

3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

**Os melhores pesquisadores nacionais e internacionais
gerando soluções para a pecuária brasileira**

COORDENAÇÃO CIENTÍFICA

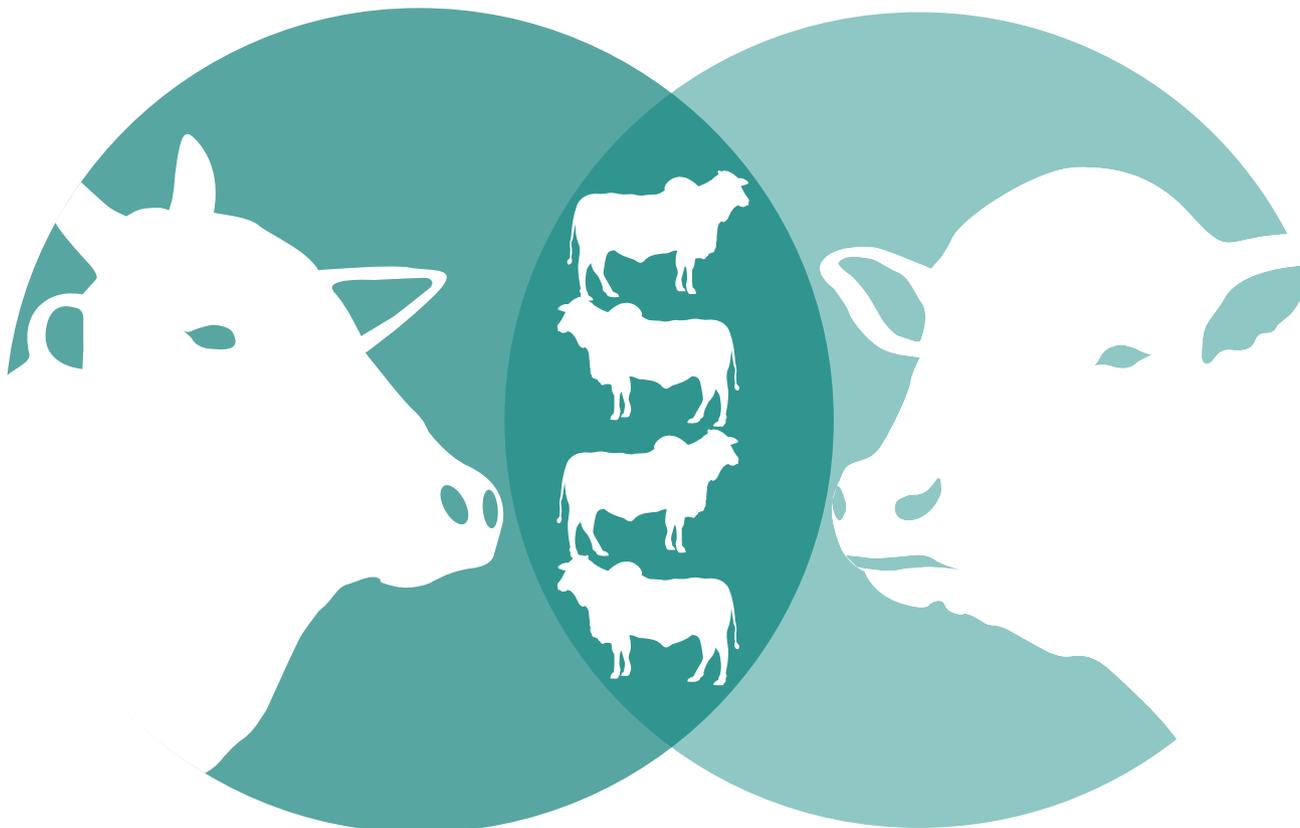
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli - USP
Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda - UEL

ORGANIZAÇÃO



PATROCÍNIO





3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

Dias 25, 26 e 27 de setembro de 2008
Hotel Sumatra - Londrina - PR

COORDENAÇÃO CIENTÍFICA

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli - USP
Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda - UEL

ORGANIZAÇÃO



PATROCÍNIO



DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

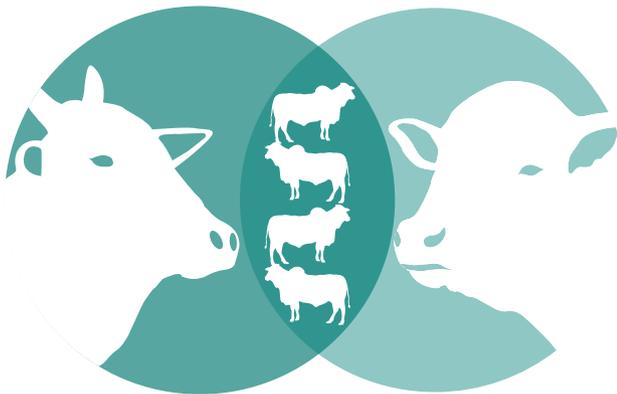
Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada (3. : 2008 : Londrina)

Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada / coordenação de Pietro Sampaio Baruselli e Marcelo Marcondes Seneda. - São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2008.

205 p.

Tema do Simpósio: Biotecnologia da Reprodução em Bovinos, realizado nos dias 25 a 27 de setembro de 2008, Londrina - PR.

I. Biotecnologia da reprodução (Simpósios). II. Reprodução aplicada animal (Simpósios). III. Bovinos. IV. Baruselli, Pietro Sampaio. V. Seneda, Marcelo Marcondes. VI. Título.



3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

Os melhores pesquisadores nacionais e internacionais gerando soluções para a pecuária brasileira

Local
Hotel Sumatra - Londrina / PR

Período
25 a 27 de setembro de 2008

Organização
Geraembryo

Coordenadores Científicos
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli - USP
Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda - UEL

Palestrantes

Prof. Dr. André M. Nassar - Diretor Geral do ICONE

Prof. Dr. Alcides de Moura Torres Jr. - Diretor-Presidente da Scot Consultoria

Dr. Roberto Jank Junior - Dir. Exe. da Láctea Brasil / Vice-Presidente da Leite Brasil e Diretor da Agridus S/A

Prof. Dr. Lino N. Rodrigues Filho - FEA - USP

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda - UEL - Londrina

Prof. Dr. Reuben Mapletoft - Western College of Veterinary Medicine / University of Saskatchewan - Canadá

Prof. Dr. Michael D'Occhio - University of Queensland - Austrália

Prof. Dr. José Bento Sterman Ferraz - USP - Pirassununga

Dr. Manoel Francisco de Sá Filho - Firmasa - Campo Grande

Dr. Márcio de Oliveira Marques - Geraembryo - C. Procópio

Prof. Dr. Richard Holroyd - Department of Primary Industry - Austrália

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa - UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Gabriel A. Bó - Instituto de Reproducción Animal Córdoba - Argentina

Prof. Dr. José Eduardo P. Santos - University of Florida, Gainesville - USA

Prof. Dr. John L. Schenk - Research Scientist, ABS Global, Inc.

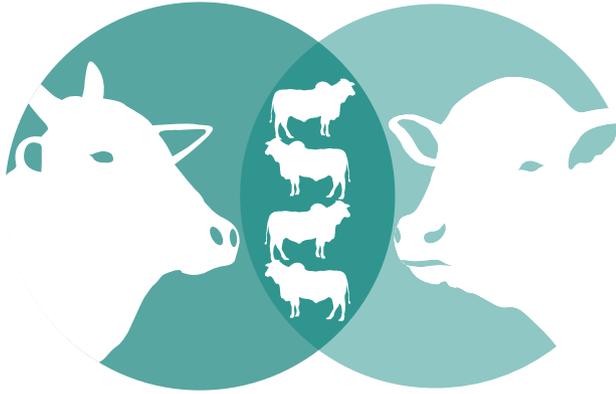
Dr. Carlos Alberto Rodrigues - SAMVET - São Carlos

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli - USP - São Paulo

Prof. Dr. Ciro Moraes Barros - UNESP - Botucatu

Prof. Dr. Roberto Sartori - Embrapa - Brasília

Prof. Dr. Flavio Meirelles - USP - Pirassununga



3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

Os melhores pesquisadores nacionais e internacionais gerando soluções para a pecuária brasileira

Programação

Dia 25/09/2008 - Quinta-feira

07:00 - **Inscrições e entrega de material**

08:00 - **O agronegócio brasileiro**

Palestrante: Prof. Dr. André M. Nassar
Diretor Geral do ICONE

09:20 - **A cadeia produtiva da carne bovina**

Palestrante: Prof. Dr. Alcides de Moura Torres Jr.
Diretor-Presidente da Scot Consultoria

Intervalo - Coffee Break

10:30 - **A cadeia produtiva do leite bovino**

Palestrante: Dr. Roberto Jank Junior
Diretor Executivo da Láctea Brasil
Vice-Presidente da Leite Brasil e Diretor da Agridus S/A

11:20 - **O marketing da reprodução animal**

Palestrante: Prof. Dr. Lino N. Rodrigues Filho
FEA - USP

12:30 - Almoço

14:00 - **Foliculogênese em bovinos**

Palestrante: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
UEL - Londrina

15:00 - **O passado, o presente e o futuro das técnicas de sincronização da ovulação para o emprego de biotecnologias da reprodução**

Palestrante: Prof. Dr. Reuben Mapletoft
Western College of Veterinary Medicine
University of Saskatchewan - Canadá

Intervalo - Coffee Break

16:20 - **Nutrição e reprodução**

Palestrante: Prof. Dr. Michael D'Occhio
University of Queensland - Austrália

17:20 - **Seleção para fertilidade em bovinos**

Palestrante: Prof. Dr. José Bento Sterman Ferraz
USP - Pirassununga

21:00 - **Evento Intervet/Schering-Plough Animal Health**

Dia 26/09/2008 - Sexta-feira

08:00 - **IATF em novilhas**

Palestrante: Dr. Manoel Francisco de Sá Filho
Firmasa - Campo Grande

09:00 - **Requisitos básicos para a implantação de um programa de IATF em gado de corte**

Palestrante: Dr. Márcio de Oliveira Marques
Geraembryo - C. Procópio

Intervalo - Coffee Break

10:20 - **Seleção e manejo de touros em condições tropicais**

Palestrante: Prof. Dr. Richard Holroyd
Department of Primary Industry - Austrália

11:20 - **Impacto do sêmen para o sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação**

Palestrante: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa
UNESP - Botucatu

Moderador: Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda - USP - Pirassununga

12:30 - Almoço

14:00 - **Atualidades nos protocolos de IATF em bovinos de leite**

Palestrante: Prof. Dr. Gabriel A. Bó
Instituto de Reproducción Animal Córdoba
- Argentina

15:00 - **O impacto da IATF na eficiência produtiva e reprodutiva em vacas de alta produção**

Palestrante: Prof. Dr. José Eduardo P. Santos
University of Florida, Gainesville - USA

Intervalo - Coffee Break

16:20 - **Emprego do sêmen sexado na IATF**

Palestrante: Prof. Dr. John L. Schenk
Research Scientist, ABS Global, Inc.

17:20 - **Requisitos básicos para implantação de um programa de IATF em gado de leite**

Palestrante: Dr. Carlos Alberto Rodrigues
SAMVET - São Carlos

Dia 27/09/2008 - Sábado

08:00 - **Emprego de eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo**

Palestrante: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli
USP - São Paulo

09:00 - **Atualidades na superovulação de doadoras *Bos Taurus* e *Bos Indicus***

Palestrante: Prof. Dr. Ciro Moraes Barros
UNESP - Botucatu

Intervalo - Coffee Break

10:20 - **Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem**

Palestrante: Prof. Dr. Roberto Sartori
Embrapa - Brasília

11:20 - **Perspectivas para as técnicas de FIV, clonagem e transgenia**

Palestrante: Prof. Dr. Flavio Meirelles
USP - Pirassununga

Sumário

1. Mercado do boi gordo: semelhanças com 2007? O que esperar da demanda por carne bovina nos próximos meses?	1
<i>Alcides de Moura Torres Jr.</i>	
2. Cadeia Produtiva do Leite	4
<i>Roberto Jank Junior</i>	
3. Foliculogênese em bovinos	6
<i>Marcelo Marcondes Seneda</i>	
4. Techniques for synchronization of follicular wave emergence and ovulation: Past, present and future	15
<i>Reuben Mapletoft</i>	
5. Interrelationships between nutrition, metabolic homeostasis, ovarian function, and the resumption of ovulation postpartum in Zebu crossbred cows	26
<i>Michael J. D'Occhio</i>	
6. Seleção para fertilidade em gado de corte	39
<i>José Bento Sterman Ferraz</i>	
7. IATF em novilha	54
<i>Manoel Francisco de Sá Filho</i>	
8. Bull selection and management under tropical conditions - some experiences from studies in northern Australia	68
<i>Richard G. Holroyd</i>	
9. Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação	78
<i>Frederico Ozanam Papa</i>	
10. Actualización sobre protocolos de IATF en bovinos de leche	95
<i>Gabriel A. Bó</i>	
11. Impact of Fixed Timed AI on Reproductive Efficiency of High-Producing Lactating Dairy Cows	111
<i>José Eduardo P. Santos</i>	
12. Sexing Bovine Sperm	127
<i>John L. Schenk</i>	
13. Fatores que influenciam o sucesso de programas de IATF em gado de leite	133
<i>Carlos Alberto Rodrigues</i>	
14. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo	146
<i>Pietro Sampaio Baruselli</i>	
15. Atualidades na superovulação de doadoras <i>Bos taurus</i> e <i>Bos indicus</i>	168
<i>Ciro Moraes Barros</i>	
16. Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem	175
<i>Roberto Sartori</i>	
17. Perspectivas para as técnicas de FIV, clonagem e transgenia	195
<i>Flávio Vieira Meirelles</i>	

Mercado do boi gordo: semelhanças com 2007?

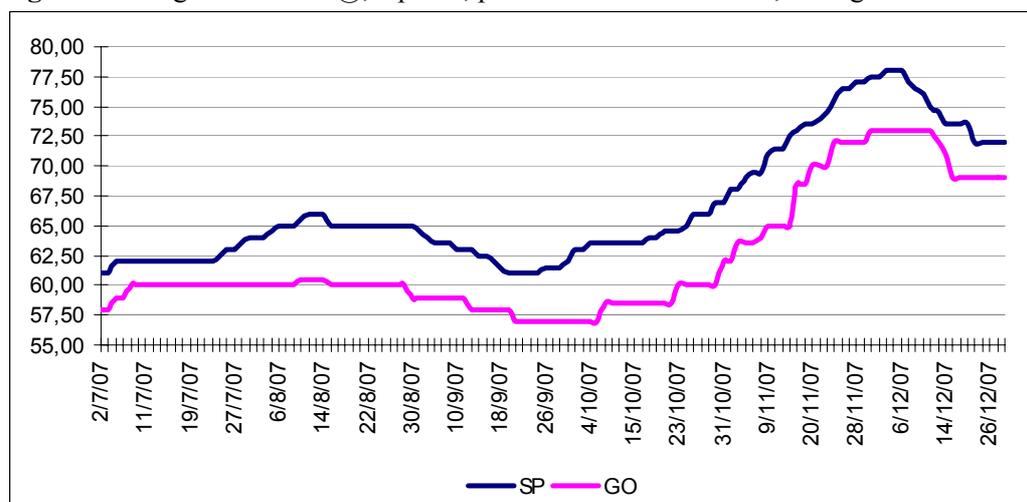
Alcides de Moura Torres Jr - Engenheiro agrônomo
Fabiano R. Tito Rosa - Zootecnista

Scot Consultoria

A pressão de baixa é forte. Os frigoríficos, ao menos aqueles que operam no Brasil Central, contam com o aumento da oferta de animais confinados para esticar as escalas e tentar derrubar as cotações da arroba.

Nós já vimos esse filme antes. Acompanhe a evolução dos preços do boi gordo ao longo do segundo semestre de 2007 na figura 1. As cotações referem-se às praças de São Paulo-SP e Goiânia-GO.

Figura 1. Boi gordo em R\$/@, a prazo, para descontar o funrural, no segundo semestre de 2007.



Fonte: Scot Consultoria

Antes vale destacar uma coisa. Até pouco tempo atrás, sempre que fazíamos qualquer análise de mercado, com a ajuda de gráficos e tabelas, era obrigatório considerar as estatísticas de São Paulo, para o caso do boi gordo, e do Mato Grosso do Sul, no caso do bezerro.

Agora, as análises de preços do boi gordo na entressafra, principalmente quando se faz referência aos confinamentos, têm que estar acompanhadas também dos números e informações de Goiás. Isso porque o Estado já responde por mais de 40% do volume de gado confinado do Brasil.

Veja no gráfico que, em meados de agosto de 2007, tem início um movimento de baixa, impulsionado pelo aumento da oferta de gado de cocho. Ele se estende até o início de outubro, quando a redução de oferta e o aquecimento do consumo voltam a favorecer a valorização da arroba.

O Brasil confina cerca de 3 milhões de cabeças, mas abate algo entre 45 e 47 milhões. Dessa forma, pode o confinamento influenciar tanto o mercado?

Eu acredito que sim. Primeiro, porque é uma oferta concentrada: pense em cerca de 3 milhões de cabeças caindo no mercado em apenas 3 ou 4 meses, sendo que ainda tem o gado de semiconfinamento, de sal proteinado, de sal com uréia...

Segundo, é mais fácil para frigorífico usar estrategicamente essa oferta. Ela está concentrada nas mãos de menos fornecedores, em comparação ao que acontece na safra, que são monitorados e consultados com frequência. E para esses fornecedores é difícil reter os animais em engorda depois de terminado (o custo é demasiadamente alto), ou seja, eles não controlam o estoque.

Além do mais, as indústrias têm gado próprio no cocho e, hoje, contam também com o boi a termo. É o tal do *hedge* de matéria-prima.

Agora... o boi de confinamento vem de uma vez e também vai embora rápido. E, principalmente em períodos de oferta realmente reduzida, ou seja, de fase de alta do ciclo pecuário, já havendo retenção de matrizes (em função da valorização do bezerro), tem-se uma boa chance de ocorrer um “vale de oferta” no final do ano.

Isso aconteceu no ano passado (veja o gráfico mais uma vez) e pode acontecer de novo este ano. Aliás, agora em 2008 é preciso considerar também que os custos de produção elevados e o arrefecimento das expectativas de preço para outubro e novembro podem influenciar (na verdade o correto seria “já podem ter influenciado”) negativamente o segundo ou terceiro turno dos confinamentos. É uma possibilidade que não pode ser desprezada.

Em outras palavras, a oferta pode, dentro de algumas semanas, voltar a trabalhar a favor da valorização da arroba.

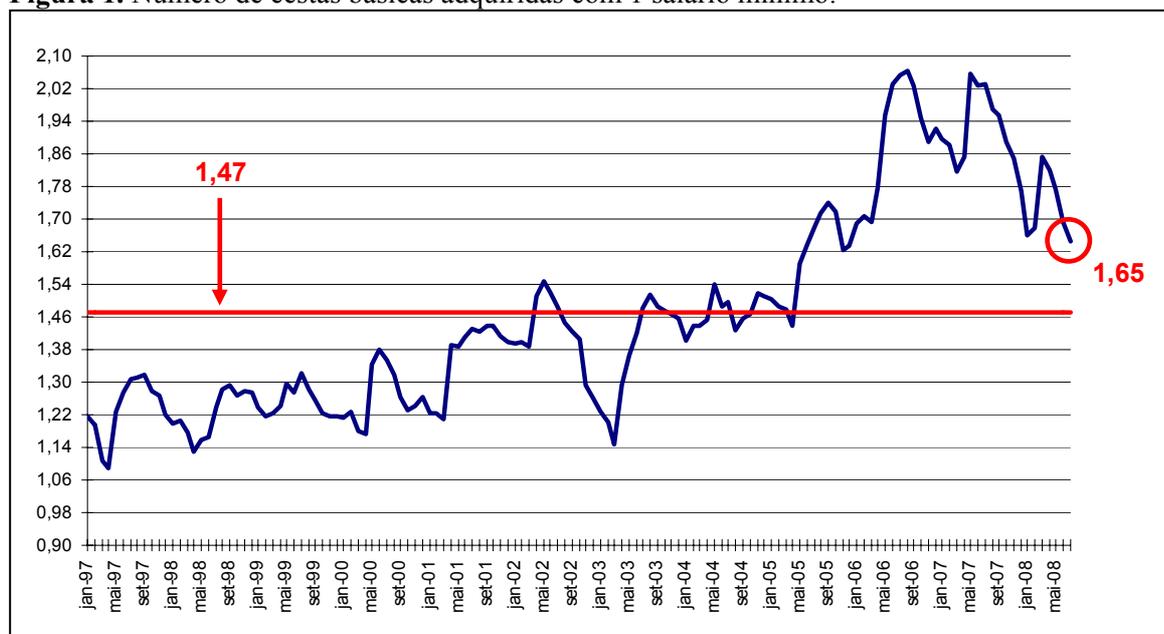
Mas e a demanda? Discutiremos esse assunto na próxima análise.

O que esperar da demanda por carne bovina nos próximos meses?

No último ano, além da redução da oferta de animais terminados, o aquecimento da demanda por carne bovina contribuiu significativamente para a valorização do boi gordo. E a demanda aumentou em função do próprio crescimento do consumo, graças ao bom desempenho da economia mundial, e da expansão da capacidade de abate das indústrias nacionais, com destaque para os grandes grupos frigoríficos.

Nos últimos meses, porém, a volta da inflação, puxada principalmente pelo aumento dos preços dos alimentos, passou a afetar negativamente o consumo, via achatamento do poder de compra. Veja a figura 1.

Figura 1. Número de cestas básicas adquiridas com 1 salário mínimo.



Fonte: Dieese / Scot Consultoria

Lá fora, em função da inflação e da crise dos Estados Unidos, o cenário também mudou um pouco. E as exportações já vinham em queda, em parte por conta da própria redução da produção, mas também como reflexo da perda de atratividade do mercado externo (graças, principalmente, à valorização do real e ao embargo da União Européia).

Esse ambiente - juntamente com o aumento da oferta de animais terminados em confinamento no Brasil Central e em pastagem de inverno no RS - minou (temporariamente?) as forças do movimento de alta no mercado físico do boi gordo, que passou a andar de lado. Na verdade, recuos foram registrados em várias regiões.

Mas a inflação começa a dar sinais de arrefecimento. Segundo a Fundação Getúlio Vargas, o IGP-DI, por exemplo, caiu 0,38% em agosto. E em final de ano, graças às festas e às gastanças típicas do período, sempre ocorre um aquecimento adicional da economia.

Em síntese, o emprego e a renda tendem a se manter em alta, ao passo que a inflação está perdendo força. Isso significa aumento do poder de compra.

No mercado internacional, espera-se, para o curto prazo, a retomada das vendas de carne *in natura* para o Chile, sendo que os embarques de carne industrializada para os Estados Unidos já recomeçaram. Além do mais, Goiás voltou, recentemente, a exportar para a Rússia (estava com as vendas suspensas devido a um caso de estomatite) e a União Européia está liberando novas fazendas para atender a demanda do bloco.

Aliás, dados consolidados do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC) apontam que, em julho, o Brasil voltou a registrar recorde em volume exportado de carne bovina, na comparação com o mesmo período do ano anterior (alta de 2%). Isso não acontecia desde setembro de 2007, e os dados preliminares de agosto apontam para um novo desempenho positivo.

O dólar, por sua vez, que há algumas semanas caminhava rumo a R\$1,50, no fechamento desta análise estava na casa dos R\$1,77. Essa desvalorização da moeda nacional, aliada aos recuos registrados para as cotações da arroba, já fizeram o boi do Brasil (tomando SP como referência) voltar a valer menos que o do Uruguai, se distanciando das cotações da Europa e dos Estados Unidos, às quais estava se aproximando “perigosamente”.

Logicamente que podemos apontar os ganhos de competitividade de proteínas concorrentes (como o frango, em função da retração dos preços do milho), o aumento dos índices de endividamento da população e outros fatores como limitadores de um possível aquecimento das vendas de carne. Mas ainda assim, analisando por “todos os lados”, não dá para negar que o cenário, em termos de venda, se mostra melhor para os próximos três meses, na comparação com os últimos três.

Cadeia produtiva do leite - 2008

Roberto Hugo Jank Jr. - Engenheiro Agrônomo e produtor de leite em Descalvado, SP;
Vice-presidente da Associação Brasileira dos Produtores de Leite - Leite Brasil

Desde 2000, a cada ano nossa cadeia do leite vem incorporando mais profissionalismo em sua, até então, amadora estrutura produtiva.

Com um crescimento importante da produção primária - da ordem de 4,5% ao ano desde o início da década – o país também vem avançando no consumo per capita e nas exportações de leite, segmento onde a balança comercial tornou-se superavitária em 2004, invertendo uma posição de déficit anual de US\$ 600 milhões em 1996, auge das importações de leite no Brasil. Os anos entre 1995 e 1999 são considerados o período mais difícil da recente história do leite no Brasil, por conta de práticas desleais de comércio nas importações combinadas com câmbio (mal) administrado.

Porém, com saldo positivo superior a US\$ 100 milhões na balança comercial, o ano de 2007 foi o ápice desta trajetória quando a combinação de preços, custos e acesso a novos mercados fez com que o mundo voltasse seus olhos para a cadeia do leite brasileira. Este ano ficou marcado pelo crescimento da demanda mundial por leite, principalmente na Ásia, mas também pelos menores estoques mundiais de leite em pó do período pós-guerra e, conseqüentemente, pelos maiores preços internacionais praticados nas últimas décadas.

Já reconhecido como um importante *player* mundial nos próximos anos, o segmento lácteo do Brasil respondeu ao estímulo do preço com grande performance. O primeiro semestre de 2008 sinaliza taxas de crescimento médio acima de 10%, chegando a 25% em alguns meses sobre o mesmo período do ano anterior. A persistir tais taxas, o Brasil deverá figurar entre os maiores crescimentos mundiais do ano, perdendo apenas para a China que, com as pesadas aquisições de gado na Oceania dos últimos anos, cresce desde o ano 2002 em parâmetros impensáveis para o resto do mundo.

Este semestre também foi marcado por um grande movimento de fusões e aquisições na área industrial, um setor com conhecido histórico de estagnação.

Grandes companhias nacionais do ramo de carnes de aves e bovinos entraram no segmento lácteo e uma delas, a Perdigão, já estaria ultrapassando a empresa líder nacional, Nestlé, em captação de leite.

Também vários fundos de investimento de capital nacional e internacional passaram a investir pesadamente no setor comprando marcas e indústrias, principalmente do segmento “longa vida”.

Merece citação a recuperação da Parmalat Brasil pelo fundo de investimento Laep, que em pouco tempo criou e abriu o capital da Integralat, empresa destinada a fomentar a produção em pontos estratégicos do país, onde, para este fim comprou empresas, terras, material genético e em pouco tempo recuperou boa parte do *share* de mercado da antiga Parmalat.

Mas, em uma recorrente e infeliz característica do agronegócio Brasileiro, os excedentes que surgiram com a combinação do estímulo à produção decorrente dos preços praticados em 2007, com a valorização do real refletida em perdas na competitividade comercial externa e com a queda recente dos preços internacionais do leite, fizeram com que o ótimo ambiente comercial se modificasse de forma radical nos últimos meses.

Com isso, boa parte dos novos investimentos no setor apresentou resultados muito aquém das expectativas iniciais; o próprio projeto de recuperação da Parmalat desmoronou na mesma velocidade com que foi criado, deixando de captar nas últimas semanas volumes calculados pelo mercado em 2,5 milhões de litros diários.

Mas este estímulo de 2007 também provocou um “boom” de investimentos no setor primário, principalmente em aquisições de gado, equipamentos de ordenha, máquinas agrícolas e insumos. Diversos

novos entrantes do setor, produtores e laticínios, participaram destes investimentos, que beneficiaram e muito o setor fornecedor de insumos e equipamentos.

Ainda assim, desde os anos 1990 permanece a trajetória de queda no número de produtores de leite, demonstrando que houve ganhos na ponta tecnológica resultando em melhor qualidade da matéria prima e produção por hectare, se comparados aos índices da década anterior.

Também não posso deixar de mencionar o caso policial da “soda cáustica” em 2007, que acabou por criar um novo divisor de águas no que se refere à qualidade do leite; é certo que após os incidentes a qualidade melhorou muito na plataforma das usinas e a IN 51 ganhou um novo significado como sinalizadora de padrões para o leite.

O momento atual reflete este agitado histórico dos últimos meses, mas acredito que o ambiente comercial deverá se estabilizar em novos patamares de preços e custos, estes decorrentes da nova ordem mundial detonada pela impressionante demanda da Ásia e aumento dos preços do petróleo, assim como também ocorreu recentemente em outras cadeias produtivas, como o boi e a soja.

Dessa forma, ainda que com sobressaltos, a cadeia do leite deverá continuar sua recente e inédita trajetória rumo ao profissionalismo.

Foliculogênese em bovinos

Seneda, M.M.¹; Silva, K.C.F.¹; Santos, G.M.G.¹; Max, M.C.¹; Gomes, R.G.¹;
Lisboa, L.A.¹; Pontes, J.H.F.²

¹Laboratório de Reprodução Animal, Departamento de Clínicas Veterinárias,
Universidade Estadual de Londrina;

²In Vitro Brasil Ltda.

Resumo

Novas teorias têm sido propostas sobre a origem e o crescimento dos gametas femininos, desafiando conceitos de mais de 150 anos. A possibilidade de formação contínua de folículos e oócitos apresenta-se como hipótese extremamente interessante, mas requer ainda novos trabalhos, seja para comprovar sua existência ou refutá-la definitivamente. O estudo da epigenética surge como grande possibilidade para uma melhor compreensão dessas teorias. As variações epigenéticas são dinâmicas, transmitidas entre gerações e guardam relação com o ambiente. O estoque finito de oócitos, a renovação contínua, ou a coexistência de ambos são discutidos neste artigo. A liderança brasileira em segmentos como a produção de embriões e o desenvolvimento de protocolos de controle reprodutivo está fundamentada na foliculogênese, tema a ser discutido a seguir.

Introdução

A reprodução é uma das áreas da ciência em maior desenvolvimento na atualidade. As biotécnicas associadas à reprodução têm apresentado um crescimento extraordinário nos últimos anos, tanto no contexto molecular quanto nos aspectos aplicados. A fisiologia da reprodução animal tem sido aprimorada pela sua importância na pesquisa fundamental, no incremento da produção zootécnica com fins comerciais e como modelo para diversas áreas da medicina humana.

Para uma expansão sólida de todo o universo tecnológico vinculado à reprodução, a base fundamental de toda a fisiologia feminina é a foliculogênese. Por esta razão, o interesse sobre o tema tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. As crescentes aplicações, bem como os múltiplos desafios das biotécnicas de colheita e transferência de embriões, produção *in vitro* de embriões e inseminação artificial em tempo fixo, além de técnicas associadas, como a medicina regenerativa, por exemplo, justificam a necessidade do contínuo aprimoramento do conhecimento da fisiologia das fêmeas, envolvendo oogênese, foliculogênese e desenvolvimento embrionário.

Somando-se aos aspectos dinâmicos da aplicação de tais biotécnicas, o estudo da foliculogênese apresenta-se em momento extremamente importante. No contexto do estabelecimento da população folicular ovariana, novas teorias têm sido propostas, desafiando conceitos de mais de 150 anos sobre a origem e o crescimento dos gametas femininos. A neo-foliculogênese apresenta-se como hipótese a requerer profundos e sólidos trabalhos, seja para comprovar sua existência, refutá-la definitivamente, ou ainda mostrar a coexistência de ambos os conceitos.

Um dos aspectos mais surpreendentes da foliculogênese é a produção de oócitos obtida naturalmente a partir de fêmeas Nelore. Vacas Nelore produzem, em média, 25 oócitos por sessão de aspiração folicular, sem qualquer procedimento adicional, como aplicação de FSH, BST ou controle do ciclo estral. Esta média de oócitos por sessão é aproximadamente quatro vezes maior à produção obtida de vacas de raças européias. Um aspecto bastante peculiar refere-se às fêmeas capazes de produzir centenas de oócitos em uma única aspiração folicular. Há relatos de 251 (Seneda et al., dados não publicados) e até 564 oócitos obtidos em um único procedimento (Santos et al., 2005). Considerando a possibilidade de três ondas de crescimento folicular, seria possível a projeção de mais de 1000 folículos recrutados em apenas um ciclo estral.

As biotécnicas associadas à reprodução têm apresentado um crescimento extraordinário nos últimos anos, tanto no contexto molecular quanto nos aspectos aplicados. O Brasil apresenta-se como segundo país em

embriões bovinos produzidos *in vivo* e líder mundial dos produzidos *in vitro*, e isto certamente tem correlação 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 (Nonato Jr et al, 2004).

Igualmente em franco desenvolvimento encontra-se a epigenética, a área do conhecimento que estuda as interações dinâmicas do DNA com as proteínas e grupos químicos presentes no núcleo da célula. Embora as possibilidades de variação da expressão gênica sejam conhecidas há alguns anos, apenas em passado bastante recente as interações epigenéticas passaram a ser melhor compreendidas. Um grande incremento ao estudo da epigenética adveio com a surpreendente descoberta do limitado número de genes da espécie humana. O Projeto Genoma Humano demonstrou de maneira inequívoca a necessidade de se buscar outras explicações, além da quantidade de genes, para justificar a complexidade funcional dos organismos superiores.

Apesar das áreas citadas serem de extrema importância para o progresso da ciência e para a herança genética das futuras gerações, o controle epigenético da reprodução é relativamente pouco conhecido. No contexto da reprodução, vários aspectos do conhecimento fisiológico, da eficiência de produção e da aplicabilidade do modelo animal nas ciências biomédicas, seriam extremamente beneficiados com um maior conhecimento da epigenética.

Somando-se aos aspectos dinâmicos da aplicação de tais biotécnicas, o estudo da foliculogênese apresenta-se em momento extremamente importante. No contexto do estabelecimento da população folicular ovariana, novas teorias têm sido propostas, desafiando conceitos de mais de 150 anos sobre a origem e o crescimento dos gametas femininos. A neo-foliculogênese apresenta-se como hipótese a requerer profundos e sólidos trabalhos, seja para comprovar sua existência ou refutá-la definitivamente. O estoque finito de oócitos, a renovação contínua, ou a co-existência de ambos são discutidos neste artigo.

Conceitos básicos da foliculogênese

Admite-se que o início da foliculogênese em fêmeas mamíferas ocorre na fase fetal, quando as células germinativas primordiais migram do saco vitelino para a gônada em formação, originando as oogônias. Estas diferenciam-se em oócitos, os quais, associados com as células da granulosa, constituem os folículos primordiais. Os oócitos iniciam o processo de divisão meiótica, o qual é interrompido em prófase da meiose I até o recrutamento folicular (Soto-Suazo & Zorn, 2005; van den Hurk & Zhao, 2005). Somente após o recrutamento há continuidade do desenvolvimento do folículo e retomada da meiose, no estágio final de desenvolvimento do folículo antral (Eppig et al., 1992). Apesar da importância do recrutamento folicular para o entendimento da foliculogênese, os mecanismos envolvidos nesse processo ainda permanecem desconhecidos.

Uma vez recrutado, o folículo primordial passa a folículo primário, cujas células granulosas apresentam formato cubóide. Trata-se mais de um processo de maturação, pois o oócito praticamente permanece com o mesmo diâmetro. Uma característica marcante dessa fase é o surgimento da zona pelúcida, estrutura ao redor do oócito mantida por todo o desenvolvimento folicular.

Com o aumento do oócito, a caracterização da zona pelúcida, as primeiras células da teca e pelo menos duas camadas da granulosa, o folículo secundário encontra-se constituído. Ao fim deste estágio, a ação gonadotrófica já pode ser detectada, sendo então iniciados os efeitos amplos do FSH e LH (van den Hurk et al., 2000).

A etapa seguinte do desenvolvimento consiste no folículo terciário, cuja distinção do anterior ocorre pela multiplicação das camadas da granulosa, além da organização completa das células da teca. O FSH tem se revelado como agente fundamental nesta etapa. Não apenas pela sua ação endócrina conhecida, mas também pelo seu envolvimento na ação parácrina de fatores de crescimento, como relatado para membros do grupo FGF, como o FGF-8 (Buratini et al., 2005). Um grande evento fisiológico, a formação do antro,

representa um marco importante no estudo do crescimento folicular, pois é precursor dos processos de desvio e dominância folicular.

Além de representar a fase de mais intensa ação gonadotrófica, a presença do líquido folicular viabiliza os estudos ultra-sonográficos, permitindo o acompanhamento *in vivo* até o destino final do folículo: atresia ou ovulação. A repetição desse processo ao longo da vida pós-natal leva ao declínio progressivo do número de oócitos, sendo aceita a ausência de células germinativas nos ovários na senilidade (Waldeyer, 1870).

Novos conceitos em foliculogênese

Apesar do conceito sobre o estoque finito e não renovável de células germinativas ser considerado uma premissa básica da fisiologia da reprodução há mais de 150 anos (Byskov et al., 2005), Johnson et al. (2004 e 2005) apresentaram evidências para propor a revisão deste paradigma, demonstrando indícios da continuidade da oogênese e foliculogênese no período pós-natal, pela atuação de células-tronco.

Existem várias populações de células-tronco na medula óssea, com evidências promissoras de potencial de plasticidade, isto é, habilidade de gerar células de outros tecidos, independente do folheto embrionário de origem. Este potencial de plasticidade da célula-tronco parece favorecer a hipótese de neo-oogênese/foliculogênese formulada por Johnson et al. em 2004. Esses autores demonstraram a ocorrência de proteínas específicas do início da meiose em ovários de camundongas adultas, o que somente deveria ocorrer durante a fase fetal, de acordo com o conceito atual. Em 2005, Johnson et al. submeteram um grupo de camundongas à esterilização química, relatando ausência de folículos após o tratamento. Em seguida, os animais receberam transfusão de medula óssea e sangue periférico e, uma semana após, folículos viáveis em crescimento foram identificados nos ovários.

A hipótese de Johnson et al. (2004 e 2005) tem promovido acirrados debates, sendo contrariada por outros pesquisadores. Nos aspectos clínicos, a ocorrência da menopausa e a inatividade ovariana em fêmeas senis apresentam-se como fenômenos amplamente aceitos. Outras críticas referem-se à ausência de sinais de início e término da primeira prófase meiótica e subsequente fase de diplóteno nos supostos oócitos derivados de células-tronco. Além disso, o curto período para crescimento dos novos folículos permitiu o questionamento da eficácia da esterilização química.

Em um experimento especificamente delineado para aferir a hipótese de Johnson et al. (2004; 2005), Eggan et al. (2006) pesquisaram a renovação folicular por células difundidas pelo sangue em camundongas parabióticas, animais isogênicos unidos cirurgicamente pela lateral do corpo, para uma circulação sanguínea partilhada. Sendo uma das fêmeas transgênica para uma proteína fluorescente, esperava-se a expressão desta proteína nos oócitos da outra fêmea, não transgênica. No entanto, mesmo após 6 meses testando diversos ensaios experimentais nas camundongas parabióticas, os autores não obtiveram ovulação de nenhum oócito expressando a proteína fluorescente, contrariando a teoria apresentada por Johnson et al. (2004 e 2005).

Apesar da conclusão de Eggan et al. (2006) mencionada acima, alguns detalhes comparativos entre os trabalhos merecem atenção. Enquanto o grupo liderado por Tilly (Johnson et al. 2004 e 2005) descrevem a “renovação folicular”, Eggan et al. (2006) declaram a ausência de “oócitos ovulados”. Ou seja, permanece uma lacuna, referente ao intervalo existente entre a formação e crescimento de um folículo – aspectos inicial e intermediário – e a presença de um oócito maduro no oviduto – produto final.

Apesar das oposições à teoria de renovação folicular pós-natal, outros grupos, utilizando diferentes estratégias experimentais, realizaram descobertas bastante promissoras, indiretamente em favor da mesma. Após indução de diferenciação de uma cultura de células-tronco de epiderme de fetos suínos, Dyce et al. (2006) verificaram que algumas dessas células apresentaram marcadores típicos de células germinativas em formação. Posteriormente, foram identificadas estruturas semelhantes a folículos em crescimento, capazes de produzir estrógeno, progesterona e responsivas a estímulos de FSH e LH. Além disso, os autores relataram partenogênese espontânea, com formação de estruturas semelhantes a embriões. Apesar de já haver relato na literatura de diferenciação *in vitro* espontânea de células-tronco em

células germinativas a partir de cultivo de células embrionárias humanas (Clark et al., 2004), até o momento, nenhum outro grupo alcançou o feito de produção de oócitos, folículos (secretando esteróides) e embriões – embora partenogênicos – a partir de células-tronco, como descrito pela equipe de Guelph (Dyce et al., 2006).

Mais recentemente, Liu et al. (2007) utilizaram ovários de mulheres adultas obtidos cirurgicamente por razões extra-ovarianas, como anomalias uterinas. Através de técnicas de RT-PCR, *Western Blot* e imunohistoquímica, os autores pesquisaram a expressão de alguns dos principais genes envolvidos com a meiose (SCP3, Oct3, Oct4, c-KIT, SCP3, PCNA e KI-67), concluindo não haver indícios da ocorrência de meiose, contrariando dessa forma a hipótese de renovação folicular pós-natal.

Tilly & Johnson (2007) prontamente contra-argumentaram a conclusão de Liu et al. (2007), alegando ser a “ausência da evidência” argumento científico insuficiente para refutar a nova hipótese. Segundo os pesquisadores de Harvard, para refutar a nova hipótese, experimentos mais sólidos do que ausência de expressão gênica seriam necessários, especialmente após transcorridos quatro anos desde o primeiro artigo apresentando a neo-foliculogênese (Johnson et al. 2004).

