciano Castellar das Neves¹

INTRODUÇÃO

Diversos trabalhos vêm sendo realizados tendo como base o controle hormonal do ciclo estral das fêmeas bovinas e o emprego da inseminação artificial (IA) com o uso do sêmen congelado na forma convencional ou sexado e transferência de embriões (TE) em tempo fixo (IATF e TETF), desobrigando a detecção do estro. Para isso, diferentes fármacos, protocolos e momentos de inseminação são usados com relatos de variação nas taxas de fertilidade (ARRUDA et al., 1997; GARCIA et al., 1999; BARROS; ERENO, 2004; BÓ et al., 2004; MADUREIRA et al., 2004; BARUSELLI et al., 2006; NOGUEIRA; BARROS, 2006).

Após a IA, os espermatozoides depositados no trato genital da fêmea devem atravessar o útero, passar para o oviduto, pela junção útero-tubária, interagir com o epitélio do oviduto e fertilizar o ovócito (SARTORI, 2004). Para que o espermatozóide seja considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil é necessário que possua morfologia, atividade metabólica e membranas 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. Deste modo, 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.

A redução da fertilidade, associada à inseminação com sêmen congelado, vem sendo atribuída aos processos ocorridos durante a congelação do sêmen, a qual ocasiona danos aos espermatozoides, os quais podem ser ultra-estruturais, físicos, bioquímicos e funcionais, e que levam as membranas espermáticas a apresentarem alteração da assimetria bilipídica (WATSON, 1995; CELEGHINI et al., 2005). Podendo-se ainda incluir a estes danos, a perda de motilidade, alterações na cromatina e na morfologia do espermatozóide, permeabilização e desestabilização das membranas e geração de espécies reativas de oxigênio (WATSON, 2000). O desenvolvimento de técnicas de associação de sondas fluorescentes, que permitam a avaliação simultânea da integridade das membranas plasmática e acrossomal e da função mitocondrial em sêmen bovino (ARRUDA; CELEGHINI, 2003; CELEGHINI, 2005) tem servido como ferramenta para avaliar os efeitos da criopreservação sobre o sêmen bovino. Forero-Gonzalez (2004) verificou que somente 15% dos espermatozoides permaneceram intactos após o processo de criopreservação. Resultado semelhante foi obtido por Celeghini (2005) com percentuais variando de 18 a 28% após a criopreservação com dois diluidores diferentes.

¹Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal – VRA/FMVZ/USP - 13630-090, Pirassununga-SP, Brasil. (arrudarp@usp.br)

Somando-se a isso, o espermatozóide, como qualquer outra célula, produz espécies reativas de oxigênio (EROs), sendo originadas do metabolismo normal da célula. Apesar da existência de agentes antioxidantes no sêmen, o balanço entre a produção e a degradação de EROs pode ser alterado, aumentando a produção de EROs, que induz a peroxidação lipídica, uma vez que o espermatozóide contém uma alta concentração de ácidos graxos em sua membrana, principalmente o ácido decosahexaenóico, que possui seis duplas ligações insaturadas por molécula. Assim, o processo de peroxidação lipídica inicia-se na presença de EROs, que ao ter contato com a membrana espermática, tiram um hidrogênio de uma dupla ligação do ácido decosahexaenóico, transformando-o em radical livre, extremamente reativo, que por sua vez irá agir em outro ácido decosahexaenóico. Este processo desencadeia a cascata de peroxidação, causando lesões na 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). A geração de radicais livres também pode atingir o DNA no núcleo espermático, promovendo fragmentação. Esta fragmentação é comumente observada nos espermatozoides de indivíduos inférteis e há fortes evidências que estes danos mediados pela ação dos radicais livres sejam induzidos por estresse oxidativo (JANUSKAUSKAS et al., 2003).

BIOTÉCNICAS UTILIZADAS PARA A 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 (%) e o teste de termo-resistência (lento ou rápido). Estas avaliações vêm sendo, desde a década de 80, baseadas nas técnicas e padrões mínimos sugeridos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), como apresentado no quadro abaixo:

| | |
|--|------|
| Motilidade progressiva (%) | 30 |
| Vigor (1-5) | 3 |
| Esperrmatózoides com motilidade progressiva ($\times 10^6$ /dose) | 10 |
| Motilidade e vigor após TTR (%) | 20/2 |
| Defeitos maiores individuais (%) | 5 |
| Defeitos menores individuais (%) | 10 |
| Defeitos maiores totais (%) | 20 |
| Defeitos menores totais (%) | 30 |
| Defeitos totais (%) | 30 |

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 técnicos experientes. 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).

Na tentativa de diminuir esta imprecisão, uma grande diversidade de biotécnicas vem sendo desenvolvidas para a avaliação seminal, das quais podemos citar sistemas de avaliação computadorizada das características seminais (CASA), 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, produção de EROs, entre outras.

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 (ARRUDA et al., 2003). 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). 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 (AMANN, 1989; FERREIRA et al., 1997).

Mais adiante, avanços recentes 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., 2002a; ARRUDA; CELEGHINI, 2003; CELEGHINI et al., 2004; CELEGHINI, 2005). Dessa forma, a funcionalidade ou integridade das estruturas dos espermatozóides é monitorada por sondas fluorescentes, as quais possuem a capacidade de se ligar a pontos específicos das células, permitindo um diagnóstico mais fácil e direto, na dependência de suas características físicas (CELEGHINI, 2005). A combinação de vários corantes fluorescentes possibilita a avaliação de diversas estruturas 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; CELEGHINI, 2003) e eqüinos (ARRUDA et al., 2002b; CELEGHINI et al., 2004). Os mesmos parâmetros são avaliados nas associações de PI, H342, FITC-PSA e CMXRos; e PI, H342, FITC-PSA e JC-1 (CELEGHINI, 2005).

Embora o uso de sondas fluorescentes por microscopia venha sendo um método eficaz para a avaliação espermática, o número de espermatozóides normalmente examinados por análise não excede 200. 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, 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 de mamíferos (EVENSON, 1980; GARNER; JOHNSON, 1995).

A produção de EROs 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 fluídos 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). Um outro método utilizado é o emprego de sondas fluorescentes como a C11-BODIPY^{581/591} (4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1, 3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-undecanoic acid) que é um análogo de ácidos graxos polissaturados, se incorporando na membrana celular. Enquanto, este fluoróforo está na forma não oxidada, é observada uma fluorescência vermelha, com

comprimento de onda de 580 a 620 nm. Já na presença de EROS, há mudança da fluorescência para verde, cujo comprimento de onda é 495 a 545 nm (BALL; VO, 2002). Quanto à avaliação das proteínas do plasma seminal, Killian et al. (1993) detectaram quatro delas 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. Posteriormente, 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). Todavia, 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, enquanto, Jobim et al. (2002) encontraram a presença das proteínas albumina (66 kDa) e OPN (55 kDa) em sêmen bovino de alta congelabilidade. Apesar de muitos estudos indicarem as proteínas do plasma seminal como marcadores da fertilidade, ainda muitas pesquisas devem ser realizadas para realmente poder responder se tais marcadores são “mito ou realidade?” (SULLIVAN, 2004).

NÚMERO DE INSEMINAÇÕES E CONTROLE DO SÊMEN

O esquema mais utilizado para inseminar doadoras em programas de TETF é o de duas inseminações, 12 e 24 horas após a indução da ovulação (NOGUEIRA; BARROS, 2006; BÓ et al., 2006). No entanto, há uma tendência para redução do custo relacionado ao sêmen utilizado para a TETF. Neste sentido, vários grupos de pesquisa vêm trabalhando no intuito de desenvolver protocolos que utilize apenas uma palheta de sêmen por doadora superestimulada (D'OCCHIO et al., 1998; BARUSELLI et al., 2006).

A redução da quantidade de duas para uma única palheta de sêmen quando as IATFs ocorreram 12 e 24hs após a aplicação do pLH, não reduziu a taxa de viabilidade (número de estruturas recuperadas/embriões viáveis) quando a IATF foi realizada 16hs após o pLH (58,3% e 52,4%, respectivamente; BARUSELLI et al., 2006) ou 24hs após o pLH (66,2% e 52,7%, respectivamente; dados não publicados), segundo citação de Nogueira e Barros, (2006).

No entanto, é importante lembrar que um controle rigoroso do sêmen, antes do inicio dos trabalhos de TETF, deverá ser seguido, uma vez que, alterações nas características seminais, tais como, concentração, motilidade, morfologia, entre outras, afetam a taxa de fertilização e desenvolvimento embrionário.

USO DO SÊMEN SEXADO

O interesse pela determinação do sexo de animais de produção remonta a época de Hipócrates (460 -370 A.C.). Porém, somente nos últimos trinta anos que ocorreram avanços nessa área.

A técnica de produção *in vitro* de embriões associada ao sêmen sexado apresenta-se, atualmente, como a associação de biotecnologias mais aconselhável para geração de descendentes com o sexo pré-determinado. Devido ao limitado número de espermatozoides contido nas doses comerciais de sêmen sexado, esta técnica maximiza seu aproveitamento em relação à quantidade de embriões produzidos,

podendo até uma dose ser compartilhada entre mais de um animal doador de oócitos (DELL'AQUA Jr et al., 2006).

Além das doses comerciais de sêmen sexado apresentarem concentrações espermáticas inferiores ao convencional, o padrão alterado de movimentação espermática resulta em dificuldade de sedimentação dos espermatozoides após a seleção de *Percoll*, portanto, o número de células recuperadas é menor, resultando em uma concentração inadequada e consequentemente, restringindo a quantidade de oócitos que poderiam ser fecundados. A baixa concentração espermática obtida após seleção em gradiente *Percoll* está relacionada com taxas mais baixas de clivagem e consequentemente, taxas inferiores de produção de blastocistos, comparando a produção com sêmen convencional ou não sexado (DELL'AQUA Jr et al., 2006).

Nos dias de hoje, a sexagem espermática pela técnica de citometria de fluxo é uma tecnologia valiosa que terá futuramente grande impacto nas criações comerciais. Porém, os efeitos oriundos desta “viagem” pela qual os espermatozoides são submetidos são ainda pouco conhecidos (SUH et al., 2005). Acredita-se que a baixa fertilidade apresentada por algumas partidas de sêmen sexado seja devido ao comprometimento de estruturas espermáticas durante o procedimento de separação (“sorting”) das populações de células X e Y.

Para o sucesso da sexagem é preciso levar em conta a susceptibilidade dos gametas quanto à adição da sonda fluorescente, a exposição ao laser, a alta diluição, a elevada pressão, e a resistência às severas mudanças na composição dos meios que ocorre durante o processo de sexagem (MAXWELL et al., 1998).

Têm que se ter em mente que para a produção comercial de doses de sêmen sexado em taxas aceitáveis, os espermatozoides são conduzidos através do aparelho em velocidades que se aproximam aos 90 km/h e a pressão de 50 psi ao deixar o “nozzle”. Esta alta pressão e suas seqüelas comprometeriam a viabilidade e a motilidade do espermatozóide, deste modo, reduzindo a fertilidade (SUH et al., 2005). A diminuição da pressão durante o processo de separação de 50 para próximo dos 40 psi aumentou a sobrevivência dos gametas após o “sorting” mantendo a precisão na separação dos espermatozoides carreadores do cromossomo X ou Y (SUH; SCHENK, 2003; CAMPOS-CHILLON; DE LA TORRE, 2003).

Segundo Hossepián de Lima (2006), a aplicabilidade comercial da sexagem dos espermatozoides depende do estabelecimento de uma metodologia que além de ser compatível com o processo de congelação, minimize a perda de espermatozoides durante o processo e não reduza o poder fecundante dos mesmos. Considerando estes aspectos, é necessário avaliar a qualidade não somente em relação à acuidade de sexagem, mas também no que diz respeito à viabilidade dos espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar da busca intensa do desenvolvimento de técnicas laboratoriais que predizem com exatidão a fertilidade do sêmen, nenhum teste laboratorial isolado pode, até o momento, estimar seu potencial de fertilização. Tal meta têm sido de difícil obtenção devido à necessidade dos espermatozoides em apresentar diferentes atributos para a fertilização do ovócito. Vale ressaltar a importância da qualidade do sêmen para se obter boas taxas de fertilidade, principalmente nos programas de IATF e TETF, seja com a utilização do sêmen congelado da forma convencional ou sexado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITKEN, R. J.; KRAUSZ, C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, v.122, p. 497-506, 2001.
- AMANN, R. P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? *Journal of Andrology*, v. 10, p. 89-98, 1989.
- 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 Docêncio) - 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, 2002a.
- ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Determinação da integridade da membrana plasmática e acrosomal de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 226-227, 2003.
- ARRUDA, R. P.; CELEGHINI, E. C. C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrosomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos, *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 230-231, 2003.
- ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; MIZUTA, K.; GUSMÖES, 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_{2α} 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 techniques 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 Iguaçu, Brasil, Elsevier, 2002b, v. 57, p. 477.
- BALL, B. A.; VO, A. Detection of lipid peroxidation in equine spermatozoa based upon the lipophilic fluorescent dye C11-BODIPY581/591. *Journal of Andrology*, v. 23, p. 259-269, 2002.
- 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), Porto Alegre: UFRGS, p. 23-34, 2004.
- BARUSELLI, P. S.; MARTINS, C. M.; SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; DE SOUZA, A. L. AYRES, H.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; BÓ, G. A. Protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos Indicus*. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 31-38, 2006.
- BÓ, G. A.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 1-22, 2004.
- BÓ, G. A.; PICINATO, D.; PERES, L.; CUTAIA, L.; NASSER, L. F.; BARUSELLI, P. S. Protocolos de transferência de embriões em tempo fixo para receptoras de embriões bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 17-23, 2006.
- CAMPOS-CHILLON L. F.; DE LA TORRE, J. F. Effect of concentration of sexed bovine sperm sorted at 40 and 50 psi on developmental capacity of in vitro produced embryos. *Theriogenology*, v.59, p. 506, 2003.
- CANCEL, A. M.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biology of Reproduction*, v. 57, n. 6, p. 1293-1301, 1997.
- CBRA: MANUAL PARA EXAME ANDROLÓGICO E AVALIAÇÃO DO SÊMEN ANIMAL. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2. ed. 1998. 49 p.
- CELEGHINI, E. C. C. Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrosomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes. 186 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

- CELEGHINI, E. C. C.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; BIANCONI, L. L.; RODRIGUES, P. H. M.; ARRUDA, R. P. Efeitos da criopreservação e do diluidor sobre o sêmen bovino quanto às membranas plasmática, acrosomal e função mitocondrial. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 327, 2005.
- 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, 2004.
- DELL'AQUA JR., J. A.; PAPA, F. O.; ARAÚJO JR., J. P.; FREITAS, C. P., PONCHIROLI, C. B.; FIGUEIREDO, A. S.; MELO, C. M., ALBERTI, K.; CRESPILO, A. M.; SIQUEIRA FILHO, E. R., ORLANDI, C. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 205-212, 2006.
- D'OCCHIO, M. J.; JILLELLA, D.; WHYTE, T.; TRIGG, T. E.; MILLER, D. Tight synchrony of ovulation in superstimulated heifers induced to ovulate with LH: embryo recovery after a single insemination. *Theriogenology*; v. 49: p. 376, 1998.
- EVENSON, D. P. Flow citometry evaluation of male germ cells. In: YEN, A. (Ed.) *Flow Citometry: advanced research and clinical applications*. Boca Raton, Florida: CRC Press; 1980, p. 217-46.
- 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-GONZALEZ, R. A. Efeito da criopreservação usando diferentes técnicas de congelação e crioprotetores sobre parâmetros espermáticos e a integridade de membranas do espermatózido bovino. Tese (doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Pirassununga, 2004. 92 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 mammalian 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.
- HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Espermatózido sexado bovino: quando utilizá-lo? *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 213-224, 2006.
- 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 relacionada com a congelabilidade do sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 26, n. 3, p. 136-141, 2002.
- 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.
- MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. V.; ALMEIDA, A. B.; ROSSA, L. A. Sincronização com progestágenos. *Biotecnologia da Reprodução em Bovinos. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA. 1. Anais...* p. 117-128. 2004.
- 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.
- MAXWELL, W. M. C.; LONG, C. R.; JOHNSON, L. A.; DOBRINSKY, J. R.; WELCH, G. R. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in

the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction Fertility and Development*, v. 10, p. 433-440, 1998.

NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M. Aspectos práticos e perspectivas futuras do modelo P-36 de superovulação em doadoras da raça nelore. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 25-29, 2006.

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 (Suplemento), n. 1, p. 108-126, 1997.