A partir dos trabalhos de Johnson et al. (2004 e 2005), sugerindo a participação de células-tronco provenientes da medula óssea na neo-oôgenese/foliculogênese, algumas especulações podem ser feitas. Seria possível ocorrer alguma alteração folicular ou ovariana após auto-transferência de medula óssea ou retirada da mesma e reinjeção no mesmo organismo? Quando submetidas a um estímulo, camundongas jovens que sofreram esterilização química apresentariam resposta diferente de camundongas que tiveram esgotamento natural de suas reservas foliculares?

Seguindo esse raciocínio, seria a esterilização química um agente para a neofoliculogênese? Sabe-se que mulheres jovens que sofreram esterilização química, quando submetidas a um estímulo, voltaram a produzir folículos.

A teoria da neo-oogênese/foliculogênese é polêmica, afinal, trata-se de um questionamento sobre um conceito amplamente aceito por mais de 150 anos. Os trabalhos atualmente em andamento deverão contribuir para esclarecer melhor a questão.

Epigenética e foliculogênese

A “epigenética” estuda as modificações fenotípicas herdáveis sem alterações na seqüência do DNA, ou seja, informações carregadas pelo código genético não vinculadas ao DNA (Cosgrove & Wolberger, 2005).

Nos eucariotos, a informação genética é armazenada na cromatina, um polímero composto pela associação do DNA com 4 proteínas histonas - H2A, H2B, H3 e H4 - mais uma histona de conexão – H1 (Trotter e Archer, 2007). O conjunto de 147 pares de base do DNA arranjadas ao redor de um octâmero de proteínas histonas constitui o nucleosomo.

Por muito tempo, acreditou-se que o nucleosomo tivesse função apenas estrutural, permitindo a condensação e organização do DNA no núcleo da célula (Cosgrove & Wolberger, 2005).

Recentemente, descobriu-se o papel crucial e dinâmico do nucleosomo no controle da expressão gênica. Conforme a maior ou menor interação do DNA com as proteínas que compõem o nucleosomo, a expressão dos genes pode ser alterada. Em outras palavras, o controle transcricional depende da acessibilidade do DNA, sendo este aspecto regulado por modificações nas histonas (Narlikar et al, 2002). Essas modificações bioquímicas podem ocorrer por fatores endógenos ou exógenos, sendo normalmente de natureza reversível. As principais alterações bioquímicas, como metilação, fosforilação e acetilação, são capazes de interferir na interação do DNA com as histonas, causando modificações na capacidade de expressão do código genético. Essas reações são predominantemente reversíveis, constituindo assim uma maneira muito dinâmica de facilitar ou reprimir a ação do DNA (Mellor, 2006).

Os processos epigenéticos são naturais e essenciais para muitas funções do organismo, porém se ocorrerem inadequadamente podem ter efeitos adversos na saúde e no comportamento. Agentes como metais pesados, pesticidas, hormônios, vírus, bactérias entre outros podem gerar alterações bioquímicas na cromatina, interferindo na expressão de certos genes, podendo levar a disfunções respiratórias, reprodutivas e a vários tipos de câncer. Essas modificações epigenéticas podem ser transmitidas por até quatro gerações, evidenciando assim a importância da epigenética no processo evolutivo (Weinhold, 2006).

Diversos fatores, internos e externos, são capazes de atuar nas modificações no nucleossomo e assim interferir na expressão final do código genético (Kimmins & Sassone-Corsi, 2005). Portanto, a epigenética poderia ser considerada uma ponte entre o genótipo e o fenótipo (Goldberg et al., 2007), apresentando-se como um mecanismo essencial para o processo evolutivo, já que estímulos externos podem variar a expressão do genoma. Tais aspectos apresentam acréscimo de importância para as células germinativas, considerando a propagação de informações para as próximas gerações (Kimmins & Sassone-Corsi, 2005).

A ativação ou repressão da transcrição também está relacionada com a ação de remodeladores da cromatina. Os remodeladores são complexos protéicos que alteram a mobilidade do nucleossomo, permitindo uma espécie de “deslizamento” entre as proteínas histonas e a dupla hélice do DNA. Com essa movimentação, ocorre também uma modificação na possibilidade de expressão do DNA (Cosgrove et al., 2004). Os eucariotos contêm pelo menos cinco famílias de remodeladores de cromatina: SWI/SNF, ISWI, NURD/Mi-2, INO80 e SWR1 (Saha et al., 2006). O complexo SWI/SNF, um dos mais estudados, regula a expressão gênica através de elementos promotores e regulatórios (Knott et al., 2006). Trata-se de um complexo protéico ATP-dependente que está envolvido em aspectos críticos do crescimento celular e na estabilidade do genoma (Kadam & Emerson, 2003). Foi primeiramente identificado em leveduras, sendo altamente conservado entre os eucariotos (Peterson & Workman, 2000).

A BRG1 (*brahma related gene*) é uma importante subunidade protéica do complexo SWI/SNF, e parece apresentar uma importância crucial nos eventos da reprodução. A expressão da BRG1 em oócitos (Bultman et al., 2000) e embriões (Bultman et al., 2006) de camundongos evidenciam a participação desta proteína na foliculogênese e embriogênese. Oócitos nulos para a expressão da BRG1 completaram a meiose e foram fecundados, porém, os embriões concebidos tiveram seu desenvolvimento interrompido no estágio de 2 a 4 células, com a atividade transcricional reduzida em 30% dos genes, o que sugere o envolvimento desta proteína na ativação do genoma embrionário e como marcador da qualidade oocitária e embrionária (Bultman et al., 2006). A ausência da expressão da BRG1 também foi associada à letalidade embrionária precoce (Bultman et al., 2000).

Admite-se que o complexo processo da foliculogênese em ovários mamíferos é regulado por um coordenado programa entre elementos genômicos e epigenéticos (Ruiz-Cortés et al., 2005). Relacionando a epigenética com o processo de foliculogênese, um estudo mostrou que a fosforilação do aminoácido de número 10, uma serina da histona H3, foi relacionada com atividade transcricional favorável ao processo de divisão celular (Hans & Dimitrov, 2001). Por sua vez, esta modificação da H3 apresentou-se vinculada à ação tanto do FSH como do estradiol, durante o período pré-ovulatório, comprovando a estreita relação desta alteração na cromatina com a regulação do crescimento folicular (Ruiz-Cortés et al., 2005).

Além da serina 10 da H3, o aminoácido de número 4 da H3, uma lisina (K), tem despertado o interesse dos pesquisadores. A H3K4 e a enzima reguladora da sua metilação – *Lysine Specific Demethylase 1* (LSD1) – parecem exercer um papel central no comando da expressão gênica, não só na meiose das células germinativas, mas também nas células de suporte, como demonstrado recentemente na espermatogênese (Godmann et al., dados não publicados) e na oogênese para *Drosophila* (Di Stefano et al., 2007).

Em mamíferos, os primeiros resultados indicam intensa atividade da H3K4 no oócito, desde o estágio de folículo primordial até os grandes folículos antrais. Para as células da granulosa e da teca, diferentes padrões foram identificados, conforme o número de metilações. Enquanto a mono e a di-metilação da H3K4 aparentemente restringem suas atividades aos folículos antrais, a H3K4 tri-metilada foi identificada

mais precocemente, em folículos primários e secundários, possivelmente exercendo um papel na regulação dos vários fatores locais envolvidos com o crescimento folicular nesta fase. A LSD1 não foi identificada em nenhuma etapa pré-ovulatória, sugerindo uma atividade ampla e ininterrupta da H3K4 ao longo de todo o crescimento folicular (Seneda et al., 2008).

Um aspecto particularmente interessante é o papel da epigenética no controle da pluripotência de células-tronco (Surani et al., 2007), e especialmente a atuação da H3K4 no restabelecimento da pluripotência em células somáticas, ou transdiferenciação (Kimura et al., 2004; Lin & Dent, 2006).

De maneira geral, o caráter dinâmico das modificações epigenéticas parece estar muito mais próximo ao contexto aplicado do que se imaginava. Afinal, mudanças sutis nos níveis de LH, FSH e hormônios esteróides podem alterar a capacidade de expressão gênica das células ovarianas, com grande repercussão na liberação de hormônios e do oócito e, por conseguinte, nas taxas de prenhez. Embora hoje ainda não se saiba exatamente a melhor maneira de se modular as modificações epigenéticas *in vivo*, os conhecimentos atuais sinalizam para uma situação de grande interação entre as ações práticas feitas no campo, e os reflexos dessas ações no contexto de atividade celular da gônada feminina.

Considerações finais e perspectivas aplicadas

Concluindo, o conceito do estoque finito de gametas femininos é um fato bem estabelecido e foi comprovado diversas vezes nas últimas décadas. Mas a capacidade de diferenciação de células-tronco tem sido cada vez mais surpreendente e células complexas, como neurônios e hepatócitos, já foram obtidas a partir de células-tronco adultas.

Considerando a recente constatação de como a epigenética pode interferir na capacidade de expressão gênica, a possibilidade de diferenciação de células-tronco em oócitos por mecanismos epigenéticos parece ser cada vez mais evidente. Uma vez que trabalhos recentes têm demonstrado a importância da participação epigenética na foliculogênese, a pergunta a ser feita é: seria a epigenética a chave para a compreensão da hipótese da renovação folicular pós-natal? Neste cenário inédito e promissor, outra pergunta se apresenta: seria compatível a co-existência de ambos os modelos, ou seja, a produção de oócitos na fase fetal e, sob condições específicas, a neo-formação folicular?

Tais perguntas poderiam desenhar situações interessantes no panorama aplicado. Por exemplo, uma auto-inoculação de medula óssea poderia recuperar a atividade ovariana de uma fêmea senil? Uma injúria provocada no estroma ovariano poderia ser um estímulo para a proliferação de eventuais células-tronco e/ou reparação da reserva folicular? O cruzamento de linhagens ou de tipos *taurus* e *indicus* poderia favorecer essa maior capacidade de produção de folículos? Como obter os melhores resultados pela modulação epigenética a partir dos fármacos de controle do ciclo reprodutivo?

As raças zebuínas podem ser um excelente modelo biológico para a elucidação de algumas dessas questões. A surpreendente quantidade de oócitos obtida naturalmente a partir de fêmeas *indicus* sinalizam claramente para isso.

As evidências sugerem algo novo, porém mais investigações são necessárias. A Ciência requer sempre o espírito crítico e isento de investigação, sem ceticismo gratuito ou impulsividade. Podemos estar diante de uma modificação extraordinária do conceito de foliculogênese, com potenciais reflexos na TE, FIV e IATF e todo o segmento da reprodução. Cabe a cada um de nós buscar a constante atualização e a análise crítica dos artigos, para que os conceitos reais sejam encontrados.

Referências bibliográficas

Bukovsky, A., Svetlikova, M., Caudle, M.R. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2005(3)17.

Bultman, S., Gebuhr, T., Yee, D., La Mantia, C., Nicholson, J., Gilliam, A., Randazzo, F., Metzger, D., Chambon, P., Crabtree, G. A Brg1 null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol. Cell* 2000; 6: 1287–1295.

Bultman, S., Gebuhr, T.C., Pan, H., Svoboda, T., Schultz, R.M., Magnuson T. Maternal BRG1 regulates zygote genome activation in the mouse. *Genes & Dev.* 2006; 20:1744-54.

Buratini Jr, J., Teixeira, A.B., Costa, I.B., Glapinski, V.F., Pinto, M.G.L., Giometti, I.C., Barros, C.M., Cao, M., Nicola, E.S., Price, C.A. Expression of fibroblast growth factor-8 and regulation of cognate receptors, fibroblast growth factor receptor-3c and -4, in bovine antral follicles. *Reproduction* 2005; 130:343-50.

Byskov, A.G., Faddy, M.J., Lemmen, J.G., Andersen, C.Y. Eggs forever? *Differentiation* 2005; 73:438-46.

Clark, A.T., Bodnar, M.S., Fox, M., Rodriguez, R.T., Abeyta, M.J., Firpo, M.T., Pera, R.A. Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Human Molecular Genetics* 2004; 13:727-39.

Cosgrove, M.S., Boeke, J.D., Wolberger, C. Regulated nucleosome mobility and histone code. *Nature* 2004; 11:1037-43.

Cosgrove, M.S., Wolberger, C. How does the histone code work? *Biochemistry and Cell Biology* 2005; 83:468-76.

Di Stefano, L., Ji, J.Y., Monn, N.S., Herr, A., Dyson, N. Mutation of drosophila LSD1 disrupts H3-K4 methylation, resulting in tissue-specific defects during development. *Current Biology* 2007; 17:808-12.

Dyce, P.W., Lihua, W., Li, J. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature Cell Biology* 2006; 8:384-90.

Eggan, K., Jurga, S., Gosden, R., Min, I.M., Wagers, A.J. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature* 2006; 441:1109-14.

Eppig, J.J., Schroeder, A.C., O'Brien, M.J. Developmental capacity of mouse oocytes matured in vitro: effects of gonadotrophic stimulation, follicular origin and oocyte size. *J. Reprod. Fertil.* 1992; 95:119-27.

Goldeberg, A.D., Allis, C.D., Bernstein, E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell* 2007; 128:635-38.

Hans, F., Dimitrov, S. Histone H3 phosphorylation and cell division. *Nature* 2001; 20(24):3021-27.

Johnson, J., Canning, J., Kaneko, T., Pru, J.K., Tilly, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature* 2004; 428:145-50.

Johnson, J., Bagley, J., Skaznik-Wikiel, M., Lee, H., Adams, G., Niikura, Y., Tschudy, K., Tilly, J., Cortes, M., Forkert, R. Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood. *Cell* 2005; 122:303-15.

Kadam, S., Emerson, B.M. Transcriptional Specificity of Human SWI/SNF BRG1 and BRM Chromatin Remodeling Complexes. *Molecular Cell* 2003; 11:377-389.

Kimmins, S., Sassone-Corsi, P. Chromatin remodelling and epigenetic features of germ cells. *Nature* 2005; 434:583-89.

Kimura, H., Tada, M., Nakatsuji, N., Tada, T. Histone Code Modifications on Pluripotential Nuclei of Reprogrammed Somatic Cells. *Molecular and Cellular Biology* 2004; 24:5710-20.

- Knott, J.G., Palmer, S., De Matos, D.G. P-226 Search for epigenetic markers of oocyte and embryo quality: Elucidation of role of Brg1 (*brahma-related gene 1*) in embryo development in mouse. *Fertility and Sterility* 2006; 86(3): S217-S218 J, Supplement 1.
- Lin, W., Dent, S.Y.R. Functions of histone-modifying enzymes in development. *Current Opinion in Genetics & Development* 2006; 16:137-42.
- Liu, Y., Wu, C., Lyu, Q., Yang, D., Albertini, D.F., Keefe, D.L., Liu, L. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Developmental Biology* 2007 (in press).
- Mellor, J. Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends in Genetics* 2006; 22(6):320-29.
- Narlikar, G.J., Fan, H.Y., Kingston, R.E. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell* 2002; 108:475-87.
- Nonato Jr, I., Rufino, F.A., Sanches, B.V., Pontes, J.H.F., Uvo, S., Ereno Jr., J.C., Seneda, M.M. Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE. *Acta Scientiae Veterinariae* 2004; 32:95.
- Peterson, C.L., Workman, J.L. Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr.Opin. Genet. Dev.* 2000; 10:187-92.
- Ruiz-Cortés, T.Z., Kimmins, S., Monaco, L., Burns, K.H., Sassone-Corsi, P., Murphy, B.D. Estrogen mediates phosphorylation of histone H3 in ovarian follicle and mammary epithelial tumor cells via the mitotic kinase, aurora B. *Molecular Endocrinology* 2005; 19(12):2991-3000.
- Saha, A., Wittmeyer, J., Cairns, B.R. Chromatin remodeling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature* 2006; 7:437-47.
- 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. Aspição folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. *Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal* 2005; 16:79.
- Seneda, M.M., Godmann, M., Murphy, B.D., Kimmins, S., Bordignon, V. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 1 in the porcine ovary. *Reproduction* 2008; 135:829-38.
- Soto-Suazo, M., Zorn, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. *Animal Reproduction* 2005; 3:147-60.
- Surani, M.A., Hayashi, K., Hajkova, P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 2007; 128:747-62.
- Tilly, J.L., Johnson, J. Recent arguments against germ cell renewal in the adult human ovary: is an absence of marker gene expression really acceptable evidence of an absence of oogenesis? *Cell Cycle* 2007; 6(8):879-83.
- Trotter, K.W., Archer, T.K. Nuclear receptors and chromatin remodeling machinery. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2007, Review; 162-167.
- van den Hurk, R., Abir, R., Telfer, E.E., Bevers, M.M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. *Human Reproduction Update* 2000; 6:457-74.
- van den Hurk, R., Zhao, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005; 63:1717-51.

Vitt, U.A., McGee, E.A., Hayashi, M., Hsueh, A.J. In vivo treatment with GDF9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology* 2000; 141:3814-20.

Waldeyer, W. *Eierstock und Ei*. Leipzig: Engelmann, 1870.

Weinhold, B. Epigenetics: The science of change. *Environmental Health Perspectives* 2006; 114:160-67.

Techniques for synchronization of follicular wave emergence and ovulation: Past, present and future

R.J. Mapletoft¹, G.A. Bó² and G.P. Adams¹

¹Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada

²Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Córdoba, Argentina

Introduction

The genetic progress made in the dairy industry through the use of artificial insemination (AI) is a matter of record, and yet AI is still not widely used in the beef industry. However, genetic information on beef bulls is increasingly becoming available, and potential benefits are apparent. Furthermore, semen sexing and genetic selection based on DNA markers has increased the need for AI. Most AI programs require estrus detection which is time consuming and costly, and becoming increasingly inefficient, especially in the dairy industry. Estrus synchronization does offer alternatives, but until recently, precise control of the time of ovulation has not allowed for the elimination of estrus detection. The following review will look at estrus synchronization from a historical perspective, and will conclude with current approaches to the synchronization of ovulation for fixed-time AI and speculate on likely future developments.

The past

Methods of estrous cycle control in cattle have included various pharmacologic treatments. As the luteal phase of the estrous cycle has been most amenable to control by external intervention, two basic techniques have been applied. These are prolongation of the progestational phase of the estrous cycle, e.g. progesterone or various progestins, and shortening of the progestational phase i.e., induction of luteolysis, e.g., prostaglandin F_{2α} (PGF). These approaches have resulted in induction of estrus and ovulation within a predictive range of 4 or 5 days, which reduces but doesn't eliminate estrus detection.

Progestins

Sixty years ago, administration of progesterone was shown to alter ovarian function and inhibit ovulation in cattle (Christian and Casida, 1948). Results of subsequent studies demonstrated that progestins, if given long enough to allow normal regression of the CL (i.e., ≥ 14 days), would induce synchronous estrus, but were associated with lowered fertility (Trimberger & Hansel, 1955; Hansel et al., 1961; Wiltbank et al., 1965). Luteal phase levels of progesterone have been found to suppress LH pulse frequency (Savio et al., 1993; Stock & Fortune, 1993), which in turn causes suppression of dominant follicle growth and emergence of a new wave (Adams et al., 1992b; Sirois & Fortune, 1988). Although it has been shown that progesterone suppresses LH secretion, progesterone apparently does not suppress FSH secretion (Adams et al., 1992a). Hence, progesterone treatment will slow the growth of LH-responsive follicles (i.e., primarily the dominant follicle) and will prevent ovulation, but it will not stop or synchronize regular periodic FSH surges and emergence of follicular waves.

Growth of the dominant follicle has been shown to be suppressed by progesterone in a dose-dependent fashion (Adams et al., 1992b); above-normal, normal, and below-normal luteal phase progesterone levels, respectively, resulted in undersized, normal, and oversized dominant follicle profiles. Doses of progestins commonly used to control the estrous cycle in cattle have relatively less suppressive effects on LH secretion than normal luteal phase progesterone levels, and are associated with development of oversized "persistent" dominant follicles (Savio et al., 1993; Stock & Fortune, 1993; Custer et al., 1994). However, persistent follicles, after a prolonged growing phase, will enter a static phase followed eventually by regression and emergence of a new wave (Adams et al., 1992a).

Melengestrol acetate (MGA) is the progestin that has been most commonly used for estrus synchronization in cattle in North America. The advantages of MGA include low cost, oral administration and extremely low toxicity. However, lowered fertility subsequent to prolonged treatment with MGA (≥ 14 days) in early studies (reviewed in Odde, 1990; Larson & Ball, 1992) has been attributed to aging of

the oocyte within the persistent follicle (Custer et al., 1994; Mihm et al., 1999). Spontaneous maturation (i.e., germinal vesicle breakdown and cumulus expansion) was evident in 23/23 “persistent” dominant follicles compared with 5/29 in growing dominant follicles (Revah & Butler, 1996). The potential of inducing “persistent” oversized follicles for the purpose of synchronizing estrus has been investigated (Kinder et al., 1996), and it has been hypothesized that regression rather than ovulation of the “persistent” follicle may be electively induced resulting in predictable emergence of a new follicular wave (Kastelic et al., 1996; McDowell et al., 1998). Indeed, Colazo et al. (2006) induced persistent follicles with used progestin devices and caused ovulation, resulting in emergence of a new follicle wave.

The use of estradiol in combination with progestins was initially introduced to cause uterine-induced luteolysis (Wiltbank et al., 1961; reviewed in Odde, 1990), and it was for this reason that estradiol was incorporated into one of the first commercially available treatments for estrus synchronization in cattle; i.e., Syncro-Mate B (SMB). The treatment involved a subcutaneous ear implant containing 6 mg norgestomet, that was left in place for 9 days, and an injection of 5 mg estradiol valerate and 3 mg norgestomet at the time of insertion. A high percentage of cattle (77% to 100%) showed estrus soon after SMB implant removal (reviewed in Odde, 1990). However, pregnancy rates were variable (33% to 68%), in part because of variability in the proportion of animals that were cycling at the time of treatment. A more recent version of the norgestomet implant, Crestar, has been used similarly, but because of the make-up of the implant, the implant contains only 3 mg of norgestomet (Kastelic et al., 1999).

Progesterone-releasing intra-vaginal devices, which are placed in the vagina for 7 or 8 days, have now become available for estrus synchronization (Mapletoft et al., 2003). Initially, luteal regression was induced by treatment with estradiol benzoate at the time of device insertion, but more recently, treatment with PGF at the time of device removal, or up to 2 d prior to device removal, has been used to induce luteal regression. Most cattle will be in estrus 2 to 3 days after the device is removed, and because of the shorter treatment interval, persistent follicles do not occur and fertility has been very good.

Prostaglandin F_{2α}

Enucleation of the CL is one of the oldest approaches used for estrus synchronization or treatment for ovarian irregularities (Teige & Jakobsen, 1956). In the early 1970's, PGF was found to be the natural luteolysin (McCracken, 1972; Manns & Hafs, 1976), and since that time PGF has been the most commonly used treatment for elective induction of luteal regression and/or synchronization of estrus in cattle (Odde, 1990; Larson & Ball, 1992). Early studies showed that the maturity of the CL at the time of PGF treatment influenced the luteolytic response (Momont & Seguin, 1984); PGF did not effectively induce luteolysis during the first 5 or 6 days following estrus. Lack of responsiveness was thought to be a result of a lack of PGF receptors in immature CL, but recent work has demonstrated the presence of PGF receptors in CL as early as 2 days after ovulation (Wiltbank et al., 1995). However, it appears that mature CL may possess a positive feedback loop that results in intraluteal PGF production which may continue the process of luteolysis initiated by a single treatment of exogenous PGF (Wiltbank, 1997). If immature CL do not possess the positive feedback loop, then multiple injections of PGF may be expected to complete the luteolytic process in early stage CL. In this regard, luteolysis and ovulation was induced in 56/60 heifers (93%) given PGF in the morning and evening of the fourth or fifth day after estrus in two studies involving superstimulation beginning near the time of ovulation (Nasser et al., 1993; Adams et al., 1994), providing a treatment alternative for nonresponsive CL.

Transrectal palpation and treatment of cattle with an apparently responsive CL should increase the proportion that respond to PGF treatment, but errors in CL assessment and failures in estrus detection result in only about 75% of treated cattle being detected in estrus (Gaines, 1994). Furthermore, in cows in which luteolysis is effectively induced by PGF treatment, the ensuing estrus was distributed over a 6 day period (Seguin, 1987). The most consistent response (i.e., the least variable interval to estrus) resulted from PGF treatment during early diestrus (7 and 8 days after estrus) or late diestrus (15 days after estrus) than mid-diestrus (10 to 13 days after estrus; Seguin, 1987). More recent studies have documented that much of this variation is due to follicular status at the time of treatment. Treatment when the dominant follicle of a wave is in its late growing (≥ 9 mm) or early static phase will result in ovulation of that follicle within 2 to 3 days, whereas treatment after the mid- to late-static phase (i.e., when it is no longer

viable) will result in ovulation of the dominant follicle of the next wave 4 to 5 days after treatment (Kastelic et al., 1990; Kastelic and Ginther, 1991). In a conventional two-dose PGF synchronization scheme, an interval of 10 or 11 days between treatments has been used because it represents the mid-point of the estrous cycle and theoretically all cows should have a PGF-responsive CL at one or both treatments. However, a shorter (8 to 9 days) or longer (13 to 14 days) interval between treatments may result in better synchrony. In this regard, one study reported a higher conception rate with a 14-day rather than an 11-day interval between PGF treatments (Folman et al., 1990). More recently, PGF treatment has been combined with treatments designed to control follicular status and precise synchrony of ovulation.

The present

Precise synchrony of ovulation has been shown to depend on synchronous growth of a dominant follicle and ovulation of that follicle at a predetermined time. Treatments that eliminate a dominant follicle will result in emergence of a new follicular wave, and synchronous growth of a new dominant follicle. In that regard, transvaginal ultrasound-guided ablation of the dominant follicle will synchronize the emergence of the next follicular wave by removing the suppressive effects of that follicle, and its products on FSH release (Bergfelt et al., 1994). Ovulation can be induced by the injection of hormones that induce LH release, or by the injection of LH. Although follicular ablation in combination with PGF and pLH was very efficacious in synchronizing estrus and ovulation, it is not practical for use in the field.

Estradiol and progesterone

Although the synchronizing effects of combined treatment with progestin and estradiol has been known for decades, it was not until recent discoveries of the effects of estradiol on follicle development that an important reason for this effect was understood. In a series of studies (reviewed in Bo et al., 1995b), estradiol treatment was found to suppress the growing phase of the dominant follicle, and suppression was more profound when given in combination with progesterone. The mechanism responsible for estrogen-induced suppression of follicle growth is not clearly understood, but it appears to involve suppression of FSH (Bo et al., 1994) and possibly LH. The combination of estradiol and progestin was subsequently used to determine if suppression of follicle growth would induce new wave emergence at a consistent interval post-treatment regardless of the phase of follicle development at which treatment was initiated (i.e., growing, static, or regressing phase of the dominant follicle of a wave). The use of estradiol-17 β in progestin-implanted cattle was followed consistently by the emergence of a new wave, on average, 4.3 \pm 0.2 days later (Bo et al., 1995a; b). Once the estradiol was metabolized, there was an FSH surge, and a new follicular wave emerged (Martinez et al., 2005; 2007). The administration of 5 or 2.5 mg estradiol-17 β (reviewed in Bo et al., 2002) or 2 mg of estradiol benzoate (EB; Caccia and Bo, 1998) or estradiol valerate (Colazo et al., 2005b) in progestin-implanted cattle at random stages of the cycle was followed by the emergence of a new follicular wave approximately 4 days later, with little variability.

In estrus synchronization protocols, estradiol is normally injected at the time of insertion of a progestin device (Martinez et al., 2000; 2005; Mapletoft et al., 2003) which is removed 7 or 8 days later, at the time of administration of PGF. A lower dose of estradiol is normally given 24 hours later to induce synchronous LH release (approximately 16 to 18 hours after treatment) and ovulation approximately 24 to 32 hours later (Mapletoft et al., 2003; Martinez et al., 2005; 2007). This has permitted fixed-time AI (FTAI) with very high pregnancy rates. Pregnancy rates have been shown to be improved in suckled beef cows, especially suckled *Bos indicus* cows and heifers when 400 IU of eCG is administered at the time of progestin removal (reviewed in Baruselli et al., 2004; Bo et al., 2005). The beneficial effect of eCG would seem to be through stimulation of dominant follicle growth and maturation, with increased progesterone production by the subsequent CL.

Estradiol and progesterone treatments have been used increasingly for the synchronization of follicle wave emergence for superstimulation (Bo et al., 1995b; 2002), and for the synchronization of ovulation in fixed-time embryo transfer protocols (FTET; Bo et al., 2002; 2005; 2007). In general, treatments for FTET are similar to those used for FTAI, except the PGF treatment may given earlier. Therefore, recipients receive a progestin device and an injection of 2 mg EB on Day 0, PGF on Day 5 (1 day after

wave emergence), progestin devices are removed on Day 8 and 1 mg EB is given on Day 9 (Day 10 is considered the day of estrus) and embryos are transferred on Day 17 in all recipients with a CL. Treatment with PGF on Day 5 has resulted in a larger diameter of dominant follicle, higher progesterone concentrations at the time of FTET, a larger proportion of recipients selected for transfer with higher overall pregnancy rates (Bo et al., 2005).

The effects of 400 IU eCG on Day 5 of the FTET treatment protocol on pregnancy rates has also been investigated mainly in *Bos taurus* x *Bos indicus* crossbred recipients (Nasser et al., 2004; Bo et al., 2005; 2007). Although eCG treatment did not result in more recipients selected for transfer, it did result in increased CL diameters and improved conception rates. Furthermore, plasma progesterone concentrations in recipients treated with eCG were significantly higher than in those not treated with eCG, regardless of the number of CL at the time of embryo transfer. An interesting observation in these studies was that pregnancy rates did not differ whether recipients were seen in estrus or not.

Gonadotropin releasing hormone (GnRH)

In cattle with a growing dominant follicle (at least 10 mm in diameter), treatment with GnRH results in ovulation (Macmillan and Thatcher, 1991), with emergence of a new follicular wave approximately 2 days later (Twagiramungu et al., 1995), but only when ovulation occurred (Martinez et al., 1999). An ovulation synchronization scheme utilizing GnRH for fixed-time AI (Ovsynch) in lactating dairy cattle was developed by Pursley et al. (1995). The first injection of GnRH is followed 7 days later with an injection of PGF, followed in 48 hours by a second injection of GnRH; fixed-time AI is performed 0 to 24 (optimally 16 to 18) hours later. The Ovsynch protocol has been used successfully for several years (Seguin, 1997), and has been much more efficacious in lactating dairy cows than in heifers (Pursley et al., 1995; Martinez et al., 2002). Although the cause for the discrepancy between cows and heifers is not known, ovulation following the first injection of GnRH occurred in 85% of cows but only 54% of heifers (Pursley et al., 1995). In addition, 19% of heifers were in estrus before the injection of PGF, dramatically reducing fertility following FTAI (Wiltbank, 1997).

Stage of development of the dominant follicle (Martinez et al., 1999), or stage of the estrous cycle (Vasconcelos et al., 1999) at the time that GnRH is administered has been shown to affect results. If GnRH is administered when the dominant follicle is immature or post-mature, ovulation may not occur and a new follicular wave will not emerge (Martinez et al., 1999). An alternative is to ensure that a viable growing dominant follicle is present at the time of GnRH treatment. It has been suggested that cattle will respond most consistently to GnRH administered between Days 5 and 12 of the estrous cycle; this can be accomplished by using a PGF pre-synchronization treatment, with the last PGF given 12 to 14 days before the first injection of GnRH (Moreira et al., 2001). We have also used progestin devices to presynchronize animals prior to initiating a GnRH-based protocol (Colazo et al., 2005a; 2006).

We have also observed that GnRH caused ovulation of the dominant follicle in only 56% of heifers and did not consistently induce the emergence of a new follicular wave (Martinez et al., 1999). Lactating beef cows appeared to be more similar to heifers than lactating dairy cows, with seldom more than 60% ovulating following administration of GnRH (Colazo et al., 2007). We also showed that circulating concentrations of progesterone affect LH release following the administration of GnRH in beef cattle (Colazo et al., 2008). The presence of a progestin insert between the first injection of GnRH and the injection of PGF 7 days later essentially doubled pregnancy rates in heifers (Martinez et al., 2002). Although GnRH-based protocols have been used successfully in suckled beef cows, the addition of a progestin insert has been also been beneficial, especially if cows are early postpartum or in low body condition. The addition of eCG at the time of progestin removal was also shown to improve pregnancy rates in first-calf, suckled beef cows (Colazo et al., 2005a; 2006).

GnRH-based protocols have also been used to synchronize ovulation in recipients (reviewed in Bo et al., 2005; 2007). In two studies involving *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred heifers (Baruselli et al., 2000; Zanenga et al., 2000), the overall pregnancy rate was higher in recipients treated with the GnRH-based protocol compared to those treated with PGF, primarily because more recipients received embryos. The inclusion of a progestin device in a GnRH-based protocol has also been shown to result in improved

pregnancy rates. In one study involving the transfer of frozen embryos, Beal (1999) reported a conception rate in Heat-Watch-detected controls (62%) that was significantly higher than in nondetected recipients synchronized with an Ovsynch protocol (48%) or numerically higher than those synchronized with an Ovsynch protocol that included a progestin device between the first injection of GnRH and PGF 7 days later (54%). However, more pregnancies were produced with the GnRH-based protocols because more recipients received embryos i.e., recipients were used regardless of whether they were seen in estrus. In a field trial involving 1637 recipients treated with the GnRH protocol plus a progestin device, embryo transfer without estrus detection resulted in an overall pregnancy rate of 59.9% (Beal & Hinshaw, personal communication).

A recent experiment examined the effect of the addition of eCG to a GnRH-based treatment protocol in *Bos indicus* x *Bos taurus* recipients that received embryos at a fixed-time (Mayor et al., 2008). Recipients received a progestin device and GnRH on Day 0, 400 IU eCG on Day 3 (1 day after expected time of follicle wave emergence), PGF at progestin removal on Day 7, a second GnRH on Day 9 and FTET on Day 16. The number of recipients selected/treated, conception rates and pregnancy rates were higher than in the control group, which were treated similarly but without eCG on Day 3

In summary, results of these studies indicate that acceptable pregnancy rates can be achieved following FTAI or FTET without the necessity of estrus detection in animals that have received treatments that synchronize follicle wave emergence and ovulation. Furthermore, the administration of eCG at the expected time of follicle wave emergence in recipients, or at the time of progestin removal, in certain classes of animals to be inseminated, was shown to improve pregnancy rates.

The future

Although the methods and techniques that will be used to synchronize follicle growth and ovulation in the future may yet to be discovered, many of the tools that are needed may already exist. Once synchronous growth of a competent dominant follicle occurs, ovulation can be induced at a predictable time by applying drugs or hormones that induce LH release, or by the administration of exogenous LH. However, these hormones may be recombinantly-derived, and may be more pure and specific in action. Molecular techniques may also be used to identify genes and gene products that control ovulation (Duggavathi et al., 2008), or will induce the cascade of events leading to ovulation at a predetermined time. The larger issue is likely to be the synchronization of follicle wave emergence, and synchronous growth of the ovulatory follicle.

Estradiol has been the hormone treatment used most successfully to synchronize follicle wave emergence in cattle (reviewed by Bo et al., 2002). However, the use of estradiol is being prohibited in an increasing number of countries, so alternatives must be sought. The mechanism of action of estradiol would appear to be through FSH, and perhaps LH, causing follicle atresia followed by synchronous release of FSH and emergence of a new follicle wave. Similarly, the use of GnRH or LH to induce ovulation, or follicle ablation to remove the suppressive effects of a dominant follicle on FSH, result in a surge in FSH and a new follicle wave at a predictable time thereafter. Therefore, the synchronization of follicle wave emergence is likely to be through FSH release, which may involve manipulation of ovarian (follicular) metabolic pathways or feedback mechanisms to the hypothalamo-pituitary axis.

Although the role of FSH in regulating the wave-like development of follicles ≥ 4 mm has been clearly defined (Adams et al., 1992a), the role of FSH in recruiting smaller follicles, including small antral, and preantral follicles, remains unclear. At the cellular level, both small and mid-sized antral follicles express FSH receptors and have a similar level of expression on a per granulosa cell basis (reviewed in Bao and Garverick, 1998). The binding of FSH to follicles with only a single layer of granulosa cells has also been demonstrated (Ginther et al., 2000), and although Wandji et al. (1992) suggested a nonfunctional adenylate cyclase-second messenger system during early stages of folliculogenesis, the growth-promoting effect of FSH on preantral and small antral follicles in cattle has been demonstrated (Fricke et al., 1997; Tanaka et al., 2001; Itoh et al., 2002). Therefore, it is likely that the developmental dynamics of small follicles also follow a wave-like pattern in response to periodic surges of endogenous FSH (Adams et al., 2008). Thus, the induction of follicular wave emergence may be as simple as the administration of

exogenous FSH, or a hormone with FSH activity. Indeed, Bo et al. (2008) have shown that it is possible to induce superstimulation in the face of a dominant follicle by extending the period of FSH treatment, a term they refer to as “subordinate follicle break-through”.

Follicular inhibin-A secretion has been reported to be one of the most important regulators of FSH release during initial follicle growth in cattle (Ginther et al. 2000; 2001; Mihm and Bleach 2003). When exogenous estradiol was administered, inhibin-A levels declines rapidly in association with follicular atresia accounting for the “rebound” rise in FSH concentrations despite concentrations of circulating estradiol that were still elevated (Mihm et al. 2001). In addition, during regression of the dominant follicle of the first follicle wave, FSH only rises when inhibin-A concentrations reach their nadir, despite estradiol concentrations that had declined 2 days previously (Bleach et al. 2001). Therefore, inhibin-A would appear to be very potent in the control of FSH release, and commercially-prepared inhibins, or their blockers, could be powerful tools for use in the exogenous control of follicular wave dynamics.

Recently, Van Steelandt et al. (2008) reported that an ovulation-inducing factor isolated from camelid seminal plasma has the unique ability to induce dominant follicle atresia in cattle, and as a consequence, early emergence of a new follicular wave. Although the mechanism of action is unknown, the active component could provide the factor(s) needed to manipulate follicular wave dynamics. Apparently there was no effect on FSH secretion suggesting a direct affect on ovarian function. It is also likely that pharmacologic products that affect steroid metabolic pathways within the ovary could be used to influence follicle growth, or atresia e.g., endocrine disruptors (Rhind, 2008) or steroid metabolic enzyme inhibitors, such as those used in human medicine to treat estrogen-dependent carcinomas (Cohen et al., 2002).

Molecular biology may direct us to other factors influencing follicle wave dynamics. For example, comparisons of granulosa cell mRNA expression profiles between the two largest follicles in a follicular wave have led to the identification of a number of known differentiation genes; however, genes not previously associated with bovine ovarian function have also been shown to be upregulated at the time of dominance and play important roles in normal follicle function (Mihm et al. 2008). External manipulation of these genes, or their products, could potentially be used to affect follicle atresia or wave emergence.

Other factors such bone morphogenetic protein-4 have recently been shown to be involved with the transition of follicles from the primordial pool into the growing primary follicle pool (Tanwar et al., 2008). Reddy et al. (2008) provided evidence that the phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K) pathway of oocytes may play a role in regulating activation of primordial follicles, and that the oocyte phosphatase and tensin homolog (PTEN) serves as a suppressor in this process. The intra-oocyte PTEN-PI3K signalling cascade appeared to play a role in the initiation of oocyte growth. The point is that the genes and gene products associated with ovarian function are just beginning to be identified; the tools for the precise control of ovarian function, and follicle growth and selection may be near at hand.

References

- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JCH, Ginther OJ. 1992a. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil*, 94:177-188.
- Adams GP, Matteri RL, Ginther OJ. 1992b. The effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating FSH in heifers. *J Reprod Fertil*, 95:627-640.
- Adams GP, Nasser LF, Bo GA, Garcia A, Del Campo MR, Mapletoft RJ. 1994. Superstimulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology*, 42:1103-1113.
- Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Mahli P. 2008. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology*, 69:72-80.
- Bao B, Garverick HA. 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: A review. *J Anim Sci*, 76:1903-21.

- Baruselli PS, Marques MO, Carvalho NAT, Valentim R, Berber RCA, Carvalho Filho AF, Madureira EH, Costa Neto WP. 2000. Ovsynch protocol with fixed-time embryo transfer increasing pregnancy rates in bovine recipients. *Arq Fac Vet UFRGS, Porto Alegre, Brazil*, 28 (Suppl):205 (abstract).
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bo GA. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*, 82/83:479-486.
- Beal, W.B. 1999. Streamlining embryo transfer. Proceedings 18th Annual Convention AETA, Colorado Springs, CO, USA, pp 78-85.
- Bergfelt DR, Lightfoot KC, Adams GP. 1994. Ovarian dynamics following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. *Theriogenology*, 42:895-907.
- Bleach ECL, Glencross RG, Feist SA, Groome NP, Knight PG. 2001 Plasma inhibin A in heifers: Relationship with follicle dynamics, gonadotropins, and steroids during the estrous cycle and after treatment with bovine follicular fluid. *Biol Reprod*, 64:743-752.
- Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Tribulo HE, Caccia M, Mapletoft RJ. 1994. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, 41:1555-1569.
- Bo GA, Adams GP, Caccia M, Martinez M, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1995a. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Reprod Sci*, 39:193-204.
- Bo GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoft RJ. 1995b. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, 43:31-40.
- Bo GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 57:53-72.
- Bó GA, Cutaia L, Chesta P, Balla E, Picinato D, Peres L, Marana D, Moreno D, Veneranda G, Mapletoft RJ, Baruselli PS. 2005. Application of fixed-time artificial insemination and embryo transfer programs in beef cattle operations. Proceedings of Joint Convention of AETA and CETA, pp 37-59.
- Bó GA, Cutaia L, Picinato D, Peres L, Mapletoft RJ. 2007. Strategies for improving pregnancy rates in beef recipients. Embryo Transfer Proceedings, Therio/ACT/AETA Joint Convention, Monterey, CA, pp 113-130.
- Bó GA, Guerrero DC, Adams GP. 2008. Alternate approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology*, 69:81-87.
- Caccia M, Bo GA. 1998. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef heifers with estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology*, 49:341 (abstract).
- Christian RE, Casida LE. 1948. The effects of progesterone in altering the oestrous cycle of the cow. *J Anim Sci*, 7:540.
- Cohen MH, Johnson JR, Li N, Chen G, Pazdur R. 2002. Approval summary: letrozole in the treatment of postmenopausal women with advanced breast cancer. *Clin Cancer Res*, 8:665-669.
- Colazo MG, Rutledge MD, Small JA, Kastelic JP, Siqueira LC, Ward DR, Mapletoft RJ. 2005a. Effects of presynchronization with a used-CIDR and treatment with eCG on fertility in lactating cows subjected to a Cosynch protocol. *Reprod Fertil Dev*, 17:156 (abstract).

- Colazo MG, Martínez MF, Small JA, Kastelic JP, Burnley CA, Ward D, Mapletoft RJ. 2005b. Effects of Estradiol Valerate on Ovarian Follicle Dynamics and Superovulatory Response in Progestin-treated Cattle. *Theriogenology*, 63:1454-1468.
- Colazo MG, Small JA, Kastelic JP, Davis H, Ward DR, Wilde R, Mapletoft RJ. 2006. Effects of CIDR-based Presynchronization and eCG on fertility to a GnRH-based Timed-AI Protocol in Beef Cattle. *Reprod Fertil Dev*, 18:114 (abstract).
- Colazo MG, Kastelic JP, Small JA, Wilde RE, Ward DR, Mapletoft RJ. 2007. Ovarian follicular dynamics, CL function, estrus, ovulation, and fertility in beef cattle resynchronized with progestins and ECP, GnRH or progesterone. *Can Vet J*, 48:49-56.
- Colazo MG, Kastelic JP, Davis H, Rutledge MD, Martinez MF, Small JA, Mapletoft RJ. 2008. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. *Dom Anim Endocrin*, 34:109-117.
- Custer EE, Beal WE, Wilson SJ, Meadows AW, Berardinelli JG, Adair R. 1994. Effect of melengestrol acetate (MGA) or progesterone-releasing intravaginal device (PRID) on follicular development, concentrations of estradiol-17B and progesterone, and LH release during an artificially lengthened bovine estrous cycle. *J Anim Sci*, 72:1282-1289.
- Duggavathi Rajesha, Volle David H, Matakhi Chikage, Antal Maria C, Messaddeq Nadia, Auwerx Johan, Murphy Bruce D, Schoonjans Kristina. 2008. Liver receptor homolog 1 is essential for ovulation. *Genes & Dev*, 22:1871-1876.
- Fricke PM, Al-Hassan MJ, Roberts AJ, Reynolds LP, Redmer DA, Ford JJ. 1997. Effect of gonadotropin treatment on size, number, and cell proliferation of antral follicles in cows. *Dom Anim Endocrin*, 14:171-80.
- Folman Y, Kaim M, Herz Z, Rosenberg M. 1990. Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 2. Effects of progesterone and parity on conception. *J Dairy Sci*, 73:2817-2825.
- Gaines JD. 1994. The use of gonadotropin releasing hormone and prostaglandin for programmed breeding of dairy cattle. *Proceedings of Society for Theriogenology*, pp. 108-120.
- Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. *Biol Reprod*, 63:383-389.
- Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. 2001. Follicle Selection in Monovular Species. *Biol Reprod*, 65:638-647.
- Hansel W, Malven PV, Black DL. 1961. Estrous cycle regulation in the bovine. *J Anim Sci*, 20:621-625.
- Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H. 2002. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biol Reprod*, 67:1099-1105.
- Jaiswal RS, Singh J, Adams GP. 2004. Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. *Biol Reprod*, 71:1244-1251.
- Kastelic JP, Knopf L, Ginther, OJ. 1990. Effect of day of prostaglandin treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. *Anim Reprod Sci*, 23:169-180.
- Kastelic JP, Ginther OJ. 1991. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim Reprod Sci*, 26:13-24.

- Kastelic JP, McCartney DH, Olson WO, Barth AD, Garcia A, Mapletoft RJ. 1996. Estrus synchronization in cattle using estradiol, melengestrol acetate and PGF. *Theriogenology*; 46:1295-1304.
- Kastelic JP, Olson WO, Martinez M, Cook RB, Mapletoft RJ. 1999. Synchronization of estrus in beef cattle with norgestomet and estradiol valerate. *Can Vet J*, 40:173-178.
- Kinder JE, Kojima FN, Bergfeld EGM, Wehrman ME, Fike KE. 1996. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J Anim Sci*, 74:1424-1440.
- Larson LL, Ball PJH. 1992. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: a review. *Theriogenology*, 38:255-267.
- Macmillan KL, Thatcher WW. 1991. Effects of an agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod*, 45:883-889.
- Manns JG, Hafs HD. 1976. Controlled breeding in cattle: A review. *Can J Anim Sci*, 56:121-131.
- Mapletoft RJ, Martinez MF, Colazo MG, Kastelic JP. 2003. The Use of Controlled Internal Drug Release Devices for the Regulation of Bovine Reproduction. *J Anim Sci*, 81(E. Suppl. 2):E28–E36.
- Martinez MF, Adams GP, Bergfeld D, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 1999. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim Reprod Sci*, 57:23-33.
- Martinez MF, Adams GP, Kastelic JP, Bergfeld DR, Mapletoft RJ. 2000. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. *Theriogenology*, 54:757-769.
- Martinez MF, Kastelic JP, Adams GP, Cook RB, Olson WO, Mapletoft RJ. 2002. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Theriogenology*, 57:1049-59.
- Martinez MF, Kastelic JP, Bó GA, Caccia M, Mapletoft RJ. 2005. Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim Reprod Sci*, 86:37-52.
- Martinez MF, Kastelic JP, Mapletoft RJ. 2007. Effects of estradiol on gonadotrophin release, estrus and ovulation in CIDR-treated beef cattle. *Dom Anim Endocrin*, 33:77-90.
- Mayor JC, Tribulo HE, Bo GA. 2008. Pregnancy rates following fixed-time embryo transfer in *Bos indicus* recipients synchronized with progestin devices and estradiol or GnRH and treated with eCG. *Proc XVI International Congress on Animal Reproduction; Reprod Domest Anim*, 43 (Suppl 3):180 (abstract).
- McCracken J A. 1972. Prostaglandins and luteal regression - A review. *Prostaglandins*, 1:1-4.
- McDowell CM, Anderson LG, Kinder JE, Day ML. 1998. Duration of treatment with progesterone and regression of persistent ovarian follicles in cattle. *J Anim Sci*, 76:850-855.
- Mihm M, Curran N, Hyttel P, Knight PG, Boland MP, Roche JF. 1999. Dominant follicle persistence in beef heifers results in alterations in follicular fluid estradiol and inhibin and deviations in oocyte maturation. *J Reprod Fertil*, 116:293-304.
- Mihm M, Khan A, Bleach E, Knight PG, 2001. Health and atresia in first wave follicles is reflected in changing serum dimeric inhibin-A concentrations in dairy heifers. *Mol Cell Endocrinol*, 180:200 (abstract).

- Mihm M, Bleach ECL, 2003. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci*, 78:217-237.
- Mihm M, Baker PJ, Fleming LM, Monteiro AM, O'Shaughnessy PJ. 2008. Differentiation of the bovine dominant follicle from the cohort upregulates mRNA expression for new tissue development genes. *Reproduction*, 135:253-265.
- Momont HW, Seguin BE. 1984. Influence of the day of estrous cycle on response to PGF_{2a} products: Implication for AI programs for dairy cattle. *Proceedings of X International Congress on Animal Reproduction*, 3:336 (abstract).
- Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. 2001. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 84:1646-1659.
- Nasser L, Adams GP, Bo GA, Mapletoft RJ. 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology*, 40:713-724.
- Nasser LF, Reis EL, Oliveira AM, Bo GA, Baruselli OS. 2004. Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* x *Bos taurus* recipients. *Theriogenology*, 62:1577-1584.
- Odde KG. 1990. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci*, 68:817-830.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology*, 44: 915-923.
- Revah I, Butler WR. 1996. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil*, 106:39-47.
- Reddy P, Liu L, Adhikari D, Jagarlamudi K, Rajareddy S, Shen Y, Du C, Tang W, Hamalainen T, Peng SL, Lan Z, Cooney AJ, Huhtaniemi I, Liu K. 2008. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, 319:611-613.
- Rhind SM. 2008. Endocrine disruptors and other food-contaminating environmental pollutants as risk factors in animal reproduction. *Reprod Dom Anim*, 43:15-22.
- Savio JD, Thatcher WW, Morris GR, Entwistle K, Drost M, Mattiacci MR. 1993. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. *J Reprod Fertil*, 98:77-84.
- Seguin B. 1987. Control of the reproductive cycle in dairy cattle. *Proceedings of Society for Theriogenology*, pp. 300-308.
- Seguin B. 1997. Strategies for estrus control to improve dairy reproductive performance. *Proceedings of Society for Theriogenology*, pp. 320-331.
- Sirois J, Fortune JE. 1988. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod*, 39:308-317.
- Stock AE, Fortune JE. 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: Relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, 132:1108-1114.
- Tanaka Y, Nakada K, Moriyoshi M, Sawamukai Y. 2001. Appearance and number of follicles and change in serum FSH in female bovine fetuses. *Reproduction*, 121:777-82.

- Tanwar PS, O'Shea T, McFarlane JR. 2008. In vivo evidence of role of bone morphogenetic protein-4 in the mouse ovary. *Anim Reprod Sci*, 106: 232-240.
- Taylor C, Manikkam M, Rajamahendran R. 1994. Changes in ovarian follicular dynamics and luteinizing hormone profiles following different progestogen treatments in cattle. *Can J Anim Sci*, 74:273-279.
- Teige J, Jakobsen KR. 1956; Investigation on the effect of enucleation, of the corpus luteum in dairy cattle. *Proceedings of III International Congress on Animal Reproduction*.
- Trimberger GW, Hansel, W. 1955. Conception rate and ovarian function following oestrus control by progesterone injections in dairy cattle. *J Anim Sci*, 14:224-232.
- Twagiramungu H, Guilbault LA, Dufour JJ. 1995. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: A review. *J Anim Sci*, 73:3141-3151.
- Van Steelandt MD, Tanco VM, Ratto MH, Adams GP. 2008. Effect of ovulation-inducing factor (OIF) on ovarian function in cattle. *Reprod Fertile Dev*, 20:162 (abstract).
- Vasconcelos JLM, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR, Wiltbank MC. 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 52:1067-1078.
- Wandji SA, Fortier MA, Sirard MA. 1992. Differential response to gonadotrophins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. *Biol Reprod*, 46:1034-41.
- Wiltbank JN, Ingalls JE, Rowden WW. 1961. Effects of various forms and levels of estrogens alone or in combination with gonadotropins on the estrous cycle of beef heifers. *J Anim Sci*, 20:341-346.
- Wiltbank JN, Zimmerman DR, Ingalls JE, Rowden WW. 1965. Use of progestational compounds alone or in combination with estrogen for synchronization of estrus. *J Anim Sci*, 24:990-994.
- Wiltbank MC, Shiao TF, Bergfelt DR., Ginther OJ. 1995. Prostaglandin F2 α receptors in the early bovine corpus luteum. *Biol Reprod*, 52:74-78.
- Wiltbank MC. 1997. How information of hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. *Proc Society for Theriogenology*, pp. 83-97.
- Zanenga CA, Pedroso MS, Lima GS, Santos ICC. 2000. Embryo transfer without estrus observation. *Arq Fac Vet UFRGS, Porto Alegre, Brazil*, 28 (Suppl):337 (abstract).

Interrelationships between nutrition, metabolic homeostasis, ovarian function, and the resumption of ovulation postpartum in Zebu crossbred cows

Michael J. D'Occhio^{1,3}, Firooz Samadi¹, Cesar Castaneda¹, Massimo Bionaz² and Juan J. Loor²

¹School of Animal Studies, The University of Queensland, Gatton, Queensland, Australia 4343

²Mammalian NutriPhysio Genomics, Department of Animal Science and Division of Nutritional Sciences, University of Illinois, 498 Animal Science Laboratory, 1207 W. Gregory Dr, Urbana, IL 61801, USA

³Correspondence: Professor Michael J. D'Occhio, School of Animal Studies, The University of Queensland, Gatton, Queensland, Australia 4343 - Phone: + 61 7 54601267 - Fax: + 61 7 54601444 - Email: m.docchio@uq.edu.au

Abstract

The general importance of nutrition as an underlying requirement for optimal reproductive performance is recognised. Less well understood, however, are the finer interrelationships between metabolic homeostasis, metabolic hormones and reproductive function. There is increasing evidence that hormones integral to metabolic function, such as insulin, leptin and IGF-1, are also important for reproduction. It is also becoming increasingly apparent that hormones with classical metabolic roles can influence reproductive function by acting at both somatic tissues and in the brain. For example, IGF-1, which is essential for normal ovarian follicular growth, is thought to also act at receptors in the hypothalamus. In addition, leptin receptors were recently located on kisspeptin (KISS1) neurons in the hypothalamus and this led to the suggestion that leptin may provide at least one of the essential links between metabolic homeostasis and the regulation of GnRH secretion. A further link between metabolic homeostasis and reproduction is the role of glucose as the major energy source of the ovaries. The majority of nutrients from digestion are channelled to the liver through the splanchnic blood system which places the liver in the unique role of metabolic gatekeeper. The liver responds to nutrient inflow, and the internal metabolic environment, by altering the cellular activities of enzymes associated with fatty acid and protein metabolism, and by the secretion of trophic factors (e.g. IGF-1) that act at tissues (e.g. muscle) and organs (e.g. ovaries) that have diverse functions. The present article provides an overview of recent findings that have contributed to the understanding of the interrelationships between nutrition, metabolic homeostasis and reproductive function in the postpartum cow. Included is preliminary information on liver gene expression in postpartum cattle exposed to divergent nutrition and the relationship to the resumption of ovulation.

Introduction

The emerging understanding of the complexity of the interrelationships between metabolic homeostasis and reproductive function was recently summarised (1) (Figure 1). It has become increasingly apparent that hormones which have endocrine and cell signalling (e.g. insulin) functions within a metabolic context also have similar functions in reproduction.

Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) remains the classical example of a metabolic factor/hormone which is important for general somatic tissue growth and differentiation (e.g. muscle), and in addition has specific roles in ovarian follicular growth and development (2).

Leptin is associated with adipose tissue status and recently emerged as potentially one of the most important factors/hormones that links metabolic homeostasis with reproduction (3). Receptors for leptin are found on KISS1 neurons of the hypothalamus which secrete kisspeptin (4).

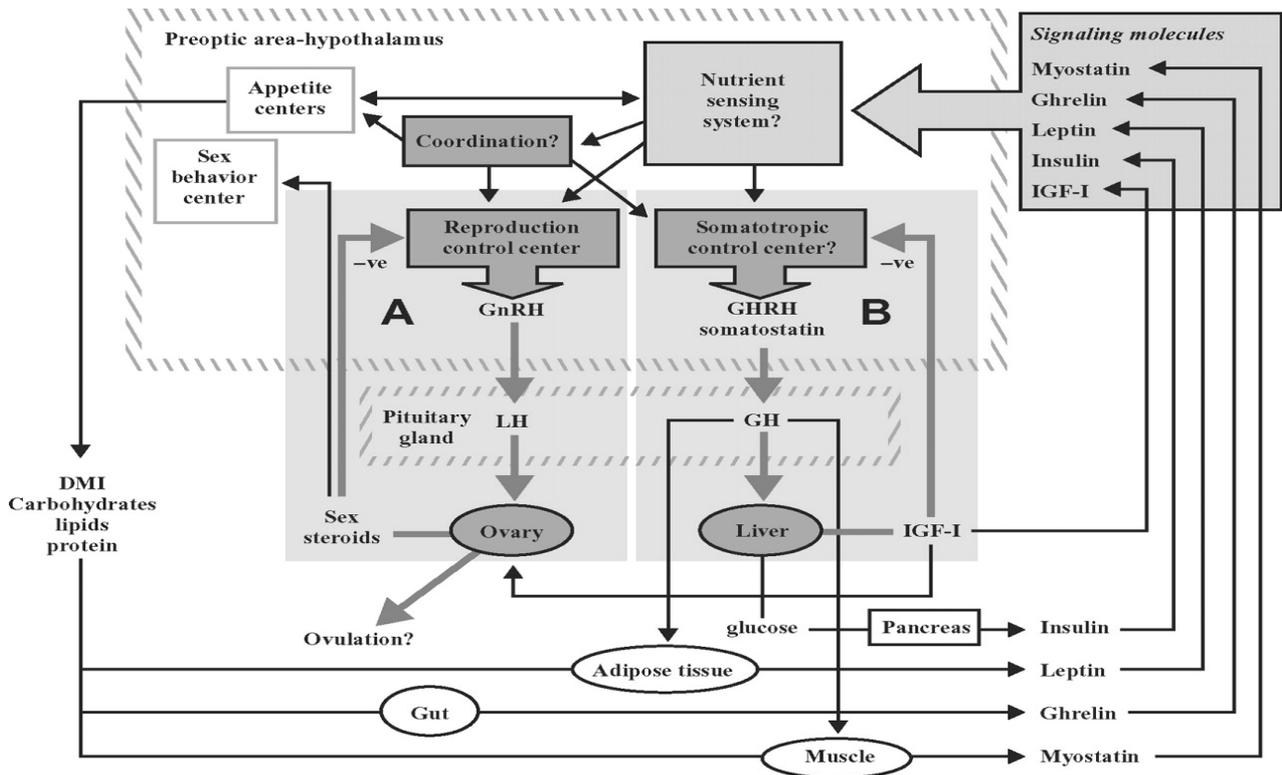


Figure 1. Schematic representation of the interrelationships between metabolic homeostasis and reproduction in the lactating dairy cow (Reference 1).

Kisspeptin is now known to regulate GnRH neurons (5, 6) and it is possible that KISS1 neurons represent the final common pathway whereby environmental and internal factors are integrated to regulate the activity of the reproductive endocrine axis.

The present article reviews recent findings that have reinforced the importance of interrelations between nutrition, metabolic homeostasis and ovarian function in cattle. Preliminary information is included for liver gene expression in suckling postpartum beef cattle exposed to divergent nutrition and the relationship to the resumption of ovulation.

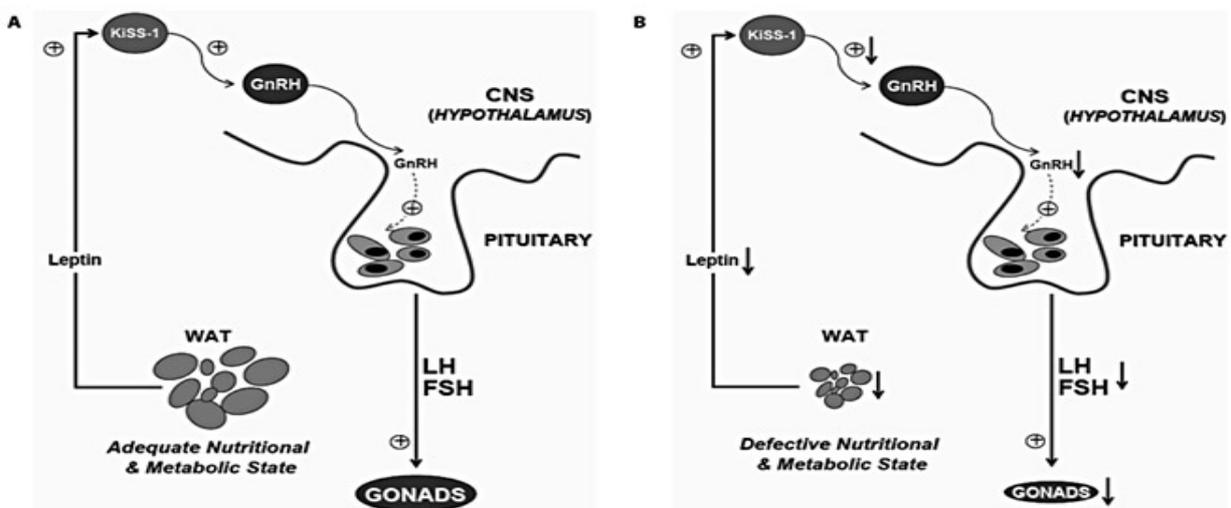


Figure 2. Schematic representation of the interrelationships between white adipose tissue (WAT) origin of leptin and influence of leptin on GnRH secretion through kisspeptin (KISS1) neurons (Reference 6).

Metabolic hormone profiles in suckling postpartum beef cows on divergent nutrition and relationship to the resumption of ovulation

In a study on the interrelationships between metabolic homeostasis and reproductive function during postpartum, multiparous Zebu crossbred cows (Droughtmaster, Brahman x Shorthorn) at 6 to 7 months of gestation were assigned to graze improved pasture (IP) or moderate pasture (MP). The IP was predominantly a mixture of green panic (*Panicum maximum*), Rhodes grass (*Chloris gayana*), and Kikuyu grass (*Pennisetum clandestinum*) and the MP comprised the same mixture of plants but with less availability, in particular Kikuyu grass.

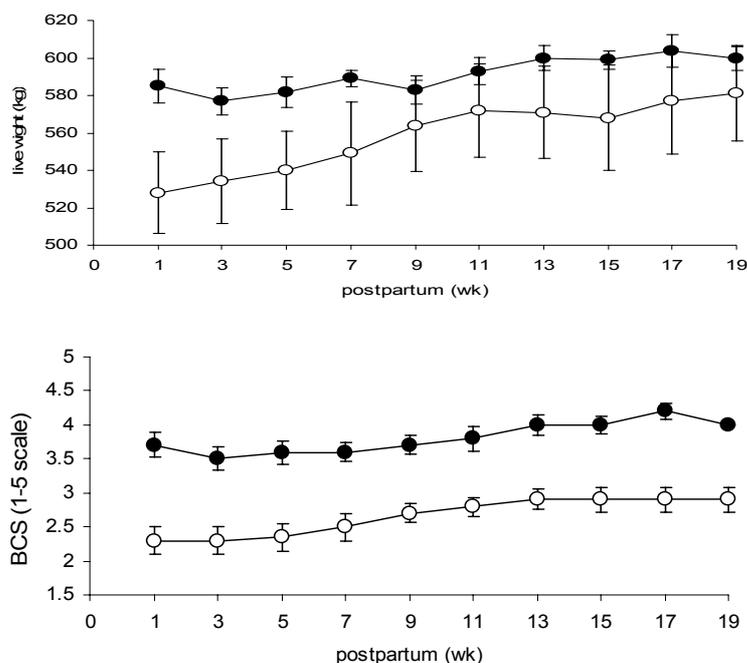


Figure 3. Body weight (upper panel) and body condition score (BCS, lower panel; scale 1-5) in suckled multiparous Droughtmaster cows maintained on improved pasture (●, n = 7) or moderate pasture (○, n = 7) from approximately 6 to 7 months of gestation and throughout postpartum. Results are means \pm SEM (Reference 8).

The two nutritional treatments were continued after calving and throughout postpartum. Starting at 1 week after calving, body weight (BW) and body condition score (BCS) were recorded every 2 weeks and ovarian follicular status was determined weekly. Liver biopsies were obtained at 1, 6 and 14 weeks postpartum.

Cows on IP had a greater ($P < 0.01$) BW than cows on MP one week after calving (585 ± 9 kg and 528 ± 21 kg, respectively) and the greater BW of cows on IP remained at 3 and 5 weeks ($P < 0.05$) (Figure 3). Cows on MP showed an increase in BW during postpartum which did not occur in cows on IP, and BW did not differ from week 7 postpartum (Figure 3). Cows on IP had a greater ($P < 0.01$) BCS than cows on MP one week after calving (3.7 ± 0.2 and 2.3 ± 0.2 , respectively) and cows on IP maintained a greater ($P = 0.03$) BCS throughout the postpartum period (Figure 3).

Plasma concentrations of IGF-1 were greater ($P < 0.01$) for cows on IP than cows on MP (191 ± 5 and 145 ± 4 ng/ml, respectively) (Figure 4).

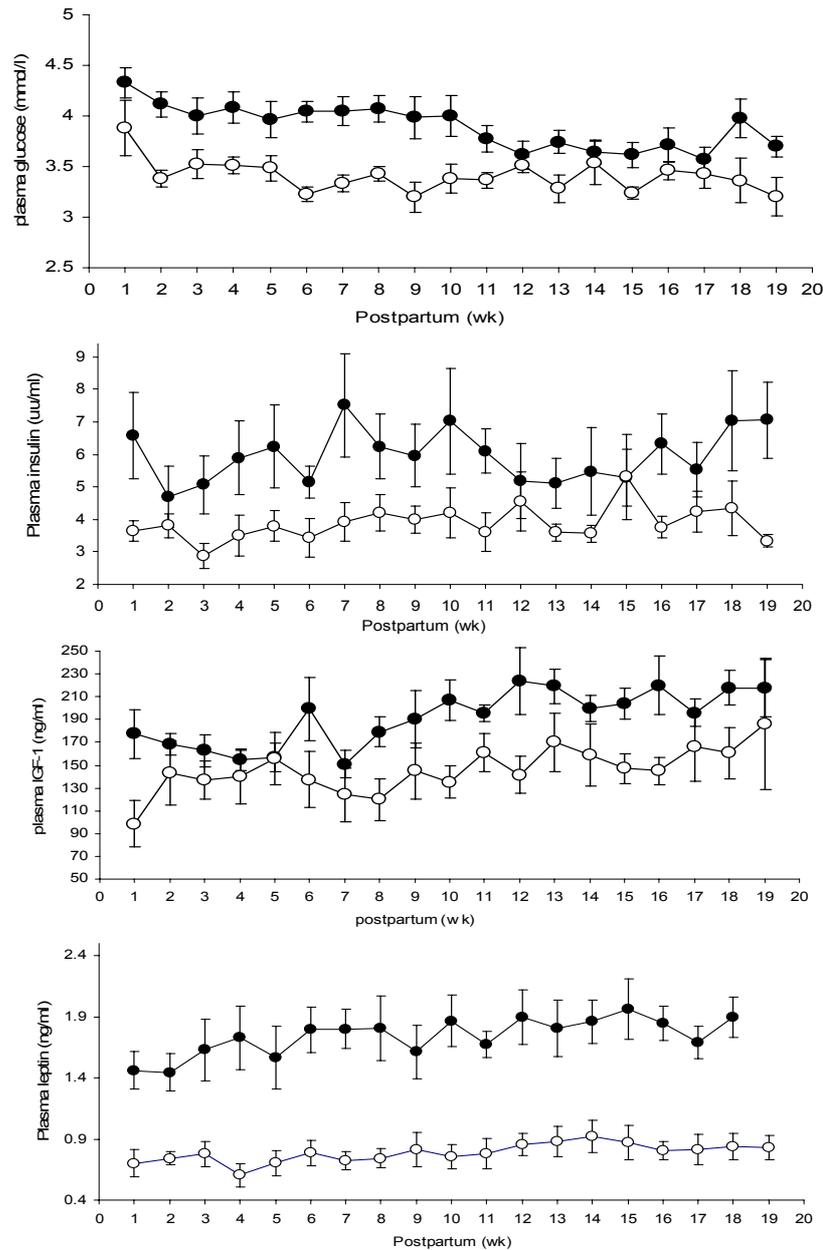


Figure 4. Plasma concentrations (mean \pm SEM) of glucose (a), insulin (b), IGF-1 (c) and leptin (d) in suckled multiparous Droughtmaster cows maintained on improved pasture (\bullet , $n = 7$) or moderate pasture (\circ , $n = 7$) from approximately 6 to 7 months of gestation and throughout postpartum (Reference 8).

Plasma IGF-1 for cows on IP tended to increase from 7 to 10 weeks and then showed a plateau to 19 weeks after calving. Cows on MP did not show any apparent changes in plasma IGF-1 from 1 to 19 weeks (Figure 4). Cows on IP had greater ($P < 0.01$) plasma concentrations of leptin than cows on MP (1.7 ± 0.03 and 0.7 ± 0.01 ng/ml, respectively). For both groups of cows there were no apparent changes in leptin during the postpartum period (Figure 4). Cows on IP also had greater ($P < 0.01$) plasma concentrations of insulin than cows on MP one week after calving (6.5 ± 1.3 and 3.6 ± 0.3 μ U/ml, respectively). Insulin remained greater ($P < 0.01$) for cows on IP throughout postpartum (5.9 ± 1.8 and 3.8 ± 0.12 μ U/ml, respectively) (Figure 4). From 1 to 19 weeks after calving, plasma concentrations of glucose were greater ($P < 0.01$) for cows on IP than cows on MP (3.9 ± 0.05 and 3.4 ± 0.03 mmol/l, respectively). There was a treatment \times time interaction ($P < 0.05$) and cows on IP showed a decline in glucose from 10 to 12 weeks after calving whereas glucose remained relatively constant for cows on MP.

Accordingly, differences in plasma glucose between cows on IP and MP were most apparent from 1 to 10 weeks after calving (Figure 4).

Cows on IP and MP showed a general increase in diameter of the largest follicle from 1 to 3 weeks after calving, but this was only significant ($P < 0.05$) for cows on MP (Figure 5). The size of the largest follicle remained relatively constant after 3 weeks and did not differ ($P = 0.75$) between cows on IP (11.5 ± 0.2 mm) and MP (11.5 ± 0.4 mm (Figure 5). The total number of follicles ≥ 4 mm was greater ($P < 0.01$) for cows on MP (6.1 ± 0.2 follicles) than cows on IP (4.9 ± 0.3 follicles). This was due to a decrease in follicles ≥ 4 mm for cows on IP after 10 weeks postpartum (Figure 5).

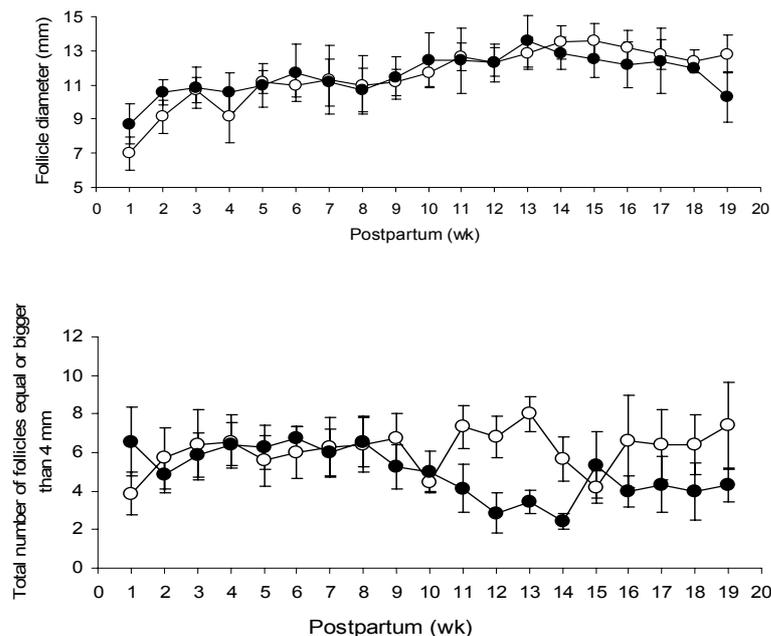


Figure 5. Size of the largest follicle (upper panel) and total number of follicles ≥ 4 mm (lower panel) in suckled multiparous Droughtmaster cows maintained on improved pasture (\bullet , $n = 7$) or moderate pasture (\circ , $n = 7$) from approximately 6 to 7 months of gestation and throughout postpartum. Results are means \pm SEM (Reference 8).

All cows on IP resumed ovulation between 12 and 15 weeks postpartum. In contrast, only 1 of 7 cows ($P < 0.01$) on MP initiated ovulations during the experimental period and this cow showed first ovulation at 8 weeks postpartum (Figure 6).

Liver gene expression in suckling postpartum beef cows on divergent nutrition

Liver genes were selected for expression study based on their potential direct and/or indirect role in postpartum reproduction (Table1).

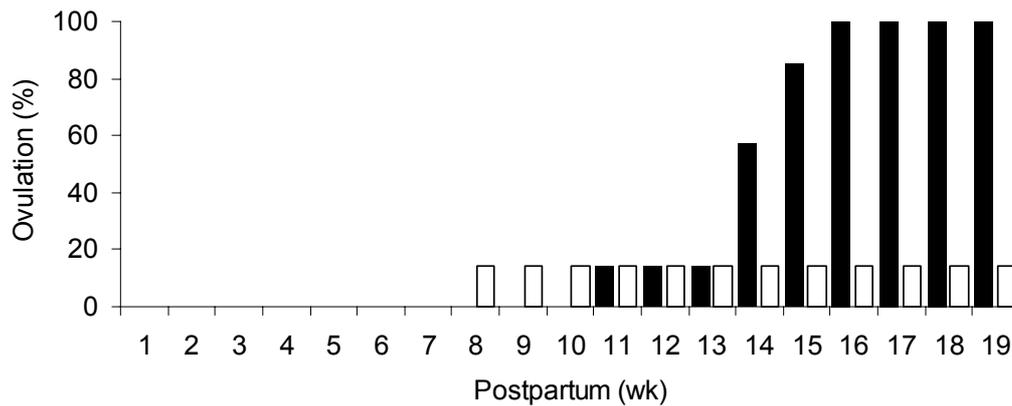


Figure 6. Cumulative number of cows showing ovulation for suckled multiparous Droughtmaster cows maintained on moderate pasture (□, n = 7) or improved pasture (■, n = 7) from approximately 6 to 7 months of gestation and throughout postpartum (Reference 8).

Table 1. Liver genes selected for expression studies

Gene category	Gene
Fatty acid metabolism	PPARA, CPT1A, PPARGC1A, PPARGC1B, ACOX1, LPIN1, ADIPOR2, FADS1, FADS2, SCD, SREBF1, HNF4A
Cholesterol biosynthesis and transport	APOA1, APOB, HMGCR, PPARD, SREBF2, SC4MOL
Cell cycle regulation	CEBPB, BAX
Acute phase reaction (i.e. inflammation)	SAA1
Insulin signalling, cell proliferation and protein synthesis	IRS1, RETN, FRAP1
Gluconeogenesis	PCK1, FBP1, PC
Genes linked with reproductive function	GHR, IGF1, KISS1, SHBG
Cell proliferation, transformation, apoptosis	FOS

The expression patterns of genes that differed in at least one sampling period postpartum (Week 1, 6 or 14) are shown in Table 2.

A noticeable feature of the expression patterns was the greater relative expression of 14/18 genes for cows on IP compared with cows on MP at Week 6 postpartum (Table 2).

Table 2. Relative expression of 18 selected liver genes in postpartum beef cows maintained on moderate pasture (MP) or improved pasture (IP). Results are means \pm SEM (n = 5).

Gene	Group	Week 1	Week 6	Week 14
PPARA	IP	3.7 \pm 0.7 ^{a, x}	5.3 \pm 0.7 ^{a, x}	3.9 \pm 0.7 ^{a, x}
	MP	4.2 \pm 1.5 ^{a, x}	2.9 \pm 0.4 ^{a, y}	3.7 \pm 0.9 ^{a, x}
CEBPB	IP	2.7 \pm 0.4 ^{a, v}	2.9 \pm 0.4 ^{a, x}	1.8 \pm 0.2 ^{a, x}
	MP	5.2 \pm 1.5 ^{c, w}	2.2 \pm 0.4 ^{d, x}	1.4 \pm 0.2 ^{d, x}
SCD	IP	0.4 \pm 0.2 ^{a, x}	0.5 \pm 0.0 ^{a, x}	0.4 \pm 0.1 ^{a, x}
	MP	0.1 \pm 0.0 ^{a, y}	0.2 \pm 0.0 ^{a, y}	0.3 \pm 0.1 ^{a, x}
SREBF1	IP	0.9 \pm 0.4 ^{c, x}	1.4 \pm 0.1 ^{d, v}	1.0 \pm 0.1 ^{d, x}
	MP	0.3 \pm 0.1 ^{a, x}	0.5 \pm 0.1 ^{a, w}	0.5 \pm 0.0 ^{a, x}
ACOX1	IP	2.7 \pm 0.6 ^{a, x}	4.4 \pm 0.3 ^{b, v}	3.6 \pm 0.5 ^{b, x}
	MP	3.3 \pm 0.9 ^{a, x}	2.3 \pm 0.3 ^{a, w}	3.3 \pm 0.7 ^{a, x}
CPT1A	IP	4.6 \pm 1.3 ^{a, x}	6.8 \pm 0.7 ^{a, v}	5.4 \pm 1.0 ^{a, x}
	MP	5.2 \pm 1.7 ^{a, x}	2.8 \pm 0.5 ^{a, w}	4.1 \pm 1.3 ^{a, x}
FRAP1	IP	1.8 \pm 0.3 ^{a, x}	2.4 \pm 0.2 ^{a, c, x}	1.7 \pm 0.2 ^{d, x}
	MP	2.0 \pm 0.4 ^{a, x}	1.6 \pm 0.3 ^{a, y}	1.8 \pm 0.3 ^{a, x}
IRS1	IP	6.2 \pm 1.6 ^{a, x}	7.6 \pm 0.5 ^{a, v}	5.9 \pm 0.8 ^{a, x}
	MP	4.9 \pm 1.6 ^{a, x}	3.9 \pm 0.5 ^{a, w}	5.0 \pm 0.9 ^{a, x}
FOS	IP	0.1 \pm 0.0 ^{a, v}	0.1 \pm 0.0 ^{a, x}	0.1 \pm 0.0 ^{a, x}
	MP	0.2 \pm 0.1 ^{a, w}	0.1 \pm 0.0 ^{b, x}	0.0 \pm 0.0 ^{b, x}
HNF4A	IP	10.4 \pm 2.4 ^{c, x}	16.9 \pm 2.0 ^{d, x}	13.8 \pm 2.5 ^{d, x}
	MP	12.0 \pm 3.7 ^{a, x}	9.5 \pm 1.1 ^{a, y}	13.7 \pm 3.2 ^{a, x}
FADS1	IP	2.2 \pm 0.6 ^{a, x}	3.3 \pm 0.5 ^{b, c, v}	2.5 \pm 0.3 ^{d, x}
	MP	2.2 \pm 0.4 ^{a, x}	1.7 \pm 0.0 ^{a, w}	2.1 \pm 0.2 ^{a, x}
ADIPOR2	IP	2.6 \pm 0.8 ^{a, x}	2.7 \pm 0.3 ^{a, x}	1.9 \pm 0.3 ^{a, x}
	MP	2.1 \pm 0.7 ^{a, x}	1.1 \pm 0.2 ^{a, y}	1.7 \pm 0.5 ^{a, x}
SHBG	IP	6.9 \pm 2.1 ^{a, x}	10.2 \pm 1.2 ^{a, x}	9.2 \pm 1.6 ^{a, x}
	MP	8.0 \pm 2.6 ^{a, x}	5.0 \pm 0.7 ^{a, y}	7.1 \pm 2.3 ^{a, x}
GHR	IP	2.9 \pm 0.3 ^{a, x}	4.7 \pm 0.6 ^{b, x}	3.6 \pm 0.5 ^{b, x}
	MP	2.8 \pm 0.6 ^{a, x}	3.2 \pm 0.7 ^{a, y}	3.9 \pm 0.6 ^{a, x}
PC	IP	1.1 \pm 0.3 ^{a, v}	1.9 \pm 0.2 ^{a, x}	1.7 \pm 0.3 ^{a, x}
	MP	2.9 \pm 0.9 ^{a, w}	1.2 \pm 0.3 ^{b, x}	1.3 \pm 0.5 ^{b, x}
SC4MOL	IP	10.9 \pm 1.5 ^{a, x}	13.2 \pm 1.3 ^{a, c, x}	8.6 \pm 0.7 ^{d, v}
	MP	10.6 \pm 2.3 ^{a, x}	12.5 \pm 2.5 ^{a, x}	14.0 \pm 1.4 ^{a, w}
PPARD	IP	0.2 \pm 0.0 ^{a, x}	0.4 \pm 0.0 ^{b, c, v}	0.2 \pm 0.0 ^{d, x}
	MP	0.3 \pm 0.1 ^{c, x}	0.1 \pm 0.0 ^{d, w}	0.23 \pm 0.0 ^{d, x}
SREBF2	IP	1.5 \pm 0.6 ^{a, x}	2.3 \pm 0.2 ^{a, v}	1.8 \pm 0.3 ^{a, x}
	MP	1.5 \pm 0.5 ^{a, x}	0.8 \pm 0.1 ^{a, w}	1.4 \pm 0.4 ^{a, x}

^{a, b} means within rows without a common superscript differ (P < 0.05)

^{c, d} means within rows without a common superscript differ (P \leq 0.10)

^{v, w} means within column without a common superscript, for respective genes, differ (P < 0.05)

^{x, y} means within column without a common superscript, for respective genes, differ (P \leq 0.10)

For genes involved in cholesterol biosynthesis, 3/6 were differentially expressed between cows on IP and MP (Figure 7). Cows on IP showed greater (P < 0.05) expression of PPARD and SREBF2 at Week 6 whilst cows on MP showed greater (P = 0.05) expression of SC4MOL at Week 14 (Figure 7).