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 sêmen de touros doadores da raça Gir. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 36, n. 2, 1999.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 35-50, 2004.

SUH, T. K.; SCHENK, J. K. Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics. *Theriogenology*, v. 59, p. 516, 2003.

SUH, T. K.; SCHENK, J. L.; SEIDEL, G. E. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*, v. 64, p. 1035-1048, 2005.

SULLIVAN, R. Male fertility markers, myth or reality. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 341-347, 2004.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v. 57, p. 149-179, 2002.

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.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with Cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, v. 60-1, p. 481-492, 2000.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. D. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, 1994, p. 189-317.

SUPEROVULAÇÃO COM INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Ciro Moraes Barros¹, Ana Cláudia Z. Barcelos¹ e Marcelo F. G. Nogueira²

RESUMO

Nos últimos anos o Brasil tornou-se líder mundial na produção de embriões bovinos. Isto foi possível graças a ampla utilização e aperfeiçoamento de biotécnicas como a inseminação artificial (IA), a indução de ovulação múltipla para a produção e transferência de embriões (MOET) e a produção in vitro de embriões (PIV). Esta mini-revisão é uma continuação da apresentada durante o I Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada (Londrina, 2004) e destaca aperfeiçoamentos no protocolo superestimulatório denominado P-36, no qual o momento da ovulação é controlado por uma fonte exógena de progesterona e aplicação de LH, permitindo o uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em doadoras de embriões.

INTRODUÇÃO

O gado zebuíno (sub-specie *Bos taurus indicus*, Meirelles et. al., 1999) predomina nas regiões tropicais devido a melhor tolerância ao estresse térmico e resistência a parasitas, quando comparado às raças européias (*Bos taurus taurus*). No Brasil, a maioria dos animais de corte pertence à raça Nelore (*Bos taurus indicus*). A indução de ovulação múltipla para a produção e transferência de embriões (MOET) é uma biotécnica da reprodução útil para acelerar o melhoramento genético de nosso gado zebuíno. Entretanto, a variabilidade de resposta das doadoras de embriões ao tratamento superestimulatório com gonadotrofinas, continua a ser um dos maiores problemas nos programas comerciais de transferência de embriões (Armstrong, 1993; Boland & Roche, 1993; Barros & Nogueira, 2001, Baruselli et al., 2006).

A superestimulação de doadoras bovinas tem sido amplamente estudada na tentativa de desenvolver protocolos que melhorem a produção de embriões ou facilitem o manejo dos animais (revisado por Barros et al., 2001, Baruselli et al., 2006). A detecção do estro é particularmente difícil no gado zebuíno devido a curta duração do comportamento estral e elevada incidência de estro noturno (Pinheiro et al., 1998). Para superar este problema vários tratamentos hormonais foram desenvolvidos para controlar o desenvolvimento folicular e o momento da ovulação, a fim de permitir a inseminação artificial em tempo-fixo (Bó et al., 2003; Baruselli et al., 2004). De forma similar, o desenvolvimento folicular e a ovulação podem ser manipulados farmacologicamente para melhorar programas de superestimulação e transferência de embriões bovinos (Barros & Nogueira, 2001; Nogueira et al., 2002; Baruselli et al., 2006).

Nesta mini-revisão será dada ênfase a modificações no protocolo superestimulatório denominado P-36, no qual o momento da ovulação é controlado por uma fonte exógena de progesterona e aplicação de LH, permitindo o uso da inseminação artificial com tempo fixo (IATF) em doadoras zebuínas e taurinas.

¹Depto. de Farmacologia, Instituto de Biociências (UNESP – Botucatu, SP)

²Depto. de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras (UNESP-Assis) cmbarros@ibb.unesp.br; marcelo@assis.unesp.br

SUPEROVULAÇÃO E PROTOCOLO P-36

Inúmeros tratamentos hormonais para induzir ovulação múltipla (superovulação) foram propostos (Gordon, 1996; Barros & Nogueira, 2001, Baruselli et al., 2006). 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; 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).

Existem evidências na literatura de que a presença de um folículo dominante no início do tratamento superestimulatório pode diminuir a produção de embriões. (Guibault et al., 1991; Lussier et al., 1995). A fim de evitar o folículo dominante no início dos tratamentos, algumas estratégias foram desenvolvidas, como por exemplo, começar a superestimulação com FSH no primeiro dia do ciclo estral (Goulding et al., 1990; Roberts et al., 1994; Stock et al., 1996), aspirar o folículo dominante ou todos os folículos acima de 5 mm de diâmetro antes da superestimulação com gonadotrofinas (Bergfelt et al., 1994; Bodensteiner et al., 1996; Hill & Kuehner, 1996) e sincronizar o início das ondas foliculares (Bó et al., 1995, 2003).

Por meio de uma série de experimentos Reuben Maplesoft e Gabriel Bo demonstraram que o uso de uma fonte de progesterona (dispositivos intravaginais), associada a administração intramuscular de estrógeno, promove atresia folicular e origina uma nova onda folicular, cerca de 4 dias após o início dos tratamentos (revisto por Bó et al., 1995, 2003). A fim de evitar a presença de um folículo dominante o tratamento superestimulatório com FSH começa justamente no início da nova onda folicular, ou seja, 4 dias após a colocação do dispositivo vaginal e administração de estrógeno. Dois dias após a primeira injeção de FSH, é administrada uma dose luteolítica de PGF_{2α} e 12 horas mais tarde o dispositivo vaginal é removido. As doadoras são inseminadas artificialmente 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.

Foi sugerido que folículos que não ovulam, após superestimulação com FSH, não se desenvolveram normalmente ou não possuem quantidade suficiente de receptores de LH para responderem ao pico pré-ovulatório de LH (Xu et al., 1995; D'Occhio et al., 1997; Liu et al., 1998). Portanto, estratégias que atrasam o pico pré-ovulatório de LH tem sido utilizadas na tentativa de aumentar o número de embriões (D'Occhio et al., 1997; Van de Leempt et al., 2001) ou ainda para viabilizar a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) após a superovulação (Barros & Nogueira, 2001 e 2005; Baruselli et al., 2006).

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 quando comparados a protocolos com detecção do estro. Entretanto, com estes tratamentos hormonais foi possível controlar o momento da ovulação, permitindo a utilização da IATF. A partir destes experimentos um novo protocolo denominado P-36 (Barros & Nogueira, 2001; 2005), no qual a fonte de progesterona (CIDR-B® ou DIB®) é mantida por até 36 horas após a aplicação de PGF_{2α} (daí a denominação P-36) e a ovulação é

induzida com LH exógeno, administrado 12 horas após a remoção da fonte de progesterona (ou seja, 48 h após a aplicação de PGF 2α). Uma vez que a ovulação ocorre entre 24 e 36 horas após a administração de LH (27), a IATF é realizada 12 e 24 h após a injeção de LH, evitando a inconveniência da detecção do estro (veja figura a seguir).

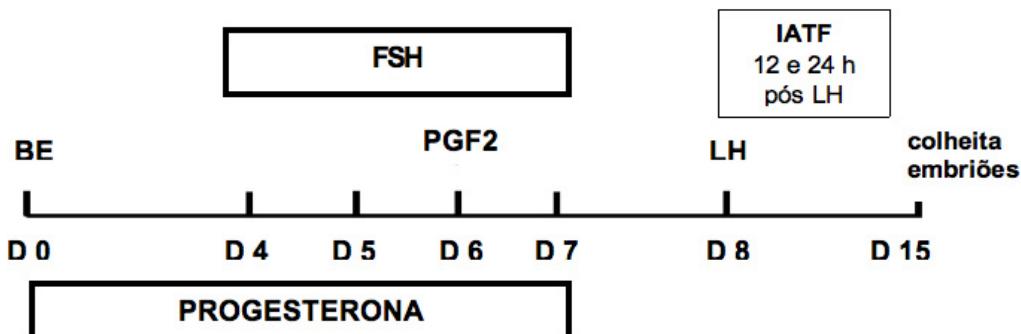


Figura 1. Protocolo superovulatório P-36. Em dia aleatório do ciclo estral (denominado dia 0 = D0) é colocada uma fonte de progesterona (CIDR, DIB, Cronipress) e administrado 2,0 a 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE) via intramuscular. Quatro dias mais tarde começa o tratamento superestimulatório com FSH. Na manhã do dia 6 (D6) administra-se dose luteolítica de PGF 2α (via IM) e no dia 7 à noite (D7) remove-se o dispositivo intravaginal, logo após a última dose de FSH. No dia seguinte às 8:00 h (D8) é aplicado 12,5 mg de LH (Lutropin®, via IM) e as doadoras são inseminadas em tempo fixo (IATF) 12 e 24 h após o LH.

Já foi demonstrado que a redução da dose de 25 para 12,5 mg de LH em vacas Nelore não altera significativamente o número de embriões viáveis ($9,8 \pm 1,09$, e $9,2 \pm 0,77$, respectivamente) ou a taxa de viabilidade (73,7 e 69,5%, respectivamente; Nogueira et al., 2002; Nogueira & Barros 2003). Resultados preliminares obtidos por Nogueira indicam que talvez seja possível reduzir a dose de LH para 6,25 mg ($8,8 \pm 0,82$ e 66,8%, embriões viáveis e taxa de viabilidade, respectivamente; Nogueira & Barros 2006). Além disso, podem-se utilizar diversas fontes exógenas de progesterona (CIDR, DIB ou Cronipress) sem que ocorram alterações na produção de embriões (Barros & Nogueira, 2005; Baruselli et al., 2006, Nogueira & Barros, 2006).

O protocolo P-36 tem se mostrado eficaz em animais da raça Nelore (Nogueira & Barros, 2001; Barros & Nogueira 2005; Baruselli et al., 2006). Em publicação recente, Nogueira et al. (2006) reportaram 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.

MODIFICAÇÕES NO PROTOCOLO P-36

Uma variação do protocolo P-36, onde o dispositivo intravaginal é retirado 24 h após a PGF 2α (protocolo P-24) e o LH continua a ser administrado no dia 9 (48 h após a PGF 2α), também pode ser utilizada em fêmeas Nelore, com resultados comparáveis ao obtidos com o P-36 (Zanenga et al., 2003, Baruselli et al. 2006).

Embora o esquema mais utilizado, para inseminar doadoras superestimuladas, seja uma inseminação 12 e outra 24 h após a indução da ovulação (Nogueira et al., 2002; Barros & Nogueira 2005; Baruselli et al., 2006), é possível realizar-se apenas uma IATF para reduzir o custo do sêmen. A utilização de uma única palheta de sêmen, não reduziu significativamente a taxa de viabilidade quando a IATF foi realizada 16 h (52,4 e 58,3%, respectivamente; uma vs duas IATF, Baruselli et al., 2006) ou 24 h após a administração de LH, no protocolo P-36 (57,7 e 66,2% respectivamente; dados não publicados fornecidos por Marcelo F.G. Nogueira). Entretanto, deve-se tomar especial cuidado com a qualidade e quantidade de sêmen a ser utilizado em uma única IATF em vacas superovuladas, a fim de evitar queda na produção de embriões (Barros & Nogueira, 2005; Nogueira & Barros, 2006).

Em algumas raças européias, o fato da utilização do protocolo P-36 originar taxas de embriões viáveis inferiores aos protocolos convencionais, motivou o estudo de alterações no protocolo P-36 para as raças européias. Tanto na raça Holandesa (Baruselli et al., 2006) como na Angus (Bó, resultados apresentados oralmente durante reunião Anual da SBTE, 2006, Araxá, MG), o protocolo P-36 se mostrou mais eficaz quando o agente indutor da ovulação (LH ou GnRH), ao invés de 48 horas (P36/LH48), era administrado 60 horas após a administração de PGF_{2α} (P36/LH60). De forma similar, Barcelos et al. (2006), mostraram que na raça Bonsmara ($\frac{5}{8}$ Africâner e $\frac{3}{8}$ Hereford e Shorthorn) a aplicação de LH 60 h após a PGF_{2α}, resultou em taxas de embriões viáveis numericamente superiores ao protocolo P36/LH48 (Tabela 1). Além disso, Barcelos et al. (2006), testaram uma outra modificação no protocolo P-36, ou seja, substituiram as duas últimas doses de FSH por uma aplicação única de eCG para estimular tanto o crescimento final quanto a maturação dos folículos ovarianos (atividade LH do eCG). Apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos, os resultados são indicativos de que a associação de eCG ao protocolo P-36 pode ser benéfica e merece ser melhor investigada (Tabela 1).

Tabela 1. Total de estruturas colhidas, embriões viáveis e taxa de viabilidade nos grupos P36/LH48, P36/LH60 e P36/LH48/eCG

| | P36/LH48 (n=12) | P36/LH60 (n=12) | P36/LH48/eCG (n=12) |
|------------------------------|--------------------|--------------------|------------------------|
| Total de estruturas colhidas | 7,17 ± 1,85 | 11,42 ± 3,45 | 9,75 ± 2,01 |
| Total de embriões viáveis | 4,58 ± 1,53 | 8,42 ± 2,44 | 6,58 ± 1,32 |
| Taxa de viabilidade (%) | 59,40 | 73,73 | 67,49 |

Não houve diferença significativa entre os grupos (p>0,05)

É importante frisar que o atraso no momento da ovulação (P-36/LH60) é benéfico para raças européias, porém o mesmo não ocorre com a raça Nelore, onde esta modificação no protocolo P-36 promove diminuição no número de embriões viáveis (Baruselli et al., 2006). Portanto, na raça Nelore o melhor protocolo continua a ser o protocolo P-36 original (P36/LH48).

Em resumo, o protocolo P-36/LH48 facilita o manejo de doadoras de embriões e origina taxas de embriões viáveis pelo menos tão boas quanto às obtidas após a utilização de outros tratamentos superovulatórios, que requerem a detecção do cio. Nas raças

européias testadas até o momento (Holandesa e Angus), e também na raça Bonsmara, recomenda-se atrasar por 12 h a aplicação do agente indutor da ovulação (protocolo P-36/LH60).

AGRADECIMENTOS:

Somos gratos aos Srs. Renato Eugênio de Rezende Barbosa e Paulo Fragnito (Agropecuária Campanário) por disponibilizarem o uso de animais para vários experimentos e a FAPESP pelo auxílio financeiro e bolsas para M.F.G. Nogueira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- BARCELOS ACZ, SATRAPA RA, NOGUEIRA MFG, BARROS CM. Protocolo superestimulatório P-36 na raça Bonsmara: uso de eCG e atraso na indução da ovulação com LH. *Acta Scientiae Veterinariae* 2006; 34 (supl.1): 514 (resumo).
- BARROS CM, NOGUEIRA MFG. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2001; 56: 1483-1496.
- BARROS CM, NOGUEIRA MFG. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. *Embryo Transfer Newsletter* 2005; 23: 5-9.
- BARUSELLI PS, REIS EL, MARQUES MO, NASSER LF, BÓ GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*. 2004; 82-83: 479-86.
- BARUSELLI PS, DE SÁ FILHO MF, MARTINS CM, NASSER LF, NOGUEIRA MFG, BARROS CM, BÓ GA. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2006; 65: 77-88.
- 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.
- 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.
- 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. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. Theriogenology 1989; 31: 183.
- ELSDEN RP, HASLER JF, SEIDEL GE JR. Non-surgical recovery of bovine eggs. Theriogenology 1976; 6: 523.
- Gonzalez A, Wang H, Carruthers TD, Murphy BD, Maplettoft 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.
- LIU J, SIROIS J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. Biol Reprod 1998; 58: 1527-32.
- 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.
- MEIRELLES FV, ROSA AJM, LÔBO BR. Is the American Zebu really *Bos indicus*? Genetics and Molecular Biology 1999; 22: 543-47.
- 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;31:509 (abstract).
- NOGUEIRA MFG & BARROS CM. Aspectos práticos e perspectivas futuras do modelo P-36 de superovulação em doadoras da raça Nelore. Acta Scientiae Veterinariae 2006; 34(supl.1): 25-29.
- NOGUEIRA M.F.G., FRAGNITO P.S., TRINCA L.A., BARROS, C.M. The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production following fixed-time AI in a progestin-based superstimulatory protocol in Nelore cattle. Theriogenology, 2006 (submitted).
- PINHEIRO OL, BARROS CM, FIGUEIREDO RA, VALLE ER, ENCARNAÇÃO RO, PADOVANI CR. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂α or norgestomet and estradiol valerate. Theriogenology 1998; 49: 667-81.
- ROBERTS AJ, GRIZZLE JM, ECHTERNKAMP SE. Follicular development and superovulation response in cows administered 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.
- 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.
- 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.
- XU Z, GARVERICK HA, SMITH GW, SMITH MF, HAMILTON SA, YOUNGQUIST RS. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. Biol Reprod 1995; 53: 951-7.