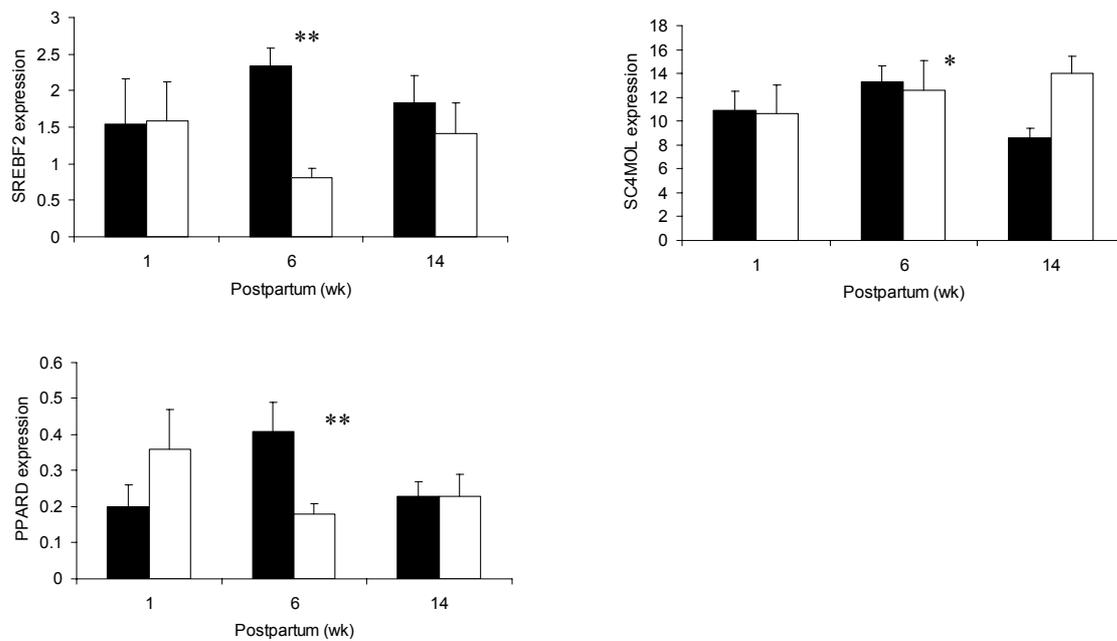


Figure 7. Expression of liver genes involved in cholesterol biosynthesis for cows on moderate pasture (□, n = 5) and improved pasture (■, n = 5). SC4MOL, sterol-C4- methyl oxidase-like; SREBF2, sterol regulatory element binding factor 2; PPARD, peroxisome proliferators-activated receptor delta. * P = 0.10; ** P < 0.05.

For genes involved in fatty acid biosynthesis, 8/12 were differentially expressed between cows on IP and MP. At Week 6 postpartum 8/12 genes had greater expression for cows on IP compared with cows on MP (Figure 8).

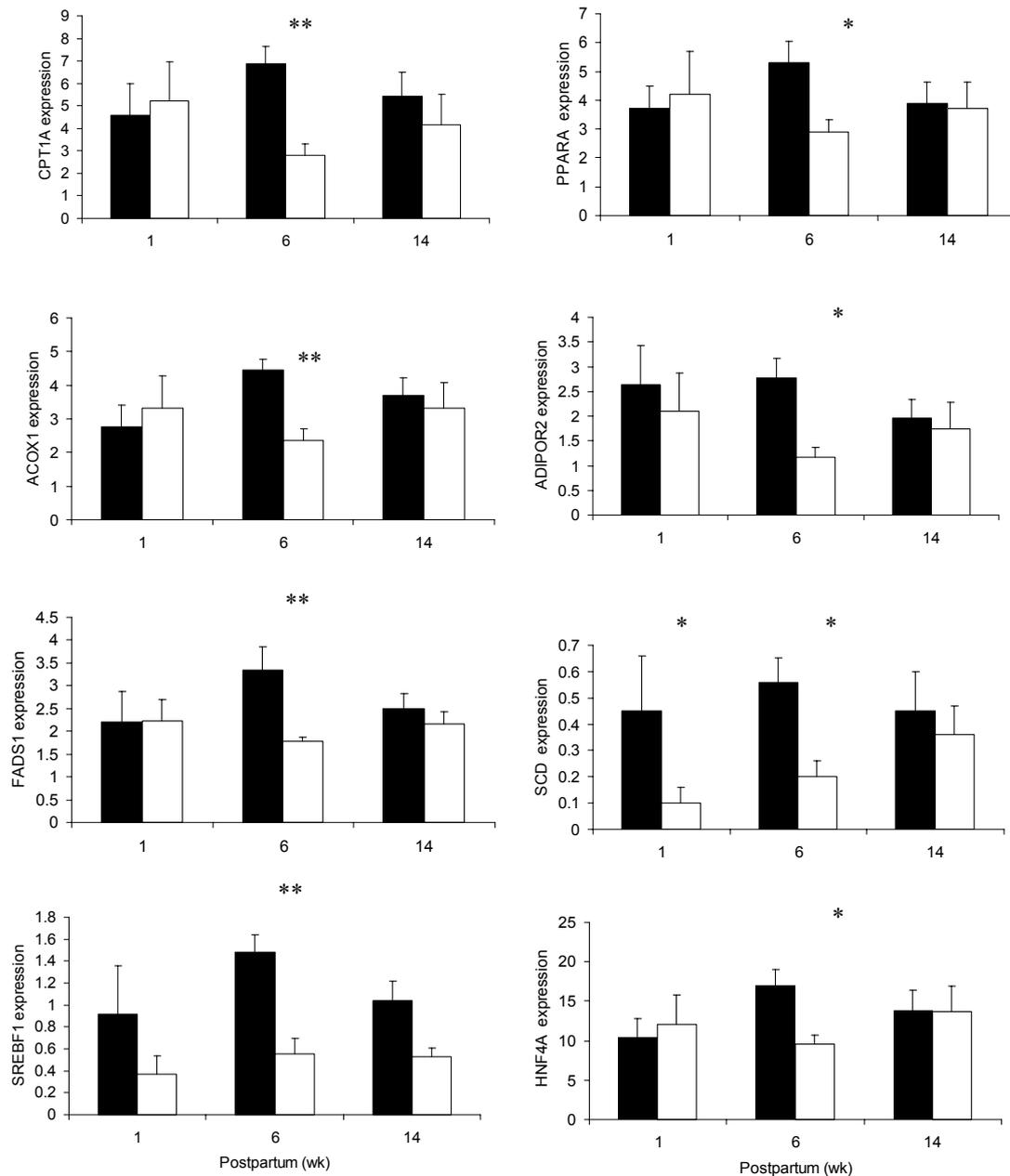


Figure 8. Expression of liver genes involved in fatty acid biosynthesis for cows on moderate pasture (□, n = 5) and improved pasture (■, n = 5). PPARA, peroxisome proliferators-activated receptor alpha; CPT1A, carnitine palmitoyl-transferase 1A; ACOX1, acyl-CoA Oxidase 1; ADIPOR2, adiponectin receptor 2; FADS1, fatty acid desaturase 1; SREBF1, sterol regulatory element binding factor 1; SCD, stearoyl-CoA desaturase; HNF4A, hepatocyte nuclear factor 4. * P ≤ 0.10; ** P < 0.05.

At Week 6 postpartum, cows on IP showed greater ($P < 0.05$) expression of IRS1, which is involved in intra-cellular insulin signal transduction, compared with cows on MP (Figure 9). For genes involved in gluconeogenesis, 2/3 genes showed evidence of differing between cows on IP and MP. Cows on MP had greater ($P < 0.05$) expression of PC at Week 1 postpartum compared with cows on IP whilst the latter cows tended to have greater ($P = 0.13$) expression of PCK1 at Week 6 (Figure 9).

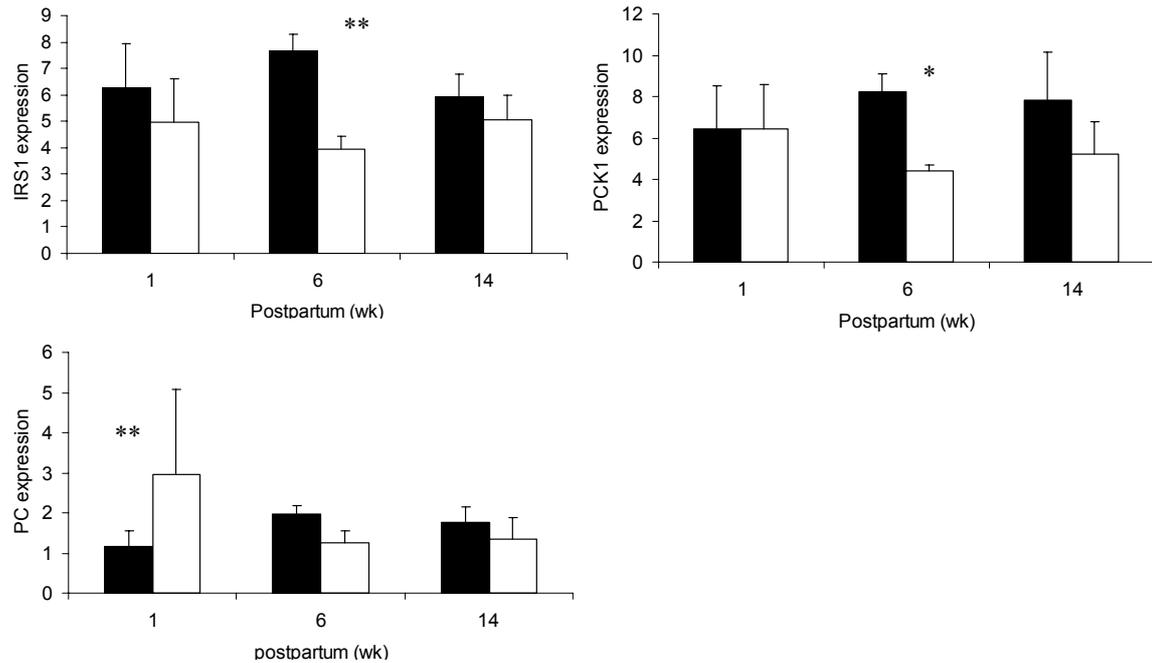


Figure 9. Expression of IRS1 (hepatic insulin receptor substrate 1), PC (pyruvate carboxylase) and PCK1 (Phosphoenolpyruvate Carboxykinase 1) for cows on moderate pasture (□, n = 5) and improved pasture (■, n = 5). * P = 0.10; ** P ≤ 0.05.

Four genes examined because of a direct or indirect link with reproductive function showed differential expression between cows on IP and MP. Cows on IP had greater (P ≤ 0.10) expression of SHBG and GHR and tended to have greater (P = 0.13) expression of IGF1 at Week 6 postpartum (Figure 10). Cows on MP tended to have greater (P = 0.13) expression of KISS1 at Week 14 postpartum (Figure 10).

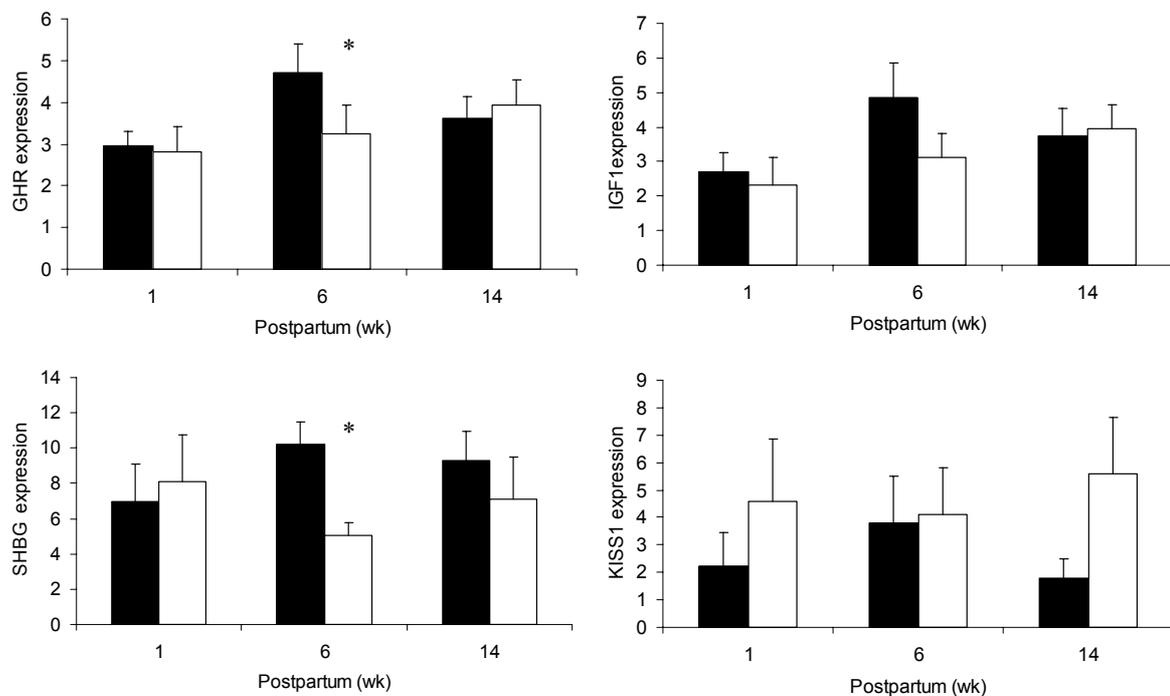


Figure 10. Expression of liver genes potentially involved in reproductive function for cows on moderate pasture (□, n = 5) and improved pasture (■, n = 5). GHR, growth hormone receptor; IGF1, insulin-like growth factor 1; SHBG, sex hormone binding globulin. * P ≤ 0.10.

Summary

Cows maintained on divergent pasture and nutrition from the third trimester of pregnancy, and throughout postpartum, showed clear differences in circulating concentrations of metabolic hormones (IGF-1, insulin) and metabolic regulatory factors (leptin, glucose). Circulating concentrations of both metabolic hormones and regulators were typically greater for cows on improved pasture (IP) compared with cows on moderate pasture (MP). The nutritional treatments appeared to result in two groups of cows with quite different metabolic homeostasis. For example, both insulin and glucose were greater for cows on IP. Insulin normally functions to maintain glucose with a narrow range in ruminants and the fact this did not occur suggested that cows on IP and MP had different metabolic settings. This is the first study to demonstrate a longer-term effect of nutrition on circulating glucose in postpartum beef cows.

The differences in metabolic homeostasis for cow on IP and MP were associated with an earlier resumption of ovulation for cows on IP. A direct cause-and-effect relationship between circulating metabolic hormones and regulators, and the resumption of ovulation, was not demonstrated in this study but it is proposed that, either individually or in combination, these factors acted to induce earlier ovulation postpartum in cows on IP.

The preliminary results for liver gene expression indicated that the nutritional treatments were associated with differential expression of genes associated with fatty acid and cholesterol metabolism. Cows on IP showed a general up-regulation of genes associated with cholesterol and fatty acid biosynthesis at Week 6 postpartum. Week 6 could be regarded as the time when there is a major shift in energy balance in the postpartum beef cow based on a reduction in the nutrient demand from lactation. It is possible that at this time cows on IP were in a positive energy balance compared with cows on MP.

Based on the temporal patterns of liver gene expression and circulating profiles of metabolic hormones and regulators, and the resumption of ovulation, it could be proposed that the generally improved metabolic homeostasis for cows on IP early in postpartum predisposed these cows to the positive actions of IGF-1 and leptin on reproductive function later in postpartum. The general interrelationships between nutritional status and liver function during the early postpartum period are shown in Figure 11 (see also References 10, 11).

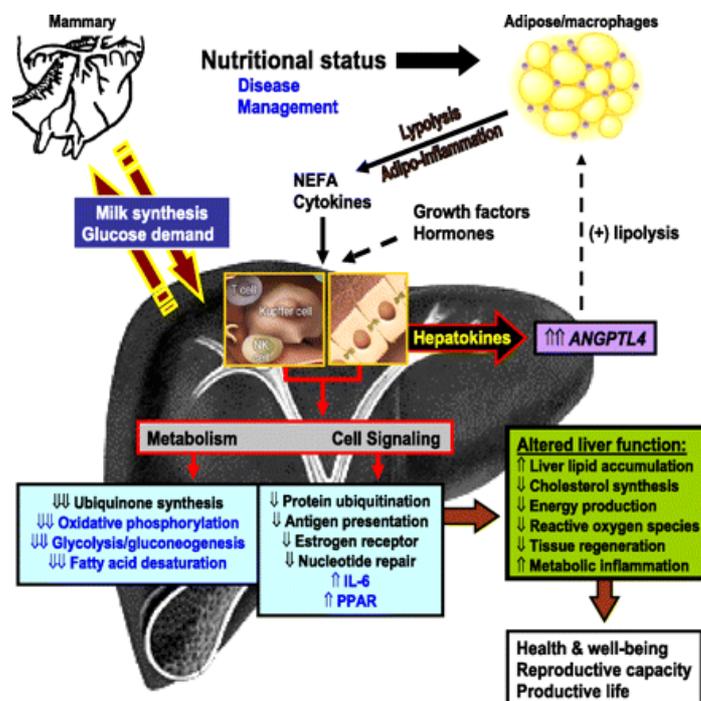


Figure 11. Summary of interrelationships between nutrition and liver function in the early postpartum cow (Reference 9).

Conclusions

Dietary treatments can be used to produce differences in metabolic homeostasis that are associated with differences in reproductive function in postpartum beef cows. Dietary treatments can also be used to induce changes in the expression of genes in the liver that are linked to cholesterol and fatty acid metabolism. The latter may prove to be of particular significance to reproduction given the fundamental roles of cholesterol and fatty acids in the general metabolic function of tissues. This would include the ovaries. The important role of liver-derived IGF-1 in follicular function has been well described and IGF-1 receptors in the brain suggest a central action in reproduction (7).

Cows on IP before and after parturition had greater plasma concentrations of leptin. Leptin has recently emerged as a potential major hormone that links metabolic homeostasis with reproductive function. Leptin receptors are present on KISS1 neurons that secrete kisspeptin which is now known to have a major role in the regulation of GnRH secretion.

Cows on IP also had elevated concentrations of both insulin and glucose. In ruminants, glucose is tightly regulated and insulin acts to maintain glucose within a relatively narrow range. The fact that this did not occur in the present studies could be interpreted to suggest that dietary treatments can be used in ruminants to achieve different metabolic settings. This, in turn, can be associated with different reproductive outcomes.

Future studies that combine conventional endocrinology with gene expression will provide greater insight on the interrelationships between nutrition, metabolic homeostasis and reproductive function. These studies should include the evaluation of gene expression in organs and tissues that traditionally have not been considered to be directly or indirectly associated with reproduction.

Acknowledgements

The unpublished results for liver gene expression in postpartum cows were generously contributed for this review by Dr Firooz Samadi.

References

- Changas LM et al 2007 New perspectives on the roles of nutrition and metabolic priorities in the subfertility of high-producing dairy cows. *J Dairy Science* 90: 4022-4032.
- Roberts AG et al 2005 Effects of varying energy intake and sire breed on duration of postpartum anestrus, insulin like growth factor-1, and growth hormone in mature crossbred cows. *J Animal Science* 83: 1705-1714.
- Spicer LJ 2001 Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. *Domestic Animal Reproduction* 21: 251-270.
- Smith JT et al 2006 Kiss-1 neurons are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J Neuroendocrinology* 18: 298-303.
- Gottsch ML et al 2006 Kisspeptin-GPR54 signalling in the neuroendocrine reproductive axis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 91: 254-255.
- Tena-Sempere M 2006 KiSS-1 and reproduction: focus on its role in the metabolic regulation of fertility. *Neuroendocrinology* 83: 275-281.
- Daftary SS, Gore AC 2005 IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Experimental and Biological Medicine* 230: 292-306.

Samadi F, Phillips NJ, Blache D, Martin GB, D'Occhio 2008 Interrelationships of nutrition, metabolic hormones and resumption of ovulation in multiparous suckled beef cows on subtropical pastures. *Animal Reproduction Science* (in press).

Lor JJ, Everts RE, Bionaz M, Dann H, Morin DE, Oliveira R, Rodriguez-Zas SL, Drackley JK, Lewin HA 2007 Nutrient-induced ketosis alters metabolic and signalling gene networks in liver of periparturient dairy cows. *Physiological Genomics* 32: 105-116.

Lucy MC 2008 Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for postpartum nutrition and reproduction. *Reproduction in Domestic Animals* 43 (Suppl 2): 31-39.

Rhoads ML, Meyer JP, Lamberson WR, Keisler DH, Lucy MC 2008 Uterine and hepatic gene expression in relation to days postpartum, estrus, and pregnancy in postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science* 91: 140-150.

Seleção para fertilidade em gado de corte

José Bento Sterman Ferraz¹ e Joanir Pereira Eler¹

¹Professores Titulares - Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia, Depto. de Ciências Básicas, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos / Universidade de São Paulo . jbferraz@usp.br

Introdução

O Brasil tem se destacado na bovinocultura desde meados da década de 1990, especialmente na bovinocultura de corte, em que o país tem se destacado como o maior exportador de carne bovina do mundo, respondendo, em 2008, por cerca de um terço do comércio mundial de carne bovina. Uma das razões para esse destaque é o sucesso dos programas de seleção, especialmente na raça Nelore.

Nesse período, de cerca de quinze anos, os programas de melhoramento genético, principalmente aqueles relacionados com a seleção e comercialização de touros jovens, apresentaram grandes progressos no aumento da média de pesos dos animais, da ordem de uma arroba no peso à desmama, nos melhores programas de seleção. Acompanhado do aumento no peso à desmama, em muitos programas, houve aumento também na média do ganho de peso pós-desmama, apesar de resultados de pesquisa indicarem que estas duas características não possuem alta correlação genética. Touros distintos têm sido identificados para aumentar peso a desmama e para aumentar a capacidade de ganhar peso em regime exclusivo de pasto, no pós-desmama, o que tem ajudado a obter resultados de extrema relevância econômica.

Além do aumento de peso e ganho de peso dos bovinos de corte, a qualidade dos animais melhorou no sentido de melhor conformação frigorífica e melhor musculosidade. Houve até mesmo certo sucesso na obtenção de rebanhos de fêmeas menores produzindo bezerros tão bons ou melhores do que eram produzidos pelas fêmeas de grande porte. Essa difusão do melhoramento genético trouxe, conseqüentemente, grande contribuição para a pecuária de corte como um todo.

No entanto, no que concerne aos aspectos reprodutivos, a maioria dos programas ainda não avançou o que seria previsível pela teoria e pelos resultados das pesquisas nesses mesmos 15 anos. O melhoramento da precocidade sexual e da fertilidade na pecuária de corte brasileira tem sido buscado quase que exclusivamente na seleção para perímetro escrotal. Boa parte dos touros jovens tem sido selecionada com base no valor fenotípico individual para perímetro escrotal, ou seja, o tourinho selecionado com base na medida do seu próprio perímetro escrotal e não em seu mérito genético para essa característica, que é expresso pela Diferença Esperada de Progênie (DEP). É comum a aquisição de reprodutores, pelos pecuaristas, com base apenas na medida do perímetro escrotal, o que não expressa com fidelidade o mérito genético. Essa falta de critérios de seleção bem definidos para características reprodutivas tem contribuído para os avanços genéticos modestos nos atributos ligados à reprodução.

Resultados práticos observados ao longo desses anos mostraram que houve algum progresso genético. Houve aumento de precocidade sexual nas populações que basearam a seleção em perímetro escrotal, principalmente naquelas que usaram a DEP como critério de seleção. Os resultados dos trabalhos científicos realizados com populações zebuínas nacionais têm mostrado, no entanto, que o progresso genético poderia ter sido muito maior. Melhor ainda, têm mostrado que o progresso genético poderá ser muito maior no futuro, se o perímetro escrotal como critério de seleção for substituído por uma característica medida diretamente na fêmea.

O melhoramento animal vem sendo realizado desde os primórdios da humanidade, quando o homem começou a domesticar os animais e percebeu que poderia modificar a aptidão dos mesmos, ao longo das gerações. A seleção de reprodutores nada mais é do que a escolha dos animais que devem ser os pais das próximas gerações e seu acasalamento de forma mais privilegiada que os demais indivíduos da população. Esse processo permite que esses animais escolhidos deixem mais descendentes do que outros

e, conseqüentemente, contribuam de forma diferenciada com o patrimônio genético da próxima geração, deixando mais cópias de seus genes e alterando a freqüência gênica.

Para se entender como funciona o processo de seleção e como o melhoramento genético animal pode ser aplicado para melhorar a produtividade e rentabilidade, é necessário o conhecimento de alguns conceitos.

O que é melhoramento genético animal?

O melhoramento genético animal é a ciência que estuda as ações da genética dos indivíduos e do ambiente na determinação de suas características de interesse econômico. Essa ciência se divide, basicamente, em duas ações: a seleção e os sistemas de acasalamento.

A seleção consiste em escolher os animais que, pela união de seus gametas, formarão a próxima geração. A seleção, por permitir taxas reprodutivas diferenciadas, é uma das mais poderosas forças de alteração da freqüência dos genes nas populações.

Mas como escolher reprodutores e matrizes de maneira adequada a determinados objetivos? Essa é a pergunta que está sempre intrigando os criadores. Para se responder a essa pergunta, é necessário responder outra pergunta crítica para o agro-negócio da pecuária de corte: para que servem reprodutores e matrizes?

Os animais de reprodução de um rebanho, reprodutores e matrizes, são verdadeiras “máquinas” e valem pelo número de produtos que elas produzem: os bezerros e bezerras. Se as máquinas valem pelos seus produtos e, para produzir esses descendentes, machos e fêmeas contribuem com partes iguais na genética nuclear, genética essa transmitida pelos seus gametas (espermatozóides e óvulos), o valor de reprodutores e matrizes é o valor desses gametas. Essa resposta é essencial para que se saiba dar o valor correto ao material genético que é adquirido nas propriedades rurais. Mas como conhecer esse valor?

Infelizmente não é possível conhecer com precisão o valor genético dos animais. O problema é muito simples: o desempenho dos animais, também denominado de fenótipo, é resultado do patrimônio genético do animal (genótipo) somado aos efeitos de ambiente, podendo haver ainda uma interação entre os efeitos de genótipo e de meio ambiente. Neste caso, alguns animais que são superiores em alguns ambientes podem se tornar inferiores em outros ambientes.

A Figura 1, apresentada a seguir, simboliza os fatores que condicionam o desempenho de um animal, desempenho esse que pode se expressar em características de crescimento, reprodutivas, de qualidade de carcaça e de carne.

O que condiciona o desempenho dos animais?

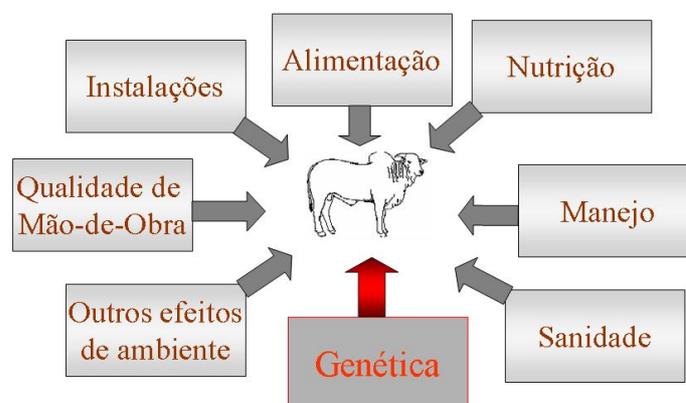


Figura 1. Esquema dos fatores que influenciam a produtividade dos animais.

Para facilitar o entendimento, é possível colocar esse diagrama na forma de um modelo ou equação simples e simbolizar o fenótipo com a letra F, o genótipo com a letra G, o meio ambiente com a letra E e a interação entre o genótipo e o ambiente com as letras GE. O desempenho dos nossos animais, seja qual for a característica estudada (peso à desmama, peso ao ano, produção de leite, circunferência escrotal, etc.) poderá ser colocado numa equação muito simples:

$$F = G + E + GE$$

Esta equação mostra que o fenótipo dos animais não representa diretamente a sua qualidade ou potencialidade genética. Essa produção ou medida F estará sempre influenciada pelo meio ambiente (E) e pela interação genótipo-ambiente (GE).

Para complicar mais um pouco, a fração G pode ser dividida em três componentes: a) o valor da ação individual dos genes ou valor aditivo (A); b) o valor dos desvios da ação individual devido aos efeitos de dominância (D), que dependem da interação entre alelos do mesmo loco contidos nos gametas que vêm do pai e de mãe; e c) o valor dos efeitos da interação entre genes de loci diferentes, também contidos nos gametas que vêm do pai e de mãe (I).

Assim, nossa equação, ficaria:

$$F = (A + D + I) + E + GE$$

No entanto, o único termo dessa equação que interessa à seleção é o A, pois é a única parte do valor fenotípico que se transmite à progênie. A enorme evolução das metodologias de análise de dados visando estimar esse valor de A, ocorrida no século XX, exige o uso de modelos estatísticos bastante complexos para, dado um conjunto de observações e informações de pedigree dos animais, obter-se essa estimativa.

Quando a escolha dos animais que deixarão descendentes é baseada nesse valor estimado de A, o ganho que a seleção pode oferecer aproxima-se do ganho máximo possível.

As avaliações genéticas

O processo pelo qual são estimados os valores genéticos aditivos dos animais, o A da equação acima, é conhecido como avaliação genética.

Portanto, avaliar a qualidade genética de um animal nada mais é do que estimar o seu valor genético aditivo (A). Não se conhece com precisão o valor que um animal tem como reprodutor, mas, utilizando-se metodologias adequadas, é possível estimar esse valor. É, entretanto, necessário que a estimativa seja livre dos efeitos de meio ambiente e da interação genótipo-ambiente.

O valor genético dos animais depende do modo de ação dos genes envolvidos na determinação das características, do número de informações a respeito dos animais avaliados (quanto maior este número, melhor a estimativa do valor genético), do parentesco entre os animais avaliados e os animais que fornecem informação (quanto mais próximo o parentesco, maior a ênfase que a informação deve ter), além dos chamados efeitos permanentes de ambiente e da precisão com que os efeitos de ambiente são identificados.

Por definição, o valor genético aditivo esperado (Expected Breeding Value ou EBV) de um animal é o valor que ele teria como reprodutor. Em última análise, o valor genético aditivo (lembrar-se do A da equação!!!) é o que os rebanhos selecionadores vendem, pois expressa o potencial genético dos animais vendidos. Este valor mostra o quanto a média dos filhos de um animal seria superior ou inferior à média dos filhos dos reprodutores em utilização, ou seja, produziriam "a mais" ou "a menos" que a média dos filhos dos outros reprodutores, que tenham sido utilizados na mesma população em que foram estimados os valores genéticos.

As DEPs (Diferenças Esperadas de Progênie) são, por definição, a fração da superioridade da progênie devida aos efeitos dos genes do reprodutor e correspondem à metade de seu valor genético aditivo.

Uma conta muito útil para entender a aplicação prática das DEPs: imagine-se que um touro A tem DEP de +12,0 kg para Ganho de peso ao sobreano e outro touro B tem DEP de -3,0 kg para a mesma característica. A diferença entre os dois touros será de 15 kg e os filhos do touro A serão 15 kg mais pesados ao sobreano que os do touro B, se ambos forem acasalados com vacas semelhantes. Se essa diferença se mantiver até o abate, o que é comum, esta arroba extra de peso vivo multiplicada por 30 filhos/ano e por 5 anos (vida útil do touro) e por 52% de rendimento de carcaça dará como resultado cerca de 80 arrobas de peso no gancho, equivalente, a preços de setembro de 2008, a cerca de R\$7.200,00 (ou cerca de US\$4.300,00). Esse é o valor da diferença, no bolso do criador, entre os valores de abate dos filhos dos touros A e B.

Este conceito de DEP é usado em geral pelos criadores de gado de corte. Os criadores de gado leiteiro utilizam-se dos termos PTA (Predicted Transmitting Ability ou habilidade prevista de transmissão), TA (Transmitting Ability, ou Habilidade de Transmissão), ou ainda PD (Predicted Difference) ou SC (Sire Comparison ou Comparação entre Reprodutores). Em essência, todos estes termos estimam a metade do valor genético de um reprodutor.

As DEPs são uma potente ferramenta para auxiliar os pecuaristas nas suas decisões de seleção. A utilização adequada dessa ferramenta no momento de decidir qual touro, ou sêmen, será adquirido, leva certamente a um aumento acentuado do progresso genético dos rebanhos.

Os pecuaristas brasileiros têm feito intenso uso das avaliações genéticas nas suas decisões de aquisição de reprodutores, com grandes ganhos de produtividade. Uma maneira de checar o status de um rebanho são os ganhos genéticos por geração, ou, melhor ainda, os ganhos genéticos por ano, que refletem a média do patrimônio genético, expresso em valor genético aditivo (A), dos animais nascidos, ano a ano.

Gráficos que representem a tendência genética de um rebanho são ótimos indicativos da eficiência dos processos de seleção, pois indicam se a evolução dos rebanhos está na direção adequada e, ainda mais, se a velocidade da evolução é compatível com o que se espera. É muito comum um criador pensar que está realizando seleção de maneira eficiente, quando, na verdade, está evoluindo numa velocidade muito menor do que a possível.

A Figura 2 reflete de maneira clara a eficiência de dois programas brasileiros de avaliação genética, utilizando a característica peso à desmama. Os dois rebanhos apresentaram ganhos ao longo dos 10 anos analisados. No entanto, enquanto o rebanho representado do lado esquerdo da figura apresentou ganho de cerca de 1,74 kg/ano, o rebanho representado do lado direito da figura apresentou ganho de apenas 0,21 kg/ano, o equivalente a 12% do ganho observado no rebanho do lado direito. Com certeza, no rebanho do lado esquerdo da Figura 2, foi aplicado, de maneira mais eficiente, os conceitos de seleção, especialmente as DEPs. Uma outra informação muito útil que se pode tirar dessa figura é obtida pela divisão do ganho genético médio de uma população, pela média da característica. Considerando-se que o peso à desmama ajustado para 205 dias na raça Nelore é de cerca de 170 kg, dividindo-se 174 por 170, observa-se que o rebanho do lado esquerdo apresentou ganho genético de 1,02% da média da característica, um valor excelente para gado de corte, enquanto que o rebanho do lado direito ganhou apenas 0,12% da média do peso à desmama. Em uma avaliação dos rebanhos dessa figura sob o ponto de vista econômico, observa-se que o rebanho do lado esquerdo ganhou, ao longo de 10 anos, $1,74 - 0,21 = 1,53$ kg de peso à desmama a mais por bezerro da população, o que, a preços atuais, significa R\$4,60/bezerro (US\$2,80). Multiplicando-se isso por 10.000 bezerras por ano, por exemplo, pode-se observar a diferença que um programa de seleção bem conduzido faz para o bolso do pecuarista.

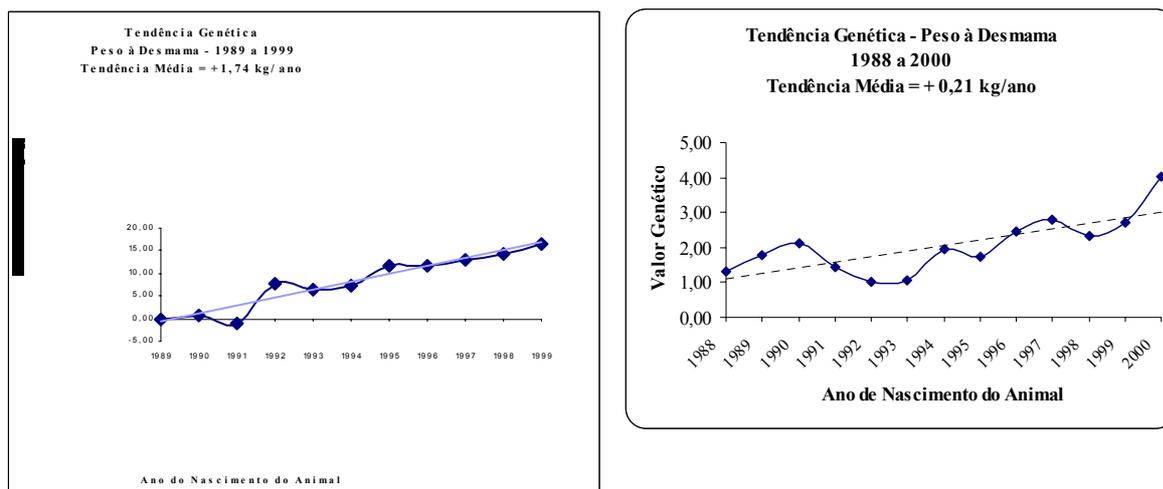


Figura 2. Representação gráfica dos valores genéticos aditivos para peso à desmama de duas populações de gado de corte submetidas à seleção, com utilização de diferenças esperadas de progênie (DEPs) e respectivas retas de tendência genética média/ano.

Por outro lado, vários programas de seleção, ao não focarem de maneira adequada algumas características, prestando atenção em apenas algumas outras, em geral ligadas ao crescimento e peso em diferentes idades, terminam por colher resultados negativos, como apresentado na Figura 3.

Casos bem sucedidos de sucesso na seleção de características reprodutivas, como precocidade sexual na raça Nelore, expressa como probabilidade de prenhez de novilhas expostas aos touros por volta dos 14 meses de idade (Figura 4) e stayability ou habilidade de permanência no rebanho após os seis anos de idade, produzindo um bezerro/ano (Figura 5), são reais e acontecem com rebanhos brasileiros daquela raça, em programas de melhoramento genético bem estruturados.

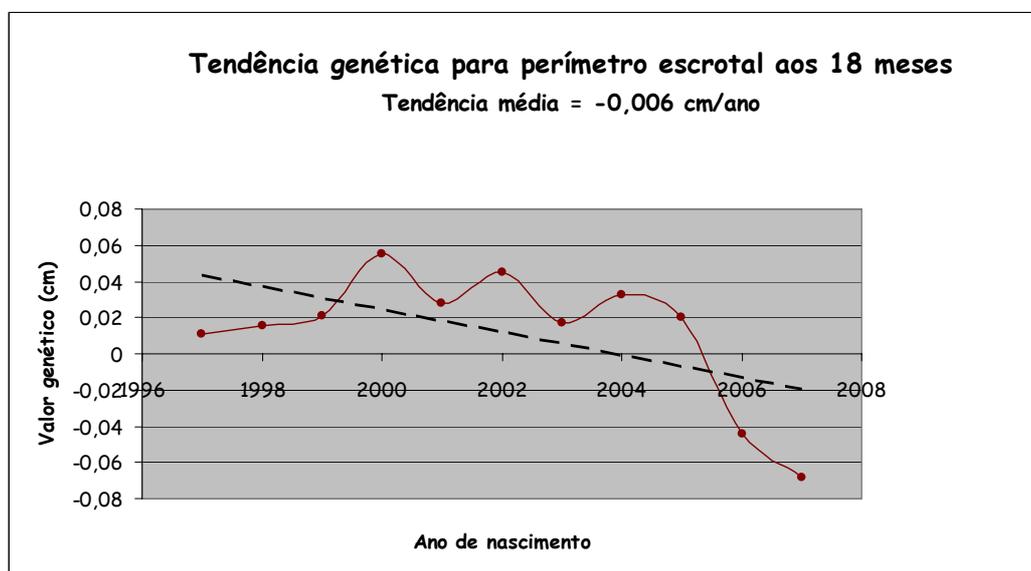


Figura 3. Representação gráfica dos valores genéticos aditivos para perímetro escrotal aos 18 meses de uma população de gado de corte submetida à seleção, com utilização de diferenças esperadas de progênie (DEPs) e respectiva reta de tendência genética média/ano.

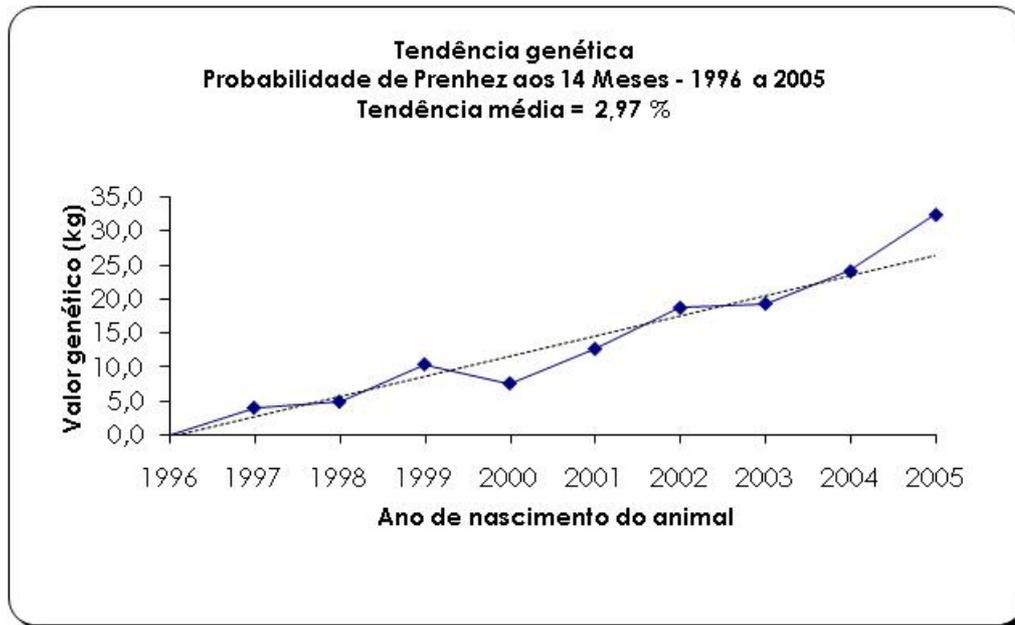


Figura 4. Representação gráfica dos valores genéticos aditivos para probabilidade de prenhez aos 14 meses de uma população de gado Nelore, submetida à seleção, com utilização de diferenças esperadas de progênie (DEPs) e respectiva reta de tendência genética média/ano.

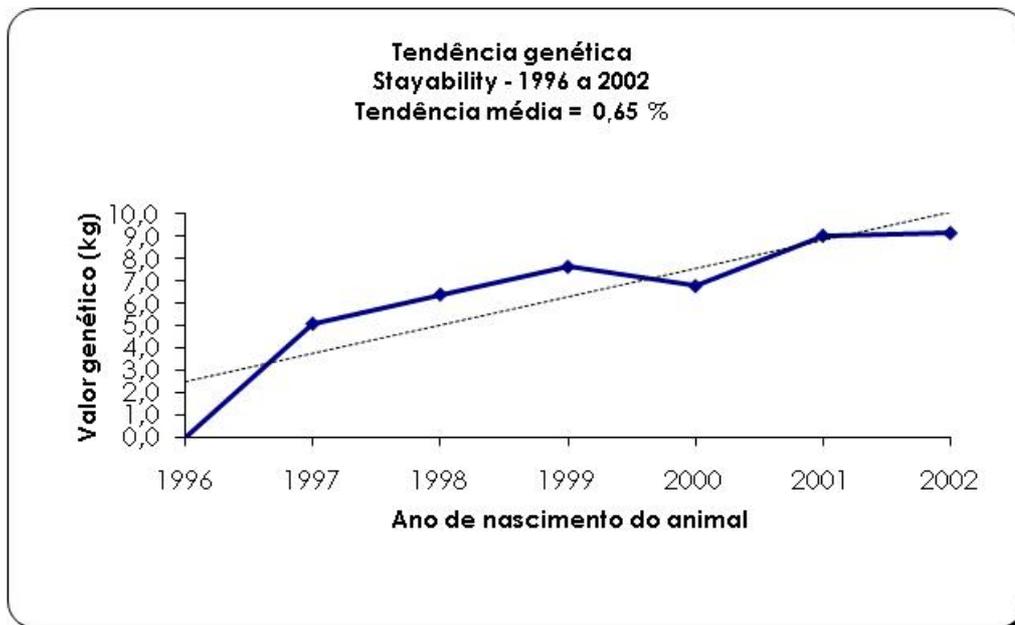


Figura 5. Representação gráfica dos valores genéticos aditivos para habilidade de permanência no rebanho após 6 anos de idade (stayability) de uma população de gado Nelore, submetida à seleção, com utilização de diferenças esperadas de progênie (DEPs) e respectiva reta de tendência genética média/ano.

Redefinindo características reprodutivas

Nas últimas três ou quatro décadas, os estudos relacionados com o melhoramento da fertilidade e da precocidade sexual centraram-se em três características: intervalo de partos, idade ao primeiro parto e perímetro escrotal, cada uma com sua peculiaridade.

A característica ligada à reprodução intervalo de partos (IP), utilizada na seleção de bovinos leiteiros, tem se mostrado pouco aplicável para bovinos de corte. Os sistemas de produção de bovinos de corte baseiam-se em estações reprodutivas (estações de monta) curtas, de 60 a 90 dias. Esse tipo de manejo reprodutivo “mascara” as diferenças genéticas existentes entre as fêmeas, pois aquelas que parem mais cedo têm de aguardar o início da nova estação de monta e entram na estação junto com as que parem por último.

Além dos problemas relacionados com a estação de monta, o intervalo de partos só pode ser medido para fêmeas que apresentam pelo menos dois partos. Isto faz com que as novilhas que não concebem na primeira estação de monta não tenham dados computados e o intervalo só será computado a partir do primeiro parto.

Assim, por razões de manejo e por deficiência no controle dos dados, o intervalo de partos apresenta-se sempre como uma característica de baixa herdabilidade em bovinos de corte, não permitindo a obtenção de boa resposta à seleção.

A outra característica medida diretamente na fêmea, a idade ao primeiro parto (IPP), apresenta-se mais promissora. No entanto, nos zebuínos, é uma característica dependente da idade em que as fêmeas entram na reprodução pela primeira vez. Pereira *et al.* (2001) reportam valor do coeficiente de herdabilidade para IPP igual a 0,02 em uma sub-população em que as novilhas entraram na reprodução aos dois anos de idade enquanto que na sub-população em que as novilhas entraram na reprodução aos 14 meses, esse coeficiente foi igual 0,18. Isto mostra que a IPP é função da idade à puberdade e se as fêmeas não são desafiadas jovens as diferenças genéticas ficam mascaradas, não se detectando as efetivamente precoces. Aos dois anos, praticamente todas as fêmeas já atingiram a puberdade.

Para que a IPP seja utilizada como critério de seleção é necessário, portanto, o desafio reprodutivo das novilhas jovens para que haja oportunidade de utilização da variabilidade genética.

A terceira característica entre as mais trabalhadas é o perímetro escrotal (PE) ou como é às vezes denominada, circunferência escrotal. Trata-se, no entanto, de uma característica indicadora da idade à puberdade e, conseqüentemente, indicadora da precocidade sexual. É uma característica com herdabilidade alta. Koots *et al.* (1994) reportam valores médios em torno de 0,47. A correlação genética entre PE e IPP é favorável, mas baixa. Pereira *et al.* (2002) estimaram esta correlação e obtiveram valor igual a -0,19 para um conjunto de dados em que as novilhas entraram na reprodução com idade em torno de 24 meses e -0,39 para outro conjunto da mesma população, mas considerando apenas as novilhas que entraram na reprodução aos 14 meses.

Considerando que a verdadeira característica reprodutiva, ou seja, a característica a ser melhorada, é a IPP, os valores de baixo a mediano da correlação genética não garantem que a seleção com base no PE forneça uma resposta correlacionada rápida para a precocidade sexual.

Mais recentemente, algumas outras características têm sido implementadas no sentido de selecionar para precocidade sexual e fertilidade. Entre essas estão a característica “dias para o parto” (Johnston *et al.*, 1996), a capacidade de permanência no rebanho ou “stayability” e “produtividade acumulada” (Schwengber, 2001) ou “produtividade média anual” (Eler *et al.*, 2008).

A característica “dias para o parto” (DPP) refere-se ao número de dias entre o primeiro dia da estação de monta e o dia efetivo do parto. Em princípio a característica leva em consideração a própria concepção mais cedo ou mais tarde na estação de monta e também a duração da gestação. Para sua implementação, os lotes de vacas que entram na reprodução precisam ser bem controlados para que se tenha, em cada lote, a data do início da estação de monta. O coeficiente de herdabilidade obtido por Johnston *et al.* (1994) foi igual a 0,13. Este valor permitiria a obtenção de resposta à seleção, principalmente se a seleção se basear em touros com grande número de progênie, nos quais a acurácia seria alta. No Brasil, a falta de controle adequado dos lotes de reprodução não permitiu ainda a sua implementação nos programas de seleção.

A stayability ou capacidade de permanência no rebanho indica o potencial dos reprodutores em produzir filhas que permanecem no rebanho, no mínimo, até um número de anos que as tornem econômicas. Na

raça Nelore, Silva *et al.* (2006) e Van Melis *et al.* (2007) reportam valores para a herdabilidade da stayability aos 6 anos de idade iguais a 0,23 e 0,22 respectivamente. A análise desta característica exige que as vacas tenha tido oportunidade de atingir a idade de permanência. Por esta razão, as vacas jovens não são avaliadas e conseqüentemente os touros jovens também não são avaliados.

A produtividade acumulada (Schwengber *et al.*, 2001) ou produtividade média anual, como é denominada em Eler *et al.* (2008), considera a produtividade média em kg de bezerros desmamados por vaca/ano, sendo, assim, uma característica de interesse econômico que leva em conta a precocidade sexual, a fertilidade e também o desempenho produtivo da vaca. Os valores de herdabilidade obtidos por Schwengber *et al.* (2001) e por Eler *et al.* (2008) foram iguais a 0,15. Esta é uma característica que depende ainda de mais pesquisas, principalmente para avaliar a correlação genética com a própria stayability.

Mais recentemente, pesquisadores da Universidade Estadual do Colorado publicaram trabalhos (Evans *et al.*, 1999; Doyle *et al.*, 2000) indicando uma nova característica reprodutiva como critério de seleção para precocidade sexual. Trata-se da prenhez de novilhas jovens e é determinada pela exposição ao touro (ou inseminação) de todas as fêmeas jovens ativas no início da estação de monta, independente do seu peso ou de sua condição corporal. É uma característica simples sem custos adicionais para o sistema de produção. Basta anotar o resultado do diagnóstico de gestação (prenhe ou vazia) e formar um conjunto de dados para a avaliação genética.

No Brasil, a Agro-Pecuária CFM Ltda, em seu programa de melhoramento da raça Nelore, já havia, desde 1996, iniciado um programa de desafio reprodutivo das novilhas jovens. O manejo reprodutivo do rebanho da empresa foi sempre baseado em estação de monta curta (60 a 70 dias para vacas, 90 a 100 dias para novilhas) iniciando-se na segunda quinzena de novembro e terminando em janeiro para as vacas e iniciando em outubro para as novilhas. Assim os nascimentos se concentram principalmente nos meses de setembro e outubro, mas ocorrendo também nascimentos em agosto, novembro e dezembro. As fêmeas originárias de concepção no início da estação de monta nascem entre agosto e outubro e têm entre 14 e 16 meses no início da estação de monta seguinte. As fêmeas originárias de concepção no final da estação de monta nascem de outubro a dezembro e têm de 12 a 14 meses na estação de monta seguinte.

No início de cada estação de monta, as novilhas da raça Nelore têm, portanto, de 12 a 16 meses de idade. Todas as novilhas ativas são expostas ao touro, independente do seu peso ou de sua condição corporal. Para que o manejo seja mais econômico utiliza-se o sistema de reprodutores múltiplos, um lote de novilhas com um grupo de touros. Os lotes de novilhas precisam ser controlados da mesma forma que se controlam os lotes de bezerros para avaliação do peso a desmama, por exemplo.

Como neste sistema de produção, que é o sistema de produção brasileiro típico, as novilhas têm em média 14 meses no início da estação de monta, a característica reprodutiva baseada na taxa de prenhez foi denominada como “Probabilidade de Prenhez aos 14 meses” ou PP14 (Eler *et al.*, 2001).

São consideradas precoces, neste sistema de produção, as fêmeas que parem com idade máxima de 27 meses. Isto porque as novilhas que entram na reprodução com 12 a 16 meses de idade precisam parir até o mês de novembro para que tenham chance de participarem da estação de monta subsequente e re-conceberem. As fêmeas que tiveram o primeiro parto com mais de 27 meses de idade são as que parem depois de novembro e têm poucas chances de re-concepção na estação de monta subsequente. As novilhas jovens que não concebem na estação de monta participariam normalmente da estação seguinte, com dois anos de idade.

Uma vez obtidos os dados pelo diagnóstico de gestação, utiliza-se uma metodologia específica para dados categóricos (prenhe igual a 1 e vazia igual a 0) e pela avaliação genética são obtidas as Diferenças Esperadas de Progênie (DEP). A DEP de PP14 é expressa em porcentagem e indica a probabilidade (a mais ou a menos) de determinado touro produzir filhas super precoces.

Por quê pp14 e não perímetro escrotal?

Os trabalhos desenvolvidos na metade final da década de 90 pelos pesquisadores da Universidade Estadual do Colorado, EUA, indicaram a prenhez de fêmea jovem como uma característica capaz de apresentar resposta à seleção visando ao melhoramento da precocidade sexual. A prenhez fêmea jovem é uma característica categórica de limiar (prenhe ou vazia) relacionada com a puberdade e depende simplesmente da exposição das fêmeas ao touro por monta natural ou por inseminação artificial e do diagnóstico de gestação. No final da estação de monta, as fêmeas prenhes recebem a “nota” 1 e as vazias a “nota” 0. A prenhez de novilhas pode ser definida como a observação referente a uma novilha conceber e permanecer prenhe até o diagnóstico de gestação, dado que ela teve oportunidade de ser acasalada.

Os trabalhos de Evans *et al.* (1999) e de Doyle *et al.* (2000), mostraram que a característica apresentava herdabilidade mediana, mas suficiente para produzir resposta à seleção. Esses trabalhos foram, no entanto, baseados em fêmeas de raças européias, principalmente da raça Angus, que são animais com histórico de seleção para precocidade sexual. Nos zebuínos, a variabilidade genética para esta característica (na mesma idade) deveria ser maior.

Em 2001, o conjunto de dados disponibilizado pelo “Programa de Melhoramento da Raça Nelore” da Agro-Pecuária CFM já permitia análises estatísticas confiáveis e os pesquisadores do Grupo de Melhoramento Animal (GMA) da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo iniciaram as suas pesquisas. A metodologia e os modelos matemáticos propostos para o gado europeu foram adequados para utilização em análises de dados referentes ao sistema de produção na raça Nelore. Os trabalhos iniciais foram desenvolvidos em parceria com o Professor Bruce L. Golden da Universidade Estadual do Colorado.

Nos programas de seleção, o fator preponderante para se obter ganho genético é a herdabilidade da característica. Para a PP14, os resultados obtidos pelos pesquisadores do GMA (Eler *et al.*, 2002) foram surpreendentes. Foram obtidos valores de coeficiente de herdabilidade da ordem de 57% na raça Nelore, enquanto os coeficientes de herdabilidade obtidos pelos pesquisadores do Colorado (Evans *et al.*, 1999 e Doyle *et al.*, 2000) ficavam entre 14 e 27%. Silva *et al.* (2005) avaliando outra população de novilhas jovens expostas ao touro, obtiveram herdabilidade igual a 52% para novilhas expostas aos 16 meses e apenas 12% para novilhas expostas aos 24 meses de idade.

A alta herdabilidade obtida para PP14 na raça Nelore tem sua explicação na pequena, senão nenhuma, pressão de seleção direta para precocidade. Os dados de campo mostraram que a raça Nelore apresenta grande variabilidade para prenhez aos 14 meses. Alguns touros chegaram a apresentar 55% das filhas concebendo enquanto outros apresentaram apenas 1 ou 2%. Isto indica claramente que filhas de determinados touros atingem a puberdade mais cedo e que filhas de outros touros atingem mais tarde. Esta variabilidade entre os touros (pais das novilhas) é responsável, em grande parte, pelo coeficiente de herdabilidade elevado. Essas diferenças só puderam ser detectadas a partir do momento em que se decidiu pelo desafio reprodutivo das novilhas aos 14 meses de idade. Quando se inicia a reprodução das novilhas aos dois anos, a variabilidade genética para idade à puberdade fica mascarada, pois praticamente todas as novilhas já atingiram esta puberdade. Com isto não se consegue detectar as diferenças genéticas entre os touros, pais dessas novilhas. A precocidade sexual é uma simples função da idade à puberdade.

No caso dos trabalhos da Universidade do Colorado, EUA, a obtenção de herdabilidade apenas moderada poderia ser explicada pelo fato de que os animais são *Bos taurus*, para os quais, aos 14 meses, a maior parte das fêmeas já atingiu a puberdade.

O perímetro escrotal também tem herdabilidade alta, mas o PE é apenas uma característica indicadora da fertilidade da novilha, principalmente indicadora da idade à puberdade. Não se seleciona perímetro escrotal com o objetivo de aumentar o perímetro escrotal em si, mas sim de diminuir a idade à puberdade. Portanto, perímetro escrotal não é o objetivo de seleção, mas simplesmente um critério de seleção visando atingir o verdadeiro objetivo que é aumentar a taxa de prenhez de fêmeas jovens na população.

O ganho genético obtido para precocidade sexual quando a seleção é baseada em perímetro escrotal é o que se denomina ganho genético correlacionado, ou seja, depende da correlação genética entre a característica de precocidade sexual (no caso a PP14) e o perímetro escrotal. Eler *et al.* (2004) e Eler *et al.* (2007) reportam estimativas de correlação genética entre perímetro escrotal e PP14 em torno de 28%. Cabe ressaltar que esses trabalhos de análise genética envolveram mais de 25.000 observações de novilhas expostas ao touro aos 14 meses e mais de 40.000 observações de perímetro escrotal. Este valor apenas moderado de correlação genética entre as duas características não garante ganho genético rápido para a precocidade sexual se a seleção for baseada em perímetro escrotal, mesmo que seja na DEP de perímetro escrotal.

Por outro lado, a característica “probabilidade de prenhez aos 14 meses” (PP14) é medida diretamente na fêmea e leva em conta a sua fertilidade inerente e, por isto, é a característica de interesse econômico, ou seja, o verdadeiro objetivo de seleção. A seleção baseada na DEP de PP14 permite ganho genético direto que é função apenas da herdabilidade da própria característica e por isto a resposta à seleção é mais rápida, ou seja, o aumento da precocidade sexual se dá muito mais rapidamente do que se a seleção fosse baseada na DEP de perímetro escrotal.

A PP14 tem ainda várias propriedades que a tornam um candidato à inclusão nos objetivos de seleção: a) a obtenção dos dados não tem custos adicionais, pois estes já são normalmente controlados pelos criadores no momento do diagnóstico de gestação; b) os métodos de diagnóstico de prenhez estão bem estabelecidos (palpação retal ou ultra-som, por exemplo) e c) os procedimentos analíticos já foram desenvolvidos e a DEP pode ser expressa em porcentagem, sendo de fácil interpretação.

A exposição ao touro de todas as fêmeas jovens numa estação de monta pode ser feita com custos reduzidos. Se o rebanho for grande, podem-se utilizar lotes com touros múltiplos. Quanto maior a taxa de prenhez obtida, melhor para o criador, mas o principal objetivo do desafio, não é a obtenção imediata de altas taxas de prenhez, mas sim a identificação de fêmeas super precoces e, mais importante ainda, a identificação de reprodutores que produzem fêmeas super precoces.

Muitos criadores comerciais de gado Nelore dizem não ter condições de clima, pastagens e manejo para fazer a primeira estação de monta das novilhas aos 14 meses. Trata-se de um assunto discutível, mas mesmo que isto seja verdadeiro, o que o criador ainda não entendeu é que o aumento da precocidade sexual do rebanho não serve apenas para quem faz a reprodução aos 14 meses. Mesmo para quem faz a primeira estação de monta das novilhas aos dois anos, o aumento da precocidade sexual no rebanho é importante para que as fêmeas concebam mais cedo na estação de monta, façam seus partos mais cedo na estação de parição e, com isto, apresentem maior taxa de re-concepção na estação subsequente. Esse aumento na precocidade sexual pode ser obtido simplesmente pela utilização de touros identificados como de alto mérito genético (altas DEP) para PP14. Albuquerque *et al.* (2006) e Albuquerque *et al.* (2007) apresentam importantes revisões sobre este assunto.

Trabalhos mais recentes reforçam ainda mais a utilização da PP14 como critério de seleção para precocidade sexual. Como mencionado anteriormente, a habilidade de permanência no rebanho ou stayability e a longevidade são características importantes na pecuária de corte. Ambas são funções das características produtivas mais econômicas, como peso a desmama e ganho de peso pós-desmama e também função da fertilidade, pois vacas que falham na produção anual de um bezerro são descartadas do rebanho. A seleção direta para longevidade ou mesmo para stayability traz o inconveniente de aumentar o intervalo de gerações, reduzindo com isto a resposta a seleção. Van Melis *et al.* (2008a) reportam, no entanto, uma correlação genética igual a 0,64 entre PP14 e stayability (habilidade de permanência no rebanho até a idade de 6 anos) e Van Melis *et al.* (2008b) obtiveram uma estimativa de correlação genética entre PP14 e longevidade igual a 82% na raça Nelore. Estes resultados permitem concluir que a seleção baseada na DEP de PP14 permite a obtenção mais rápida de fêmeas precoces, férteis e longevas. A revisão de Ferraz & Eler (2007) traz informações adicionais.

A utilização da PP14 como critério de seleção elimina a necessidade de medir perímetro escrotal?

Ao se dar ênfase à característica PP14, poderia então ser argumentado que a coleta de dados de perímetro escrotal (PE) seria um esforço inútil?! Na verdade não é, pelo menos ainda não. Embora a correlação genética entre PP14 e perímetro escrotal seja apenas moderada, Eler *et al.* (2004) mostraram que a incorporação de informações de perímetro escrotal nos procedimentos analíticos para sua análise simultânea com PP14 (análise bi-característica) leva a um aumento da acurácia da predição da DEP para PP14, principalmente nos touros jovens.

Além dos touros jovens, sem progênie, touros mais antigos, sem informação de prenhez das filhas, mas que dispõem de informação de perímetro escrotal dos filhos, teriam aumento na acurácia da predição da DEP de PP14.

Evans *et al.* (1999) e de Doyle *et al.* (2000) sugeriram que a relação entre prenhez de novilhas e perímetro escrotal poderia não ser uma função linear, ou seja, poderia haver um limiar na medida do perímetro escrotal para influenciar a prenhez. A partir desse valor o impacto na taxa de prenhez seria o mesmo.

Parece plausível, não haver necessidade de perímetros escrotais excessivamente grandes para influenciar a prenhez das filhas. Outro fator que pode estar interferindo na estimativa da correlação é a idade de medição do PE. Há necessidade de processar análises envolvendo PP14 e medidas de perímetro escrotal realizadas em diferentes idades para que se estabeleça a idade apropriada para se estimar a correlação genética entre as duas características. Eler *et al.* (2007) não encontraram diferenças significativas entre as estimativas de correlação genética entre as duas características quando o perímetro escrotal foi medido mais próximo dos 450 dias ou mais próximo dos 550 dias.

A quantidade de informações é outro fator determinante na estimação da correlação genética entre PE e PP14. Correlações muito mais altas são obtidas para conjuntos de dados com grande quantidade de informações nos quais as relações de pedigree são mais adequadas. PP14 e PE são informações medidas em animais diferentes e a correlação entre elas é obtida por procedimentos que se baseiam na matriz de parentesco entre os animais, o que torna a estimativa dependente das relações de pedigree envolvendo as duas características simultaneamente.

Como entender a dep de pp14

Para uma melhor interpretação da DEP de PP14, tome-se o seguinte exemplo de dois touros extremos em termos de mérito genético, touros A e B, cada um acasalado com grupos diferentes de vacas do mesmo rebanho. Para simplicidade, assumam-se que toda a progênie é formada de novilhas, todas são retidas para acasalar, e todas têm oportunidade igual no acasalamento. O touro A tem uma DEP de PP14 igual a +27 e o touro B uma DEP igual a -25. Em média, as novilhas filhas do touro A têm 52% a mais de probabilidade de conceber e permanecer prenhes quando comparadas com as filhas do touro B. [Diferença = $+27 - (-25) = 52\%$].

A DEP é calculada desviando-se as soluções de modelos mistos de 50% de modo a se ter valores positivos e negativos. Se a taxa de prenhez na população avaliada for de 30%, um touro DEP = 0 teria 30% de probabilidade de prenhez de suas filhas aos 14 meses. O touro DEP +27 produziria filhas com cerca de 57% de probabilidade de prenhez aos 14 meses [$30 + 27 = 57$]. O touro DEP -25 produziria filhas com apenas 5% de probabilidade de prenhez aos 14 meses [$30 - 25 = 5$]. O exemplo acima é de dois touros extremos em mérito genético e a diferença entre eles é de 52% (57% - 5%).

Desenvolvimentos mais complexos da metodologia mostram, no entanto que, para baixas taxas de prenhez, as diferenças são maiores. No exemplo acima, com dois touros extremos em mérito genético, a diferença entre os touros extremos poderia chegar próximo de 60%, resultado consistente com dados observados no campo em que os touros são realmente extremos em relação à taxa de prenhez de suas filhas.

Na pecuária de corte existe o “mito” que faz crer que o Nelore (e o Zebu de um modo geral) é tardio e ponto final. Na realidade, o que existe são animais tardios e animais precoces. Para se fazer uma população precoce basta identificar os reprodutores que transmitem precocidade (além das fêmeas) e utilizá-los. A seleção depende, no entanto, de predição confiável do mérito genético (entenda-se DEP) e para esta predição é fundamental a percepção e o interesse dos criadores. Nas raças européias, quando se fala de prenhez de novilha, está implícito que é em torno de um ano de idade. Para os zebuínos, a idade de reprodução sempre foi tida como 24 meses ou mais. No caso de seleção para precocidade, há necessidade de desafiar as fêmeas jovens, seja utilizando monta natural ou inseminando-as, independente do peso que apresentem no início da estação de monta. A taxa de prenhez será baixa no início, mas irá aumentando significativamente nas gerações sucessivas de seleção.

Resultados práticos

Alguns resultados práticos de campo mostraram que novilhas filhas de vacas precoces apresentaram taxa de prenhez aos 14 meses significativamente maior do que as contemporâneas, filhas de vacas normais. São classificadas como precoces as vacas que parem pela primeira vez com no máximo 27 meses de idade. Parindo até esta idade, elas ainda têm chance de entrar normalmente na estação de monta do ano subsequente, para a re-concepção. As taxas de prenhez para o conjunto total de vacas expostas e para a última safra avaliada (2007) estão na Tabela 1.

Foram expostas aos 14 meses 28.912 fêmeas nascidas entre 1994 e 2004. A taxa de prenhez média aos 14 meses de idade foi de 16,1%. À primeira vista pode parecer uma taxa de prenhez baixa, mas deve-se levar em consideração que esses resultados foram obtidos exclusivamente em regime de pasto e utilizando lotes muito grandes de novilhas expostas a um grupo de reprodutores múltiplos (RM). Os lotes tinham em média 300 novilhas e o RM para um lote de 300 fêmeas tinha em torno de 8 touros. Se o sistema de produção tivesse sido baseado em lotes menores de fêmeas, a taxa poderia ter sido maior. Com suplementação das fêmeas, os resultados também poderiam ter sido melhores. Mesmo assim, o sistema permitiu a identificação de 4.650 fêmeas precoces e permitiu a identificação de touros que produzem filhas precoces (como os touros da Tabela 1).

Tabela 1. Taxa de prenhez obtida para as novilhas expostas ao touro com 14 meses de idade, em média.

PRENHEZ AOS 14 MESES (PP14)	
TOTAL DE FÊMEAS EXPOSTAS: 28.912	
QUADRO GERAL	
TOTAL	SAFRA 2007
28.912	988
Prenhes: 4.650 (16,1 %)	Prenhes: 309 (31,3%)
Vazias: 24.262 (83,9%)	Vazias: 679 (68,7%)
----- EM RELAÇÃO À PRECOCIDADE SEXUAL DAS MÃES -----	
MÃES NORMAIS	MÃES NORMAIS
TOTAL: 24.931	SAFRA 2007: 510
Prenhes: 3.663 (14,7%)	Prenhes: 105 (20,6%)
Vazias: 21.268 (85,3%)	Vazias: 405 (79,4%)

MÃES PRECOSES	MÃES PRECOSES
TOTAL: 3.981	SAFRA 2007: 478
Prenhes: 987 (24,8%)	Prenhes: 204 (42,7%)
Vazias: 2.994 (75,2%)	Vazias: 274 (57,3%)

A utilização dos dados referentes às 28.912 fêmeas permitiu a realização de avaliação genética com predição de DEP para precocidade sexual (PP14) para os touros jovens comercializados nas últimas safras, ou seja, permitiu a identificação de touros jovens com alto mérito genético para PP14. Parte dos touros jovens foi utilizada pelo próprio programa de melhoramento genético (CFM) e parte foi disponibilizada para o mercado que pode assim adquirir material genético para o melhoramento de seus plantéis.

Uma observação rápida da Tabela 2 leva a pensar em um aumento muito grande do mérito genético para precocidade das novilhas nascidas em 2004 e expostas ao touro em 2007. A taxa de prenhez na safra 2007 foi de 31,3% contra uma média histórica de 16,1%. Na verdade, a safra 2007, mostrada neste artigo por ser a última safra avaliada pelo programa de melhoramento, foi uma safra atípica em termos do manejo reprodutivo das fêmeas jovens. Por razões econômicas, a população objeto deste estudo está sendo transferida para o Mato grosso do Sul e para o Oeste da Bahia. Por esta razão, na estação de reprodução 2006/2007, apenas 988 fêmeas jovens foram expostas aos 14 meses contra 3.789 em 2004/2005 e 3.348 em 2005/2006. As novilhas da safra 2007 constituem uma amostra com certo grau de seleção. No entanto, devido às comparações que serão feitas um pouco mais à frente, no texto, a safra 2007 constitui-se em importante conjunto de dados para aferição dos resultados de PP14.

Observa-se, na Tabela 2, que, das 28.912 fêmeas expostas ao touro aos 14 meses, 24.931 novilhas são filhas de vacas normais, vacas que tiveram seu primeiro parto com mais de 27 meses de idade. Para estas, a taxa de prenhez foi de 14,7% (média histórica igual a 16,1%) e 3.981 novilhas vieram de vacas precoces e para elas, a taxa de prenhez foi igual a 24,8%. Isto quer dizer que as filhas de vacas precoces tiveram 72% a mais de chance de conceber aos 14 meses do que as filhas de vacas normais.

Em relação à safra 2007, a comparação é também importante. Das 988 novilhas expostas aos 14 meses, para as quais a taxa de prenhez foi de 31,3%, 510 são filhas de vacas não precoces (ou normais) e 478 filhas de vacas precoces. Para as filhas de vacas precoces, a taxa de prenhez foi de 42,7% contra 20,6% para as filhas de vacas normais, ou seja, a taxa de prenhez das filhas de precoces foi 107,3% maior do que a das filhas de vacas normais.

Os resultados da Tabela 1 mostram claramente que a precocidade sexual, medida pela PP14, apresenta alta herdabilidade e que o aumento da precocidade sexual na população pode ser obtido muito rapidamente com a seleção baseada nesta característica.

Impacto da seleção para precocidade sexual

Um trabalho de simulação (em conjunto com a FNP Consultoria) mostrou que a redução do primeiro parto de 3 para 2 anos produziria um aumento de 16% no retorno econômico do sistema. Uma observação simplista permite dizer que uma vaca que pare aos dois anos de idade produziria ao longo da vida um bezerro a mais e existe a exclusão de um ano de recria dessa fêmea, período que o animal normalmente apresenta somente custo de produção sem receita alguma para o sistema. Há, no entanto, necessidade de se efetuarem estudos de longo prazo para que isto possa ser confirmado. Se não é um bezerro a mais, esse número poderia ficar entre 0,5 a 0,8 bezerros a mais, em média.

A reprodução aos 14 meses não requer grande aumento de investimento em alimentação e pode ser a melhor alternativa para melhorar sistemas de produção de baixo custo. Mas não adianta ser só precoce, o animal precisa ser também ganhador de peso, apresentar qualidade de carne e de carcaça, ou seja, deve-se selecionar para obtenção de um animal bem equilibrado.

Os estudos relacionados com PP14 foram realizados em regime exclusivo de pasto. Os aspectos nutricionais são importantes. Poderia ser discutida a utilização de suplementação das fêmeas jovens de modo a obter maior taxa de prenhez já no início da estação de monta. Isto não prejudicaria a identificação dos animais precoces desde que houvesse controle eficiente dos lotes de reprodução. O benefício principal seria a parição mais cedo permitindo o aumento da taxa de re-concepção.

E selecionar para precocidade sexual é selecionar para fertilidade?

A seleção para precocidade sexual nem sempre é viável em ambientes menos favoráveis, onde a disponibilidade ou qualidade da alimentação é muito variável durante o ano. No entanto, ao introduzir no rebanho fêmeas com genética superior para precocidade sexual e machos, ou sêmen, com a mesma qualidade genética, o criador terá novilhas de reposição mais precoces que, no início da estação de monta, quando elas terão de 24 a 26 meses de idade, estarão todas em plena atividade sexual, o que gerará altíssimos índices de prenhez de novilhas, logo nos primeiros dias dessa estação de monta, permitindo que essas fêmeas, primíparas na próxima safra, se recuperem e, novamente, apresentem índices superiores de fertilidade.

Conclusões

Os criadores devem estar sempre familiarizados com os catálogos de touros e consultar tais valores antes dos leilões ou pedidos de sêmen. O criador deve saber o que ele deve melhorar em seu rebanho e comparar as DEP's ou PTA's dos reprodutores disponíveis. A compra de material genético é, antes de tudo, uma compra técnica. Estar atualizado no significado dos termos técnicos de avaliação de reprodutores é uma importante ferramenta tanto de compra quanto de venda.

Os veterinários envolvidos com indicação de touros, colheita e transferência de embriões, em especial, devem estar muito atualizados com esses conceitos. Sua atuação na intensificação das taxas reprodutivas de machos (pelo uso da inseminação artificial) e fêmeas (pela transferência de embriões) e pelas técnicas de clonagem, podem estar ajudando a disseminar na população genes de animais mais tardios, tanto sob o ponto de vista sexual quanto de acabamento de gordura, (características que estão correlacionadas) quanto de animais menos férteis.

É importante o conhecimento das avaliações genéticas das matrizes antes de escolher aquelas que doarão oócitos para FIV, TE, etc. Seria ético produzir embriões com base apenas na expectativa de preço dos mesmos nos leilões?!!

Bibliografia citada

Albuquerque, L.G.; Mercadante, M.E; Eler, J.P. Recent Studies on the Genetic Basis For Selection of *Bos indicus* for Beef Production. In WORD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8TH. Proceedings. Belo Horizonte, August 2006, 2006.

Albuquerque, L.G.; Eler, J.P.; Mercadante, M.E. Aspectos da Seleção de *Bos indicus* para Produção de Carne. Boletim da Indústria Animal, 64 (4): 339 -348, 2007.

Doyle, S.P.; Golden, B.L.; Green, R.D.; Brinks, J.S. Additive genetic parameter estimates for heifer pregnancy and subsequent reproduction in Angus females. J. Anim. Sci., 78: 2091-2098, 2000.

Eler, J.P.; Silva, J.A.V.; Ferraz, J.B.S.; Dias, F.; Oliveira, H.N.; Evans, J.L.; Golden, B.L. Genetic Evaluation of the Probability of Pregnancy at 14 Months for Nellore Heifers. J. Animal Sci., 80: 951-954, 2002.

Eler, J.P.; Silva, J.A.V.; Evans, J.L.; Ferraz, J.B.S; Dias, F.; Golden, B.L. Additive Genetic Relationship Between Heifer Pregnancy and Scrotal Circumference in Nellore Cattle. J. Anim. Sci., 82: 2519-2527, 2004.

Eler, J.P.; Ferraz, J.B.S; Balieiro, J.C.C., Mattos, E.C., Mourão, G.B. Genetic correlation between heifer pregnancy and scrotal circumference measures at 15 and 18 month of age in Nellore cattle. Genetics and Molecular Research, 5(4): 569-580, 2006

Eler, J.P.; Ferraz, J.B.S; Balieiro, J.C.C., Mattos, E.C. Genetic Analysis of Average Annual Productivity of Nellore Breeding Cows (COWPROD). Genetics and Molecular Research, 2008 (in press).

Evans, J. L.; Golden, B.L; Bourdon, R.M.; Long, K.L. Additive genetic relationship between heifer pregnancy and scrotal circumference in Hereford cattle. *J. Anim. Sci.*, 77: 2621 a 2628, 1999.

FERRAZ, J. B. S., ELER, J. P. Seleção de *Bos indicus* para precocidade sexual. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.*, v.31, p.167 - 171, 2007.

Johnston, D.J., Bunter, K.L. Days to calving in Angus cattle. genetic and environmental effects, and covariances with other traits. *Livest. Prod. Sci.*, 45: 13-22, 1996.

Koots, K.R.; Gibson, J.P.; Wilton, J.W. Analysis of published parameter estimates for beef production traits: 2. Phenotypic and genetic correlations. *Anim. Bred Abstr.*, 62: 825-853, 1994.

Pereira, E.; Eler, J.P.; Costa, F.A.A.; Ferraz, J.B.S. Análise genética da idade ao primeiro parto e do perímetro escrotal em bovinos da raça Nelore. *Arq. Brás. Méd. Vet. Zootec.*, 53 (1): 116-121, 2001.

Schwengber, E.B.; Bezerra, L. A. F.; Lobo, R. B. Produtividade acumulada como critério de seleção em fêmeas da raça Nelore. *Ciência Rural*, 31 (3): 483-486, 2001.

Silva, J.A.II.V; Dias, L.T.; Albuquerque, L.G. estudo genético da precocidade sexual de novilhas em um rebanho Nelore. *Rev. Bras. Zootec.*, 34 (5): 1568-1572, 2005.

Van Melis, M.H.; Eler, J.P.; Oliveira, H.N.; Rosa, G.J. M.; Silva, J.A.II.V.; Ferraz, J.B.S.; Pereira, E. Study of stayability in Nellore cows using a threshold model. *J. Anim. Sci.*, 85: 1780-1786, 2007.

Van Melis, M.H. et al (2008a). Relação genética aditiva entre perímetro scrotal, probabilidade de prenhez aos 14 meses e habilidade de permanência no rebanho em fêmeas Nelore. (em preparação para publicação).

Van Melis, M. H. et al (2008b). Additive genetic relationship of survival with fertility and production traits in Nelore cattle using bivariate models. (em preparação para publicação).

IATF em novilha

Manoel F. Sá Filho^{1*}; Lindsay U. Gimenes²; José Nélio S. Sales²; Gabriel A. Crepaldi²;
Adriana G. Medalha¹; Pietro S. Baruselli²

¹FIRMASA- IATF, CEP 79020-210, Campo Grande-MS, Brasil; ²VRA, FMVZ/USP, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brasil; *manoel@firmasa.com.br

Introdução

O atual rebanho bovino brasileiro é composto por aproximadamente 167,5 milhões de cabeças. Desse rebanho, ao redor de 13,2 milhões são novilhas de dois a três anos de idade (7,9%, ANULPEC 2008). A eficiência econômica da pecuária de corte está vinculada à produção de bezerros, sendo estes destinados à produção de carne ou reposição do rebanho. Neste contexto, a eficiência reprodutiva em novilhas demonstra-se como de grande importância, principalmente no ponto de vista da concentração da ocorrência das gestações em determinados momentos durante a estação reprodutiva bem como o de promover o melhoramento genético do rebanho.

O melhoramento genético em rebanhos bovinos, baseado na seleção de indivíduos com maior desenvolvimento ponderal, rendimento de carcaça, capacidade de conversão alimentar, habilidade materna, fertilidade e precocidade sexual, possibilita o aumento da produtividade de carne. Assim, a eficiente disseminação deste material genético proporciona maior retorno econômico para a atividade.

Durante os últimos anos, novas tecnologias aplicadas à reprodução animal vêm contribuindo de maneira importante para o melhoramento genético. A inseminação artificial (IA) se tornou uma das principais biotecnologias reprodutivas de impacto econômico na produção de bovinos por possibilitar a utilização em massa de indivíduos melhoradores, viabilizar o cruzamento industrial em regiões tropicais e aumentar a produção de carne por hectare. Embora apresente essas vantagens, apenas 7% das fêmeas em idade reprodutiva são inseminadas no Brasil. As principais limitações impostas ao emprego dessa biotecnologia referem-se às falhas na detecção do estro, a puberdade tardia e ao longo período de anestro pós-parto.

Devido a essas limitações, tornou-se de grande interesse econômico nos últimos anos, o desenvolvimento de tratamentos que tem por objetivo a indução e/ou sincronização do estro e da ovulação. O emprego de alguns fármacos disponíveis no mercado permitiu a sincronização do ciclo estral, a luteólise e a ovulação em tempo determinado sem haver comprometimento na fertilidade do estro induzido. Assim, inúmeros protocolos hormonais vêm sendo desenvolvidos para realização da inseminação artificial em tempo pré-determinado, ou seja, em tempo fixo com taxas de concepção aceitáveis.

A presente revisão tem como objetivo descrever alguns conceitos importantes referentes à fisiologia reprodutiva, do controle farmacológico do ciclo estral e apresentar diferentes protocolos para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em novilhas, especialmente visando descrever as peculiaridades existentes no emprego da manipulação hormonal do ciclo estral principalmente em novilhas Nelore (*Bos indicus*).

Puberdade e maturidade sexual

Em fêmeas bovinas, a puberdade pode ser definida como aquisição da capacidade em se reproduzir. Entretanto, a puberdade não deve ser interpretada como um evento isolado, sendo caracterizada como a etapa final de inúmeras alterações fisiológicas e morfológicas que culminam com a capacidade de conceber e manter a gestação. Sendo assim, uma definição interessante para puberdade seria a primeira ovulação fértil acompanhada de uma fase lútea de duração normal.

Após o nascimento, diversos mecanismos endócrinos inibem a ação do sistema reprodutivo até que a fêmea atinja o desenvolvimento corporal compatível com a reprodução. Nesse momento, os gastos

energéticos utilizados para o crescimento e desenvolvimento diminuem, permitindo a ocorrência normal da gestação, parto e lactação (NOGUEIRA, 2006).