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.

SITUAÇÃO ATUAL DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR E DA FECUNDAÇÃO IN VITRO

Seneda MM¹, Santos GMG¹, Silva KCF¹, Spegiorin MR^{1,2}, Blaschi W¹, Pontes JHF²

INTRODUÇÃO

A aspiração folicular (AF) e a produção in vitro de embriões (PIVE) podem ser consideradas técnicas estabilizadas. Estima-se que mais de 200.000 bezerros tenham nascido a partir da associação destas duas técnicas em todo o mundo, e números como 50 bezerros a partir de uma única doadora são relativamente obtidos sem extremas dificuldades [1]. O Brasil é o primeiro país do mundo em número de embriões produzidos in vitro. Durante o ano de 2003, mais de 60.000 embriões foram gerados por esse método e aproximadamente 87.000 embriões pelo método in vivo [2]. Apesar do expressivo número de embriões obtidos por lavagem uterina, verifica-se uma clara tendência de continuidade ao aumento de embriões produzidos in vitro. Em muitos países, a aspiração folicular e produção in vitro de embriões somente são utilizadas como última opção para obtenção de embriões, quando a recuperação pela lavagem uterina é inviável. No entanto, no Brasil, a produção in vitro de embriões é muitas vezes a primeira opção para a multiplicação de animais de interesse zootécnico e/ou comercial, e isto certamente tem relação com o predomínio da raça Nelore no plantel nacional. Para fêmeas Nelore, pode-se admitir uma maior quantidade de embriões por procedimento com a PIVE, quando comparada à colheita e transferência de embriões [3]. Esta maior eficiência pelo método de produção in vitro de embriões, a grande quantidade de laboratórios em atividade e a valorização da raça Nelore estão relacionados com a supremacia brasileira desta biotécnica.

Após duas décadas de atividades, tanto a aspiração folicular quanto a produção in vitro de embriões apresentam poucos obstáculos quanto à parte técnica. Os principais desafios de hoje, em termos operacionais, referem-se às questões de maximizar eficiência, agregar outras biotécnicas e evitar oscilações nos resultados. Já no contexto acadêmico, a compreensão dos mecanismos epigenéticos envolvidos no início da atividade embrionária, bem como a elevada produção de oócitos da raça Nelore figuram como questões a serem melhor compreendidas.

Neste artigo, será feita uma abordagem de alguns dos principais aspectos aplicados nos cenários da aspiração folicular e produção in vitro de embriões.

APARATO TÉCNICO DA ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Após uma evolução técnica considerável de procedimentos poucos eficientes, como laparotomia, colpotomia, laparoscopia transvaginal ou paralombar [4,5] a aspiração folicular encontra-se relativamente estabilizada quanto ao uso de equipamentos e aparatos técnicos. Após várias adaptações desde o primeiro relato de descrição da aspiração folicular, ou Ovum pick up (OPU) [6], atualmente há pouca expectativa de mudanças na técnica, pois grande é a eficiência atual no procedimento. Uma dupla bem treinada é capaz de promover aspiração folicular e seleção de oócitos de aproximadamente 20 vacas por dia, número altamente satisfatório e capaz de gerar suficiente demanda para as etapas seguintes da produção in vitro de embriões. Algumas situações ainda requerem adaptações, como a aspiração de bezerras pré-

¹Departamento de Clínicas Veterinárias – Universidade Estadual de Londrina

²In Vito Brasil Ltda

púberes. No entanto, a demanda para estes casos é bastante pequena e provavelmente permanecerá restrita a ocorrências particulares. Curiosamente, o aprimoramento para aspiração folicular em bezerras talvez venha do crescimento da produção in vitro de embriões verificado em outra espécie – ovina – na qual também não é possível fazer a manipulação transretal.

Uma importante conquista brasileira refere-se ao pioneirismo da utilização do transdutor endo-vaginal humano, ou micro-convexo. Esta probe mostrou-se altamente adequada às condições anatômicas de vacas pequenas e novilhas pré-púberes, além de permitir ótima visualização dos folículos em vaca, pela facilidade de manipulação ovariana, além de apresentar uma imagem com alta resolução e possuir imagem com grande ângulo de abertura [7]. Para aqueles profissionais interessados em acrescentar a aspiração folicular de forma gradativa em sua rotina de trabalho, o transdutor linear continua sendo uma opção interessante [8]. Apesar da restrição do linear quanto ao espaço limitado entre o transdutor e a agulha, a sua versatilidade deve ser considerada quando a utilização do ultra-som não for exclusiva para aspiração folicular. Neste caso, é possível a obtenção de resultados satisfatórios sem a necessidade de aquisição de outro transdutor.

Inicialmente, a aspiração era realizada apenas com agulhas longas (55 cm), altamente eficientes, pois produzidas especificamente para aspiração folicular [6]. Mas as desvantagens do elevado custo, a baixa eficiência quando reutilizada e as lesões ovarianas no caso de várias utilizações, conduziram sua utilização para um franco declínio no Brasil, e provavelmente deve ficar cada vez menor nos próximos anos.

Com relação às bombas de vácuo, as da empresa Handle Cook permanecem como as de máxima eficiência. No entanto, dado ao seu elevado custo, as bombas alternativas são cada vez mais comuns. Bombas de aspiração odontológica, de fluidos endotraqueais e de infusão controlada (Tabela 1) são alguns dos exemplos. 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. Cabe a cada profissional decidir pelo equipamento mais viável conforme sua atividade e disponibilidade de recursos [9].

Tabela 1. Número médio de oócitos recuperados através da OPU com a utilização de duas bombas de vácuo diferentes.

| Autor | Nº de procedimentos | Nº de oócitos recuperados | Média de oócitos viáveis/aspiração | Bomba geradora de vácuo |
|--------------------------|---------------------|---------------------------|------------------------------------|---------------------------|
| Nonato Jr. et al. (2004) | 85 | 2.270 | 26,7 | Handle Cook® |
| Rubin et al. (2004) | 28 | 704 | 25,1 | Bomba de infusão contínua |

Fonte: Seneda et al., 2005 [9]

PROTOCOLOS PARA CONTROLE DE ONDA E INCREMENTO DO CRESCIMENTO FOLICULAR

Atualmente, a aspiração folicular tem sido realizada geralmente em momentos aleatórios do ciclo estral. O principal aspecto para esta situação refere-se à praticidade desta opção para a equipe de aspiração, pois alterações no calendário podem ser feitas facilmente, sem consequências para quaisquer segmentos – pecuarista,

laboratório de PIVE, etc. No entanto, a crescente necessidade de maior eficiência e o acréscimo de demanda para situações menos favoráveis (animais com menor produção de oócitos) sinalizam para um incremento na utilização de protocolos pré-aspiração folicular.

Naturalmente, o número de folículos disponíveis para a aspiração folicular apresenta considerável variação conforme a dinâmica folicular, 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 a partir de folículos menores [10].

Apesar dos relatos em animais zebuínos [11], é importante ressaltar que a utilização 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 consequente disponibilidade de oócitos para a produção de embriões [12].

Desta forma, para animais zebuínos, os protocolos pré-aspiração têm sido considerados geralmente para situações de produção insatisfatória, e não para maximizar a produção com número de oócitos dentro da média da raça, ou seja, ao redor de 20 -25 oócitos por procedimento [25]. Dentre as situações com indicação a protocolos, destacam-se animais senis, com aderências ovarianas e com natural pequena produção de oócitos. Para estes casos, uma enorme gama de protocolos pode ser utilizada. Estes protocolos obedecem aos mesmos princípios fisiológicos dos fármacos destinados à inseminação artificial em tempo fixo (IATF), mas com algumas alterações. A principal alteração refere-se ao término do protocolo, ou seja, o momento da aspiração folicular. Uma vez que a ovulação não é desejada, e a eficiência de recuperação de oócitos é melhor com a punção de folículos pequenos [10], preconiza-se a aspiração quando os folículos se apresentam com 4 a 6 mm de diâmetro. Este padrão geralmente ocorre de 2 a 4 dias após o período esperado de emergência da onda, ou seja, de 6 a 8 dias após a aplicação inicial de estrógeno e progesterona [13].

Outra particularidade em relação aos protocolos para aspiração refere-se ao implante de progesterona utilizado. Os implantes intra-vaginais causam, em alguns animais, uma secreção vaginal mucóide. Embora esta secreção geralmente seja asséptica, decorrente de processo irritativo, sua consistência viscosa dificulta o procedimento da aspiração folicular, por causar acúmulo de muco na extremidade do aparato de aspiração, com risco de entupir a agulha. Uma alternativa para esta ocorrência é o implante de Norgestomet (Crestar), por sua indicação de ser colocado na região auricular, via sub-cutânea. Um exemplo desta utilização foi realizada sob a coordenação do Prof. Baruselli, com destaque evidente ao grupo tratado com o protocolo Benzoato de Estradiol e Norgestomet (Tabela 2).

Tabela 2. Eficiência a produção in vitro de embriões conforme tratamento para sincronização da onda de crescimento folicular. Mogi Mirim – SP, 2006.

| | OPU (n) | Oócitos (n) | | Embriões (n) | | Embriões (%) | Prenhezes (n) | | Prenhezes (%) | |
|----------------------|------------|----------------|----------------|-----------------|---------------|-----------------|------------------|---------------|------------------------|--|
| | | Total | Média / OPU | Total | Média/ OPU | | Total | Média/ OPU | Embriões/ prenhezes | |
| Controle | 23 | 484 | 21,0 | 200 | 8,7 | 41,3 | 67 | 2,9 | 33,5 | |
| Asp. FD (-3d) | 9 | 156 | 17,3 | 62 | 6,9 | 39,7 | 27 | 3,0 | 43,5 | |
| Cestar + BE+P4 (-5d) | 8 | 262 | 32,8 | 96 | 12,0 | 36,6 | 37 | 4,6 | 38,5 | |
| BE+P4 (-5d) | 11 | 264 | 24,0 | 67 | 6,1 | 25,4 | 20 | 1,8 | 29,9 | |

Fonte: Nonato Jr. et al., 2006 [14]

Ressaltamos, no entanto, a necessidade de se analisar com bastante critério dados de produção embrionária e prenhez em função de protocolos pré-aspiração. Após a obtenção dos oócitos, há uma enorme influência de outros aspectos, tais como, o processo de maturação, fecundação, o sêmen, o cultivo, as condições das receptoras, entre outros. A quantidade e qualidade dos oócitos podem ser facilmente relacionadas com o protocolo pré-aspiração. No entanto, todos as outras etapas concernentes à PIVE devem ser consideradas para se inferir que um melhor resultado de produção de embriões ou prenhezes seja decorrente do protocolo pré-aspiração.

Um outro aspecto interessante refere-se à aplicação de PGF_{2α} previamente à aspiração, para evitar-se a presença do CL ao momento da aspiração. Para analisar este aspecto, nosso grupo conduziu o seguinte experimento: aplicação de 2 mg de Benzoato de Estradiol mais 0.5 mg de PGF_{2α} e 50 mg de progesterona sintética injetável, todos via IM. Após 6 dias, procedeu-se à aspiração folicular para obtenção dos oócitos, e avaliação da presença de CL nos ovários. Os resultados foram comparados com controle da onda por aspiração folicular 3 dias antes da punção para obtenção dos oócitos. Os dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Número de aspirações, folículos, oócitos e corpos lúteos após controle da onda por aspiração do FD ou aplicação de fármacos (BE+P4) mais PGF_{2α}. Londrina, 2006.

| | OPU (n) | Folículos (n) | Oócitos (n) | Corpos Lúteos (n) |
|----------------------------|------------|------------------|----------------|-------------------------|
| Aspiração FD (- 3 dias) | 28 | 201 | 162 | 10 |
| BE+P4 (- 6 dias) | 28 | 307 | 226 | 2 |

Fonte: Bacelar et al., 2006 [13]

Obs: ambos os tratamentos receberam PGF_{2α} ao início do protocolo.

De acordo com os dados da Tabela 3, houve um aumento quanto ao número de oócitos após a utilização do controle hormonal, em comparação com a aspiração do FD como método de controle de onda. Além da maior quantidade de oócitos, nota-se uma maior eficiência na luteólise com uso de BE+P4. Este incremento de eficiência provavelmente foi decorrente da ação do BE no processo luteolítico. Considerando-se o momento da punção folicular, a ausência de CL apresentou vários aspectos favoráveis. Pode-se destacar a maior facilidade de localização e punção dos folículos, bem como uma redução de perfusão vascular, com menor captação de sangue.

Comparando-se os dados das Tabelas 2 e 3, nota-se a superior quantidade de oócitos com a utilização do Norgestomet, em relação ao uso apenas da progesterona injetável. A manutenção de uma concentração sérica de P4, possível com o uso do Crestar, possivelmente contribuiu para um maior recrutamento folicular e consequente maior número de oócitos. No entanto, como os experimentos foram realizados por duas equipes distintas, esta observação precisar ser comprovada com maior número de animais.

SÊMEN SEXADO NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

Atualmente, o método utilizado para sexagem de espermatozóides é a citometria de fluxo, baseada em uma diferença de 3,8% entre no conteúdo do DNA do espermatozóide bovino X e Y [15]. A utilização de sêmen sexado, até poucos anos atrás, parecia ser algo destinado a um longo caminho até ser uma opção ao alcance do pecuarista. No entanto, esta ferramenta já faz parte do leque de opções para incremento da eficiência reprodutiva. A produção in vitro de embriões muito tem contribuído para uma maior difusão desta biotécnica. De maneira geral, o preço do sêmen sexado ainda é pouco atrativo para uso em larga escala. Entretanto, no processo da PIVE, cada dose de sêmen tem sua utilização maximizada. Desta forma, uma expressiva demanda de doses sexadas tem como destino as centrais de PIVE, com benefícios evidentes para todas as etapas do processo.

As taxas de produção de blastocistos tendem a ser inferiores quando se utiliza o sêmen sexado [16]. No entanto, a eficiência nas etapas seguintes – taxa de prenhez e produtos nascidos – aparentemente apresenta-se similar aos embriões produzidos com sêmen convencional. Desta forma, o maior número de fêmeas nascidas poderia compensar a menor eficiência da PIVE com o uso do sêmen sexado. Os principais desafios para uma mais ampla disseminação do uso do sêmen sexado na PIVE referem-se às alternâncias de resultados. Poucos laboratórios apresentam estabilidade nos procedimentos e por isto, os meios para a fecundação in vitro e os protocolos de separação dos espermatozóides viáveis (Percoll) ainda precisam ser otimizados. Considerando-se os preços extremamente elevados do sêmen de alguns touros, mais o fato da necessidade de ajustes de individuais de protocolos para certos touros, deduz-se que um progresso mais rápido neste segmento possa ocorrer quando houver maior eficiência na sexagem de espermatozóides e menor custo por dose [17].

Na Tabela 3 pode-se notar as perspectivas favoráveis do uso desta biotécnica, pelos encorajadores resultados obtidos.

Tabela 1. Dados da utilização de sêmen sexado, referentes a procedimentos de PIVE, percentuais de gestação, índices de macho e fêmea. In Vitro Brasil Ltda, Mogi Mirim, SP, 2004-2005.

| Touro | Procedimentos PIVE (n) | Embriões produzidos (%) | Índice gestação (%) | Índice machos (%) | Índice fêmeas (%) |
|-------|---------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------|----------------------|
| A | 114 | 36,4 | 35 | 6 | 94 |
| B | 15 | 14,7 | 37,5 | 0 | 100 |
| C | 37 | 38,5 | 30,9 | 3 | 97 |
| D | 20 | 36,2 | 23,4 | 28 | 72 |
| E | 22 | 46,5 | 44,4 | 14 | 86 |
| F | 6 | 47,4 | 26,2 | 15 | 85 |
| H | 78 | 41,9 | 39,2 | 5 | 95 |
| I | 33 | 39,5 | 27,8 | 0 | 100 |
| J | 34 | 34,5 | 29,7 | 0 | 100 |
| K | 41 | 28,7 | 28,1 | 3 | 97 |
| M | 8 | 33,0 | 42,6 | 5 | 95 |

DESAFIOS, PERSPECTIVAS ACADÊMICAS E APLICADAS

Atualmente não há uma expectativa de grandes modificações na forma atual de produção in vitro de embriões. A técnica está estabilizada e os principais desafios encontram-se em minimizar as flutuações nos resultados, padronizar os meios utilizados e ampliar o conhecimento a respeito da compreensão dos mecanismos envolvidos na ativação genética durante as primeiras fases do desenvolvimento embrionário [1]. A aplicação da aspiração folicular/produção in vitro de embriões progrediu da ampliação da progênie de animais com infertilidade adquirida, até um aumento considerável na possibilidade de uma doadora gerar descendentes, quando em comparação a outras técnicas.