A idade à puberdade é uma característica de produção fundamental em bovinos. Em raças de corte selecionadas para precocidade sexual, as novilhas podem atingir a puberdade com idade entre 13 e 15 meses. Em sistemas intensivos de produção de leite e de carne, novilhas devem apresentar o primeiro parto com até 25 meses de idade. O atraso na ocorrência do primeiro parto irá acarretar importantes perdas econômicas. No entanto, a idade à puberdade para novilhas zebuínas varia entre 22 e 36 meses e ao primeiro parto entre 44 e 48 meses de idade (SOUZA et al., 1995). De acordo com Torres (1996), a idade ao primeiro parto do rebanho de corte nacional é de quatro anos e o intervalo entre partos de 20 a 21 meses. A baixa eficiência reprodutiva demonstrada pelos dados de Torres (1996) acarreta perdas econômicas para o produtor e para a indústria pecuária nacional. É importante salientar que os 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 das raças zebuínas serem menos precoces que as raças européias, um manejo nutricional adequado associado à terapia hormonal podem reduzir a idade à puberdade desses animais para 18 a 20 meses (Santos & Sá Filho, 2006).

A idade da puberdade em novilhas está diretamente relacionada ao seu peso e composição corporal. Para que as novilhas de corte apresentem o primeiro parto com idade média de 24 meses, é necessário atingir a puberdade por volta dos 12 e 13 meses. Entretanto, em novilhas zebuínas, é difícil observar a ocorrência do primeiro ciclo estral ao redor dos 13 meses. Na raça Nelore observa-se grande quantidade de animais pré-púberes com idade acima de dois anos provavelmente devido ao baixo peso corporal, baixa reserva de gordura e também à seleção genética.

Santos e Sá Filho (2006) avaliaram o peso vivo, a condição corporal e a ciclicidade de 617 novilhas Nelore com idade entre dois e três anos. Foi observada relação quadrática tanto para o escore de condição corporal quanto para o peso vivo na proporção de fêmeas pré-púberes, no qual o aumento da condição corporal ou do peso vivo reduziu a proporção de novilhas em anestro (Figura 1).

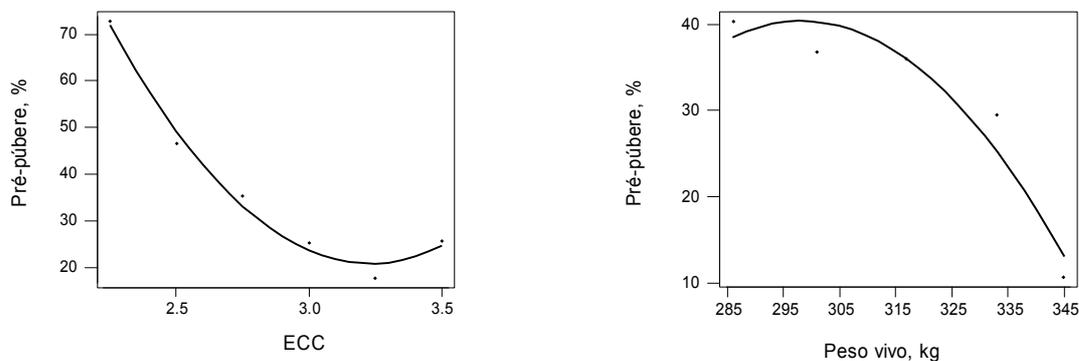


Figura 1. Relação entre o escore de condição corporal (ECC) e o peso vivo com a porcentagem de novilhas Nelore classificadas como pré-púbere entre dois a três anos de idade (SANTOS e SÁ FILHO, 2006).

Em recente levantamento realizado em fazendas comerciais localizadas nos estados do Paraná e do Mato Grosso do Sul, avaliou-se o efeito da condição corporal na frequência de novilhas Nelore (n=1803) que apresentaram corpo lúteo no primeiro dia da estação reprodutiva (SÁ FILHO 2008, dados não publicados). Os resultados (Figura 2) corroboram com o observado no estudo anterior, no qual o incremento no escore de condição corporal aumenta a porcentagem de novilhas ciclando no início da estação de monta.

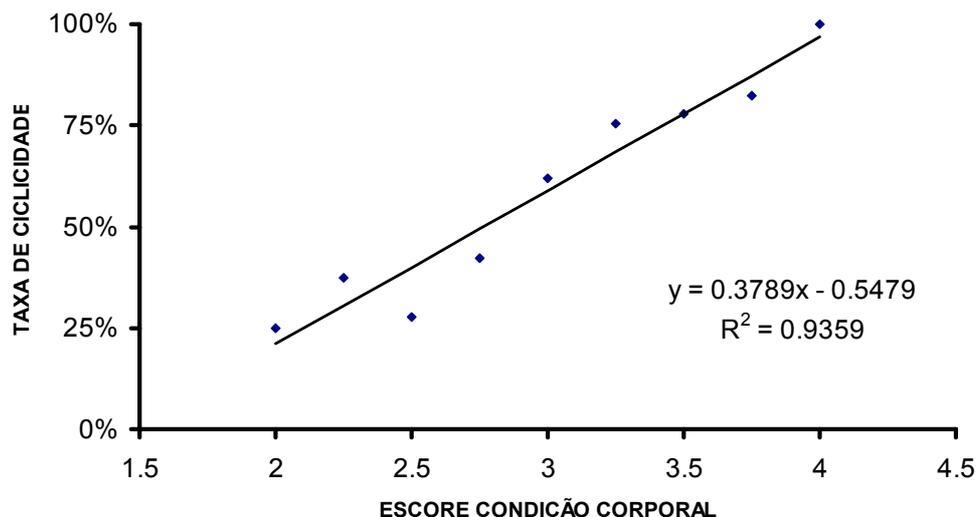


Figura 2. Relação entre o escore de condição corporal e a porcentagem de novilhas Nelore (n=1803) com presença de corpo lúteo no primeiro dia da estação de monta (SÁ FILHO, 2008 dados não publicados).

No início da estação de reprodução, as novilhas devem atingir um peso equivalente a 55-60% do peso adulto da vaca da raça correspondente. Para atingir essa meta é necessário que essas novilhas sejam submetidas a um manejo nutricional adequado. No caso de novilhas de corte de raças zebuínas, o peso ao início da estação de monta deve estar em torno de 300 a 330 kg. Pesos inferiores no início da estação irão comprometer o desempenho reprodutivo dessas fêmeas, afetar o peso ao parto, trazer conseqüências negativas ao desempenho animal na primeira lactação e na fertilidade da 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 pode não se justificar economicamente, se a maior parte desses animais não estiver apta à reprodução (SANTOS e SÁ FILHO, 2006).

Durante a puberdade o trato reprodutivo de novilhas apresenta diversas alterações fisiológicas e morfológicas que irão permitir a gestação. Autores têm demonstrado que o tamanho e peso do útero, da cérvix e da vagina aumentam rapidamente após a puberdade (DESJARDINS e HAFS, 1969; HONARAMOOZ et al., 2004). Em novilhas Nelore (n=17 fêmeas), Sá Filho (2008, dados não publicados) observou efeito semelhante da puberdade no desenvolvimento uterino (Figura 3). Esse rápido efeito da puberdade no desenvolvimento do trato reprodutivo parece estar ligado à estimulação exercida pelo aumento das concentrações de estradiol e progesterona durante o período pós-púbere.

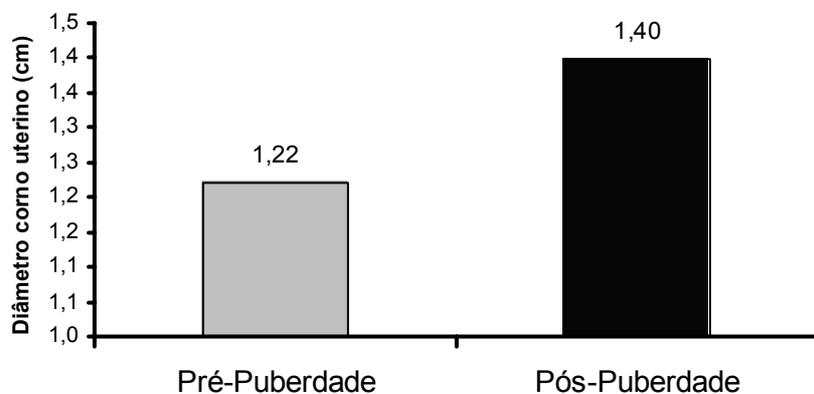


Figura 3. Efeito da puberdade no desenvolvimento uterino de novilhas Nelore (*Bos indicus*; n=17 fêmeas, SÁ FILHO, 2008, dados não publicados).

A maturidade sexual é definida como a idade em que o animal atinge o seu máximo potencial reprodutivo. Essa maturação sexual é evidenciada pelo aumento da incidência de manifestação de estro e da fertilidade (BYERLEY et al., 1987). Geralmente, são necessários dois a três ciclos estrais com fases luteais normais (40 a 60 dias após a ocorrência da puberdade) para que a fêmea bovina adquira maturidade sexual, capacidade de conceber e levar a gestação a termo (SANTOS e SÁ FILHO, 2006). Byerley et al. (1987) expôs novilhas a touros no primeiro ou somente no terceiro estro após a puberdade. Os autores observaram que novilhas cobertas no primeiro cio após a puberdade apresentaram menor taxa de concepção quando comparadas as novilhas cobertas no terceiro cio. Sendo assim, a fertilidade de novilhas ciclando submetidas à monta natural ou a programas de sincronização da ovulação para IATF no início da estação reprodutiva, parece ser dependente da quantidade de ciclos estrais que essas novilhas apresentaram previamente.

Emprego da IATF em novilhas

Os programas de sincronização da ovulação apresentam resultados satisfatórios e possibilitam o emprego da IATF em vacas zebuínas (BARUSELLI et al., 2004a). Contudo, os protocolos hormonais desenvolvidos para vacas lactantes apresentam comprometimento na eficiência quando utilizados em novilhas. Estudos realizados em novilhas *Bos indicus* submetidas ao tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®], Pfizer) apresentaram baixa taxa de ovulação ao final do tratamento (BARUSELLI et al., 2004b). Enquanto que novilhas *Bos taurus* apresentam satisfatórias taxas de ovulação e de prenhez após sincronização com dispositivos intravaginais de progesterona (P4; CUTAIA et al., 2001). Existem diferenças na fisiologia reprodutiva entre *Bos taurus* e *Bos indicus* que pode influenciar a resposta aos protocolos de sincronização empregados. Uma das diferenças observadas está relacionada aos níveis de P4 durante o ciclo estral. Randel (1977) observou que fêmeas *Bos indicus* apresentam níveis de P4 circulantes inferiores a fêmeas *Bos taurus*. Além disso, na literatura existem estudos demonstrando que elevadas concentrações de P4 diminuem a frequência de liberação de hormônio luteinizante (LH) e do crescimento folicular (BERGFELD et al., 1995; BURKE et al., 1996). Assim, podemos levantar a hipótese de que as novilhas *Bos indicus* são mais sensíveis aos níveis circulantes de P4 liberados pelos dispositivos intravaginais. Dessa forma, estudos foram desenvolvidos visando aprimorar os conhecimentos endocrinológicos e fisiológicos em novilhas *Bos indicus* para tentar viabilizar a utilização da sincronização da ovulação para IATF nessa categoria animal.

Em estudos iniciais, avaliou-se a dinâmica folicular e as concentrações plasmáticas de P4 durante o tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®]) associado ou não ao tratamento com prostaglandina F_{2α} (PGF) no dia da inserção do dispositivo (D0) em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus* (CARVALHO, 2004; CARVALHO et al., 2008). O objetivo do estudo foi antecipar a luteólise e diminuir as concentrações sanguíneas de progesterona durante o tratamento. A hipótese levantada foi que menores concentrações circulantes de P4 aumentaria a taxa de crescimento folicular e ovulação, e consequentemente a eficiência do tratamento de sincronização. Os resultados desse experimento foram indicativos de que o tratamento com prostaglandina no momento da inserção do dispositivo intravaginal aumenta a taxa de crescimento folicular, o diâmetro do folículo dominante no dia da retirada do dispositivo (D8), o diâmetro máximo do folículo dominante e a taxa de ovulação. Esses resultados sugerem que o tratamento com PGF no dia do início da sincronização (D0) pode aumentar a taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas. No entanto, verificou-se que novilhas *Bos indicus* apresentaram comprometimento na taxa de crescimento do folículo dominante, que culminou na diminuição do diâmetro máximo e da taxa de ovulação (Tabela 1), indicando baixa resposta ao tratamento de sincronização. Além disso, novilhas *Bos indicus* apresentaram maiores níveis circulantes de P4 durante o tratamento (P<0,05; Figura 4).

Tabela 1. Dia da emergência da nova onda de crescimento folicular, número de folículos recrutados, diâmetro máximo do folículo dominante (FD), taxa de crescimento diária do folículo dominante e taxa de ovulação em novilhas *B. indicus*, *B. indicus* x *B. taurus* e *B. taurus* tratadas com dispositivo intravaginal de P4 segundo o tratamento com PGF no dia da inserção do dispositivo (Dia 0).

Grupo Genético	N	Início da onda (dia)	Nº de folículos recrutados (>2mm)	Ø máximo do FD (mm)	Taxa de cresc. (mm/dia)	Taxa de ovulação (%)
<i>B. indicus</i>	23	3,1± 0,1	33,4± 3,2 ^a	9,5± 0,5 ^b	0,9 ± 0,1 ^b	39,1 (9/23) ^b
<i>B.indicus</i> x <i>B.taurus</i>	25	3,3± 0,1	29,6± 2,5 ^{ab}	12,3± 0,4 ^a	1,2 ± 0,1 ^a	84,0 (21/25) ^a
<i>B. taurus</i>	22	3,2± 0,1	25,4± 2,5 ^b	11,6± 0,5 ^a	1,1 ± 0,1 ^a	72,7 (16/22) ^a
Com PGF	33	3,3± 0,1	28,7± 2,8	11,9± 0,4 ^a	1,2 ± 0,1 ^a	78,8 (26/33) ^a
Sem PGF	37	3,1± 0,1	30,4± 1,8	10,5± 0,4 ^b	0,9 ± 0,1 ^b	54,0 (20/37) ^b

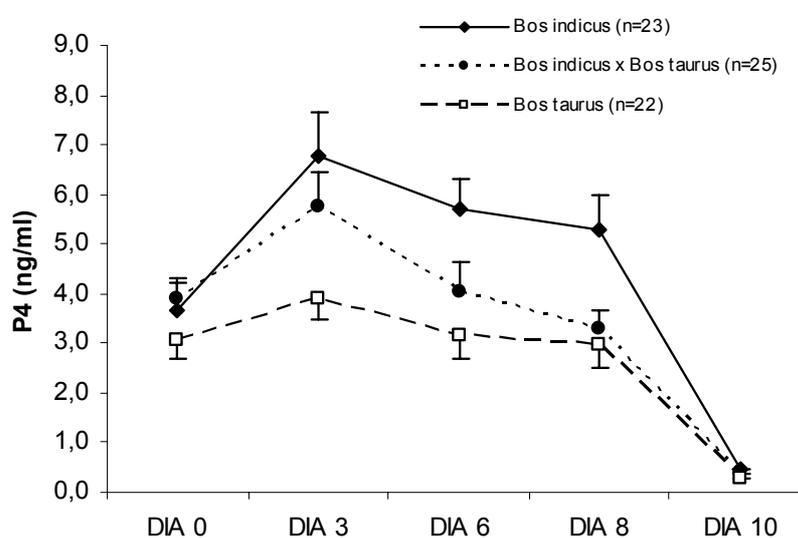


Figura 4. Concentração plasmática de P4 durante o tratamento com dispositivo intravaginal de P4 em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus*.

Em resumo, novilhas *Bos indicus* apresentaram menor taxa de crescimento (mm/dia), menor diâmetro máximo do folículo dominante, menor taxa de ovulação e maior concentração plasmática de P4 durante o tratamento que as novilhas *Bos taurus*. Assim, os maiores níveis circulantes de P4 em novilhas *Bos indicus* tratadas com dispositivo intravaginal podem diminuir a frequência da liberação de LH o que compromete o crescimento folicular e a ovulação, inviabilizando o emprego deste tratamento para a IATF em novilhas zebrinas.

Em outro experimento, Marques et al. (2005) avaliaram o efeito da administração de PGF no D0 e da eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 (CIDR®, D8) com o objetivo de aumentar a eficiência do tratamento de sincronização da ovulação para IATF em novilhas Nelore (*Bos indicus*). No experimento foram utilizadas 392 novilhas Nelore com peso corporal acima de 300Kg. Os resultados estão descritos na tabela 2.

Tabela 2. Taxa de prenhez à IATF em novilhas Nelore tratadas com PGF no início do tratamento (D0) e com eCG (400UI) na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR[®], D8).

	Número	Taxa Prenhez (%)
Sem PGF / Sem eCG	100	14,0 ^b (17/100)
Com PGF / Sem eCG	97	17,5 ^b (17/97)
Sem PGF / Com eCG	98	35,7 ^a (35/98)
Com PGF / Com eCG	97	34,0 ^a (33/97)
EFEITOS PRINCIPAIS		
Sem PGF	198	24,7 (49/198)
Com PGF	194	25,8 (50/194)
Sem eCG	197	15,7 ^a (31/197)
Com eCG	195	34,9 ^b (68/195)

Verificou-se que o tratamento com eCG no momento da retirada do dispositivo de P4 aumentou a taxa de prenhez em novilhas Nelore. No entanto, o uso da PGF no D0 não apresentou efeito na resposta ao tratamento de sincronização. Apesar do aumento na taxa de prenhez com o uso de eCG, pôde-se observar que as taxas de prenhez não foram satisfatórias em novilhas Nelore, sincronizadas e inseminadas artificialmente em tempo fixo.

Como discutido anteriormente, elevadas concentrações de P4 (endógena e/ou exógena) estão associadas a inibição da secreção pulsátil de LH (RATHBONE et al., 2001). Essa inibição promove redução na taxa de crescimento folicular em novilhas Nelore submetidas aos tratamentos com dispositivo intravaginal de P4 (CARVALHO et al., 2004). Ainda, o bloqueio do LH promovido durante o tratamento de sincronização varia em função da fonte de progesterona utilizada, visto que, os progestágenos promovem menor supressão na frequência de LH (KOJIMA et al., 1992). Diante desses resultados, outros trabalhos foram desenvolvidos para avaliar a dinâmica folicular e a taxa de prenhez de novilhas Nelore tratadas com implantes auriculares contendo Norgestomet, associados ao benzoato de estradiol.

Sá Filho et al. (2006) avaliaram o efeito da administração no D0 de 2mg de benzoato de estradiol (BE) ou de diferentes doses de valerato de estradiol (VE) no momento e na sincronização da emergência da onda folicular em vacas e novilhas *Bos indicus* tratadas com implante auricular de Norgestomet. Observou-se efeito significativo no intervalo e na dispersão do momento da emergência da nova onda de crescimento folicular entre os tratamentos (Tabela 3). O BE promoveu efeito semelhante em vacas e em novilhas na indução da emergência da nova onda de crescimento folicular. No entanto, novilhas apresentaram maior intervalo entre o tratamento e a emergência da nova onda quando tratadas com VE. Conclui-se que em novilhas *Bos indicus*, deve-se utilizar no início do protocolo de sincronização Benzoato de estradiol associado ao implante auricular contendo Norgestomet.

Tabela 3. Dinâmica folicular de novilhas e vacas *Bos indicus* tratadas com 2mg de Benzoato de estradiol (BE), 5mg de Valerato de estradiol mais 3mg de Norgestomet (VE) ou ½ dose de VE no início do tratamento com implante auricular de Norgestomet.

	Parâmetros	BE	½ VE	VE	Valor P
Novilhas	Número animais	10	10	9	
	Média emergência	2,5±0,2 ^a	4,2±0,3 ^b	6,1±0,6 ^c	<0,001
	Variação emergência	2-3 ^x	3-6 ^{xy}	3-8 ^y	<0,05
Vacas	Número animais	10	10	10	
	Média emergência	2,5±0,2 ^a	3,1±0,4 ^{ab}	4,0±0,5 ^b	<0,05
	Variação emergência	2-4 ^x	2-6 ^{xy}	2-6 ^y	<0,05

Um segundo experimento foi realizado para avaliar a dinâmica folicular de novilhas Nelore pré-pubescentes tratadas com BE associados ou não a progesterona injetável no início do tratamento com implante auricular contendo Norgestomet (SÁ FILHO et al., 2005a). Foram utilizadas 18 novilhas Nelore pré-pubescentes, sem corpo lúteo (CL) diagnosticado por ultra-sonografia nos dias -28, -14 e no dia da inserção do implante. As fêmeas foram subdivididas em dois tratamentos (BE ou BE+P4) de acordo com o diâmetro do folículo dominante no momento da inserção do implante (D0). Os resultados podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4. Dinâmica folicular de novilhas Nelores pré-pubescentes tratadas com implante auricular de Norgestomet e benzoato de estradiol associado ou não a progesterona injetável.

	BE	BE+P4
Número de animais	9	9
Diâmetro FD D0 (cm)	1,12±0,05	1,05±0,04
Ovulações no início tratamento (%)	22,2 (2/9)	44,4 (4/9)
Emergência da onda folicular (dias)	3,33±0,33	2,67±0,19
Diâmetro FD D8 (cm)	0,86±0,07	1,01±0,07
Diâmetro FD máx (cm)	1,05±0,05 ^a	1,26±0,06 ^b
Taxa de ovulação final do tratamento (%)	100,0 (8/8)	77,7 (7/9)
Intervalo retirada implante-ovulação (h)	73,7±1,7	72,0±0,0

Torres-Júnior et al. (2005) avaliaram o efeito da administração de PGF no momento da inserção do implante (D0) em novilhas cíclicas tratadas com implante auricular contendo Norgestomet e Benzoato de estradiol. No experimento foram utilizadas 22 novilhas Nelore (*Bos indicus*) cíclicas de 20 a 24 meses de idade. Os resultados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Efeito da administração de PGF no início do tratamento em novilhas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante auricular de Norgestomet e benzoato de estradiol.

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

Os resultados apontam que não houve diferença significativa em nenhum dos parâmetros avaliados ($P>0,05$), sendo, provavelmente, decorrente do menor bloqueio na pulsatilidade do LH pelo implante de Norgestomet. Esses resultados contrastam com os observados em experimentos que utilizaram PGF no D0 em protocolos com dispositivos intravaginas de P4.

Sá Filho et al. (2005b) avaliaram o efeito da adição ou não de uma dose de PGF no momento da inserção do implante auricular contendo Norgestomet ou do dispositivo intravaginal de P4 (Fatorial 2x2). No experimento foram utilizadas 48 novilhas cíclicas pré-sincronizadas com duas doses de PGF_{2α} (Dia-24 e Dia-12). Os resultados estão apresentados na tabela 6 e Figura 5.

Tabela 6. Efeito da administração de PGF no início do protocolo de sincronização na dinâmica folicular de novilhas Nelore (*Bos indicus*) com implante auricular contendo Norgestomet (Crestar®) ou dispositivo intravaginal de P4 (CIDR®).

	CIDR®	CIDR® +PGF	Crestar®	Crestar® +PGF	Valor de P		
					Impl.	PGF	Impl x PGF
Número de animais	10	11	12	12			
Diâmetro FL Dia 0	1,01±0,04	1,02±0,05	0,99±0,04	1,02±0,06	0,83	0,66	0,86
Emergência Folicular	3,2±0,18	3,0±0,23	3,0±0,17	2,83±0,21	0,38	0,38	0,97
Diâmetro FD Dia 8	0,76±0,05 ^b	0,89±0,04 ^a	0,98±0,04 ^a	0,99±0,06 ^a	<0,01	0,21	0,17
Diâmetro FD na IATF	0,81±0,05 ^b	1,03±0,06 ^{ab}	1,12±0,08 ^a	1,18±0,07 ^a	<0,01	0,08	0,27
Diâmetro FL máximo	0,88±0,05 ^b	1,06±0,05 ^{ab}	1,15±0,07 ^a	1,20±0,06 ^a	<0,01	0,11	0,28
Diâmetro FL ovulatório	0,97±0,09 ^b	1,10±0,06 ^{ab}	1,18±0,07 ^a	1,26±0,05 ^a	0,02	0,31	0,73
Taxa de crescimento folicular médio (cm/dia)	0,09±0,01 ^b	0,11±0,01 ^{ab}	0,13±0,01 ^a	0,13±0,01 ^a	0,01	0,39	0,17
Taxa de ovulação (%)	40,0(4/10) ^b	72,7(8/11) ^{ab}	83,3(10/12) ^a	83,3(10/12) ^a	0,03	0,15	0,22
Momento da ovulação (h)	84,0±6,93 ^{xb}	77,1±2,42 ^{xab}	74,4±1,60 ^{ay}	72,0±0,00 ^{ay}	0,01 (*<0,01)	0,24 (*0,02)	0,19

*Teste de Bartlett ($x \neq y$), $a \neq b$ na mesma coluna indica diferença estatística ($p < 0,05$).

Os resultados demonstram que houve efeito do uso de PGF no início do tratamento apenas na sincronização da ovulação. No entanto, o implante auricular de Norgestomet promoveu aumento na taxa de crescimento folicular, no diâmetro do folículo dominante, na taxa de ovulação e maior sincronia das ovulações quando comparado ao dispositivo intravaginal de P4 em novilhas *Bos indicus*.

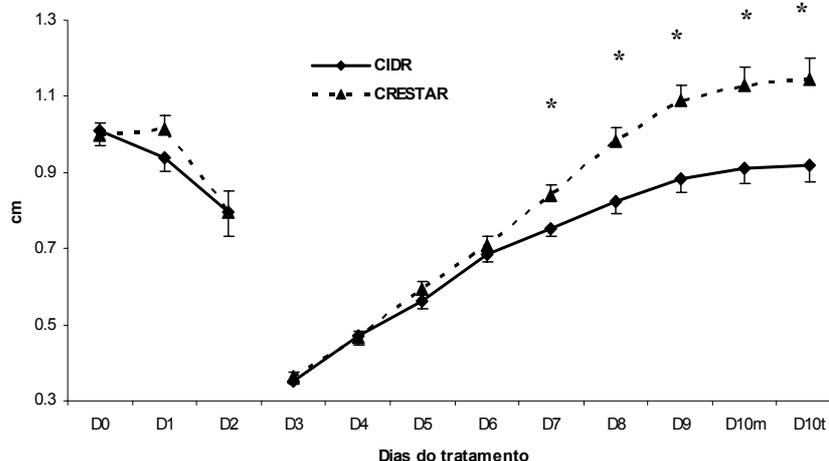


Figura 5. Dinâmica folicular de novilhas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante auricular contendo Norgestomet (Crestar®) ou dispositivo intravaginal de P4 (CIDR®)

* ($p < 0,05$).

Diante dos resultados observados nos experimentos anteriores pôde-se concluir que é possível obter satisfatórias taxas de ovulação que justificam o emprego da IATF, tanto em novilhas Nelore púberes quanto em pré-púberes tratadas com Benzoato de estradiol associado ao implante auricular com Norgestomet. Assim, com o objetivo melhorar os resultados da IATF em novilhas, Sá Filho et al. (2005c) avaliaram o efeito da administração de 400 UI de eCG no momento da retirada do implante auricular

contendo Norgestomet em novilhas Nelore cíclicas e não cíclicas. Exame ultrassonográfico foi realizado em 177 animais no dia do início do tratamento de sincronização para determinar a presença ou não de CL. A partir dessa avaliação, os animais foram agrupados em fatorial 2x2 de acordo com a ciclicidade e tratamento com eCG. Os resultados estão apresentados na tabela 7 e na figura 6.

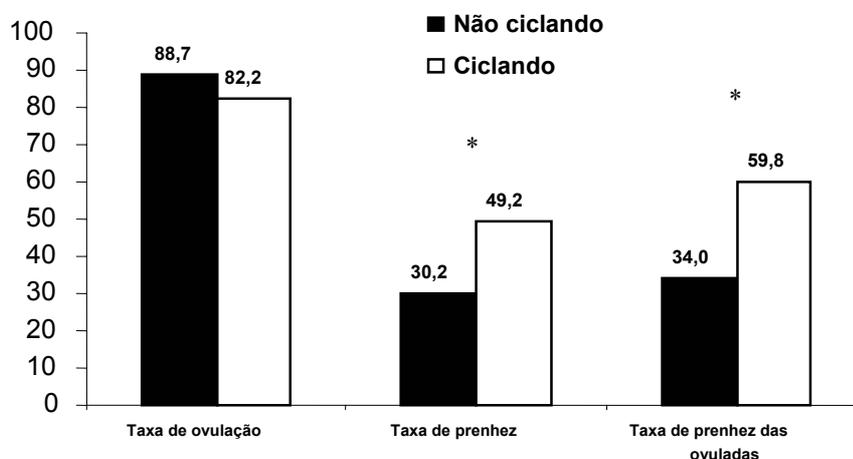


Figura 6. Efeito da ciclicidade na taxa de ovulação e de prenhez de novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à IATF.

*($p < 0,05$)

Tabela 7. Efeito da ciclicidade e da administração de eCG (400UI) na dinâmica folicular de novilhas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante auricular contendo Norgestomet associado ao benzoato de estadiol.

	Não ciclando (n=53)	Ciclando (n=124)	sem eCG (n=87)	com eCG (n=90)	Valor P (Teste F)	
					Ciclicidade	eCG
Ø FD D8 (cm)	0,89±0,02	0,82±0,02	0,82±0,02	0,86±0,02	0,04	0,28
Ø FD na IATF (cm)	1,02±0,03	1,00±0,02	0,95±0,02	1,06±0,02	0,58	0,0009
Taxa ovulação % (n)	88,7 (47/53)	82,2 (102/124)	73,6 (64/87)	94,4 (85/90)	0,28	0,0001
Ø do CL cinco dias após a IATF (cm)	1,42±0,04	1,50±0,03	1,39±0,03	1,55±0,03	0,04	0,0001
Taxa prenhez % (n)	30,2 (16/53)	49,2 (61/124)	36,8 (32/87)	50,0 (45/90)	0,02	0,04
Taxa prenhez nas ovuladas % (n)	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 (Figura 7; $p < 0,05$). Com isto, pode-se concluir que é possível obter taxas de prenhez satisfatórias em novilhas Nelore tratadas com eCG e/ou ciclando em programas de sincronização da ovulação com implante auricular contendo Norgestomet e benzoato de estradiol para IATF.

Em recente experimento, Sá Filho et al. (2008) avaliaram o efeito da utilização de diferentes tipos de indutores de ovulação em novilhas Nelore cíclicas tratadas com implante auricular contendo Norgestomet novo ou reutilizado (Fatorial 2x3). No experimento, 620 novilhas ciclando (com CL) oriundas de três fazendas comerciais dos estados do Paraná, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul foram selecionadas de acordo com a presença de CL no dia do início do tratamento (Dia 0). A partir desta avaliação, os animais

foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais receberam um implante auricular (Crestar[®] Novo ou Crestar[®] utilizado previamente por nove dias) associado à administração im de 2mg de BE no D0. No momento da retirada do implante (D8) foram administradas im 1,5mg de d-cloprostenol (Preloban[®], Intervet) e 300UI de eCG (Folligon[®], Intervet). Nesse mesmo momento, as fêmeas foram distribuídas homoganeamente de acordo com o escore de condição corporal (ECC) em três grupos experimental: BE, Cipionato de estradiol (CE) ou GnRH. As fêmeas do grupo CE receberam 0,5mg de CE (ECP[®], Pfizer), no momento da retirada do implante auricular (D8). No grupo BE, administrou-se 1mg de BE 24 horas após a retirada do implante (D9). No grupo GnRH as novilhas receberam 100µg de Gonadorelina (Fertagil[®], Intervet) no momento da IATF (D10). Todas as fêmeas foram inseminadas em tempo fixo 54 horas após a retirada do implante auricular. No momento da IATF, as fêmeas foram avaliadas por ultrassonografia para identificar e mensurar o maior folículo presente nos ovários. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF. Não foram observadas interações entre os diferentes indutores de ovulação (BE, CE ou GnRH) e os tipos de implantes auriculares utilizados (novo ou re-utilizado) no diâmetro folicular na IATF e na taxa de prenhez ($p>0,05$). Os resultados principais estão apresentados na tabela 8.

Tabela 8. Efeito da utilização de diferentes indutores de ovulação em novilhas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante auricular contendo Norgestomet novo ou re-utilizado no diâmetro folicular no momento da inseminação e na taxa de prenhez.

		Ø folicular na IATF (mm)	Taxa de Prenhez (%)
Indutor de ovulação	BE	8,28±0,03 ^b	40,4 (88/218)
	CE	8,09± 0,03 ^b	48,3 (99/205)
	GnRH	9,39± 0,03 ^a	48,7 (95/195)
Tipo do implante	Novo	9,20±0,02 ^a	46,6 (142/305)
	Reutilizado	7,90± 0,03 ^b	44,3 (139/314)

a≠b na mesma coluna indica diferença estatística ($p<0,05$)

Nesse estudo, avaliaram-se outras variáveis que podem influenciar a resposta folicular e a taxa de prenhez de novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas a protocolos de sincronização da ovulação para IATF. Observou-se efeito significativo da condição corporal no início do tratamento, no diâmetro folicular no momento da IATF e na taxa de prenhez à IATF. As novilhas com ECC $\geq 3,25$ apresentaram maior diâmetro folicular e maior taxa de prenhez ($P=0,03$, Tabela 9). O diâmetro folicular no momento da IATF influenciou a taxa de prenhez. Novilhas com folículo maior que 8mm no momento da IATF obtiveram maior taxa de concepção ($P=0,001$, Figura 7). Outro resultado observado foi o efeito significativo da fazenda na taxa de prenhez à IATF [Fazenda A= 55,2%^a (48/87), B=41,1%^b (173/421) e C= 54,1%^a (60/111); $p=0,008$], sendo que este efeito da fazenda pode ser decorrente principalmente do tipo de alimentação ou do grau de maturidade sexual em que as novilhas sincronizadas apresentavam ao início do tratamento hormonal.

Tabela 9. Efeito do escore de condição corporal no diâmetro do folículo dominante no momento da IATF e na taxa de prenhez de novilhas Nelore (*Bos indicus*).

	$\leq 2,75$	3	$\geq 3,25$	P
Diâmetro Folicular na IATF (mm)	8,21±0,03 ^b	8,29± 0,03 ^b	9,31± 0,03 ^a	0,03
Taxa de Prenhez (%)	41,5 ^b (105/253)	43,1 ^b (84/195)	54,1 ^a (93/172)	0,03

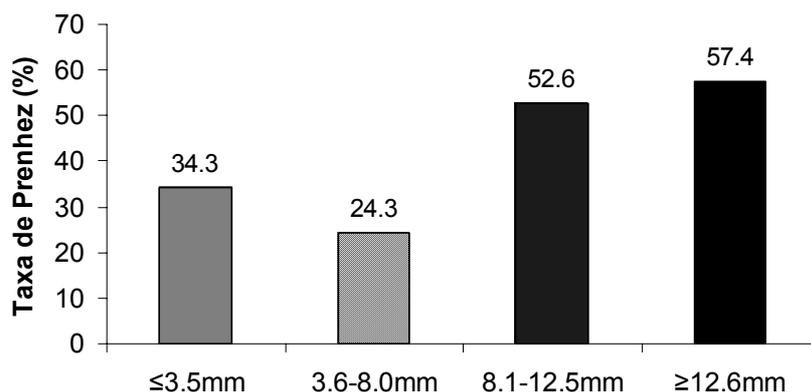


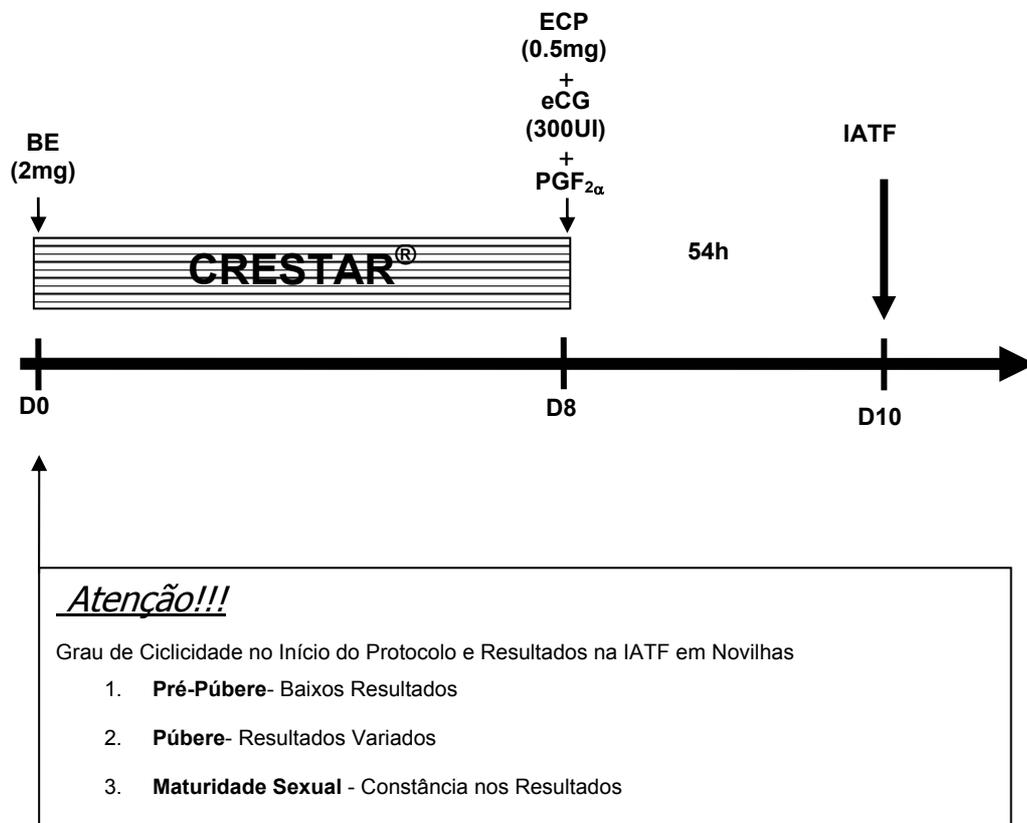
Figura 7. Relação entre o diâmetro do foliculo no momento da IATF e a taxa de prenhez de novilhas Nelore (n=617 inseminações) tratadas com implante auricular associado ao benzoato de estradiol ($a \neq b = p < 0,05$).

Conclusão

Inúmeras vantagens são obtidas com o emprego da inseminação artificial em fêmeas bovinas. A inseminação artificial em tempo fixo apresenta-se como uma alternativa para superar os entraves ligados principalmente, a baixa taxa de serviço e a limitações de infra-estrutura nas fazendas. Problemas referentes ao manejo das pastagens destinadas a realização dos rodeios diários de observação de cio e da necessidade de mão-de-obra permanente na fazenda durante os programas tradicionais de inseminação artificial são entraves para o desenvolvimento dessa biotecnologia. Na atualidade, inúmeros protocolos para sincronizar a ovulação com o objetivo de realizar a inseminação artificial em tempo fixo em novilhas estão disponíveis, sendo que a escolha do protocolo mais apropriado depende da avaliação técnica das condições dos animais a serem utilizados. Pelos dados apresentados, nota-se que é possível obter resultados satisfatórios após IATF em novilhas, no entanto, estes resultados são dependentes do grau de ciclicidade, condição corporal e da maturidade sexual destas fêmeas ao início do protocolo de sincronização. Estudos futuros devem ser realizados visando aumentar a proporção de novilhas sexualmente maduras no início da estação reprodutiva aumentando assim, a eficiência técnica e econômica dos programas de IATF em novilhas Nelore.

Proposta de protocolo de sincronização da ovulação de novilhas *Bos indicus* para inseminação artificial em tempo fixo.

Com base nos dados obtidos, propõe-se:



Referências bibliográficas

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA (ANUALPEC), 2008.

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 anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*, v. 82-83, p. 479-486, 2004a.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; CARVALHO, N.A.T.; CARVALHO, J.B.P. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION-ICAR, 1., 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** 2004b.

BERGFELD, E. D.; KOJIMA, N.; WEHRMAN, M. F.; CUPP, A. S.; PETERS, K. E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KITTOCK, R. J.; GARCIA-WINDER, M.; KINDER, J. E. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17β -oestradiol concentrations in cows is related of concentration of progesterone in circulation when the progesterone comes from either an endogenous or exogenous source. *Animal Reproduction Science*, v. 37, n. 3-4, p. 257-265, 1995.

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

BYERLEY, D. J.; STAIGMILLER, R. B.; BERARDINELLI, J. G.; SHORT, R. E. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. **Journal Animal Science**, v. 65, p. 645-650, 1987.

CARVALHO, J.B.; CARVALHO, N.A.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**. v. 69; p. 167-75, 2008.

CARVALHO, J.B.P. Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®) em novilhas *B. indicus*, *B.indicus* x *B.taurus* e *B. taurus*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2004. Dissertação (Doutorado).

CUTAIA, L.; TRÍBULO, R.; ALISIO, L.; TEGLI, J. C.; MORENO, D.; BÓ, G. A. Efecto de los tratamientos con dispositivos DIV-B nuevos o reutilizados en los índices de preñez en vacas y vaquillonas inseminadas a tiempo fijo (IATF). In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 4., Córdoba. **Anais...** Córdoba: Instituto de Reproducción Animal de Córdoba, 2001, p. 244.

DESJARDINS, C.; HAFS, H. D. Maturation of bovine female genitalia from birth through puberty **Journal Animal Science**, v. 28, p. 502-507, 1969.