Uma lacuna quanto aos processos concernentes à PIVE refere-se à criopreservação dos embriões obtidos por esta técnica. Embora tenhamos resultados bastante interessantes de pesquisadores da área [18], protocolos mais otimizados e uma maior disseminação dos mesmos junto aos profissionais de campo ainda são requeridos. Uma maior fragilidade de embriões Nelore, ou complicações referentes a todo o processo de PIVE de um modo geral são algumas das hipóteses aventadas para justificar o baixo índice de desenvolvimento embrionário após a criopreservação. Aparentemente não há relação entre diferentes meios de cultivo e atividade embrionária após criopreservação [19], mas novos trabalhos com maior número de embriões poderão assegurar esta afirmativa.

Especificamente quanto à aspiração folicular, após quase vinte anos de utilização da técnica, permanecem os conceitos de ser uma alternativa simples e aplicável, viabilizando a obtenção repetida de óócitos destinados aos procedimentos in vitro. Cada vez mais aprimora-se a eficiência das aspirações para situações que exigem mais perícia do operador, tais como fêmeas gestantes e situações de infertilidade extra-ovariana, como aderências ovarianas e/ou uterinas.

No contexto acadêmico, o maior desafio referente à PIVE no Brasil refere-se, possivelmente, à questão da grande produção de óócitos em Nelore. Esta elevada quantidade é algo digno de nota, especialmente porque, considerando outros aspectos reprodutivos, as divergências entre *Bos taurus* e *Bos indicus* são discretas. Há diferenças moderadas entre o tamanho do trato reprodutivo e divergência folicular [20, 21] e, especificamente quanto à obtenção de embriões pela lavagem uterina, as médias obtidas são similares [22]. No entanto, quanto ao número de óócitos, vacas Nelore produzem, em média, 25 óócitos por sessão de aspiração folicular, sem qualquer procedimento adicional, como aplicação de FSH, BST ou controle do ciclo estral [23]. Esta média de óócitos por sessão é aproximadamente quatro vezes maior à produção obtida de vacas de raças européias [24]. Uma ressalva deve ser feita, quanto à esta elevada média de vacas Nelore. Muitas vezes as doadoras são submetidas à avaliação ovariana ultra-sonográfica antes da punção folicular. Este critério tem sido usado para seleção das doadoras com maior atividade ovariana. Evidentemente, esta seleção prévia à aspiração folicular seguramente tem contribuído para as elevadas médias de óócitos obtida em vacas Nelore. Embora o maior número de óócitos em raças zebuínas seja algo indiscutível, é importante destacar que a amostragem não é obtida de forma aleatória, mas geralmente considerando-se as fêmeas mais eficientes na produção de óócitos.

Um aspecto bastante peculiar refere-se às fêmeas capazes de produzir centenas de óócitos em uma única aspiração folicular. Há relatos de 251 (Seneda et al., dados não publicados) e até 564 óócitos obtidos em um único procedimento [25]. Considerando a possibilidade de três ondas de crescimento folicular, seria possível a projeção de mais de 1000 folículos recrutados em apenas um ciclo estral. Tal magnitude de população

folicular sugere uma discordância quanto aos números descritos da literatura, obtidos com *Bos taurus*, quanto ao total de folículos primordiais e as taxas de atresia folicular. Uma das maiores estimativas da população folicular ovariana na espécie bovina cita o número de 200.000 folículos primordiais por ovário [26]. No entanto, considerando que mais de 99,9% dos folículos sofrem atresia, principalmente na fase pré-antral, nota-se uma discrepância entre o total de folículos atribuídos a bovinos, obtidos com *Bos taurus*, e os dados de oócitos obtidos *in vivo* das fêmeas Nelore [27, 28, 29].

Uma hipótese para explicar esta discrepância seria uma quantidade muito maior de folículos primordiais em fêmeas da raça Nelore. Os trabalhos sobre quantificação de folículos primordiais na espécie bovina são anteriores à grande expansão da PIVE, situação em que veio à tona a elevada média de oócitos da raça Nelore. No entanto, apesar da reduzida amostra de trabalhos de quantificação folicular em Nelore, os dados da literatura não sinalizam claramente para uma quantidade muito maior às descrições anteriores, obtidas com *Bos taurus* [30]. Assim, embora haja a necessidade de maiores investigações na quantificação folicular em Nelore, outra hipótese poderia ser aventada, a renovação das células germinativas, conforme sugerido para a espécie murina por Johnson et al. [31,32]. Trata-se de questão extremamente polêmica, mas no cenário científico deve-se priorizar a análise imparcial das hipóteses levantadas. Desta forma, nosso grupo de trabalho encontra-se empenhado em estudar a questão da grande produção de folículos e oócitos na raça Nelore.

Como comentário final, novamente sugerimos a necessidade de se avaliar o grande impacto da produção *in vitro* de embriões no futuro da pecuária nacional, especialmente na raça Nelore. A posição de destaque do Brasil no cenário internacional deve ser acompanhada de uma análise criteriosa de todas as etapas da PIVE. Restrição ou ampliação de linhagens da raça, importação de novas famílias da raça Nelore e exportação de nosso material genético são alguns dos desafios do cenário geral. Em relação à parte aplicada, o domínio da criopreservação e maior utilização do sêmen sexado constituem o foco das companhias privadas. No contexto científico, destacam-se os estudos epigenéticos e uma melhor compreensão da enorme quantidade de folículos e oócitos da raça Nelore. Em cada uma dessas etapas, ressaltamos a necessidade de uma proposta de trabalho equilibrada entre as necessidades imediatas e as repercussões para as futuras gerações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] VAN WAGTENDONK-DE LEEUW AM. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*, v. 65, p. 914-925, 2006.
- [2] THIBIER, M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. *International Embryo Transfer Society Newsletter*, 12-19, 2004.
- [3] NONATO JUNIOR, I.; RUFINO, F.A., SANCHES, B.V., PONTES, J. H. F.; UVO, S.; ERENO JUNIOR, J. C.; SENEDA, M.M. Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32, p. 95, 2004. (Abstract).
- [4] REICHENBACH H.D. Embryo transfer and cryopreservation in cattle: practical considerations. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, p. 28-50, 2003.
- [5] LAMBERT, R. D., SIRARD, M.A., BERNARD, C., BÉLAND, R., RIOUX, J.E., LECLERC, P., MÉNARD, D.P., BEDOYA, M. *In vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vivo* and collected at laparoscopy. *Theriogenology*, v. 25, n. 01, p. 117-133, 1986.
- [6] 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.

- [7] AERTS, J.M.J., LEROY, J.L.M.R., BOLS, P.E.J. The use of an endovaginal ultrasound micro-convex array transducer adapted for tranvaginal oocyte retrieval in the cow. Abstracts of 15th International Congress on Animal Reproduction, Porto Seguro, Brasil v.02, p.435, 2004. (Abstract).
- [8] 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.
- [9] SENEDA, M. M. ; RUBIN, K C P; BLASCHI, W; LISBOA, L A; PONTES, J H F. Utilização de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para a aspiração folicular transvaginal guiada pela ultra-sonografia. *Revista de educação continuada do CRMV-SP*, v. 8, n. 2, p. 168-175, 2005.
- [10] 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.
- [11] 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).
- [12] BLASCHI, W., ANDRADE, E.R., NONATO JUNIOR, I.; PONTES, J. H. F.; ERENO JUNIOR, J. C.; UVO, S.; SENEDA, M.M. Utilização prévia do Pluset na aspiração follicular: impacto na produção in vitro de embriões em vacas Bos indicus . *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 32, p. 186, 2004. (Abstract).
- [13] BACELAR, DS; PADILHA, LC; BARUSELLI, PS; SENEDA, MM. Incremento da obtenção de óócitos em vacas Nelore com utilização de um protocolo com progesterona injetável. *Acta Scientiae Veterinariae* 34 (Suplemento 1), p. 461, 2006.
- [14] NONATO JR, I; PONTES JHF; ERENO JR JC, GIMENES LUG, TORRES JR JRS; BARUSELLI, PS. Utilização de progesterona exógena na recuperação de óócitos obtidos por aspiração folicular, produção de embriões e prenhez em vacas Nelore – resultados preliminares. *Acta Scientiae Veterinariae* 34 (Suplemento 1), p. 452, 2006.
- [15] JOHNSON LA, WELCH GR, RENS W. The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI. *Journal of Animal Science* v. 77, p. 220-231, 1999.
- [16] MERTON JS, HARING RM, STAP J, HOEBE RA, ATEN JA. Effect of flow cytometrically sorted frozen/thawed semen on sucess rate of in vitro bovine embryo production. *Theriogenology* 1997; 47:295 [abstract].
- [17] VAN VLECK LD. Potential genetic impact of artificial insemination, sex selection, embryo transfer, cloning, and selfing in dairy cattle. In: Brackett BG, Seidel GE, Seidel SM, editors. *New technologies in animal breeding*. New York: Academic Press; p. 222-42, 1981.
- [18] WERLICH D.E., BARRETA M.H., MARTINS L.T., VIEIRA A.D., MORAES A.N. & MEZZALIRA A. Embriões bovinos PIV vitrificados em diferentes soluções crioprotetoras... *Acta Scientiae Veterinariae*. 34: 77-82, 2006.
- [19] VIEIRA A.D., FORELL F., FELTRIN C., SANTOS L.C. & RODRIGUES J.L. Bovine in vitro embryo production protocol: does it really influence embryo cryotolerance? *Acta Scientiae Veterinariae*. 34: 57-63, 2006.
- [20] ADAYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in Bos taurus and Bos indicus heifers. *Theriogenology*, 14:422-420, 1980.
- [21] SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (Bos indicus) heifers and cows. *Theriogenology*, 63:2382-2394, 2005.
- [22] CASTRO NETO, A.S.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M.; SENEDA, M.M.; PERRI, S.H.; GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology*, 63:1249-1255, 2005.
- [23] RUBIN, K.C.P; RIGO, A.G.; SCHROEDER, R.V.; SILVA, R.C.P; MARQUES, M.O.; SENEDA, M.M. Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para obtenção in vivo de óócitos bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32, p.121, 2004.
- [24] RUBIN, K.C.P; PONTES, J.H.F.; NONATO JR., ERENO JR., J.C.; PANSARD, H.; SENEDA, M.M. Influência do grau de sangue Nelore na produção in vivo de óócitos. *Acta Scientiae Veterinariae*, 33, p. 183, 2005.

- [25] SANTOS, R.G.; SOTO, M.A.B.; LOURENÇO, R.X.; STRANIERI, P.; BISHOP, W.; ACCORSI, M.F.; WATANABE, M.R.; DAYAN, A.; WATANABE, Y.F. Aspiração folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de óocitos recuperados. Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, p. 79, 2005.
- [26] ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.*, 25:800-805, 1966.
- [27] SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. *Rec. Méd. Vét.*, 157 :29-38, 1981.
- [28] THIBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. *International Embryo Transfer Society Newsletter*, 12-19, 2004.
- [29] DRIANCOURT, M.A.; CAHILL, L.P.; BINDON, B.M. Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes. *J. Reprod. Fert.*, 73:93-107, 1985.
- [30] FIGUEIREDO, J.R. Isolement, caractérisation et culture et follicules préantraux chez les bovins. Liege-Belgique, 1995. 113 p. Tese - Université de Liège.
- [31] LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. *Theriogenology*, 57:1467–83, 2002.
- [32] JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J.K.; TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 428:145-150, 2004.
- [33] JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H.J.; ADAMS, G.B.; NIKURA, Y.; TSCHUDY, K.S.; TILLY, J.C.; CORTES, M.L.; EORKERT, R.; SPITZER, T.; IACOMINI, J.; SCADDEN, D.T.; TILLY, J.L. Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood. *Cell*, 122:303-315, 2005.

CLONING AND TRANSGENIC ANIMALS FOR AGRICULTURE

Matthew B. Wheeler¹

INTRODUCTION

Production of transgenic livestock provides a method to rapidly introduce "new" genes into cattle without crossbreeding. It is a more extreme methodology, but in essence, not really different from crossbreeding or genetic selection in its result. One of the most common methods used to produce transgenic animals is the injection of "foreign" DNA sequences into the pronucleus of recently fertilized zygotes (9, 13 18, 32, 35, 57, 80, 81). This allows the DNA to integrate randomly into a chromosome and subsequently be expressed in somatic and germ tissues of the resultant individual.

Cloning or nuclear transfer is one of the more recent methods used to make transgenic animals. Further, the use of cloning techniques may have the potential to increase the number of offspring from a single female into the thousands and possibly the tens of thousands (7). Since the famous cloned sheep "Dolly" was born (87), nuclear transfer technology has become another methodology available for the production of transgenic animals. The nuclear transfer procedure utilizes either *in vitro* or *in vivo* oocytes as the cytoplasm donor (cytoplast). The genetic material of the cytoplasm is removed (enucleation) leaving only the cytoplasm. Following the enucleation of the oocyte, a donor nucleus (karyoplast) is injected into the perivitelline space of the enucleated oocyte (cytoplast). The enucleated oocyte and the donor cell are fused by electrofusion. Electrofusion of the cytoplasm and the karyoplast is highly species-dependent with regards to the duration of fusion, fusion medium, equilibration to the fusion medium and amplitude of the pulse. After fusion of the donor nuclei and the enucleated oocyte, the oocyte is activated by either chemical or electrical stimulation. Successful activation initiates development to the blastocyst stage, followed by their transfer into a suitable recipient.

Prior to the birth of "Dolly", investigations were conducted on assessments of cytoplasm and karyoplast. Prather *et. al.* (52) investigated the use of pig zygotes as the cytoplasm in pig nuclear transfer. There are several advantages to using the zygote as the cytoplasm, one of which is the decreased level of maturation promoting factor (MPF). Another advantage is that the cytoplasm is activated and ready for subsequent development to the various stages. However, there are disadvantages to the use of zygotes as cytoplasm donors. The major disadvantage is the need to remove large portions of the cytoplasm. The first successful cloned pig was produced using the zygote as the cytoplasm. However, bovine and murine systems use metaphase II oocytes as the cytoplasm. The advantage of using an oocyte is that only a small amount of cytoplasm needs to be removed. Despite this advantage, there is a disadvantage to using an oocyte in that the cytoplasm must be activated.

Before 1997, nuclear transfer was limited only to karyoplasts from embryonic origin (7, 52, 53, 63, 68, 72, 75, 76, 86). The karyoplast of choice were from blastomeres and the inner cell mass from preimplantation stage embryos. "Dolly" showed that somatic cells could also be used as donor nuclei in nuclear transfer. After the successful production of "Dolly", various cell types have been investigated for the production of cloned animals, including trophectodermal cells (76), mesenchymal stem cells (41), cumulus and oviductal cells (40, 82), and fetal fibroblast cells (17, 87).

The obvious question is "WHY MAKE TRANSGENIC LIVESTOCK?" The answer is not

¹Laboratory of Molecular Embryology, Department of Animal Sciences, University of Illinois, Urbana, IL 61801, U.S.A.

so simple; however, some of the reasons are to: 1) gain new knowledge, 2) decipher the genetic code, 3) study the genetic control of physiological systems, 4) build genetic disease models, 5) improve animal production traits, and 6) produce new animal products. This question is sure to be debated, refined and pondered for a long time.

There are many potential applications of transgenic methodology to develop new and improved strains of livestock. Practical applications of transgenics in livestock production include enhanced prolificacy and reproductive performance, increased feed utilization and growth rate, improved carcass composition, improved milk production and/or composition and increased disease resistance. Development of transgenic farm animals will allow more flexibility in direct genetic manipulation of livestock. Gene transfer is a beneficial way of modifying the genome of domestic livestock. The use of these methodologies will have a great impact toward improving the efficiency of animal agriculture.

APPLICATIONS OF TRANSGENIC ANIMALS IN AGRICULTURE

There are numerous potential applications of transgenic methodology to develop new or altered strains of agriculturally important livestock. Practical applications of transgenics in livestock production include improved milk production and composition, increased growth rate, improved feed utilization, improved carcass composition, increased disease resistance, enhanced reproductive performance, increased prolificacy, and altered cell and tissue characteristics for biomedical research (84) and manufacturing. The production of transgenic swine with human growth hormone (GH) serves as an excellent example of the value of this technology (11, 35). Transgenic alteration of milk composition has the potential to enhance the production of certain proteins and/or growth factors deficient in milk (12). The improvement of the nutrient or therapeutic value of milk may have a profound impact on survival and growth of newborn in both humans and animals. Additionally, other animal products, such as eggs and meat could benefit from the use of transgenesis. Genes could be targeted that could result in continuous egg production in chickens, and combat reproductive senescence not only in chicken but also in other species as a result of physiologic events such as lactation, anorexia, poor nutrition and season of the year (66).

The application of transgenics is being utilized by commercial aquaculture to enhance the growth of commercially valuable fish. Fish embryos have been microinjected with a DNA construct containing either bovine or Chinook salmon GH. Another possibility is that we may be able to improve the nutritional value of fish. Recent studies have shown that human consumption of fish containing omega-3 fatty acid seems to decrease the occurrence of coronary heart disease (66). Transgenic technology could provide a method to transfer the nutritionally beneficial traits to other foodstuffs.

MODIFICATION OF MILK

Advances in recombinant DNA technology have provided the opportunity either to change the composition of milk or to produce entirely novel proteins in milk. These changes may add value to, as well as increase the potential uses of milk.

The improvement of livestock growth or survivability through the modification of milk composition requires production of transgenic animals that: 1) produce a greater quantity of milk; 2) produce milk of higher nutrient content; or 3) produce milk that contains a beneficial "nutriceutical" protein. The major nutrients in milk are protein, fat

and lactose. By elevating any of these components, we can impact growth and health of the developing offspring. In many production species such as cattle, sheep and goats, the nutrients available to the young may not be limiting. However, milk production in the sow limits piglet growth and therefore pig production (36). In swine, 44% of the growth rate of the developing piglets can be attributed to yield and composition of the sow's milk (45). Methods that increase the growth of piglets during suckling result in an increase in weaning weights, a decrease in the number of days required to reach market weight, and thus a decrease in the amount of feed needed for the animals to reach market weight.

The high percentage in growth rate attributed to milk indicates the potential usefulness of this technology to the developing piglet. An approach to increase milk production in pigs may be accomplished by alteration of milk components such as lactose, a major osmole of milk in mammary gland cells. The over expression of lactose in the milk of pigs will increase the carbohydrate intake by the developing young, resulting in improvement of piglet growth (51).

Cattle, sheep and goats used for meat production may also benefit from increased milk yield or composition. In tropical climates, *Bos indicus* cattle breeds do not produce copious quantities of milk. Improvement in milk yield by as little as 2–4 liters per day may have a profound affect on weaning weights in cattle such as the Nelore breed in Brazil. Similar comparisons can be made with improving weaning weights in meat type breeds like the Texel sheep and Boer goat. This application of transgenic technology could lead to improved growth and survival of offspring.

A second mechanism by which the alteration of milk composition may affect animal growth is the addition or supplementation of beneficial hormones, growth factors or bioactive factors to the milk through the use of transgenic animals. It has been suggested that bioactive substances in milk possess important functions in the neonate with regard to regulation of growth, development and maturation of the gut, immune system and endocrine organs (33). Transgenic alteration of milk composition has the potential to enhance the production of certain proteins and/or growth factors that are deficient in milk (83). The over expression of a number of these proteins in milk through the use of transgenic animals may improve growth, development, health and survivability of the developing offspring. Some factors that have been suggested to have important biological functions in the neonate are obtained through milk included IGF-I, EGF, TGF- β and lactoferrin (33). Recently, it has been suggested that oral administration of IGF-I may also improve nutrient absorptive function (1).

Other properties of milk that bare consideration for modifications are those that affect human and animal health. It has been shown that the preformed specific antibodies can be produced in transgenic animals (73). It should be possible to produce antibodies in the mammary gland that are capable of preventing a mastitis infection in cattle, sheep and goats and MMA (mastitis-metritis-agalactia) in pigs, and/or antibodies that aid in the prevention of domestic animal or human diseases (59). Another example is to increase proteins that have physiological roles within the mammary gland itself such as lysozyme (46) or other anti-microbial peptides.

It is important to consider the use of transgenics to increase specific component(s), which are already present in milk for manufacturing purposes. An example might be to increase one of the casein components in milk. This could increase the value of milk in manufacturing processes such as production of cheese or yogurt. One might also alter the physical properties of a protein such as β -casein or κ -casein (10). By increasing the glycosylation of β -casein (15), one could increase β -casein solubility in milk. Increasing the β -casein concentration of milk would reduce the time required for rennet coagulation and whey expulsion. This would produce firmer curds that are important in cheese

making. The deletion of phosphate groups from β -casein would result in softer cheeses. Changes in other physical properties could result in dairy foods with improved characteristics, such as better tasting low fat cheese (6). Increasing the κ -casein content would result in increased thermal stability of milk that could improve manufacturing properties as well as storage properties of fluid milk and milk products. It may ultimately be possible to increase the concentration of milk components while maintaining a constant volume. This could lead to greater product yield, i.e. more protein, fat or carbohydrate from a liter of milk. This would also aid in manufacturing processes as well as potentially decreasing transportation costs of the more concentrated products in fluid milk. The end result would be more saleable product for the dairy producer.

The overall result of the transgenic modification of milk will be the creation of more uses of milk and milk products in both agriculture and medicine (14, 26, 77, 78, 88). This is truly a "value-added" opportunity for animal agriculture by increasing the concentrations of existing proteins or producing entirely new proteins in milk.

MODIFICATION OF GROWTH AND CARCASS COMPOSITION

The production of transgenic livestock has been instrumental in providing new insights into the mechanisms of gene action implicated in the control of growth (11, 25, 28, 34, 50, 55, 58, 61, 62, 65, 79, 85). Using transgenic technology it is possible to manipulate known growth factors, growth factor receptors and growth modulators. Transgenic mice, sheep and pigs have been used to examine postnatal growth of mammals. GH and IGF genes have been incorporated and expressed at various levels in transgenic animals (66). Transgenic livestock as well as salmon and catfish have been produced which contain an exogenous GH gene. This type of work enabled the study of chronic expression of these hormones on growth in mammals (66) and fish. Results from one study have shown that an increase in human GH leads to enhancement of growth and feed efficiency in pigs, yet is accompanied by side effects such as an increased incidence of arthritis and bone thickening (57). Similar increases in growth have been shown with the porcine GH (pGH) gene (79). In fish, increased GH levels have lead to dramatic (30–40%) increase in growth rates in catfish by introducing salmon GH into these animals (24). Introduction of salmonid GH constructs has resulted in a 5–11-fold increase in weight after 1 year of growth (20, 21, 23). This illustrates the point that increased growth rate and ultimately increased protein production per animal can be achieved via transgenic methodology. Several other genes have also been introduced into transgenic pigs in an effort to alter growth. An alternative approach was performed by the introduction of the chicken 'ski' oncogene, which was previously shown to cause hypertrophy of numerous muscles, while reducing body fat (74). This strategy, however, has resulted in limited success although muscle hypertrophy has been observed in some transgenic pigs (60) and transgenic cattle (8).

The Rendement Napole (RN) or Acid-Meat gene has been implicated in lower processing yields in several lines of Hampshire and Hampshire crossbred pigs. The low pH in the carcass post-mortem results in differences in pork quality that can be distinguished by various properties such as water holding capacity, color, marbling, firmness, shear force and processing yield. "Knocking-out" the RN gene (once it is identified and sequenced) may provide a method to alter the glycolytic potential, post-mortem pH, and, thereby, meat quality in this species. Other specific loci, which may affect growth patterns, are the ryanodine receptor (formerly the halothane sensitivity gene locus, *Hal*; 30), the *myo-D* (37, 70), GH releasing factor, high affinity IGF binding

proteins (IGFBP-1 to IGFBP-6), the sheep callipyge (69) and the myostatin (growth/differentiation factor-8, GDF-8; 47) genes. Based on a recent report in the mouse (47) the myostatin gene is an exceptionally intriguing potential locus for "knock-out" using ES cells in meat producing species. The loss of the myostatin protein results in an increase in lean muscle mass. Mice lacking this gene have enlarged shoulders and hips. The increased skeletal muscle mass is widespread throughout the carcass and appears grossly normal. Individual muscle groups from homozygous knockouts have 2–3 times the weight of control animals. Fat content was comparable in both the wild type and mutant genotypes (47). Researchers concluded that a large part of the observed increase in skeletal muscle mass was due to muscle cell hyperplasia. Certainly, there are numerous potential genes related to growth, including growth factors, receptors or modulators which have not been used, but may be of practical importance in producing transgenic livestock with increased growth rates and/or feed efficiencies.

Another aspect of manipulating carcass composition is that of altering the fat or cholesterol composition of the carcass. By altering the metabolism or uptake of cholesterol and/or fatty acids, the content of fat and cholesterol of meats, eggs and cheeses could be lowered.

There is also the possibility of introducing beneficial fats such as the omega-3 fatty acids from fish or other animals into our livestock (42). Potential targets are enzymes in the cholesterol and fat biosynthesis pathways such as cholesterol 7-alpha hydroxylase (19), hydroxy-methylglutaryl Coenzyme A (HMG-CoA) reductase, fatty acid synthetase and lipoprotein lipase. In addition, receptors such as the low-density lipoprotein (LDL) receptor gene and hormones like leptin are potential targets that would decrease fat and cholesterol in animal products.

The use of transgenic technology to modify feed efficiency and/or appetite could profoundly impact livestock production. Again, increased uptake of nutrients in the digestive tract, by alteration of the enzyme profiles in the gut, could increase feed efficiency. The ability to introduce enzymes such as phytase or xylanase into the gut of species where it is not normally present such as swine or poultry is particularly attractive. The introduction of phytase would increase the bioavailability of phosphorus from phytic acid in corn and soy products. Golovan et al. (31) reported the production of transgenic pigs expressing salivary phytase as early as 7 days of age. The salivary phytase provided essentially complete digestion of the dietary phytate phosphorus in addition to reducing phosphorus output by up to 75%. Furthermore, transgenic pigs required almost no inorganic phosphorus supplementation to the diet to achieve normal growth. The use of phytase transgenic pigs in commercial pork production could result in decreased environmental phosphorus pollution from livestock operations.

Finally, the introduction of cellulolytic enzymes into the digestive tracts of non-ruminants could allow for increased digestion of plant cell wall material. This would allow for the increased utilization of fibrous feedstuffs in the diets of poultry and swine. The ultimate result would be decreased competition with humans for cereal grains and an increase in the potential feedstuffs, which could be used for these livestock species.

MODIFICATION OF DISEASE RESISTANCE

A very interesting aspect of agricultural transgenics is the potential to increase disease resistance by introducing specific genes into livestock. Identification of single genes in the major histocompatibility complex (MHC), which influence the immune response, was instrumental in the recognition of the genetic basis of disease resistance/susceptibility

(4). The application of transgenic methodology to specific aspects of the immune system should provide opportunities to genetically engineer livestock with superior disease resistance.

It has only been realized recently that there are many aspects of disease resistance or susceptibility in livestock that are genetically determined (44). However, little information exists regarding the roles of specific genes in the immune or other systems in the etiology of diseases with economic importance in livestock species (27). Embryonic cells and/or NT will be very useful for manipulation of genes or large clusters of genes from the MHC. The use of ES, EG or somatic cells with NT will allow transfer and integration of much larger (>100 kb) DNA fragments than previously possible with pronuclear injection. Large yeast artificial chromosome (YAC) vectors containing extremely large genes (>400 kb) have been transfected into ES cells and produced germ line transgenics (16, 43). Manipulation of the MHC in farm animals through ES cells or NT transgenics could have a major beneficial effect on disease resistance for livestock producers.

One specific example where transgenesis has been applied to disease resistance in livestock is the attempt to produce of pigs that are resistant to influenza. Previously, mice and mouse fibroblast cell lines that contain the Mx 1 protein were shown to be resistant to infection with influenza virus (34, 71). Muller et al. (49) reported the production of transgenic piglets after introduction of an SV40:Mx construct. However, they also reported that a permanent high level of Mx 1 protein synthesis might be detrimental to the pigs. Further, all the transgenic piglets born were found to have rearrangements in the integrated transgenes, which abolished protein synthesis in the live piglets (49). Although, this particular study was not successful in producing transgenic pigs resistant to influenza, this manipulation is an example of how transgenesis could be used to increase disease resistance in livestock. It also shows that there needs to be further research in this important area. Another example is cattle resistant to mastitis. Mastitis is an infectious disease of the mammary gland that causes decreased milk production and lost productivity. Further, treatment and prevention of mastitis is costly both monetarily and in increased labor. The transgenic dairy cows that secrete lysostaphin into their milk have been produced to address the mastitis issue. Lysostaphin is an antimicrobial peptide that protects mammary gland against *Staphylococcus Aureus* infection by killing the bacteria in a dose-dependent manner (22).

The application of chimeras or NT technology will enable the augmentation of beneficial alleles and/or the removal (via gene "knock-out") of undesirable alleles associated with disease resistance or susceptibility. An example is "knocking-out" the intestinal receptor for the K88 antigen. The absence of the antigen has been shown to confer resistance to both experimentally and naturally induced infection of K88-positive *E. coli* (29). Potential areas of investigation include resistance to: 1) parasitic organisms such as trypanosomes and nematodes, 2) viral or bacterial organisms such as bovine leukemia virus, pseudorabies virus, foot and mouth virus, clostridium and streptococcus, and 3) genetic diseases such as deficiency of UMP synthase (DUMPS), mule foot and bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD).

The opportunity to produce animals that could self-immunize against pathogens is an exciting application of transgenic technology. The design of transgenes that would be expressed in response to specific stimuli or physiological state could produce antigens that result in immunization of the transgenic animal to that particular disease. Transgenes will be designed which respond to specific stimuli like feeding zinc or a specific antibiotic to produce antigens that could raise protective antibody titers.

In the future we may be able to produce prion-free, scrapie-free and BSE-free livestock

using the genetics from naturally resistant animals in cloning schemes. An example of this application is the production of transgenic mice expressing either the human or bovine prion protein. Each of these mouse strains was inoculated with the prions that cause bovine spongiform encephalopathy (BSE) or with a variant of Creutzfeldt-Jakob disease (vCJD). BSE was transmitted to the mice containing the bovine prion protein but was transmitted to transgenic mice containing the human prion protein (5). However, all three transgenic mouse lines containing the human prion protein showed transmission of the disease when inoculated with vCJD (5). Another example of this potential application is the production of fetuses that are resistant to brucellosis (67). This is only a partial list of organisms or genetic diseases that decrease production efficiency and may also be targets for manipulation via transgenic methodologies.

MODIFICATION OF REPRODUCTIVE PERFORMANCE AND PROLIFICACY

Several potential genes have recently been identified which may profoundly affect reproductive performance and prolificacy. These include the estrogen receptor (ESR) and the Boroola fecundity (FECB) genes. Rothschild et al. (64) have reported an association of a polymorphism in the ESR gene with litter size in pigs. They found a difference of 1.4 more pigs born per litter between the two homozygous genotypes. Introduction of a mutated or polymorphic ESR gene could increase litter size in a number of diverse breeds of pigs. A single major autosomal gene for fecundity, the FECB gene, which allows for increased ovulation rate, has been identified in Merino sheep (54). Each copy of the gene has been shown to increase ovulation rate by approximately 1.5 ova, although the increase in litter size is not completely additive (54). Production of transgenic sheep containing the appropriate FECB allele could increase fecundity in a number of diverse breeds. Identification of additional genes involved in prolificacy and fecundity from hyperprolific breeds/strains of swine (Meishan); sheep (Finnish Landrace) and cattle (high twinning) will provide additional opportunities to increase reproductive performance. Other transgenic applications in reproduction could be a visual indicator of estrus in farm animals. In the baboon, estrogen levels increase at the time of estrus making their posterior bright red. Transgenic pigs could be made to have bright red posteriors at the time of estrus (66). This type of transgenic pigs could save swine producers time, money and possibly increase conception rates.

The use of the so called "suicide genes" to specifically kill cells could be a great benefit to livestock production. These genes, once incorporated into a cell, can be stimulated or induced to initiate apoptosis or programmed cell death. The incorporation of such strategies into the production of transgenic animals could allow for precise control over the reproduction of certain strains and even specific sex distributions of livestock. An example would be using a testis specific promoter that when expressed would kill "Y" chromosome bearing sperm in the case of sex selection and would kill all sperm in the case of control of reproduction. Similar strategies could be envisioned for female transgenics. This type of manipulation could produce sterile individuals that could only be used for food production without fear of an accidental release of a reproductively competent transgenic animal into the environment. A good application would be the use of these strategies in the production of transgenic salmon, trout and catfish. The use of suicide genes could also limit the breeding of valuable transgenic livestock by inappropriate parties. This would offer some protection to the large investment usually required to develop and produce such animals.