HONARAMOOZ, A.; ARAVINDAKSHAN, J.; CHANDOLIA, R.K.; BEARD, A.P.; BARTLEWSKI, P.M.; PIERSON, R.A.; RAWLINGS, N.C. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers **Animal Reproduction Science**, v. 80, p. 15–29, 2004.

KOJIMA, N.; STUMPF, T.T.; CUPP, A.S.; WERTH, L.A.; ROBERSON, M.S.; WOLFE, M.W.; KITTOCK, R.J.; KINDER, J.E. 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 circulations of cows. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 1009-1017, 1992.

MARQUES, M.O.; SÁ FILHO, M.F. ; GIMENES, L.U. ; FIGUEIREDO, T.B. ; SÓRIA, G.F.; BARUSELLI, P.S. Efeito do tratamento com PGF_{2α} na inserção ou do eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas Nelore **Anais...** Reunião Sociedade Brasileira de Reprodução Animal, **SBTE**, p. 218, 2005 (abstract).

NOGUEIRA, G.P. Puberdade e maturidade sexual de novilhas *Bos indicus*. **Bioteecnologias da Reprodução em Bovinos** (2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada), Londrina, p. 101-112, 2006.

RANDEL, R.D., MOSELEY, W.M.. Serum luteinizing hormone surge and progesterone near estrus in Brahman, Brahman x Hereford and Hereford heifers. **Journal Animal Science**. (Supl. 1),v. 45, p. 199, 1977 abstr.

RATHBONE, M. J.; KINDER, J. E.; FIKE, K.; KOJIMA, F.; CLOPTON, D.; OGLE, C. R.; BUNT, C. R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. **Advance Drug Delivery Reviews**, v. 50, p. 277-320, 2001.

SÁ FILHO, M.F.; GIMENES, L.U.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Dinâmica folicular de novilhas nelore (*Bos indicus*) pré-puberes tratadas com implante auricular de norgestomet e benzoato de estradiol associado ou não à progesterona injetável. **Reunião Sociedade Brasileira de Reprodução Animal**, p. 220, 2005a.

SÁ FILHO, M.F.; GIMENES, L.U. ; AYRES, H.; CARVALHO, J.B. ; CARVALHO, N.A.T; BARUSELLI, P.S. Dinâmica folicular de novilhas *Bos indicus* tratadas com implante auricular de norgestomet ou com dispositivo intravaginal de progesterona. **Reunião Sociedade Brasileira de Reprodução Animal**, p. 292, 2005b.

SÁ FILHO, M.F.; PENTEADO, L.; REIS, E.L.; GIMENES, L.U.; BARUSELLI, P.S. Efeito da ciclicidade e do tratamento com eCG na dinâmica folicular e na taxa de concepção de novilhas Nelore tratadas com implante auricular de norgestomet e benzoato de estradiol **Reunião Sociedade Brasileira de Reprodução Animal**, p. 291, 2005c.

SÁ FILHO, M. F. ; REIS, E.L. ; AYRES, H.; GIMENES, L.U.; PERES, A.A.P.; CARVALHO, C.A.B. ; CARVALHO, J.B.; ARAUJO, C.A.S.C.; BARUSELLI, P.S. Effect of oestradiol valerate or benzoate on induction of a new follicular wave emergence in *Bos indicus* cows and heifers treated with norgestomet auricular implant. **Reproduction Fertility and Development**, v. 18, p. 289, 2006.

SÁ FILHO, M.F.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A. ; GIROTTO, R.W.; CAVALHEIRO, I.; BARUSELLI, P.S. Effect of different ovulation inductors on pregnancy rates of Nelore (*Bos indicus*) heifers synchronized to fixed-time artificial insemination. **ISABR - International Symposium on Animal Biology of Reproduction**, 2008 (no prelo).

SANTOS, J.E.P; SA FILHO, M.F. Nutrição e reprodução em bovinos. **Bioteχνologias da Reprodução em Bovinos** (2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada), Londrina, p. 30-54, 2006.

SOUZA, E. M., J. C. MILAGRES, M. A. SILVA, A. J. REGAZZI E A. G. C. CASTRO. Influências genéticas e de meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir leiteiro. **Revista Sociedade Brasileira Zootecnia.**, v. 24(6), p. 926-935, 1995.

TORRES, L.F.T. 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, 1996.

TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; SÁ FILHO, M.F.; GIMENES, L.U.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Efeito da administração de PGF2 α no início do tratamento com implante auricular de norgestomet na dinâmica folicular de novilhas Nelore (*Bos indicus*). **Reunião Sociedade Brasileira de Reprodução Animal**, p. 222, 2005.

WILTBANK, J.N., S. ROBERTS, J. NIX E L. ROWDEN. Reproductive performance and profitability of heifers fed to weigh 272 or 318 kg at the start of the first breeding season. **Journal Animal Science**, v. 60, p. 25-34, 1985.

Bull selection and management under tropical conditions - some experiences from studies in northern Australia

Richard G. Holroyd

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

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:

- 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 pre-mating 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. The selection of sires for herd genetic improvement for growth and carcass traits 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;

- *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 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:

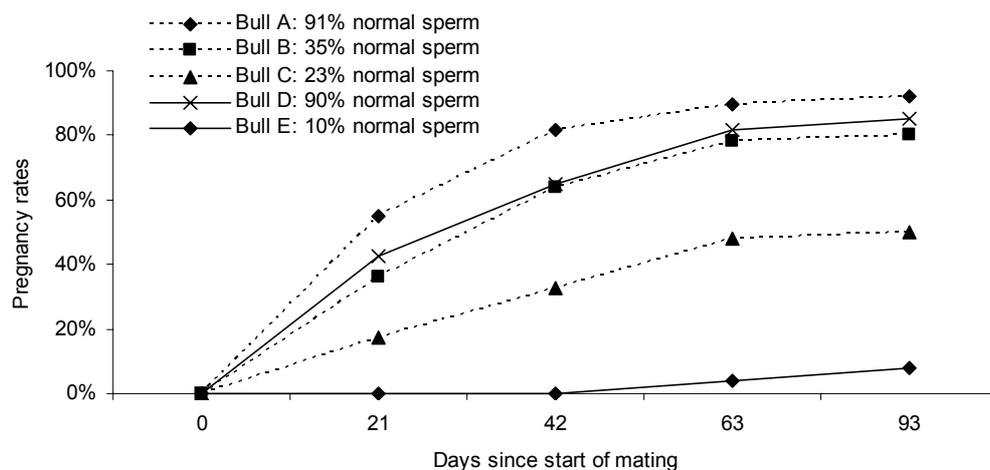
- Physical – Liveweight, body condition score, scrotal size, and physical normality of the testes, penis, sheath, feet, legs, gait and head.
- Semen – both as a crush-side assessment and a laboratory examination for sperm abnormalities.
- Serving assessment used to determine whether a bull is capable 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 when 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) 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 taken 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 its scrotal contents are abnormal or, if its scrotal size is not within normal ranges (Table 1).

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 gentling 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 ($r = 0.41 - 0.75$) once bulls have reached sexual maturity (Holroyd *et al.* 2007). 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, carcass, 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, carcass 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.* 2007). 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.* 2007) 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 Brahman 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 is an increase 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 (bulls were familiar with each other prior to transport, 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 maximal 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 pecking 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 beef 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. The study commenced in April 2005 and will be completed in November 2011 and will include 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.

Our preliminary analyses of genetic estimations and correlations with male and female traits are encouraging. The heritability of pre-pubertal hormones and scrotal circumference to 24 months of age was generally moderate to high but heritability of semen quality traits was generally low except for percent normal at 24 months. IGF-1 and scrotal size, particularly at 12 months showed favourable genetic correlation with age at puberty in the females and was more pronounced in Brahmans. Percent normal sperm in the bulls at 24 months and presence of sperm in the ejaculate at 12 months tended to be favourably associated with earlier puberty in the females. Percent normal sperm in bulls was genetically associated with shorter post-partum intervals in females and was more pronounced in Brahmans suggesting that selection for higher percent normal sperm in males would indirectly reduce post-partum interval.

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 are in the competency of conducting a BBSE and timing of a BBSE prior to sale:

- *Competency to conduct BBSE*
The ACV has introduced an accreditation scheme to demonstrate competence in the use of the ACV standards for the conduct and reporting of BBSE results by veterinarians. It will be based upon an initial declaration of experience in the assessment of at least 100 bulls followed by a practical and written examination as well as 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. It has been proposed by the ACV to extend this period to 70 days before sale as an indicator of bull fertility at the point of sale. However this is at the discretion of the breed societies or organisers of bull sales. 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.

Acknowledgements

I wish to thank a number of colleagues who have contributed to these studies over the years. These include John Bertram, Brian Burns, Nick Corbet, Debra Corbet, Vivienne Doogan, Geoffry Fordyce, Lee Fitzpatrick, Jessica Mayes, Michael McGowan, Carol Petherick and Bronwyn Venus.

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 (eoacv@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.

Holroyd RG, Bertram JD, Doogan VJ, Fitzpatrick LA, Fordyce G and Petherick JC (2007). Bullpower and beyond – maximising the calf output of bulls. Proceedings, Northern Beef Research Update Conference (Bill Pattie and Barrie Restall, editors), Published by North Australia Beef Research Council, www.nabrc.org.au

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.

Impacto do sêmen no sucesso dos programas de IATF: métodos básicos e avançados de avaliação

Papa, F.O.^{1*}; Crespilho, A.M.¹; Freitas Dell'Aqua, C.P.¹; Dell'Aqua Jr, J.A.¹.

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ-UNESP, Botucatu/SP. Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária. Distrito de Rubião Junior S/N, CEP: 18618-000, Botucatu/SP.

*Autor para correspondência: papa@fmvz.unesp.br

Resumo

A qualidade dos meios diluidores exerce um papel decisivo para a obtenção de altas taxas de fertilização em programas de inseminação artificial convencional ou em tempo-fixo. No entanto, como a criopreservação dos ejaculados resulta em danos irreversíveis a estrutura da célula espermática, a avaliação das amostras seminais pós-descongelamento representa um componente indispensável para o sucesso dos programas de reprodução animal. Diversos métodos de análise laboratorial do sêmen bovino congelado têm sido desenvolvidos, no entanto, a correlação entre os parâmetros espermáticos e os índices de fertilidade *in vivo* ainda é variável. Dentre os principais testes utilizados pode-se destacar: análise subjetiva da motilidade, análise computadorizada do movimento espermático e morfologia, testes de separação, análise morfo-funcional através de microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo. Embora nenhuma técnica de avaliação tomada isoladamente apresente sensibilidade suficiente para a determinação da fertilidade, a combinação dos diversos métodos tem agregado maior precisão para a estimativa do potencial de fertilização das amostras de sêmen congelado.

Palavras-chave: Sêmen bovino, meios diluidores, criopreservação, análise laboratorial, fertilidade.

1.0 - Introdução

A partir da descoberta das propriedades crioprotetoras do glicerol por Polge em 1949, muitas células e tecidos têm sido criopreservados (CELEGHINI et al., 2008; WOODS et al., 2004). Tão importante quanto a descoberta dos agentes crioprotetores foi a observação de que os espermatozoides, especialmente bovinos, representavam células passíveis de congelamento e que poderiam ser estocados por longos períodos de tempo e utilizados com sucesso nos programas de inseminação artificial (HOLT, 2000).

O grande objetivo dos protocolos de congelamento espermática representa a preservação eficiente das células, garantindo uma boa habilidade de fertilização (YOSHIDA, 2000). Nesse contexto, embora a criopreservação tenha se tornado um procedimento de rotina na indústria bovina da inseminação artificial (CHEN et al., 1993; CRESPILOHO et al., 2006^a), admite-se que a maioria dos protocolos utilizados até o presente baseiam-se em observações empíricas (CHAVEIRO et al., 2004) resultando em um número considerável de espermatozoides que falham em sobreviver ao processamento (NAGY et al., 2004).

Diversos estudos revelam que a proporção de espermatozoides completamente funcionais em uma amostra pós-descongelamento é geralmente baixa, muitas vezes inferior a 10% (YOSHIDA, 2000). De uma forma geral, pode-se admitir que o processo de criopreservação é responsável pelo decréscimo de 50% na viabilidade dos espermatozoides (GRAVANCE et al., 1998), observando-se diversas alterações bioquímicas e estruturais abrangendo os diferentes compartimentos anatômicos da célula espermática.

Entre outros fatores, a qualidade dos meios diluidores representa um dos principais fatores relacionados ao sucesso da criopreservação, exercendo influência significativa não só sobre a qualidade das amostras congeladas como também sobre a fertilidade das partidas seminais utilizadas em programas de reprodução animal.

A função principal dos espermatozoides, a fertilização do ovócito, representa um conjunto de processos integrados que exigem múltiplos atributos celulares (GRAHAM, 2001). Para desempenhar suas funções específicas as células espermáticas são dotadas de motilidade, atividade mitocondrial, integridade de

membrana plasmática e acrossomal e núcleo celular altamente condensado que permite a interação com o trato reprodutor feminino e a fertilização (GRAHAM & MOCÉ, 2005; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2000).

Em virtude da natureza multicompartimental dos espermatozóides (GRAHAM & MOCÉ, 2005), torna-se uma difícil tarefa desenvolver ensaios laboratoriais capazes de determinar com precisão o potencial de fertilidade de uma amostra seminal. Por essa razão, muitos trabalhos vêm buscando a associação de diferentes métodos que avaliem simultaneamente vários atributos espermáticos relevantes ao processo de fecundação.

Essa revisão tem como objetivo apresentar algumas das inovações metodológicas na criopreservação do sêmen bovino, bem como descrever os principais métodos de avaliação laboratorial do sêmen pós-descongelamento, apresentando a correlação de cada teste utilizado com os índices de fertilidade observados *in vitro* e/ou *in vivo*.

2.0 - Relação entre os Meios Diluidores, Congelabilidade e Fertilidade Animal

A primeira etapa envolvida na criopreservação espermática representa a diluição das amostras seminais em meios específicos, evitando-se os efeitos deletérios relacionados ao metabolismo espermático e exposição ambiental, garantindo a manutenção do movimento e viabilidade celular (FOOTE, 1982). Em virtude de sua importância, considera-se que os meios diluidores desempenharam o papel mais importante para o estabelecimento da inseminação artificial como prática de manejo reprodutivo em bovinos (HURST, 1953).

A interação entre as células espermáticas e o meio diluidor representa um fator crucial para a preservação da integridade espermática e habilidade de fertilização (MANJUNATH et al., 2002), embora invariavelmente, independente do diluidor e do método de processamento, se observem danos aos espermatozóides durante a congelamento.

A influência dos diferentes diluidores de congelamento de sêmen bovino sobre os índices de fertilidade animal vêm motivando uma série de trabalhos científicos desenvolvidos a partir da década de 50. Segundo Amirat et al., (2005) o sucesso da IA com sêmen bovino congelado implica na redução dos efeitos deletérios impostos às células espermáticas que podem ocorrer prematuramente desde a diluição das amostras seminais.

Embora o diluidor Tris-gema de ovo frutose (TRIS) represente o meio de criopreservação mais difundido em todo o mundo (TARDIFF et al., 1997), novos diluidores comerciais têm sido desenvolvidos especialmente na última década, buscando-se a melhora nos índices de congelabilidade dos ejaculados.

Dentre os diluidores, o meio Botu-Bov® (Biotech Ltda, Botucatu/SP) representa uma das principais inovações tecnológicas desenvolvidas no Brasil para a criopreservação seminal. A TABELA-1 abaixo expressa os resultados de experimentos recentes comparando a efetividade do diluidor Botu-Bov® frente ao meio comercial a base de lecitina de soja Bioxcell® (IMV, França) e em comparação ao tradicional diluidor TRIS. Em ambos os estudos foram observadas diferenças significativas para os padrões de movimento desempenhados por espermatozóides *Bos taurus taurus* (CELEGHINI et al., 2008) e *Bos taurus indicus* (CRESPILHO et al., 2006^a) criopreservados em Botu-Bov® em relação aos outros diluidores, denotando a superioridade desse diluente que proporciona uma melhor manutenção da viabilidade espermática pós-descongelamento.

Tabela 1. Valores para a Análise Computadorizada do Movimento Espermático (técnica CASA, Hamilton Thorn Research, USA) comparando os padrões de movimento desempenhados por células espermáticas criopreservadas em meio Bioxcell® (IMV, França) ou Botu-Bov®, e para ejaculados congelados em meio TRIS ou Botu-Bov®.

Variáveis	Bioxcell®	Botu-Bov®	TRIS	Botu-Bov®
Motilidade Total (%)	24,1 ± 1,4 ^a	40,1 ± 1,9 ^b	67,4 ± 10,5 ^a	71,8 ± 9,7 ^a
Motilidade Progressiva(%)	10,7 ± 0,9 ^a	20,8 ± 1,4 ^b	52,5 ± 9,8 ^a	61,8 ± 6,1 ^b
Velocidade de Trajeto (µm/s)	92,4 ± 2,6 ^a	80,3 ± 1,3 ^b	86,1 ± 6,0 ^a	83,7 ± 16,0 ^a
Velocidade de Retilínea (µm/s)	81,5 ± 2,3 ^a	73,1 ± 1,2 ^b	69,1 ± 4,6 ^a	79,5 ± 14,4 ^a
Velocidade Curvilínea (µm/s)	145,2 ± 4,1 ^a	113,8 ± 2,0 ^b	139,7 ± 13,1 ^a	121,5 ± 27,0 ^a
Amplitude Lateral de Cabeça (µm/s)	5,7 ± 0,1 ^a	4,1 ± 0,1 ^b	5,9 ± 0,5 ^a	4,84 ± 1,1 ^b
Frequência de Batimentos (Hz)	33,9 ± 0,4 ^a	38,4 ± 0,5 ^b	26,6 ± 1,3 ^a	30,4 ± 4,2 ^b
Retilinearidade (%)	87,9 ± 0,4 ^a	90,3 ± 0,3 ^b	81,5 ± 3,0 ^a	89,3 ± 4,6 ^b
Linearidade (%)	58,6 ± 0,7 ^a	66,0 ± 0,7 ^b	55,0 ± 7,4 ^a	66,4 ± 8,3 ^b
Dados adaptados de:	CELEGUINI et al., 2008		CRESPILHO et al., 2006 ^a	

Além de uma melhor preservação do movimento espermático, o diluidor Botu-Bov® representa também a melhor alternativa para uma eficiente manutenção da viabilidade espermática, expressa por uma maior preservação da integridade das membranas plasmáticas e acrossomais em relação a outros diluidores que utilizam lecitina de soja ou gema de ovo como um dos seus principais componentes (Tabela-2).

Tabela 2. Resultados obtidos para a Análise Computadorizada do Movimento Espermático (técnica CASA, Hamilton Thorn Research, USA) e para a integridade das membranas plasmática e acrossomal de espermatozoides bovinos criopreservados nos diluidores Andromed® (Minitüb®, Alemanha) ou Botu-Bov®, e para ejaculados congelados em meio TRIS ou Botu-Bov® submetidos ao processamento de sexagem seminal.

Variáveis	Andromed®	Botu-Bov®	TRIS	Botu-Bov®
Motilidade Total (%)	80,78 ± 6,58 ^a	86,28 ± 3,56 ^b	56,7 ± 13,96 ^a	67,4 ± 8,77 ^b
Motilidade Progressiva(%)	41,61 ± 8,45 ^a	46,22 ± 9,12 ^a	32,8 ± 12,58 ^a	45,5 ± 12,09 ^b
Velocidade de Trajeto (µm/s)	129,56 ± 18,75 ^a	91,06 ± 12,19 ^b	109,4 ± 27,04 ^a	99,1 ± 11,67 ^a
Velocidade de Retilínea (µm/s)	89,11 ± 10,44 ^a	72,33 ± 8,75 ^b	89,7 ± 10,38 ^a	83,3 ± 8,73 ^a
Velocidade Curvilínea (µm/s)	229,72 ± 34,37 ^a	146,56 ± 21,80 ^b	206,6 ± 32,93 ^a	157,3 ± 27,25 ^b
Amplitude Lateral de Cabeça (µm/s)	9,48 ± 0,86 ^a	6,77 ± 0,62 ^b	8,0 ± 1,36 ^a	5,9 ± 1,09 ^b
Frequência de Batimentos (Hz)	23,11 ± 1,94 ^a	28,44 ± 2,41 ^b	24,3 ± 3,37 ^a	25,0 ± 4,33 ^a
Retilinearidade (%)	69,06 ± 2,60 ^a	80,00 ± 2,20 ^b	79,8 ± 5,24 ^a	85,1 ± 5,03 ^b
Linearidade (%)	40,11 ± 1,94 ^a	51,89 ± 3,23 ^b	45,6 ± 5,44 ^a	57,4 ± 8,22 ^b
Integridade de Membrana (%)	34,94 ± 10,6 ^a	57,33 ± 15,10 ^b	39,4 ± 10,48 ^a	50,1 ± 7,31 ^b
Integridade de Acrossomo (%)	64,33 ± 17,66 ^a	73,94 ± 18,58 ^b	71,2 ± 9,77 ^a	85,3 ± 4,93 ^b
Dados adaptados de:	DELL`AQUA Jr et al., 2008		FREITAS et al., 2007	

Em virtude da maior preservação espermática, o meio Botu-Bov®, oferece as melhores condições para a manutenção da viabilidade do sêmen bovino sexado (TABELA-2), condição provavelmente relacionada a alta concentração de aminoácidos essenciais e não essenciais presentes no diluidor (FREITAS et al., 2007).

2.1 - Interação entre os Meios Diluidores e a Dose Inseminante

Nas últimas décadas, questões como o número mínimo de espermatozóides necessários para a obtenção de índices aceitáveis de concepção vêm motivando novos trabalhos de pesquisa envolvendo a IA em bovinos (CRESPILHO, 2007).

Um dos maiores entraves para a determinação da melhor dose inseminante, apresentando a melhor relação custo/benefício e garantindo bons índices de fertilidade, representa a grande variação individual dos touros. Diversos trabalhos reportam a variabilidade marcante entre os índices de fertilidade tomados individualmente (“efeito touro”), observando-se diferenças significativas entre animais quanto às taxas de concepções relacionadas ao número de espermatozóides inseminados (ANDERSON et al., 2004; CRESPILHO et al., 2007; DEEN DAAS, et al., 1998; JONDET, 1976; NEHRING & ROTHE, 2003), taxa de fertilização e número de embriões recuperados pós-transferência de embriões (MISRA et al., 1999; SAACKE et al., 2000), taxa de clivagem e desenvolvimento embrionário inicial em sistemas de fertilização *in vitro* (WARD et al., 2001) e manutenção da gestação pós-inseminação artificial (LIMA et al., 2004).

As possíveis falhas espermáticas em estabelecer contato com o ovócito feminino após a IA representam a origem primária dos fracassos no processo de fecundação (HAWK, 1986). Embora se observe uma baixa quantidade de células espermáticas no sítio de fertilização em relação ao número de espermatozóides inseminados (JANUSKAUSKAS & ZILINSKAS, 2002) são reportadas correlações positivas para o aumento da dose inseminante em função do número de espermatozóides que alcançam o oviduto e o número células espermáticas acessórias (HAWK, 1986; LARSSON & LARSSON, 1986; SAACKE et al., 2000). Nesse sentido uma das alternativas para o aumento da eficiência da inseminação artificial em ovulações simples ou para vacas superovuladas compreende o acréscimo de espermatozóides por meio do aumento da dose inseminante (Tabela-3).

Tabela 3. Índices médios de concepção observados para vacas Nelore ou ½ sangue Nelore inseminadas em tempo-fixo com comprovação ultra-sonográfica da ovulação, em função da dose inseminante (12, 25, 50 ou 100 milhões de espermatozóides por mililitro de meio).

Tratamento	Número de Vacas inseminadas	Número de Vacas Prenhez	Taxa de Concepção (%)
12 × 10 ⁶ sptzs/mL	116	60	51,72 ^a
25 × 10 ⁶ sptzs/mL	106	59	55,66 ^b
50 × 10 ⁶ sptzs/mL	112	67	59,82 ^c
100 × 10 ⁶ sptzs/mL	74	49	66,22 ^d
Média	408	235	57,60

Adaptado de CRESPILHO (2007).

No entanto, o número de espermatozóides inseminados e os índices médios de concepção (em função do aumento da dose inseminante) sofrem influência significativa do meio diluidor utilizado para a criopreservação (Tabela-4).

Crespilho et al., (2007) comparando o efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre os índices médios de concepção de vacas submetidas a IATF observaram que amostras seminais criopreservadas em diluidor Botu-Bov® apresentaram índices de fertilidade lineares independente da dose inseminante ($p > 0,05$), situação diferente da observada para doses congeladas em meio TRIS, que apresentaram uma melhora significativa ($p < 0,05$) dos índices de concepção na IATF em função do aumento da concentração de espermatozóides inseminados, sugerindo um efeito compensatório da dose inseminante, provavelmente relacionado aos índices inferiores de congelabilidade espermática proporcionados por TRIS.

Tabela 4. Índices médios de concepção observados para vacas Nelore ou ½ sangue Nelore inseminadas em tempo-fixo com comprovação ultra-sonográfica da ovulação, de acordo com a meio diluidor utilizado na criopreservação espermática e da dose inseminante (12, 25, 50 ou 100 milhões de espermatozoides por mililitro de meio).

	Botu-Bov®		TRIS	
	n	Concepção (%)	n	Concepção (%)
12 x 10 ⁶ sptzs/mL	59	57,63	57	45,61
25 x 10 ⁶ sptzs/mL	63	60,31	43	48,84
50 x 10 ⁶ sptzs/mL	54	59,26	58	60,34
100 x 10 ⁶ sptzs/mL	40	62,50	34	70,59
Média	(n = 216)	59,72	(n=192)	60,41

2.2 - Utilização do Sêmen Bovino Refrigerado em Programas de IATF

Diversos estudos contemplando diferentes espécies animais indicam que os espermatozoides criopreservados apresentam uma menor meia-vida no trato reprodutor feminino comparado ao sêmen fresco (CURRY, 2000), sendo notório que a redução no número ou na qualidade dos espermatozoides inseminados determinam uma queda exponencial nos índices de fertilidade animal (WATSON, 2000). Nesse sentido, novos estudos conduzidos, sobretudo, em países como a Austrália e Nova Zelândia, têm apontado para a possibilidade de utilização e comercialização do sêmen bovino na forma líquida e sob refrigeração (Tabela-5).

Apesar da maior dificuldade para o armazenamento desse tipo de material por longos períodos de tempo, o processamento do sêmen no estado líquido apresenta uma grande aplicabilidade relacionada a utilização de touros geneticamente superiores intolerantes ao processo de criopreservação, permitindo inclusive a redução da dose inseminante para a maioria dos reprodutores em função da maior qualidade dos espermatozoides (YOSHIDA, 2000).

Tabela 5. Índices médios de concepção observados para vacas Nelore ou ½ sangue Nelore inseminadas em tempo-fixo, de acordo com a metodologia de preservação e dose inseminante (Congelado com 40×10⁶ ou Refrigerado por 48 horas com 10×10⁶ espermatozoides totais/mL) utilizando o diluidor Botu-Bov®.

Tratamento	Número de Vacas inseminadas	Taxa de Concepção (%)
Congelado 40×10 ⁶ /mL	64	39,06 ^a
Refrigerado 10×10 ⁶	83	60,24 ^b
Média	147	51,02

Adaptado de CRESPILO et al., 2008.

3.0 - Análise do Sêmen Bovino

Nas últimas décadas diversos métodos de análise seminal foram desenvolvidos, mas apenas uma pequena parcela dessas inovações foram adotadas na rotina de avaliação do sêmen bovino congelado (JANUSKAUSKAS et al., 2002).

Embora os testes de inseminação artificial (IA) ou fertilização *in vitro* (FIV) representem as técnicas de maior sensibilidade para o acesso ao potencial de fertilização das amostras seminais, o alto custo e consumo de tempo das avaliações, aliado a complexidade e dependência da estabilidade laboratorial imposta pela FIV (HALLAP et al., 2004; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005) tornam impraticável a adoção de tais métodos na rotina da análise do sêmen bovino. Por essa razão, diversos estudos têm sido conduzidos no sentido de se estabelecer a correlação de cada teste laboratorial ou suas associações com os

índices de fertilidade *in vivo*, buscando-se, dessa maneira, prever o potencial de fertilidade agregado às amostras seminais.

Os principais trabalhos desenvolvidos nas últimas duas décadas contemplam a adoção de técnicas computadorizadas de avaliação do movimento espermático, análise da integridade dos diferentes compartimentos dos espermatozóides, além dos testes de incubação e separação espermática para o acesso ao potencial de fertilização das amostras de sêmen congelado (CRESPILHO, 2007). Os tópicos abaixo descrevem os métodos mais utilizados e estudados na atualidade no campo da análise laboratorial bem como as possíveis correlações de cada técnica com os índices de fertilidade animal.

3.1 - Análise do Movimento Espermático

Usualmente a motilidade dos espermatozóides é estimada de forma subjetiva através da avaliação visual das células sob microscopia óptica convencional (ARRUDA et al., 2004; CRESPILO et al., 2006^b; PESH & BERGMANN et al., 2006) representando a principal análise laboratorial utilizada pelas centrais de IA para o acesso a viabilidade espermática (GRAHAM, 2001; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2000).

O movimento desempenhado pelos espermatozóides representa uma das características mais importantes associadas ao potencial de fertilização de uma amostra seminal (SOZÁNSKA et al., 2005), reportando-se uma clara associação entre a ausência de movimento e os quadros de infertilidade (OLDS-CLARKE, 1996).

Apesar da importância da análise no contexto da avaliação seminal, a relação entre motilidade espermática e fertilidade permanece contraditória, sofrendo grande divergência entre os diferentes trabalhos de pesquisa que apontam índices de correlação variáveis entre 0,15 a 0,83 (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005). A subjetividade da análise, que depende, sobretudo, da experiência do técnico que conduz o exame, pode ser apontada como principal responsável pela baixa acurácia em termos de repetibilidade do teste (BRAUNDMEIER & MILLER, 2001; JANUSKAUSKAS et al., 2000), revelando uma baixa correlação entre motilidade e fertilidade animal. Nesse sentido, variações de 30 a 60% são reportadas na estimativa da motilidade espermática para o mesmo ejaculado quando avaliado subjetivamente (SOZÁNSKA et al., 2005; VERSTEGEN et al., 2002).

Com o propósito da obtenção de uma técnica que demonstre maior repetibilidade para determinação da motilidade e morfometria espermática, diversos sistemas que utilizam a análise computadorizada de imagens têm sido desenvolvidos e empregados (ARRUDA et al., 2004). O sistema computadorizado de análise espermática (CASA) representa um método objetivo que gera informações importantes a respeito das propriedades cinéticas de um ejaculado baseando-se na avaliação individual das células (JANUSKAUSKAS & ZILINSKAS, 2002) o que permite a identificação de diferentes sub-populações espermáticas em uma amostra (VERSTEGEN et al., 2002).

O detalhamento da cinética celular proporcionada por CASA reflete indiretamente a atividade metabólica espermática (GIL et al., 2000) e diretamente a qualidade dos espermatozóides presentes em uma amostra seminal (FARREL et al., 1996).

Apesar da grande controvérsia existente a respeito da correlação dos padrões de movimento espermático com os índices de fertilidade *in vivo*, são observadas diferenças significativas no padrão de movimento entre espermatozóides que alcançam altas e baixas taxas de fertilização (VERSTEGEN et al., 2002).

Nesse sentido, algumas variáveis geradas pela técnica CASA como a linearidade espermática parecem apresentar uma maior correlação com fertilidade (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005; ZHANG et al., 1999). Ainda, a associação de múltiplas variáveis de movimento geradas pela técnica CASA demonstram uma maior correlação com fertilidade *in vivo* em relação à utilização de apenas um atributo de movimento (FARREL et al., 1998).

No entanto, a avaliação do movimento espermático, mesmo com o advento e utilização das técnicas computadorizadas, proporciona inconsistente correlação com os índices de concepção animal quando

utilizada isoladamente, visto que a motilidade espermática representa apenas um dos vários pré-requisitos básicos indispensáveis para que os espermatozóides concluam com êxito sua função biológica representada pela fertilização do ovócito (GRAHAM & MOCÉ, 2005).

3.2 - Morfologia Espermática

Assim como a determinação de motilidade, a morfologia das células espermáticas representa um dos principais parâmetros avaliados para o acesso a qualidade das amostras seminais (JANUSKAUSKAS & ZILINSKAS, 2002; TARTAGLIONE & RITTA, 2004).

Como apenas os espermatozóides viáveis são capazes de interagir com o ovócito e iniciar o processo de fertilização (WALTERS et al., 2004) admite-se que os defeitos específicos na morfologia estrutural das células espermáticas correlacionam-se com a sub e infertilidade masculina (PESH & BERGMANN, 2006; SAAKE et al., 1998). Por essa razão, a análise minuciosa da morfologia espermática permite a eliminação de touros com baixo potencial de fertilidade, evitando a entrada desses animais nos programas de congelamento de sêmen e nos testes de progênie (JANUSKAUSKAS & ZILINSKAS, 2002).

Nos estudos realizados por Phillips et al., (2004)^a das 30 análises laboratoriais conduzidas na tentativa de prever os índices de fertilidade do sêmen bovino congelado, isoladamente apenas morfologia espermática pós-descongelamento apresentou correlação significativa com a taxa de concepção pós-IA. No mesmo trabalho foi possível concluir que as melhores equações preditivas encontradas foram derivadas dos resultados referentes à morfologia espermática, permitindo, dessa forma, a identificação dos touros com maior ou menor potencial de fertilidade. Em outro estudo observando a porcentagem de espermatozóides com defeitos de cauda após teste de *swim-up* foi constatada modesta, porém significativa correlação entre o resultado individual de morfologia com as taxas de não retorno ao cio obtidas pós-inseminação artificial (HALLAP et al., 2004).

Apesar da grande importância no contexto da avaliação das amostras seminais, os resultados da análise de morfologia espermática não apresentam uma alta sensibilidade para o acesso à fertilidade do sêmen bovino congelado. Assim como a estimativa de motilidade espermática, geralmente a morfologia dos espermatozóides é avaliada subjetivamente por meio de microscopia óptica convencional (ARRUDA et al., 2004). Em virtude da subjetividade de análise, vários sistemas de classificação podem ser utilizados para descrever os defeitos morfológicos, impossibilitando a comparação de resultados entre os diferentes laboratórios (BRAUNDMEIER & MILLER, 2001). Phillips et al. (2004)^b ilustraram a grande variação observada entre diferentes centrais de IA da Austrália para o valor mínimo aceitável de espermatozóides bovinos morfológicamente normais presentes em uma amostra congelada; segundo os autores, a proporção mínima de células normais em uma dose congelada varia entre 25 a 95% (média = 67%), de acordo com o padrão de qualidade adotado por cada central de congelamento.

Outro aspecto a ser considerado é que quando os defeitos morfológicos se expressam por alterações em escala nanométrica (nm) podem ocorrer falhas nos métodos tradicionais de avaliação (JOSHI et al., 2001). Por exemplo, embora a identificação de espermatozóides portadores de defeitos de cabeça seja possível através de testes convencionais (SAAKE et al., 1998), a observação de elementos como a forma do núcleo espermático requerem o emprego de métodos mais objetivos como a análise computadorizada da morfometria espermática (ASMA), técnica que pode proporcionar a identificação de touros de baixa fertilidade (PARRISH & FOOTE, 1987).

Quando amostras seminais de alta qualidade são avaliadas, a relação entre morfologia espermática e fertilidade tende a não existir, denotando falhas na sensibilidade da avaliação (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005). Nesse sentido, pode-se assumir que a avaliação da morfologia e motilidade espermática apresentam maior sensibilidade e, portanto, valor diagnóstico, quando empregadas na identificação de amostras que naturalmente apresentam baixo potencial de fertilidade.

3.3 - Testes de Separação Espermática

Os procedimentos de separação espermática permitem a recuperação de espermatozóides de melhor qualidade, exibindo maior proporção de movimento progressivo e de células morfológicamente normais, o que justifica a ampla utilização das diversas técnicas nos trabalhos de fertilização *in vitro* (SAMARDZIJA et al., 2006).

Dentre os principais métodos utilizados para separação espermática destacam-se o *swim-up*, separação por gradiente descontínuo de BSA, filtração em coluna de lã de vidro, técnica do sedimento ou *swim-down*, filtração em coluna de sefadex/filtro de troca iônica, separação por gradiente descontínuo de Percoll e lavagem mediante centrifugação (COELHO et al., 2000). Particularmente os métodos de separação baseados em lavagens e centrifugações podem resultar, direta ou indiretamente, em danos irreversíveis aos espermatozóides (CENTOLA et al., 1998), havendo, portanto, a preferência por técnicas de separação baseadas na própria capacidade de migração espermática para efeito de avaliação da qualidade das amostras seminais.

Nesse contexto, o *swim-up* pode ser definido como um teste multifuncional que avalia a capacidade espermática em transpor diferentes barreiras fluidas, semelhante ao processo que ocorre durante o transporte espermático no trato reprodutor feminino, representando uma alternativa valiosa no acesso à fertilidade do sêmen bovino congelado.

O *swim-up* mimetiza laboratorialmente o processo de seleção espermática que ocorre naturalmente na junção útero-tubárica do aparelho reprodutor feminino, avaliando o número de espermatozóides presentes em uma amostra que se encontram aptos ao processo de fertilização (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005).

O número de espermatozóides recuperados ao *swim-up* apresenta uma alta correlação com a quantidade de células viáveis presentes em uma amostra seminal (PARRISH & FOOTE, 1987), sendo reportadas correlações significativas entre a quantidade de espermatozóides separados pela técnica (concentração e concentração de espermatozóides móveis) com os resultados ao teste de ligação a zona pelúcida e com a taxa de formação de blastocistos na fertilização *in vitro* (ZHANG et al., 1999). Todos os parâmetros gerados a partir da técnica de *swim-up* correlacionam-se positivamente com a taxa de não retorno ao cio das fêmeas bovinas, destacando-se o número de espermatozóides normais ($p \leq 0,01$), concentração espermática recuperada e motilidade total ($p \leq 0,02$) e número de células exibindo movimento progressivo pós *swim-up* ($p \leq 0,05$), segundo Phillips et al., (2004)^a.

No entanto, parâmetros como número de espermatozóides recuperados e integridade de membrana plasmática após *swim-up* sofrem influência significativa da concentração de células espermáticas originalmente presentes nas amostras seminais submetidas ao teste (CRESPILHO, 2007), condição que pode determinar uma baixa sensibilidade às avaliações.

3.4 - Integridade de Membrana Plasmática (IMP)

A porcentagem de espermatozóides viáveis em uma amostra seminal pode ser definida pelo número de células que exibem estabilidade e integridade de membrana plasmática (GRAHAM, 2001; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005). A IMP é um pré-requisito para que ocorram os eventos fisiológicos relacionados ao processo de fertilização, que incluem a capacitação espermática, ligação à zona pelúcida, reação acrossomal e fusão dos gametas (PAPA et al., 2000).

No entanto os diversos domínios de membrana dos espermatozóides mostram-se altamente vulneráveis a criopreservação, observando-se freqüentemente a queda significativa da viabilidade espermática em função do processamento. Em virtude das características intrínsecas aos espermatozóides, desprovidos de atividade biossintética, reparadora, de crescimento e divisão (YOSHIDA, 2000), observa-se uma grande vulnerabilidade celular ao processo de congelamento/decongelamento, resultando, particularmente, na ruptura e desestabilização das membranas durante a criopreservação.

A classificação comumente utilizada que agrupa os diferentes touros em “bons” ou “maus congeladores” se relaciona a características individuais da estrutura das membranas espermáticas, as quais podem ser determinadas por fatores genéticos, predispondo a resistência ao processo de criopreservação (STORNELLI et al., 2005).

Vários testes têm sido empregados para a determinação da IMP, como as colorações supra-vitais incluindo Tripan-Blue-Giensa e Eosina-Nigrosina, testes hiposmóticos e mais recentemente o uso das sondas fluorescentes que atuam através de reações com enzimas citoplasmáticas ou de ligação com o DNA espermático (ARRUDA et al., 2004; BRITO et al., 2003 ; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005).

As preparações empregando a combinação de sondas fluorescentes ou fluorocromos, avaliadas através de microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo, destacam-se como as mais estudadas e utilizadas na determinação da IMP dos espermatozóides, gerando dados quantitativos sobre a permeabilidade relativa das membranas, conferindo especificidade na discriminação entre células funcionais e afuncionais (GARNER et al., 1988; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2003). As principais sondas utilizadas para determinação da viabilidade espermática representam o iodeto de propídeo (PI), SYBR-14, Diacetato de Carboxifluoresceína (CFDA), Hoeschst 33258 (H258) e 33342 (H342), e a Concanavalina A (Conc A) associada ao isotiocionato de fluoresceína (ARRUDA et al., 2004; HARRISON & VICKERS, 1990).

Embora existam relatos indicando grande variabilidade entre a correlação dos índices de fertilidade com a integridade de membrana plasmática do sêmen bovino congelado (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2003), diversos trabalhos sinalizam para efetividade da técnica como ferramenta de análise das amostras seminais.

Tartaglione & Ritta (2004) associando os valores obtidos para a IMP determinada por colorações supra-vitais e teste hiposmótico conseguiram explicar 82,4% das variações encontradas nas taxas de fertilização *in vitro*. A utilização de sondas fluorescentes para o acesso a IMP determinou que o número de espermatozóides viáveis presentes em amostras de sêmen bovino congelado correlaciona-se positivamente com fertilidade ($r = 0,68$), representando a variável de maior impacto isolado na predição da fertilidade seminal (JANUSKAUSKAS et al., 2003).