The manipulation of reproductive processes using transgenic methodologies is only beginning and should be a very rich area for investigation in the future.

MODIFICATION OF FIBER AND HAIR

The control of the quality, color, yield and even ease of harvest of hair, wool and fiber for fabric and yarn production has been an area of focus for transgenic manipulation in livestock. The manipulation of the quality, length, fineness and crimp of the wool and hair fiber from sheep and goats has been examined using transgenic methods (38, 56). Other aspects that transgenic methods will allow modification of are increasing the elasticity of the fiber and increasing the fiber strength (3). In the future transgenic manipulation of wool will focus on the surface of the fibers. Decreasing the surface interaction could decrease shrinkage of garments made from such fibers (2).

Another application of this technology is the efforts to induce sheep to shed their wool at specific times to alleviate the need for hand shearing of fiber producing animals (38, 56). Genes such as EGF with inducible promoters have been introduced into sheep (38). The idea is that when EGF expression is induced, a weak spot is produced in the wool fiber that allows the fleece to be removed with hand pressure. The fleece can literally be peeled off without the need for metal shears or clippers. This would greatly reduce the expense of wool harvest. Similar strategies could be developed for mohair goats, alpacas, camels and other fiber-producing animals.

A very novel approach to produce useful fiber has been recently accomplished using the milk of transgenic goats (39). Spiders that produce orb-webs synthesize as many as seven different types of silk used in making these webs. Each of these silks have very specialized mechanical properties that make them distinct from other synthetic and natural fibers (39). One of the most durable varieties is dragline silk. This material can be elongated up to 35% and has tensile properties close to those of the synthetic fiber Kevlar™. This silk has the energy absorbing capabilities before snapping; which exceeds those of steel. The protein monomers that assemble to produce these spider silk fibers have been produced in the milk of transgenic goats using the BELE® (Breed Early Lactate Early) goat system. The protein monomers can be assembled in the laboratory or factory to produce fibers with properties approaching those seen in the natural spider silk. The numerous potential applications of these fibers include medical devices, suture, ballistic protection, aircraft, automotive composites and clothing to name a few. The use of the mammary gland to produce protein components of fibers has a great deal of utility in producing new products or value-added products from livestock.

In summary, the potential applications of transgenic technology in livestock production are tremendous. The utility of this technology is limited only by our ability to identify appropriate genes and gene functions to manipulate in our production livestock species.

CONCERN WITH TRANSGENIC ANIMAL PRODUCTION

As one can imagine, problems occur. These problems can be: 1) unregulated expression of genes resulting in over or under production of gene products; 2) too high a copy number resulting in over expression of products; 3) possible side effects, GH transgenic swine had arthritis, altered skeletal growth, cardiomegaly, dermatitis, gastric ulcers and renal disease;

4) insertional mutations, which result in some essential biological processes being altered; 5) mosaicism in the founders, which results in transmission of the transgene to only some of the offspring; and 6) transgene integration on the "Y" chromosome which results in only males carrying the transgene. Many, if not all, of these problems are related to the transgene itself, integration site, copy number and transgene expression.

ETHICS AND ANIMAL WELFARE ISSUES ASSOCIATED WITH TRANSGENIC PRODUCTION

The technology involved in production of transgenic animals holds great promise for both agriculture and biomedicine. This as with other areas of biological research has both benefits and potential risks. The public's perception of biotechnology is different depending on its uses. Development of new vaccines to treat infectious diseases may be widely accepted whereas production of transgenic livestock that grow at a faster rate, for consumption as food for humans, may not. There is no doubt that this type of research will experience ever growing public scrutiny. It is also evident that not only self-regulation but also increasing governmental regulation is imminent. Mechanisms are already in place in a number of European countries to evaluate the ethics and animal welfare of proposed manipulation of animal genomes. The production of transgenic livestock, at present, is inefficient and financially costly. To date, improvement in productivity traits of these animals have been modest. One aspect that must be determined is whether, in the long-term, these costs are proportional to the increased productivity (48) or increased consumer benefit. It is clear that for the long-term benefit of society and the area of transgenic technology, the impacts on the environment, farmers, consumers and especially the animals must be carefully evaluated. Issues that need further discussion and evaluation are animal welfare, behavioral freedom, food safety, product labeling, freedom to adopt or decline technology and biodiversity to name a few (48). It is important for scientists using this technology to become engaged and be willing participants in the discussion and consideration of ethical issues and concerns surrounding the implementation of this work.

It is worth pointing out here that the goal of using this technology is for the *benefit* not the detriment of mankind. As previously stated use of this technology is not simple, efficient or inexpensive. Scientists using this technology are trying to develop models to study diseases, produce bio-pharmaceuticals and produce more wholesome, healthy and economical food. These studies are difficult and great care must be taken before such investigations begin. Such considerations are critical due to the time, cost, welfare, ethics, concerns, risks and benefits involved in these kinds of investigations. Realize none of these groups, farmers, consumers or scientists, are motivated to produce inappropriate medical models, ineffective or dangerous pharmaceuticals, or unsafe food. None of these groups would be around very long if that were the case. This does not mean that animal care, concern, animal welfare, ethics, societal benefit and vigilance should be ignored. On the contrary, they should be embraced when designing and conducting such investigations. Consideration of these as well as scientific issues will lead us forward to reaping the benefits from this important technology.

PERSPECTIVES

The overall goal of producing transgenic animals is to 1) increase our knowledge of biology and biomedical science and 2) increase our ability to efficiently produce milk, meat and fiber. To successfully obtain these improvements, we will test our ability to quantify desirable traits, to identify genes responsible for these traits and to introduce those genes into laboratory animals as well as production livestock. We must select and/or "re-design" populations of superior individuals, which can be propagated. The incorporation of cell, NT and recombinant DNA technologies into these strategies will continue to be an important aspect of future advances. However, we must remember that the production capability of genetically selected and/or genetically engineered

animals will only be realized when their true genetic potential is attained through appropriate environmental and management considerations.

CONCLUSION

The ultimate utility and value of transgenic technology will be limited by our ability to: 1) identify genes and appropriate regulatory sequences for the production of traits we wish to study, improve or include in development of transgenic animals; and 2) incorporate these desired genes in an appropriately expressed and regulated manner into our domestic livestock.

Finally, there are a number of new and developing technologies that will have a profound impact on the genetic improvement of livestock. The rate at which these technologies are incorporated into production schemes will determine the speed at which we will be able to achieve our goal of more efficiently producing livestock, which meets consumer and market demand.

REFERENCES

- ALEXANDER AN, CAREY HV, ORAL. IGF-I enhances nutrient and electrolytes absorption in neonatal piglet intestine. *Am J Physiol*, 1999; 277: G619–G625.
- BAWDEN CS, DUNN SM, MCLAUGHLAN CJ, NESCI A, POWELL BC, WALKER SK, ROGERS GE. Transgenesis with ovine keratin genes: expression in the sheep wool follicle for fibres with new properties. *Transgenic Res* 1999; 8: 474 abstr.
- BAWDEN CS, POWELL, BC WALKER, SK, ROGERS GE. Expression of a wool intermediate filament keratin transgene in sheep fiber alters structure. *Transgenic Res* 1998; 7: 273–287.
- BENACERRAF B, MCDEVITT HO. Histocompatibility linked immune response genes. A new class of genes that controls the formation of species immune response has been identified. *Science* 1972; 175: 273–279.
- BISHOP MT, HART P, AITCHISON L, BAYBUTT HN, PLINSTON C, THOMSON V, TUZI NL, HEAD MW, IRONSIDE JW, WILL RG, MANSON JC. Predicting susceptibility and incubation time of human-to-human transmission of vCJD. *Lancet Neurol* 2006; 5: 393–398
- BLECK GT, JIMINEZ-FLORES R, WHEELER MB. Production of transgenic animals with altered milk as a tool to modify milk composition, increase animal growth and improve reproductive performance. In: Greppi GF, Enne G (ed), *Animal Production & Biotechnology*. Elsevier, Amsterdam, 1995; 1–19.
- BONDIOLI KR, WESTHUSIN ME, LOONY CR. Production of identical bovine offspring by nuclear transfer. *Theriogenology* 1990; 33: 165-174.
- BOWEN RA, REED, M, SCHNIEKE A, SEIDEL GE, STACEY A, THOMAS WK, KAIKAWA O. Transgenic cattle resulting from biopsied embryos: expression of *c-ski* in a transgenic calf. *Biol Reprod* 1994; 50: 664–668.
- BREM G, BRENIG B, GOODMAN HM, SELDEN RC, GRAF F, KRUFF B, SPRINGMAN K, HONDELE J, MEYER J, WINNACKER E-L, KRAUBLICH H. Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene* 1985; 20: 241-245.
- BROPHY B, SMOLENSKI G, WHEELER T, WELLS D, L'HUILLIER P, LAIBLE G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of β -casein and κ -casein. *Nature* 2003; 21: 157-162.
- BREM G, BRENIG B, GOODMAN HM, SELDEN RC, GRAF F, KRUFF B, SPRINGMAN K, HONDELE J, MEYER J, WINNACKER E-L, KRAUBLICH H. Production of transgenic mice, rabbits and pigs by microinjection into pronuclei. *Zuchthygiene* 1985; 20: 241–245.
- BREMEL RD, YOM H-C, BLECK GT. Alteration of milk composition using molecular genetics. *J Dairy Sci* 1989; 72: 2826–2833.

- BRINSTER RL, CHEN HY, TRUMBAUER ME, SENEAR AW, WARREN R, PALMITER, RD. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a foreign gene into eggs. *Cell* 1981; 27: 223-231.
- BUEHLER TA, BRUYERE T, WENT DF, STRANZINGER, G, BUERKI K. Rabbit - casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. *Biotechnology* 1990; 8: 140-143.
- CHOI BK, BLECK GT, WHEELER MB, JIMINEZ-FLORES R. Genetic modification of bovine-casein and its expression in the milk of transgenic mice. *J Agric Food Chem* 1996; 44: 953-960.
- CHOI TK, HOLLENBACH PW, PEARSON BE, UDEA RM, WEDDELL GN, KURAHARA CG, WOODHOUSE CS, KAY RM, LORING J. Transgenic mice containing a human heavy chain immunoglobulin gene fragment cloned in a yeast artificial chromosome. *Nat Genet* 1993; 4: 117-123.
- CIBELLI JB, STICE SL, GOLUEKE PJ, KANE JJ, JERRY J, BLACKWELL C, PONCE DE LEON FA, ROBL JM. Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science* 1998; 280: 1256-1258.
- COSTANTINI F, LACY E. Introduction of a rabbit β -globin gene into the mouse germ line. *Nature* 1981; 294: 92-94.
- DAVIS AM, POND WG, WHEELER MB, ISHIMURA-OKA K, SU DR, LI CM, MERSMANN HJ. Distribution of alleles of the cholesterol-7-alpha-hydroxylase (CYP7) gene in pigs selected for high or low plasma total cholesterol. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217: 466-470.
- DEVLIN RH, YESAKI TY, DONALDSON EM, DU S-J, HEW CL. Extraordinary salmon growth. *Nature* 1994; 371: 209-210.
- DEVLIN RH, YESAKI TY, DONALDSON EM, DU S-J, HEW CL. Production of germline transgenic Pacific salmonids with dramatically increased growth performance. *Can J Fish Aquat Sci* 1995; 52: 1376-1384.
- DONOVAN DM, KERR DE, WALL RJ. Engineering disease resistant cattle. *Transgenic Res* 2005; 14: 563-567.
- DU SJ, GONG Z, FLECTHER GL, SCHEARS, KING MA, KING MJ, IDLER DR, HEW CL. Growth enhancement in transgenic salmon by the use of an "all fish" chimeric growth hormone gene construct. *Biotechnology* 1992; 10: 176-181.
- DUNHAM RA, DEVLIN RH. Comparison of traditional breeding and transgenesis in farmed fish with implications for growth enhancement and fitness. In: Murray JD, Anderson GB, Oberbauer AM, Mc Gloughlin MM (ed), *Transgenic Animals in Agriculture*. CABI Publishing, New York 1999; 209-230.
- EBERT K, LOW M, OVERSTROM E, BUONOMA F, ROBERTS TM, LEE A, MANDEL G, GOODMAN RA. Moloney MLV-RAT somatotropin fusion gene produces biologically active somatotropin in a transgenic pig. *Mol Endocrinol* 1988; 2: 277-283.
- EBERT KM, SELGRATH JP, DITULLIO P, DENMAN J, SMITH, TE, MEMON MA, SCHINDLER JE, MONASTERSKY GM, VITALE JA, GORDON K. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology* 1991; 9: 835-840.
- EBERT KM, SELGRATH JP. Changes in domestic livestock through genetic engineering. In: Pedersen RA, McLaren A, First NL (ed), *Current Communication in Cell and Molecular Biology: Animal Applications of Research in Mammalian Development* 1991; 233-266.
- EBERT KM, SMITH TE, BUONOMA FC, OVERSTROM EW, LOW MJ. Porcine growth hormone gene expression from viral promoters in transgenic swine. *Anim Biotechnol* 1990; 1: 145-159.
- EDFORS-LILIA I, PETERSSON H, GAHNE B. Performance of pigs with or without the intestinal receptor for Escherichia Coli K88. *Anim Prod* 1986; 42: 381-387.
- FUJII J, OTSU K, ZORZTO F, DE LEON S, KHANNA VK, WEILER JE, O'BRIAN PJ, MACLENNAN DH. Identification of a mutation in the porcine ryanodine receptor associated with malignant hyperthermia. *Science* 1991; 253: 448-451.
- GOLOVAN SP, MEIDINGER RG, AJAKAIYE A, COTTRILL M, WIEDERKEHR MZ, BARNEY DJ, PLANTE C, POLLARD JW, FAN MZ, HAYES MA, LAURSEN J, HJORTH JP, HACKER RR, PHILLIPS JP, FORSBERG CW. Pigs expressing salivary phytase produce low-phosphorus manure. *Nature Biotechnol* 2001; 19: 741-745.
- GORDON MF, SCANGOS GA, PLOTKIN DJ, BARBOSA JA, RUDDLE FH. Genetic transformation of

- mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7380-7384.
- GROSVENOR CE, PICCIANO MF, BAUMRUCKER CR. Hormones and growth factors in milk. *Endocrinol Rev*. 1993; 14 (6), 710-728.
- HALLER O, ARNHEITER H, GRESSER I, LINDENMANN J. Virus-specific interferon action/protection of newborn Mx carries against lethal infection with influenza virus. *J Exp Med* 1981; 154: 199-203.
- HAMMER RE, PURSEL VG, REXROAD JR, CE, WALL RJ, BOLT DJ, EBERT KM, PALMITER RD, BRINSTER RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 1985; 315: 680-683.
- HARTMANN PE, MCCUALEY I, GOONERATNE AD, WHITELY JL. Inadequacies of sow lactation: survival of the fittest. *Symp Zool Soc Lond* 1984;51: 301-326.
- HARVEY RP. Widespread expression of MyoD genes in *Xenopus* embryos is amplified in presumptive muscle as a delayed response to mesoderm induction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 9198-9202.
- HOLLIS DE, CHAPMAN RE, PANARETTO BA, MOORE GP. Morphological changes in the skin and wool fibers of Merino sheep infused with mouse epidermal growth factor. *Aust J Biol Sci* 1983; 36: (4), 419-434.
- KARATZAS CN, ZHOU JF, HUANG Y, DUGUAY F, CHRETIEN N, BHATIA B, BILODEAU A, KEYSTON R, TAO T, KEEFER CL, WANG B, BALDASSARE H, LAZARIS A. Production of recombinant spider silk (BiosteelTM) in the milk of transgenic animals. *Transgenic Res* 1999; 8: 476-477.
- KATO Y, TANI T, SOTOMARU Y, KUROKAWA K, KATO J, DOGUCHI H, YASUE H, TSUNODA Y. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 1998; 282: 2095-2098.
- KIM J-H, JUNG-HA H-S, LEE HT, CHUNG K-S. Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. *Mol Reprod Dev* 1997; 46: 515-526.
- LAI L, KANG JX, LI R, WANG J, WITT WT, YONG HY, HAO Y, WAX DM, MURPHY CN, RIEKE A, SAMUEL M, LINVILLE ML, KORTE SW, EVANS RW, STARZL TE, PRATHER RS, DAI Y. Generation of cloned transgenic pigs rich in omega-3 fatty acids. *Nat Biotechnol*. 2006 Apr; 24(4): 435-6.
- LAMB BT, SISODIA SS, LAWLER AM, SLUNT HH, KITT CA, KEARNS WG, PEARSON PL, PRICE DL, GEARHART JD. Introduction and expression of the 400 kilobase precursor amyloid protein gene in transgenic mice. *Nat Genet* 1993; 5: 22-30.
- LEWIN HA. Disease resistance and immune response genes in cattle: strategies for their detection and evidence of their existence. *J. Dairy Sci* 1989; 72: 1334-1348.
- LEWIS AJ, SPEER VC, HAUGHT DG. Relationship between yield and composition of sow's milk and weight gains of nursing pigs. *J Anim Sci* 1978; 47: 634-638.
- MAGA EA, ANDERSON GB, MURRAY JD. The effect of mammary gland expression of human lysozyme on the properties of milk from transgenic mice. *J Dairy Sci* 1995; 78: 2645-2652.
- MCPHERRON AC, LAWLER AM, LE S-J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature* 1997; 387, 83-90.
- MENCH JA. Ethics, animal welfare and transgenic farm animals. In: Murray JD, Anderson GB, Oberbauer AM, McGloghlin MM (ed), *Transgenic Animals in Agriculture*. CABI International, 1999; 25-268.
- MULLER M, BRENIIG B, WINNACKER EL, BREM G. Transgenic pigs carrying cDNA copies encoding the murine Mx1 protein which confers resistance to influenza virus infection. *Gene* 1992; 121: 263-270.
- MURRAY JD, NANCARROW CD, MARSHALL JT, HAZELTON IG, WARD KA. The production of transgenic Merino sheep by microinjection of ovine metallothionein-growth hormone fusion genes. *Reprod Fertil Dev* 1989; 1: 147-155.
- NOBLE MS, RODRIGUEZ-ZAS S, BLECK GT, COOK JS, HURLEY WL, WHEELER MB. Lactational performance of first parity transgenic gilts expressing bovine α -lactalbumin in their milk. *J Anim Sci* 2002; 80: 1090-1096.
- PRATHER RS, BARNES FL, SIMS MM, ROBL JM, EYESTONE WH, FIRST NL. Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte. *Biol Reprod* 1987; 37: 859-866.
- PRATHER R, SIMS M, FIRST N. Nuclear transplantation in early pig embryos. *Biol Reprod* 1989; 41: 414-418.

- PIPER LE, BINDON BM, DAVIS GH. The single inheritance of the high litter size of the Booroola Merino. In: Land RB, Robinson DW (ed), *Genetics of Reproduction in Sheep*. Butterworths, London, 1985; 115–125.
- POLGE EJC, BARTON SC, SURANI MHA, MILLER JR, WAGNER T, ELSOME K, DAVIS AJ, GOODE JA, FOXROFT GR, HEAP RB. Induced expression of a bovine growth hormone construct in transgenic pigs. In: Heap RB, Prosser CG, Lamming GE (ed), *Biotechnology of Growth Regulation*. Butterworths, London, 1989; 189–199.
- POWELL BC, WALKER SK, BAWDEN CS, SIVAPRASAD AV, ROGERS GE. Transgenic sheep and wool growth: possibilities and current status. *Reprod Fertil Dev* 1994; 6 (5): 615–623.
- PURSEL VG, HAMMER RE, BOLT DJ, PALMITER RD, BRINSTER RL. Integration, expression and germ-line transmission of growth-related genes in pigs. *J. Reprod. Fertil.* 1990; 41 (Suppl): 77–87.
- PURSEL VG, PINKERT CA, MILLER KF, BOLT DJ, CAMBELL RG, PALMITER RD, BRINSTER RL, HAMMER RE. Genetic engineering of livestock. *Science* 1989; 244: 1281–1288.
- PURSEL VG, REXROAD JR, CE. Status of research with transgenic farm animals. *J Anim Sci* 1993; 71 (Suppl 3): 10–19.
- PURSEL VG, SUTRAVE P, WALL RJ, KELLY AM, HUGHES SH. Transfer of *c-ski* gene into swine to enhance muscle development. *Theriogenology* 1992; 37: 278 abstr.
- REXROAD JR CE, HAMMER RE, BOLT DJ, MAYO KM, FROHMAN LA, PALMITER RD, BRINSTER RL. Production of transgenic sheep with growth regulating genes. *Mol Reprod Dev* 1989; 1: 164–169.
- REXROAD JR CE, MAYO KM, BOLT DJ, ELSASSER TH, MILLER KF, BEHRINGER RR, PALMITER RD, BRINSTER RL. Transferrin- and albumin-directed expression of growth-related peptides in transgenic sheep. *J Anim Sci* 1991; 69: 2995–3004.
- ROBL JM, PRATHER R, BARNES F, EYESTONE W, NORTHEY, D, GILLIGAN B, FIRST NL. Nuclear transplantation in bovine embryos. *J Anim Sci* 1987; 64: 642–647.
- ROTHSCHILD MF, JACOBSON C, VASKE DA, TUGGLE CK, SHORT TH, SASAKI S, ECKARDT GR, MCLAREN, DG. A major gene for litter size in pigs. In: *Proceedings of the Fifth World Congress Genet Applied to Livestock Production*, Guelph, Canada, 1994; 21: 225–228.
- SEAMARK RE. Potential of transgenic pigs and related technology for the pig industry. In: Barnett JL, Batterham ES, Cronin GM, Hansen C, Hemsworth PH, Hennessy DP, Hughes PE, Johnston NE, King RH (ed.), *Manipulating Pig Production*. VIP Printing Pty Ltd, Australia, 1987; 165–170.
- SEIDEL GE. The future of transgenic farm animals. In: Murray JD, Anderson GB, Oberbauer AM, Mc Gloughlin MM (ed), *Transgenic Animals in Agriculture*. CABI Publishing, New York, 1999; 269–283.
- SHIN T, ADAMS LG, TEMPLETON JW, WESTHUSIN ME. Nuclear transfer using somatic cell line derived from a bull genetically resistant to brucellosis. *Transgenic Res* 1999; 8: 488 abstr.
- SMITH LC, WILMUT I. Influence of nuclear and cytoplasmic activity on the development in vivo of sheep embryos after nuclear transplantation. *Biol Reprod* 1989; 40: 1027–1035.
- SNOWDER GD, BUSBOOM JR, COCKETT NE, HENDRIX F, MENDENHALL VT. Effect of the Callipyge gene on lamb growth and carcass characteristics. In: *Proceedings of the Fifth World Congress Genet Applied to Livestock Production*, Guelph, Canada, 1994; 18: 51–54.
- SORRENTINO V, PEPPERKOK R, DAVIS RL, ANSORGE W, PHILLIPSON L. Cell proliferation inhibited by MyoD1 independently of myogenic differentiation. *Nature* 1990; 345: 813–814.
- STAHELI P, HALLER O, BOLL W, LINDEMANN NJ, WEISMANN C. Mx protein: constitutive expression in 3T3 cells transformed with cloned MxcDNA confers selective resistance to influenza virus. *Cell* 1986; 44: 147–158.
- STICE SL, ROBL JM. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol Reprod* 1988; 39: 657–664.
- STORB U. Transgenic mice with immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol* 1987; 5: 151–174.
- SUTRAVE P, KELLY AM, HUGHES SH. *ski* can cause selective growth of skeletal muscle in transgenic mice. *Genes Dev* 1990; 4: 1462–1472.
- TSUNODA Y, KATO Y. Full-term development after transfer of nuclei from 4-cell and compacted morula stage embryos to enucleated oocytes in the mouse. *Exp Zool* 1997; 278: 250–254.

- TSUNODA Y, KATO Y. Not only inner cell mass cell nuclei but also trophectoderm nuclei of mouse blastocysts have a developmental totipotency. *J Reprod Fertil* 1998; 113: 181-184.
- VAN BERKEL PHC, WELLING MM, GEERTS M, VAN VEEN HA, RAVENSBERGEN B, SALAJEDDINE M, PAUWELS EKJ, PIEPER F, NUIJENS JH, NIBBERING PH. Large-scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *Nature* 2002; 20: 484-487.
- VELANDER WH, JOHNSON JL, PAGE RL, RUSSELL CG, SUBRAMANIAN A, WILKINS TD, GWAZDAUSKAS FC, PITTIUS C, DROHAN WN. High-level of expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 12003-12007.
- VISE PD, MICHALSKA AE, ASHUMAN R, LLOYD B, STONE AB, QUINN P, WELLS JRE, SEAMARK RR. Introduction of a porcine growth hormone fusion gene into transgenic pigs promotes growth. *J Cell Sci* 1988; 90: 295-300.
- WAGNER EF, STEWART TA, MINTZ B. The human α -globin gene and a functional thymidine kinase gene in developing mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 5016-5020.
- WAGNER TE, HOPPE PC, JOLLICK JD, SCHOLL DR, HONDINKA RL, GAULT JB. Microinjection of a rabbit β -globin gene in zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78: 6376-6380.
- WAKAYAMA T, PERRY ACF, ZUCCOTTI M, JOHNSON KR, YANAGIMACHI R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 1998; 394: 369-373.
- WALL RJ, PURSEL VG, SHAMAY A, MCKNIGHT RA, PITTIUS CW, HENNINHAUSEN L. High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 1696-1700.
- WHEELER MB, CHOI SJ. Embryonic stem cells and transgenics: recent advances. *Arch Fac Vet UFRGS* 1997; 25: 64-83.
- WIEGHART M, HOOVER JL, MCGRANE MM, HANSON RW, ROTTMAN FM, HOLTZMAN SH, WAGNE TE, PINKERT CA. Production of transgenic pigs harbouring a rat phosphoenolpyruvate carboxykinase-bovine growth hormone fusion gene. *J Reprod Fertil* 1990; 41(Suppl): 89-96.
- WILLADSEN SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986; 320: 63-65.
- WILMUT I, SCHNEIEKE AE, MCWHIR JM, KIND AJ, CAMPBELL KHS. Viable offspring from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-813.
- WRIGHT G, CARVER A, COTTON D, REEVES D, SCOTT A, SIMONS P, WILMUT I, GARNER I, COLMAN A. High level of expression of active alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology* 1991; 9: 830-834.

UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA A SELEÇÃO

José Fernando Garcia¹

RESUMO

O uso de biotecnologias da reprodução, acopladas aos programas de melhoramento genético, ganhou crescente posição de destaque nos sistemas de produção de ruminantes nas últimas décadas. A criopreservação de espermatozóides e a inseminação artificial, associadas à transferência de embriões e à produção de embriões *in vitro*, marcaram fase importante e decisiva para o melhoramento genético dos animais de produção. Mais recentemente, graças ao acelerado desenvolvimento tecnológico, a seleção genética entrou em nova fase na qual a avaliação fenotípica passou a contar com o auxílio da avaliação genômica dos animais, pelo uso de ferramentas da genética molecular. A sexagem de embriões, os estudos de expressão gênica diferencial, a identificação de QTL (*Quantitative Trait Loci*) e de marcadores genéticos específicos, são partes integrantes da atual tecnologia que está à disposição da seleção animal. O presente artigo sumariza conceitos atuais sobre marcadores moleculares e as perspectivas de sua utilização em programas envolvendo seleção e melhoramento genético, incluindo o uso da transferência de embriões e tecnologias correlatas.

Palavras-chave: marcador molecular, PCR, transferência de embriões, fecundação *in vitro*, SNP.

INTRODUÇÃO

O Brasil segue a tendência mundial na busca de maior eficiência e qualidade na produção de alimentos destinados à população humana em constante crescimento. A pecuária moderna baseia-se na intensificação da atividade, tanto em relação a busca de qualidades produtivas dos animais, quanto ao aumento da velocidade do ciclo de produção, favorecendo a maior produção por área/ano (Milazzotto, 2001).

Para manter a competitividade comercial da produção de derivados animais num cenário de mercados internos e externos em desenvolvimento, a agroindústria brasileira vêm investindo em programas de melhoramento genético buscando aumentar a eficiência da produção, padronização dos animais e de seus produtos. Dentre das estratégias utilizadas nos programas de seleção podemos destacar: 1) o direcionamento de cruzamentos entre animais geneticamente provados, 2) a importação e disseminação de material genético (animais, sêmen e embriões) de rebanhos selecionados e 3) a utilização de cruzamentos entre raças aumentando a heterose, geralmente refletida no aumento de produtividade.

Como exemplo desses investimentos pode-se tomar o caso da bovinocultura. No cenário atual, os bovinos representam atividade pecuária de destaque no Brasil onde diversas raças das sub-espécies zebuínas e taurinas são prevalentes. Os animais zebuínos são possuidores de diversas vantagens em relação à produção nos trópicos quando comparados aos taurinos. É relatada maior resistência ao calor, aos ectoparasitas, aos hematozoários e maior adaptabilidade a alimentos com menor qualidade nutricional. Entretanto, como desvantagens são citadas a menor capacidade

¹Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal – Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – UNESP – Araçatuba e International Atomic Energy Agency (IAEA) Collaborating Centre on Animal Genomics and Bioinformatics

produtiva, qualidade inferior da carcaça e desenvolvimento tardio, comparativamente aos taurinos avaliados em seu ambiente natural (Koger, 1980; Pringle *et al.*, 1997; Lobo, 1998; Associação de Criadores de Nelore do Brasil; Associação Brasileira de Criadores de Zebu). Animais taurinos apresentam muitas características desejáveis, destacando-se entre elas a produção e qualidade do leite, a precocidade sexual e de qualidade e terminação de carcaça. Entretanto como desvantagens demonstram maior suscetibilidade a infestação por ecto e endoparasitas e menor tolerância ao calor. Buscando contornar os problemas apresentados pelos grupos raciais individualmente, muitos sistemas produtivos utilizam o cruzamento entre animais taurinos e zebuíños para aumentar a produção e produtividade dos animais.

Neste contexto, as biotecnologias da reprodução acopladas ao melhoramento genético ganharam crescente posição de destaque nos sistemas de produção de ruminantes. A criopreservação de espermatozóides e a inseminação artificial, associadas à transferência de embriões e à produção de embriões *in vitro*, marcaram fase importante e decisiva para o melhoramento genético dos animais de produção. Na última década, graças ao acelerado desenvolvimento tecnológico, a seleção genética entrou em nova fase na qual a avaliação fenotípica passou a contar com o auxílio da avaliação genômica dos animais, pelo uso de ferramentas da genética molecular. A sexagem de embriões, os estudos de expressão gênica diferencial, a identificação de QTL (Quantitative Trait Loci) e de marcadores genéticos específicos, são partes integrantes da atual tecnologia que está a disposição da seleção animal (Garcia, 1995; Garcia, 2001, ISAG 2006).

Outras espécies de ruminantes que possuem menor número populacional, mas não menor importância, como a bubalinocultura, ovinocultura e caprinocultura, apresentam cada vez maior destaque no cenário das raças animais exploradas no Brasil, consolidando-se como contribuintes efetivos para o aumento do PIB nacional, através da seleção e melhoramento de raças nacionais bem como com a introdução de germoplasma importado. A mesma situação não pode ser observada setor de suínos e aves onde a padronização fenotípica de animais chegou a ponto de estabilizar o “tipo” animal ideal que, via de regra, é comercializado por grandes empresas multinacionais de melhoramento genético, sendo o aprimoramento de sistemas de manejo, nutrição e sanidade de maior importância nessas espécies, em detrimento de programas de melhoramento genético locais.

CONCEITOS E FUNDAMENTOS

Os chamados marcadores moleculares, originados das variações no código do material genético (genoma) dos animais e que segregam pelas gerações segundo padrão de herança Mendeliana relacionada a características monogênicas ou que apresentam distribuição compatível com as esperadas em características poligênicas, são também denominados de marcadores genéticos (Ferreira e Grattapalia, 1998).

Os principais marcadores genéticos descritos são: 1) as inserções e deleções (Indels), 2) os polimorfismos de base única (SNP, do inglês: *single nucleotide polymorphism*) e 3) as regiões repetitivas. Quando estão localizados em regiões codificantes dos genes, os polimorfismos podem levar a alteração no aminoácido da seqüência protética, nesse caso sendo chamados de polimorfismo “não sinônimo”, o que pode determinar diferenças na função protética e consequente variação fenotípica. As variações em regiões não codificantes podem também alterar significativamente a expressão genética por diversos fatores tais como: promover processamentos alternativos do

RNA, geração ou supressão de códons de terminação/iniciação para a tradução ou alterar seqüências promotoras (Curi, 2004).

O elevado grau de polimorfismo, a inexistência de influência ambiental e a praticidade na análise (devido à variedade de materiais biológicos passíveis de serem utilizados e à simplicidade das técnicas envolvidas na análise) são algumas das vantagens da utilização desse tipo de informação para análise genética individual ou populacional de animais (Ferreira e Grattapalia, 1998).

Dentre os marcadores baseados em seqüências repetitivas estão os marcadores microssatélite, normalmente localizados em regiões não codificantes, com elemento repetitivo entre 1 e 6 pares de bases posicionados em estrutura concatenada (*em tandem*) e com número menor do que 100 repetições (Ferreira e Grattapalia, 1998). O polimorfismo de marcadores microssatélites pode ser determinado pela amplificação por PCR da região desejada, seguida de separação eletroforética, revelando padrões de banda variáveis de acordo com o número de elementos repetitivos (Neuenschwander, 2001).

Os marcadores microssatélites estão amplamente distribuídos em todo o genoma de eucariotos, apresentam elevado grau de polimorfismo, padrão de herança Mendeliana, codominância e facilidade na detecção por PCR e consequente determinação dos alelos e genótipos, sendo atualmente a ferramenta de eleição para execução de testes de paternidade (Page e Holmes, 1998).

A caracterização fenotípica dos animais, de forma simplificada, é determinada pela interação entre genótipo e o meio ambiente. Para estudar essa relação e suas consequências fisiológicas, é preciso fixar uma das variáveis para melhor analisar a outra. Mantendo os animais nas mesmas condições ambientais, é possível de forma segura, determinar a influência do genótipo no desenvolvimento animal (Lewontin, 2002).

Como exemplo clássico, desde a domesticação dos bovinos há aproximadamente 10.000 anos (Bruford *et al.*, 2003) e exploração destes animais como fonte de alimento e matéria prima, o ser humano vem selecionando os melhores indivíduos para características de seu interesse, concomitantemente à seleção natural. Com o conhecimento de que características fenotípicas podem ser herdadas pelos descendentes, mesmo muito antes da descoberta do papel do DNA como código genético, intensificou-se a seleção, primeiramente na área vegetal e posteriormente na área animal, buscando-se plantas e animais de maior interesse pela seleção daqueles considerados “superiores”.

Os sistemas de seleção clássica dependem da avaliação e mensuração das características fenotípicas, havendo necessidade de esperar o desenvolvimento natural do animal avaliado, para a realização das mensurações nos momentos em que os fenótipos se manifestam naturalmente. Essa abordagem possui um forte componente de subjetividade uma vez que está sujeita a erros humanos e estatísticos, apesar de ser a única base técnica disponível para o melhoramento genético até o presente.

Uma das vantagens do uso de marcadores moleculares em programas de seleção é a de apresentar o potencial de complementar a seleção clássica. As principais vantagens na sua utilização estão relacionadas à precocidade de avaliação dos animais para características específicas, uma vez que esta tecnologia emprega amostras de DNA, permitindo análises desde momentos imediatamente após o nascimento, ou até mesmo durante a fase embrionária pré-implantação, podendo ser inclusive incorporada a programas de produção *in vitro* e transferência de embriões, agilizando e otimizando os sistemas de seleção genética/produção animal (Garcia, 2001, Garcia e Porto-Neto, 2006). Além da objetividade envolvida na análise do DNA, outro importante benefício refere-se à possibilidade de seleção de características não observadas

tradicionalmente tais como aquelas que envolvem dificuldades técnicas de mensuração (precocidade sexual e de terminação de carcaça), elevado custo das análises (maciez/marmoreio da carne e resistência a ectoparasitas) ou por ser uma característica avaliada tardeamente (longevidade).

Em termos práticos, o principal foco na aplicação de tecnologias de biologia molecular relacionadas a avaliação de marcadores moleculares no melhoramento genético animal, consiste em identificar e analisar a variabilidade e correlação dos marcadores com os fenótipos de interesse. Esses marcadores podem ser classificados como indiretos (por exemplo, como na maioria dos casos em que marcadores microssatélite são relacionados a um QTL) ou diretos (como no caso dos polimorfismos em genes que codificam proteínas que influenciam nas características fenotípicas de interesse quer seja pela função da própria proteína quer seja por sua atuação como intermediário em vias metabólicas relacionadas ao fenótipo, contribuindo para a melhor compreensão dos mecanismos regulatórios de controle da função gênica) (Curi, 2004). Nesse último caso, em geral, atribui-se o efeito sobre o fenótipo a marcadores do tipo SNP.

A maior parte das características de interesse econômico apresenta padrão de manifestação quantitativo e consequentemente controlados por vários genes, cujos efeitos se somam para constituir o fenótipo manifestado efetivamente. Entretanto, acredita-se que certos genes apresentem papel majoritário na expressão dessas características, por serem responsáveis por grande parte da manifestação do fenótipo, sendo denominados por isso como genes principais (adaptado do termo em inglês: *major genes*) (Montaldo e Meza-Herrera, 1998).

As duas principais metodologias utilizadas para a identificação de marcadores relacionados a manifestação de características de interesse em programas de seleção são a abordagem do gene principal (ou gene candidato) e a da identificação de QTL através do mapeamento genético. Os estudos baseados em genes candidatos buscam identificar polimorfismos diretamente nas regiões codificantes de um dado gene alvo ou em elementos regulatórios flanqueadores a essas regiões (Fitzsimmons *et al.*, 1998; Liefers *et al.*, 2002; Almeida, 2003). Já a metodologia baseada no mapeamento genético busca identificar polimorfismos relacionados a regiões genéticas de interesse, mesmo que não se conheça o gene diretamente envolvido no fenótipo em questão (Womack, 1993). Os marcadores mais utilizados atualmente para essa última abordagem são os microssatélites, pois graças às suas características peculiares previamente descritas, constituem-se em ferramenta ideal para a associação entre o fenótipo e o genótipo monogênico ou poligênico (Ihara *et al.*, 2004).

Embora a abordagem de caracterização do mapa genético envolva maior número de marcadores e aponte para maior número de regiões com potencialidade de relação positiva entre fenótipo e genótipo, a metodologia do gene candidato é mais assertiva por buscar a própria região de interesse que apresenta o efeito direto.

Recentes avanços biotecnológicos vêm permitindo a descoberta de marcadores genéticos aplicáveis à seleção e melhoramento em animais, sendo que em bovinos já foram descritos polimorfismos e variantes moleculares nos genes de diversos hormônios e receptores hormonais (Campagnari, 2002, Pringle *et al.*, 1997; Liefers *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2004; Di Stasio *et al.*, 2005; Curi *et al.*, 2005; Almeida, 2003) e em enzimas relacionadas a importantes vias metabólicas como por exemplo, as da calpaína e a calpastatina relacionadas a maciez da carne (Barendse, 1997; Page *et al.*, 2002; Grisart *et al.*, 2004, Casas *et al.*, 2005). Esses achados têm elevado os genes evolvidos com a manifestação e controle dessas etapas fisiológicas como fortes candidatos a possuírem marcadores moleculares de utilidade para a seleção genética. Entretanto faz-se necessária a validação do efeito desses marcadores nas distintas

populações (raças), em especial em raças de bovinos zebuínos, pequenos ruminantes e bubalinos existentes no Brasil, objetivando a melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos com essas manifestações, que ainda estão longe de serem simples e diretamente explicados.

PERSPECTIVAS E CONCLUSÕES

Apesar de serem grandes os avanços observados na literatura especializada nos últimos 10 anos, as aplicações de marcadores de DNA em seleção e melhoramento genético nos ruminantes, diversamente do que vem ocorrendo com aves e suínos, tem se restringido apenas a iniciativas pontuais e isoladas tais como a sexagem de embriões, os testes de paternidade para fins de registro genealógico e a detecção de alguns marcadores individuais para doenças genéticas ou características funcionais em raças específicas.

Avanços oriundos das diversas iniciativas atualmente existentes no mundo para sequenciar o genoma bovino deverão gerar grande quantidade de dados em breve (expectativa para final de 2006). Além do descobrimento da totalidade de seqüências gênicas no genoma bovino, em projeto liderado pelo Consórcio Internacional do Sequenciamento do Genoma Bovino, a identificação de sítios polimórficos do tipo SNP em grandes quantidades, consistirá ferramenta para a busca de correlações entre genótipos e fenótipos com maior acurácia do que pelo uso de alguns poucos marcadores individuais (ISAG, 2006).

Nesse sentido, uma das iniciativas científicas mais promissoras da atualidade é o projeto BovHapMap (ligado ao Consórcio Internacional do Sequenciamento do Genoma Bovino), que segue os moldes do Projeto Genoma Humano e objetiva a identificação e análise dos diferentes perfis polimórficos de marcadores SNP em diversas raças bovinas (ISAG, 2006).

Espera-se que com essas informações seja possível aumentar a acurácia dos testes para correlação fenótipo e genótipo, e validar marcadores para características de produção em curto espaço de tempo, não somente nos bovinos, mas eventualmente com extrações nos demais ruminantes (bubalinos, ovinos e caprinos).

Especialmente no caso das raças zebuínas existentes no Brasil (bem como de seus cruzamentos), o presente momento é de crucial importância, pois é necessária a realização de testes de validação dos marcadores candidatos em populações controladas, o que consistirá da primeira fase dessa nova etapa tecnológica que está a caminho.

O resultado desses testes deverá fornecer critérios adicionais para a realização dos cruzamentos e acasalamentos entre animais, refletindo diretamente nas atividades práticas de transferência de embriões *in vivo* (TE convencional) e de produção de embriões *in vitro* (FIV).

Outro campo que surge nesse novo cenário diz respeito a adaptação da tecnologia de análise de marcadores moleculares diretamente ao embrião em fases pré-implantação, a partir da retirada e análise de biópsia embrionária. Apesar de tecnicamente exequível, esse processo ainda não encontra respaldo nos aspectos econômicos e práticos uma vez que o uso dos marcadores moleculares (principalmente aqueles relacionados às características funcionais) encontra-se ainda em estágio de validação. A exemplo da recente expansão no uso da sexagem de embriões bovinos por PCR, quando da sua incorporação às rotinas de produção de embriões *in vitro* após uma década da demonstração de sua exequibilidade (Garcia, 1995; Garcia, 2001, Alonso et

al., 2006), o mesmo poderá ocorrer com os marcadores funcionais, entretanto nenhuma previsão pode ser estabelecida nesse momento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. E. M. Marcadores moleculares em sintenia com os genes da leptina e de seu receptor em bovinos: associação com parâmetros produtivos. Tese de doutorado. Genética e biologia molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.
- ALONSO, R. V. Hellu, J. A. A., ARDAIS, D. B., VISINTIN, J.A., GARCIA, J.F. Aplicação comercial em larga escala da sexagem de embriões produzidos *in vitro* por análise de DNA. Acta Scientiae Veterinariae, 34 (Supl 1), 440, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE ZEBU, World Wide Web (URL: <http://www.abcz.org.br>) (Agosto de 2005).
- ASSOCIAÇÃO DE CRIADORES DE NELORE DO BRASIL. World Wide Web (URL: <http://www.nelore.org.br>) (Agosto de 2005).
- BARENDE, W. Assessing lipid metabolism. Patent WO9923248, Patent US6383751, Disponível em <http://www.uspto.com>, 1997.
- BRUFORD, M.W.; BRADLEY, D.G.; LUIKART, G. DNA markers reveal the complexity of livestock domestication. Nature Reviews, v.4 p.900-910, 2003.
- CAMPAGNARI, F. Novas variantes moleculares dos genes dos receptores do hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRHR) e do hormônio Folículo Estimulante (FSHR) em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – campus de Botucatu, 2002.
- CASAS, E.; WHITE, S. N.; RILEY, D. G.; SMITH, T. P. L.; BRENNEMAN, R. A.; OLSON, T. A.; JOHNSON, D. D.; COLEMAN, S. W.; BENNETT, G. L.; CHASE-JR C. C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in Bos indicus cattle. Journal of Animal Science, v.83, p.13-19, 2005.
- CURI, R.A. Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaça e características de produção de bovinos de corte no modelo biológico superprecoce. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – campus de Botucatu, 2004.
- CURI, R. A.; DE OLIVEIRA, H. N.; SILVEIRA, A. C.; LOPES, C. R. Effects of polymorphic microsatellites in the regulatory region of *IGF1* and *GHR* on growth and carcass traits in beef cattle. Animal Genetics, v.36, p.58-62, 2005.
- DI STASIO, L.; DESTEFANIS, G.; BRUGIAPAGLIA, A.; ALBERA, A.; A. ROLANDO. Polymorphism of the *GHR* gene and relationships with meat production and quality. Animal Genetics, v.36, p.138-140, 2005.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPALIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ed. EMBRAPA-CENARGEN: Brasília, 1998, 220p.
- FITZSIMMONS, C. J.; SCHMUTZ, S. M.; BERGEN, R. D.; MCKINNON, J. J. A potential association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. Mammalian Genome, v.9, p.432-434, 1998.
- GARCIA, J.F. Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) de embriões bovinos. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 1995.
- GARCIA, J.F. Practical considerations of embryo manipulation: Preimplantation genetic typing. Theriogenology. v. 56, p. 1393-1399, 2001.
- GARCIA, J. F. e PORTO-NETO, L. P. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. Acta Scientiae Veterinariae, 34 (Supl 1), 197-203, 2006
- GRISART, B.; FARNIR, F.; KARIN, L.; CAMBISANO, N.; KIM, J.; KVASZ, A.; MNI, M.; SIMON, P.; FRÈRE, J.; COPPIETERS, W.; GEORGES, M. Genetic and functional confirmation of the causality of the

DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. PNAS, v.101, p.2398-2403, 2004.

IHARA, N.; TAKASUGA, A.; MIZOSHITA, K.; TAKEDA, H.; SUGIMOTO, M.; MIZOGUCHI, Y.; HIRANO, T.; ITOH, T.; WATANABE, T.; REED, K.M.; SNELLING, W.M.; KAPPES, S.M.; BEATTIE, C.W.; BENNETT, G.L.; SUGIMOTO, Y. A comprehensive genetic map of the cattle genome based on 3802 microsatellites. Genome Research, v.14, 1987-1998, 2004.

ISAG – International Society of Animal Genetics, 2006. Proceedings, Porto Seguro. Bahia, Brasil, 2006.

KOGER, M. Effective crossbreeding systems utilizing Zebu cattle. Journal of Animal Science, v.50, p. 1215-1220, 1980.

LEWONTIN, R. A tripla Hélice: gene, organismo e ambiente. Tradução José Viegas Filho – São Paulo: Companhia das Letras, 140 p., 2002.

LI, C.; BASARAB, J.; SNELLING, W. M.; BENKEL, B.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; MOORE, S. S. Assesment of a positional candidate gene *myf5* and *igf1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. Journal Animal Science, v.82, p. 1-7, 2004.

LIEFERS, S. C.; te PAS, M. F. W.; VEERKAMP, R. F.; van der LENDE, T. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in holstein heifers. Journal of Dairy Science, v.85, p.1633-1638, 2002.

NEUENSCHWANDER, S. Structural and functional genomics in farm animals: a laboratory view point. Institut für Nutztierwissenschaften, Gruppe Züchtungsbiologie, 2001.

LOBO, R.N.B. Genetic parameters for reproductive traits of zebu cows in the semi-arid region of Brazil. Livestock Production Science, v.55, p.245-248, 1998.

MILAZZOTTO, M. P. Mutações no gene do receptor do hormônio luteinizante (LHR) bovino e associação com precocidade sexual em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore). Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – campus de Botucatu, 2001.

MONTALDO, H.H.; MEZA-HERRERA, C.A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. Electronic Journal of Biotechnology, v.1, 83-89, 1998.

PAGE, B. T.; CASAS, E.; HEATON, M. P.; CULLEN, N. G.; HYNDMAN, D. L.; MORRIS, C. A.; CRAWFORD, A. M.; WHEELER, T. L.; KOOHMARAIE, M.; KEELE, J. W.; SMITH, T. P. L. Evaluation of a single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. Journal of Animal Science, v.80, p. 3077-3085, 2002.

PAGE, R.D.M; HOLMES, E.C. Molecular evolution: a phylogenetic approach. 1ed. Blackwell Science Ltd, London, UK; 1998, 346p.

PRINGLE, T.D.; WILLIAMS, S.E.; LAMB, B.S.; JOHNSON, D.D.; WEST, R.L. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and age tenderness if Angus and Brahman crossbred steers. Journal of Animal Science, v.75, p. 2955-2961, 1997.

WOMACK, J.E. The goals and status fo the bovine gene map. Journal of Dairy Science, v. 76, p. 219-226, 1993.