3.5 - Ensaios de Capacitação Espermática e Reação Acrossomal

Essencialmente o acrossomo representa uma estrutura secretória, sendo responsável pelo início das reações físico-químicas que resultam na fertilização (FAWCETT, 1970). Previamente a reação acrossomal, os espermatozóides mamíferos sofrem um processo de capacitação envolvendo uma série de alterações de membrana que conferem habilidade de fertilização às células espermáticas (CORMIER et al., 1997). Nesse sentido, ambos processos, capacitação espermática e reação acrossomal, eventos paralelos e complementares, representam fenômenos essenciais que conferem aos espermatozóides a capacidade de penetração no ovócito.

A congelação e descongelação provocam alterações mecânicas na membrana plasmática que induzem a capacitação parcial ou completa das células espermáticas (CORMIER et al., 1997), abreviando o tempo de sobrevivência desses gametas (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2003). Nesse sentido, o uso de corantes fluorescentes como Merocianina-540 ou Clortetraciclina têm sido utilizados no sentido de monitorar o grau de capacitação espermática e sua associação com a fertilidade do sêmen bovino congelado (GRAHAM & MOCÉ, 2005).

Cerca de 30% dos espermatozóides bovinos pós-descongelação apresentam alterações compatíveis com capacitação (GIL et al., 2000) sendo observada uma correlação positiva entre porcentagem de espermatozóides não capacitados e taxa de não retorno ao cio pós-IA (THUNDATHIL et al., 1999).

As membranas acrossomais são “pré-programadas” para sofrerem a fusão natural que resulta na reação acrossomal, característica que determina uma maior sensibilidade aos processos de refrigeração e congelação em relação aos outros domínios de membrana dos espermatozóides (GRAHAM, 2001). Nesse sentido, a integridade do acrossomo e a capacidade das células espermáticas em reagir *in vitro* à

estimulação para reação acrossomal podem ser utilizadas para fins prognósticos no acesso a qualidade das amostras congeladas.

Para a determinação da integridade do acrossomo tem-se popularizado a combinação de sondas fluorescentes como o isotiocianato de fluoresceína (FITC) associado a aglutininas como a do *Ricinus communis* (RCA) e *Psium sativum* (PSA) que apresentam especificidade de ligação a glicoproteínas da membrana acrossomal (ARRUDA et al., 2004), permitindo, dessa forma, a visualização das estruturas sob microscopia de fluorescência. Já a indução de reação do acrossomo pode ser avaliada *in vitro* através da incubação com glicosaminoglicanos (heparina), cálcio ionóforo (Hoescht A23187) ou solubilizado de proteínas de zona pelúcida (GIL et al., 2000; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2000) sendo descritas correlações significativas ($r=0.60$) entre a responsividade à reação e as taxas de não retorno ao cio animal (JANUSKAUSKAS et al., 2000).

3.6 - Avaliação da Cromatina Espermática

A concepção em programas de IA depende, entre outros fatores, da habilidade da cromatina espermática previamente condensada em se descondensar e formar o pronúcleo masculino durante a interação com o ovócito (MADRID-BURY et al., 2005). O aumento da susceptibilidade à desnaturação denota a heterogeneidade da estrutura da cromatina, relacionando-se a distúrbios da espermatogênese e teratozoospermia (HALLAP, 2005; PESH & BERGMANN, 2006).

Como o desenvolvimento embrionário inicial depende da integridade do DNA espermático que o compõe (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005), o acesso à estabilidade do material genético dos espermatozóides pode proporcionar informações adicionais sobre a qualidade das amostras seminais (HALLAP, 2005).

A avaliação estrutural da cromatina espermática tem sido realizada, entre outros métodos, com o uso da acridina laranja, um corante que se intercala à dupla fita de DNA e fluoresce em verde quando esta apresenta-se íntegra; todavia quando associada a uma porção desnaturada da fita de DNA ou ao RNA, a acridina emite fluorescência laranja, permitindo a quantificação de desnaturação do DNA das células de uma amostra (ARRUDA et al., 2004).

Bochenek et al., (2001) demonstraram que ocorre de 1,2 a 3% de danos na cromatina em sêmen congelado com alta fertilidade e uma correlação negativa entre os danos na cromatina e a fertilidade ($r = -0.50$). São descritas correlações outras significativas, porém variáveis ($r = 0,33$ a $0,94$), entre o grau de desnaturação do DNA com os índices de fertilidade de amostras de sêmen bovino congelado utilizadas em programas de IA (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005).

3.7 - Avaliação da Função Mitocondrial

Cerca de 100 mitocôndrias encontram-se dispostas helicoidalmente à peça intermediária de cada espermatozóide (HALLAP, 2005), apresentando como função principal a produção do ATP celular, matriz energética para os batimentos flagelares. Em virtude do seu papel biológico, a integridade e funcionalidade das mitocôndrias espermáticas relacionam-se positivamente com motilidade (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2005) e viabilidade dos espermatozóides (JANUSKAUSKAS & ZILINSKAS, 2002), embora a correlação com fertilidade *in vivo* se apresente variável (HALLAP, 2005).

Atualmente a função mitocondrial pode ser avaliada sob microscopia de fluorescência através de sondas como Rodamina 123, Mito Tracker Green FM e Mito Tracker Reed que permitem a identificação de mitocôndrias em células vivas (ARRUDA et al., 2004). Outra possibilidade corresponde a utilização da sonda JC-1 que permite a identificação de diferentes sub-populações espermáticas exibindo alta ou baixa funcionalidade mitocondrial (GRAHAM, 2001).

3.8 - Análise Seminal Multiparamétrica

A combinação de vários parâmetros de qualidade do sêmen bovino pós-descongelamento, avaliados através de baterias de testes específicos, podem explicar de maneira mais fidedigna as possíveis diferenças de

fertilidade observadas entre touros em relação a qualquer avaliação espermática tomada isoladamente (HALLAP et al., 2004). A observação de um único atributo espermático não permite mensurar adequadamente o potencial de fertilidade de uma amostra seminal, que depende, sobretudo, da funcionalidade de diversos componentes da célula espermática (BRAUNDMEIER & MILLER, 2001). As amostras de sêmen devem ser submetidas *in vitro* a testes funcionais capazes de distinguir a habilidade dos espermatozóides em superar etapas específicas relacionadas ao processo de fertilização e ativando o desenvolvimento embrionário inicial (MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, 2003).

A associação de várias sondas fluorescentes possibilita a avaliação simultânea de diversos parâmetros celulares (ARRUDA et al., 2004), permitindo a identificação de diferentes categorias espermáticas dentro de uma mesma amostra seminal, o que garante maior acurácia às avaliações. Segundo Graham (2001) a associação dos parâmetros motilidade espermática e número de células viáveis (apresentando integridade de membrana plasmática e acrossomal) determinam correlações próximas a 80% com os índices de fertilidade *in vivo*.

Phillips et al. (2004)^a agrupando os valores de IMP (pós-descongelamento e após o teste de *swim-up*) aos índices de clivagem obtidos na FIV, obtiveram, baseados em cálculos de regressão, a melhor equação preditiva para taxa de concepção de vacas inseminadas, explicando em 70% dos casos a variação encontrada nos índices de fertilidade. Zhang et al. (1999), associando 7 parâmetros espermáticos diferentes observaram alta correlação entre o índice de fertilidade previsto para cada touro e as taxas de não retorno ao cio ($r = 0,944$), indicando que a avaliação espermática multiparamétrica proporciona maior relação com os índices de fertilidade animal.

3.9 - Avaliação por citometria de fluxo

Uma série de características da célula espermática como integridade das membranas plasmática e acrossomal, viabilidade e função celular podem ser avaliadas pela citometria de fluxo. Esta técnica possibilita a contagem, classificação e isolamento das células espermáticas que, após serem marcadas com um corante fluorescente específico, são individualmente movidas através de um sistema detector óptico em fluxo laminar e então contadas.

A descoberta de uma variedade de fluorocromos e compostos conjugados com sondas fluorescentes tornaram possível uma análise mais pormenorizada da qualidade do sêmen em níveis bioquímicos, ultra-estruturais e funcionais. A maior parte destes ensaios usando fluorocromos tem sido desenvolvidos para a utilização na microscopia de epifluorescência. No entanto, apenas a análise microscópica de um pequeno número de espermatozóides dentro de uma população pode ser subjetiva e, geralmente não contempla toda população espermática.

A adaptação destas avaliações para uso em citometro de fluxo com marcadores fluorescentes pode ser uma forma rigorosa e rápida para avaliar diferentes atributos de uma amostra seminal em grande escala (GILLIAN et al., 2004), permitindo, dessa forma, a avaliação de múltiplos parâmetros espermáticos simultaneamente.

A citometria de fluxo é hoje utilizada para avaliar diferentes características da célula espermática, tais como: estrutura da cromatina (LOVE, 2005), viabilidade espermática (GARNER et al., 1994; GARNER & JOHNSON, 1995; FERRARA et al., 1997), função mitocondrial (GRAHAM et al., 1990), status acrossomal (GRAHAM et al., 1990), índice de apoptose (RICCI et al., 2002), entre outros fatores.

Novas técnicas associando diferentes sondas fluorescentes estão constantemente sendo desenvolvidas para aplicação em citometria de fluxo, permitindo uma avaliação mais fiel do potencial de fertilidade dos espermatozóides bovinos (GILLIAN et al., 2004).

4.0 - Conclusões

Os meios diluidores, e especialmente, seus constituintes específicos, exercem influência significativa sobre os padrões de movimento, viabilidade espermática e fertilidade do sêmen bovino pós-

descongelamento, representando, muitas vezes, um dos principais fatores para obtenção de altos índices de fertilidade nos programas de IATF. No entanto, os processos de congelamento e descongelamento, independente do meio diluidor utilizado, invariavelmente resultam em danos irreversíveis aos espermatozoides, justificando a necessidade de avaliação laboratorial de qualquer partida seminal previamente a sua utilização.

Como os espermatozoides representam células complexas que dependem da funcionalidade de múltiplos atributos para exercerem seu papel natural na reprodução, ocorrem falhas nos métodos tradicionais de avaliação, observando-se, geralmente, correlações baixas ou variáveis entre os padrões de qualidade das amostras seminais e os índices de fertilidade alcançados nos programas de IA em bovinos. Estudos demonstrando correlações entre os parâmetros espermáticos tomados isoladamente e os índices de fertilidade animal geralmente não apresentam repetibilidade e, portanto, sua utilidade torna-se duvidosa. A combinação dos resultados de vários métodos de avaliação seminal tem agregado maior valor prognóstico aos testes conduzidos *in vitro*, indicando claros avanços no tocante ao controle da grande fonte de variação dos programas de reprodução animal, representada pela qualidade das amostras seminais.

No entanto, uma predição laboratorial para os índices de concepção observados a campo representa uma barreira de difícil transposição, envolvendo diversos fatores inerentes ao reprodutor (genótipo, idade, ambiente, sazonalidade), às fêmeas bovinas (detecção de cio, protocolo de sincronização de estro, condição corporal, inseminador) e aos laboratórios envolvidos no processo, havendo a necessidade da padronização das técnicas e tecnologias a fim de conferir objetividade, repetibilidade e acurácia às avaliações do sêmen bovino congelado.

5.0 - Referências

- AMIRAT, L. et al. Modifications of bull spermatozoa induced by three extenders: Biociphos, low density lipoprotein and Triladyl, before, during and after freezing and thawing. **Reproduction**, v.129, p.535-543, 2005.
- ANDERSSON, M. et al. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology**, v. 61, p.1583-1588, 2004.
- ARRUDA, R.P. et al. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TEFT. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina, Brasil, 2004. p.166-179.
- BOCHENEK, M.; SMORAG, Z.; PILCH, J. Sperm chromatin structure assay of bulls qualified for artificial insemination. **Theriogenology** 56, 557-567, 2001.
- BRAUNDMEIER, A.G.; MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1915-1925, 2001.
- BRITO, L.F.C. et al. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003.
- CELEGHINI, E.C.C. et al. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.119-131, 2008.
- CENTOLA, G.M.; HERKO, R.; ANDOLINA, E. Comparison of sperm separation methods: effect on recovery, motility, motion parameters, and hyperactivation. **Fertility and Sterility**, v.70, n.6, p.1173-1175, 1998.
- CHAVEIRO, A. et al. Determination of bull sperm membrane permeability to water and cryoprotectants using a concentration-dependent self-quenching fluorophore. **Cryobiology**, v.48, p.72-80, 2004.

CHEN, Y. et al. Survival of bull spermatozoa seeded and frozen at different rates in egg yolk-Tris and whole milk extenders. **Journal of Dairy Science**, v.76, n.4, p.1028-1034, 1993.

COELHO, L.A. et al. Fecundação *in vitro* de ovócitos bovinos com sêmen submetido a diferentes diluidores. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.2, p.397-402, 2000.

COOTER, P.Z. et al. Preliminary evaluation of a unique freezing technology for bovine spermatozoa cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, p.98-99, 2005.

CORMIER, N. et al. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**, v.18, n.4, p.461-468, 1997.

^aCRESPILHO, A.M. et al. Eficiência comparativa entre dois diluidores para a congelação de sêmen bovino sobre os padrões de motilidade e integridade de membrana plasmática. **ARS Veterinária**, v.22, n.3, p.229-235, 2006.

^bCRESPILHO, A.M.; LANDIM-ALVERENGA, F.C.; PAPA, F.O. Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. **Ciência Rural**, v.36, n.5, p.1507-1510, 2006.

CRESPILHO, A.M. **Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre a congelabilidade e fertilidade do sêmen bovino utilizado em programas de inseminação artificial em tempo-fixado (IATF)**. 2007. 124f. Dissertação (Mestrado, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

CRESPILHO, A.M.; et al. Efeito do meio diluidor e da dose inseminante sobre as taxas de concepção de vacas Nelore submetidas a IATF. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, supl.3, P.1116, 2007.

CRESPILHO, A.M.; et al. Effect of two sperm preservation methods on conception rate after fixed-time artificial insemination. In: Jubilee World Buiatrics Congress, XX., 2008, Budapeste. **Anais....Budapeste, Hungria**, 2008. P.211.

CURRY, M.R. Cryopreservation of domestic livestock. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.46-52, 2000.

DELL'AQUA Jr, J.A. et al. Andromed® and Botu-Bov® extenders on bovine semen cryopreservation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, suppl. 3, p.36, 2008.

DEN DAAS, J.H.G.; et al. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. **Journal Dairy Science**, v.87, p.1714-1723, 1998.

FARREL, P.B. et al. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull sperm for computer-assisted sperm analyses (CASA). **Journal of Andrology**, v.17, n.3, p.293-300, 1996.

FARREL, P.B. et al. Quantification of Bull Sperm Characteristics Measured by Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) and the Relationship to Fertility. **Theriogenology**, v.49, p.871-9, 1998.

FAWCETT, D.W. A comparative view of sperm ultrastructure. **Biology of Reproduction**, v.2, p.90-127, 1970.

FERRARA, F. et al. Automation of human sperm cell analysis by flow cytometry. **Clinical Chemistry**, v. 43, p.801-807, 1997.

FOOTE, R.H. Cryopreservation of spermatozoa and artificial insemination: past, present and future. **Journal of Andrology**, v.3, p.85-100, 1982.

- FREITAS, C.P. et al. The effect of TRIS and Botu-Bov® for bovine sexed sperm cryopreservation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, n.1, p.211, 2007.
- FUERST-WALTL, B. et al. Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Australian Simmental bulls. **Animal Reproduction Science**, v.95, p.27-37, 2006.
- GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; ALLEN, C.H. Fluorometric evaluation of cryopreserved bovine spermatozoa extended in egg yolk and milk. **Theriogenology**, v.30, p.369-378, 1988.
- GARNER, D.L. et al. Dual DNA staining assessment for bovine sperm viability using SYBR 14 and propidium iodide. **Journal of Andrology**, v.15, p.620-629, 1994.
- 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.
- GIL, J. et al. Functional sperm parameters and fertility of bull semen extended in Biciphos-Plus® and Triladyl®. **Reproduction in Domestic Animals**. v.35, p.69-77, 2000.
- GILLIAN, L.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. **Theriogenology**, v.63, p.445-457, 2005.
- GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.43, p.55-64, 1990.
- GRAHAM, J.K. Assessment of sperm quality. **AAEP Proceedings**, v.47, p.302-305, 2001.
- GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.
- GRAVANCE, C.G. et al. Effect of cryopreservation on bull sperm head morphometry. **Journal of Andrology**, v.19, n.6, p.704-709, 1998.
- HALLAP, T. et al. Does cleansing of frozen-thawed bull semen before assessment provide samples that relate better to potential fertility? **Theriogenology**, v.62, p. 702-713, 2004.
- HALLAP, T. **Assessment of sperm attributes of frozen-thawed AI doses from Swedish and Estonian dairy bulls sires**. 2005. 35f. Tese (Doutorado, Área de Concentração: Animal Reproduction) – Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala/Sweden.
- HARRISON, R.A.P.; VICKERS, S.E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.88, n.1, p.343-352, 1990.
- HAWK, H.W. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.1487-1503, 1986.
- HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: The importance of species and individual differences. **Theriogenology**, v.43, p.47-58, 2000.
- HURST, V. Dilution of bull semen with frozen egg yolk-sodium citrate. **Journal Dairy Science**, v.36, p. 181-184, 1953.
- JANUSKAUSKAS, A. et al. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v.52, p.641-658, 2000.

- JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. **Veterinarija ir Zootechnika**, v.39, p.1-8, 2002.
- JANUSKAUSKAS, A. et al. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v.60, p.743-758, 2003.
- JONDET, R.; RABADEAUX, Y. Utilisation du test de thermoresistance dans l'appréciation de la valeur su sperme congelé de taureau. **Elev. Insemin.**, v. 156, p.13-20, 1976.
- JOSHI, N. et al. Determination of the ultrastructural pathology of human sperm by atomic force microscopy. **Fertility and Sterility**, v.75, n.5, p.961-66, 2001.
- LARSSON, B.; LARSSON, K. Sperm localization in the oviducts of artificially inseminated dairy cattle. **Acta Veterinaria Scandinava**, v.27, p.3003-312, 1986.
- LIMA, F.S.; VASCONCELOS, J.L.M.; GARCIA, P.H. Efeito do touro na taxa de perda de gestação em vacas holandesas lactantes. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, XVIII, 2004, Barra Bonita. **Resumos....** Barra Bonita: São Paulo, 2004, p.171.
- MADRID-BURY, N. et al. Relationship between non-return rate and chromatin condensation of deep frozen bull spermatozoa. **Theriogenology**, v.64, p.232-241, 2005.
- MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, p.1250-1258, 2002.
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. Evaluation of frozen semen: traditional and new approaches. In: **Topics in bull fertility**. Adquirido em 20 de agosto de 2006. Online. Disponível na Internet: www.ivis.org/bull_fertility/2000/Martínez-Rodríguez.
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.312-18, 2003.
- MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ. Methods for semen evaluation and their relationship to fertility. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia. **Anais:Palestra**. Goiânia: Goiás, 2005. p.1-8.
- MISRA, A.K.; et al. Bull specific effect rate and viable embryo recovery in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v.52, p.701-707, 1999.
- NAGY, S. et al. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4h incubation as measured by multicolor flow cytometry. **Animal Reproduction Science**. v.80, n.3-4, p.225-235, 2004.
- NEHRING, H.; ROTHE, L. Insemination of cryopreserved Bull semen portions with reduced sperm numbers after dilution with two egg yolk-free extenders. In: European A.I. Vets Meeting, 15, 2003, Budapeste. **Anais Palestra....**Budapeste: Hungria, 2003. p.14-23.
- OLDS-CLARKE, P. How does poor motility alter sperm fertilizing ability? **Journal of Andrology**, v.17, n.3, p.183-186, 1996.
- PARRISH, J.J.; FOOTE, R.H. Quantification of bovine sperm separation by *swim-up* method – relationship to sperm motility, integrity of acrosomes, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. **Journal of Andrology**, v.8, p.259-266, 1987.

PAPA, F.O. et al. Viabilidade espermática pós-descongelção de sêmen bovino criopreservados com meio diluente glicina-gema em quatro diferentes tempos de estabilização. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 24, n.1, p.39-44, 2000.

PESH, S., BERGMANN, M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. **Micron**, Article in press, 2006.

^aPHILLIPS, N.J. et al. Relationship between thirty post-thaw spermatozoa characteristics and field fertility of 11 high-use Australian dairy AI sires. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.47-61, 2004.

^bPHILLIPS, N.J. et al. Measures used to assess frozen-thawed semen in Australian live-stock semen processing centers. **Australian Veterinary Journal**, v.82, n.5, p.309-310, 2004.

SAAKE, R.G. et al. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulation cattle. **Theriogenology**, v.51, p.117-128, 1998.

RICCI, G. et al. Apoptosis in human sperm: its correlation with sêmen quality and the presence of leukocytes. **Human Reproduction**, v.17, p.2665-2672, 2002.

SAMARDZIJA, M. et al. A comparison of BoviPure® and Percoll® on bull sperm separation protocols for IVF. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p.237-247, 2006.

SOZÁNSKA, A. et al. Simple optical method of qualitative assessment of sperm motility: preliminary results. **AAEP Proceedings**, v.59, p.176-184, 2005.

STORNELLI, M.C. et al. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinária**, v.25, n.2, p.28-35, 2005.

TARDIF, A.L. et al. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. **Journal of Dairy Science**, v.80, n.8, p. 1606-12, 1997.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, p.1245-1252, 2004.

THOMAS, C.A. et al. Effect of cryopreservation on bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v.58, p.786-793, 1998.

THUNDATHIL, J. et al. Premature capacitation post-thaw and the fertility of AI bull semen. **Theriogenology**, v.51, p.351, 1999.

VERSTEGEN, J. et al. Computer Assisted Semen Analyzers in Andrology Research and Veterinary Practice. **Theriogenology**, v.57, p. 149-179, 2002.

YOSHIDA, M. Conservation of sperms: current status and new trends. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.349-355, 2000.

WALTERS, A.H. et al. Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development. **Journal of Andrology**, v.25, n.4, p.554-563, 2004.

WARD, F. et al. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development *in vitro* and fertility in vivo. **Molecular Reproduction and Development**, v.60, p.47-55, 2001.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**. v. 60-61, p.481-92, 2000.

WOODS, E.J. et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v.48, p.146-156, 2004.

ZHANG, B.R. et al. Prediction of bull fertility by combined in vitro assessments of frozen-thawed semen from young dairy bulls entering an IA-programme. **International Journal of Andrology**, v.22, p.253-260, 1999.

Actualización sobre protocolos de IATF en bovinos de leche

Gabriel A. Bó¹, Lucas E. Cutaia¹, Alexandre H. Souza² y Pietro S. Baruselli²

¹Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Zona Rural Estación Gral Paz
5145, General Paz, Córdoba, Argentina

²Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Brasil.
Correo electrónico: gabrielbo@iracbiogen.com.ar

Introducción

La situación económica mundial requiere de prácticas de manejo eficaces para mejorar la rentabilidad de los establecimientos de producción de leche. Aunque los sistemas de manejo de los rodeos lecheros comerciales difieren en distintas partes del mundo, el objetivo reproductivo principal es preñar a las vacas lecheras lo más rápido posible después del parto (Lucy et al., 2004). Sin embargo, el desempeño reproductivo ha disminuido progresivamente, debido principalmente a la disminución de la fertilidad de las vacas de leche (Lucy, 2001, Wiltbank et al., 2006) y a la detección ineficiente de los celos en la mayoría de los sistemas de manejo (Lucy et al., 2004, Wiltbank et al., 2006). En el manejo lechero actual, se considera que el concepto de la tasa de preñez cada 21 días es un índice confiable del desempeño reproductivo general porque indica la cantidad de vacas preñadas en cada periodo de 21 días, lo que permite cambios y mejoras rápidas (Leblanc, 2005). Brevemente, la tasa de preñez en 21 días se obtiene al multiplicar la cantidad de vacas detectadas en celo y enviadas a servicio en 21 días (es decir, la cantidad de vacas inseminadas/la cantidad de vacas elegibles para ser inseminadas en el rodeo) por la tasa de concepción (es decir, la cantidad de vacas preñadas/la cantidad de vacas inseminadas). Por lo tanto, si la cantidad de vacas detectadas en celo y enviadas a servicio es del 70% y la tasa de concepción es del 50%, la tasa de preñez en 21 días es del 35%. Por el contrario, si la cantidad de vacas detectadas en celo y enviadas a servicio es sólo del 40% y la tasa de concepción es del 50%, la tasa de preñez en 21 días es sólo del 20%. Entre los años 2001 y 2003, la tasa promedio de preñez en 21 días en 257 rodeos lecheros de Argentina, que incluían a 70.000 vacas de leche, fue de entre el 15 y el 16% (Capitaine Funes et al., 2003). La cantidad de vacas detectadas en celo y enviadas a servicio fue del 45% y la tasa de concepción fue de entre el 36 y el 37% para estos rodeos. Estos resultados no difirieron significativamente del desempeño reproductivo que otros autores reportaron en los Estados Unidos y en Canadá (Eiker et al., 2000; Leblanc, 2005). Por lo tanto, un sistema eficaz para inseminar vacas en un periodo corto es muy importante para preñar a las vacas lo más rápido posible después del parto. Una de las alternativas más útiles para incrementar la cantidad de vacas inseminadas en un periodo corto es la utilización de protocolos que sincronizan la ovulación y permiten la inseminación sistemática sin la necesidad de detectar celo, generalmente denominados protocolos de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF). Además, el desarrollo de protocolos para las vacas en anestro posparto permitirá la inseminación de una población de animales significativamente mayor. El propósito de este trabajo es presentar datos de estudios en los que se aplicaron métodos actuales de manipulación de ondas foliculares y ovulación por IATF sistemática en rodeos lecheros, prestando especial atención a los que se aplican actualmente en rodeos lecheros pastoriles en América del Sur.

Sincronización de celo y ovulación

Prostaglandina F2 α

La prostaglandina F2 α (PGF) ha sido el tratamiento comúnmente utilizado para la sincronización del celo en bovinos (revisado por Odde, 1990). Los primeros estudios mostraron que la madurez del cuerpo lúteo (CL) en el momento del tratamiento con PGF influenciaba la respuesta luteolítica y que la PGF no inducía la luteólisis de manera efectiva durante los primeros 5 a 6 d después del celo (Momont y Seguin, 1984). Además, en los bovinos en los que la luteólisis no se producía, el comienzo del celo se distribuía por un periodo de 6 días (Macmillan y Henderson, 1984). Los estudios en los que se utiliza la ecografía en tiempo real revelaron que el intervalo desde el tratamiento con PGF hasta la manifestación del celo y la ovulación está determinado por la fase de desarrollo del folículo dominante en el momento del

tratamiento (Kastelic y Ginther, 1991) Si se administra PGF cuando el folículo dominante de una onda se encuentra en la última fase de crecimiento o en la primera fase estática, la ovulación se producirá entre 3 y 4 d. Por otro lado, el tratamiento con PGF administrado cuando el folículo dominante se encuentra en la fase estática media a tardía (es decir, cuando ya no es viable), producirá la ovulación del folículo dominante de la próxima onda folicular entre 5 y 7 d más tarde (Kastelic y Ginther, 1991). Este intervalo refleja el tiempo necesario para que el folículo dominante de la onda nueva crezca y se desarrolle con un tamaño preovulatorio y afirma que la detección eficaz del celo es esencial para lograr altas tasas de preñez en programas de IA. La combinación de la tasa de celo baja y variable y la alta incidencia del anestro, común en animales en pastoreo, explica la amplia variabilidad en la tasa de celo y en las tasas de preñez después de los tratamientos con PGF. Por lo tanto, se deben desarrollar tratamientos que controlen el desarrollo folicular y luteal para obtener tasas de preñez altas sin la necesidad de detección de celo. Además, los protocolos de tratamiento deberían poder inducir el celo y la ovulación en animales en anestro.

Protocolos con GnRH

Los protocolos de tratamiento con GnRH han sido utilizado en gran medida durante los últimos años para la IATF de bovinos de carne y leche en los Estados Unidos (Pursley et al., 1995, 1997; Geary et al., 2001). Estos protocolos de tratamiento consisten de una inyección de GnRH seguida de PGF 7 d más tarde y una segunda inyección de GnRH 48 h después del tratamiento con PGF. En los protocolos Co-Synch, las vacas son inseminadas a tiempo fijo al momento de la segunda GnRH (Geary et al., 2001), mientras que en los protocolos Ovsynch, las vacas son inseminadas a tiempo fijo 16 h después de la segunda GnRH (Pursley et al., 1995). Varios reportes demostraron que los protocolos Ovsynch producen tasas de preñez similares a las que se obtienen en las vacas que fueron sincronizadas con PGF e inseminadas 12 h después de detectado el celo (Burke et al., 1996, De la Sota, 1998, Pursley et al., 1995, 1997, Stevenson et al., 1999, Thatcher et al., 2001, 2006). Por lo tanto, esta técnica se utiliza en gran medida para inseminar vacas de leche (Caravielo et al., 2006).

La utilización del protocolo Ovsynch no tuvo éxito para sincronizar las vacas en anestro posparto. Este protocolo induce aparentemente la ovulación en un alto porcentaje de vacas de leche en anestro, pero algunas de estas vacas tienen una fase luteal posterior más reducida (Gumen et al., 2003), lo que produce tasas de concepción menores que en las vacas cíclicas (Moreira et al., 2001). De esta manera, si bien el Ovsynch puede inducir la ovulación en vacas no cíclicas, la reducción en las tasas de concepción de estas vacas sigue siendo probable. En los últimos años, varios grupos de los Estados Unidos han combinado la utilización de un dispositivo de liberación de progesterona con el protocolo Ovsynch en vacas de leche no cíclicas. En este protocolo, las vacas tienen el dispositivo de liberación de progesterona colocado en la vagina en el momento en que se coloca la primera inyección de GnRH del protocolo Ovsynch y el dispositivo se retira durante el tratamiento con PGF. A pesar de que un experimento inicial reveló una mejora significativa en las tasas de preñez (55,2% vs 34,7%; n=182) para las vacas tratadas o no tratadas con dispositivos de liberación de progesterona en el momento de la primera GnRH; (Pursley et al., 2001), una revisión reciente demostró (Stevenson et al., 2006) que los resultados varían sorprendentemente, pero en general las diferencias rondan en el entre el 6 al 8%.

Tratamiento Pre-Synch Ovsynch

Se ha demostrado recientemente que la fase del ciclo estral en el momento en el que se administra la GnRH afecta los resultados del programa Ovsynch (Vasconcelos et al., 1999). Si se administra GnRH durante la primera fase de crecimiento del folículo dominante, es posible que no se produzca la ovulación en respuesta a liberación de LH, en cuyo caso, no se sincronizará la emergencia de la onda folicular. Moreira et al. (2001) sugirieron que los bovinos responderán de manera más consistente a los protocolos con GnRH si éstos se inician entre los Días 5 y 12 del ciclo; esto se puede lograr con la presincronización antes de la primera inyección de GnRH. Se ha demostrado que la presincronización con una o con dos dosis de PGF (con una diferencia de 14 días) mejora las tasas de preñez en los protocolos de IATF con GnRH. Sin embargo, es poco probable que los tratamientos con PGF mejoren la reproducción en vacas de leche no cíclicas, lo cual parece ser el caso según estudios previos (Moreira et al., 2001). Además, con

este tratamiento no pudimos mejorar las tasas de preñez en las vacas de leche en lactancia en un sistema pastoril, al mismo nivel que cuando se le agrego al Ovsynch la inserción de un dispositivo de liberación de progesterona entre los Días 0 y 7 (Veneranda et al., 2008).

Dispositivos de liberación de progesterona

Existen diferentes dispositivos intravaginales comercialmente disponibles y están impregnados con diferentes cantidades de progesterona. Se diseñó un experimento para caracterizar los perfiles de liberación de progesterona en plasma de cuatro dispositivos (Rogan et al., 2007). Se utilizaron vacas Holstein cíclicas y en lactancia, que recibieron dos inyecciones de PGF (150 µg D (+) cloprostenol, Bioprost-D, Biotay S.A., Argentina) con 14 d de intervalo y fueron asignadas de manera aleatoria a uno de los cuatro grupos y se les aplicaron dispositivos intravaginales de la siguiente manera: Cue-Mate (1,56 g de progesterona; Bioniche Animal Health Canada Inc; n=10), DIB (1 g de progesterona; Syntex SA, Argentina; n=10), CIDR con 1,9 g de progesterona (Pfizer Salud Animal S.A., Argentina; n=10), o CIDR con 1,38 g de progesterona (Pfizer Animal Health, USA; n=10). Todos los dispositivos se colocaron 24 h después de la segunda PGF y se dejaron por 31 días. Se obtuvieron muestras de sangre para el análisis de progesterona en intervalos de 6 h durante las primeras 24 h, luego todos los días durante una semana y cada 2 días por 25 días más. Se observó a las vacas dos veces por día para confirmar que no se hubieran salido los dispositivos vaginales. Las vacas no mostraron evidencia de molestia con ninguno de los dispositivos vaginales y no hubo diferencias en las pérdidas. Tampoco hubo diferencias en los picos de las concentraciones de progesterona (ng/ml) entre los grupos (Cue-Mate: 5,0±1,1; DIB: 3,9±0,6, 1,9 g CIDR: 4,6±0,6; 1,38 g CIDR 3,7±0,4; P=0,51). Las concentraciones medias (±EE) de progesterona en el periodo de inserción de 31 días difirieron entre 1,9 g CIDR (1,8±0,2 ng/ml) y DIB (1,5±0,1 ng/ml, P<0,006). Con Cue-Mate (1,5±0,2 ng/ml) y 1,38 g CIDR (1,6±0,1 ng/ml) fueron intermedias y no difirieron entre sí. Cuando se evaluaron los datos desde la inserción hasta el Día 7, las concentraciones de progesterona en plasma no difirieron entre los grupos. Sin embargo, las concentraciones de progesterona desde la inserción hasta el Día 21 fueron mayores (P<0,03) en las vacas con 1,9 g CIDR (2,1±0,1 ng/ml) que en las vacas con DIB (1,6±0,1 ng/ml) o 1,38 g CIDR (1,6±0,1 ng/ml), con Cue-Mate (1,7±0,1 ng/ml) intermedio y no diferente (Figura 1). Se arribó a la conclusión de que los perfiles de progesterona en las vacas Holstein en lactancia no presentaron diferencias entre los diferentes dispositivos de liberación de progesterona. Sin embargo, el tratamiento con DIB o 1,38 g de CIDR resultó en perfiles menores de concentraciones de progesterona en plasma durante 21 d lo que indica que los dispositivos que poseen mayor cantidad de progesterona liberaron progesterona por un periodo más prolongado que los dispositivos con menor cantidad de progesterona.

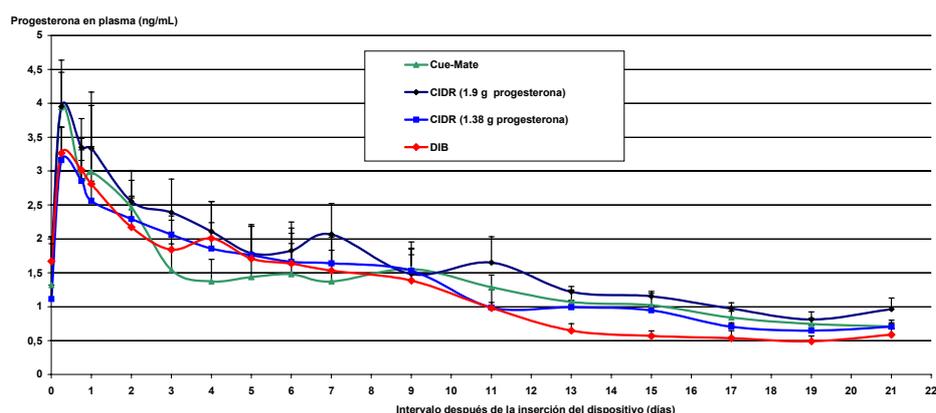


Figura 1. Concentraciones de plasma en vacas Holstein en lactancia tratadas con Cue-Mate (1,56 g de progesterona; n=9), CIDR con 1,9 g de progesterona (n=7), CIDR con 1,38 g de progesterona (n=9) o DIB (1 g de progesterona, n=10) durante 21 d en vacas lecheras en lactancia en las que se había inducido la regresión luteal con PGF. Las concentraciones de progesterona en plasma no difirieron en las vacas tratadas con un dispositivo CIDR con 1,9 g de progesterona y a las que se les aplicó Cue-Mate (P>0,25). Sin embargo, las concentraciones de progesterona en plasma en las vacas tratadas con CIDR con 1,9 g de progesterona fueron superiores a las de las vacas tratadas con DIB (P<0,03) o CIDR con 1,38 g de progesterona (P<0,03).

Se han utilizado cada vez más tratamientos con estradiol y progesterona durante los últimos años en programas de sincronización de celo en ganado bovino de carne y leche (Bó et al., 2002a, 2002b, 2002c, 2003, 2007; Cavalieri et al., 2006, Macmillan and Peterson 1993, Macmillan and Burque 1996, Martinez et al., 2002). Los tratamientos consisten en la inserción de un dispositivo de liberación de progesterona y en la administración de estradiol el Día 0 (para sincronizar la emergencia de la onda folicular y evitar el desarrollo de folículos persistentes), PGF al momento de la remoción del dispositivo los Días 7 u 8 (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. Los productores de leche de todo el mundo utilizaron estos protocolos y obtuvieron tasas entre 35 y 55%. Las tasas de preñez estuvieron principalmente influenciadas por el score de condición corporal, los días en lactancia de los animales sincronizados y la producción de leche de las vacas (Bó et al., 2006, Cavalieri et al., 2006, Lucy et al., 2004).

Tratamientos con dispositivos de liberación de progesterona, estradiol y eCG.

Bajo condiciones normales, una vaca posee el potencial de ovular poco tiempo después del parto (Wiltbank et al., 2002). Sin embargo, el ganado bovino lechero bajo condiciones de pastoreo con frecuencia posee una alta incidencia de anestro posparto que extiende el intervalo desde el parto hasta la concepción y como consecuencia, afecta de manera negativa su desempeño reproductivo (Cavalieri et al., 2006, Lucy et al., 2004). La utilización de 400 UI de eCG al momento de retirar el dispositivo de liberación de progesterona dio como resultado un aumento en la concentración de progesterona en plasma y en las tasas de preñez en vacas amamantadas tratadas durante el anestro posparto (Baruselli et al., 2004; Bó et al., 2007). Desarrollamos la hipótesis de que el tratamiento con eCG puede resultar útil para aumentar las tasas de preñez dado que la IATF mejora la eficiencia reproductiva en los rodeos lecheros pastoriles.

Se diseñaron tres experimentos para evaluar los efectos de diferentes tratamientos para sincronizar la ovulación en las tasas de preñez después de la IATF en vacas lecheras en lactancia (Veneranda et al., 2006). En el Experimento 1, se utilizaron 40 vacas Holstein con $57,8 \pm 1,5$ d de posparto (rango, 47 a 82 d), con una producción de leche de $30,2 \pm 0,8$ kg por d (rango, 14,0 a 40,7 L) y un score de condición corporal (BCS) de $2,8 \pm 0,0$ (rango, 2,5 a 3,5; escala de 1 a 5) y lactancias de $2,5 \pm 0,2$ (rango, 1 a 7). Las vacas se alimentaban de alfalfa y recibían un complemento de raciones balanceadas con el 13% de proteína bruta (320 g/L de leche), más ensilaje de maíz (20 kg/vaca). Las vacas se agruparon por días posparto y fueron asignadas de manera aleatoria a 1 de los 4 grupos de tratamiento. A las vacas en los grupos de tratamiento con progesterona y estradiol (P4+EB) se les aplicó un dispositivo intravaginal de liberación de progesterona (1 g P4, DIB, Syntex, Argentina) y 2 mg de benzoato de estradiol (EB) i.m. el Día 0. El día 8 se retiraron los dispositivos de progesterona y se les aplicó PGF (150 µg D (+) cloprostenol, Ciclase, Syntex) y se las subdividió para administrarles 400 UI eCG (Novormon 5000, Syntex) i.m., o no recibieron ningún otro tratamiento en ese momento. El Día 9, a todas las vacas se les aplicó 1 mg de EB y se les realizó la IATF 36 h más tarde (60 h después de la remoción del dispositivo). El Día 0, a las vacas de los grupos P4-Synch se les colocó un DIB y 50 µg de GnRH (Lecirelina, Gonasyn, Syntex) i.m. El Día 7, se retiraron los dispositivos; se les aplicó PGF y se las dividió para aplicarles 400 UI eCG i.m. o no recibieron ningún otro tratamiento. El Día 9, todas las vacas recibieron un segundo tratamiento con GnRH y se les realizó la IATF 16 h más tarde (60 h después de la remoción del dispositivo). Desde el Día 0 al Día 9, se examinaron todas las vacas a diario con ultrasonografía para determinar el momento de emergencia de la onda folicular y cada 6 h a partir del Día 9 para determinar el momento de la ovulación. No existieron diferencias entre los grupos de tratamientos en cuanto a la cantidad de vacas que comenzaron una onda folicular nueva ($P > 0,12$). Sin embargo, si se compara con las vacas tratadas con GnRH ($P < 0,01$, Tabla 1), la emergencia de la onda folicular se demoró en las que fueron tratadas con EB.

Tabla 1. Tiempo de emergencia de la onda folicular en vacas lecheras en lactancia tratadas con dispositivos de liberación de progesterona y 2 mg EB ó 50 µg de Lecirelin (GnRH) el Día 0.

	Vacas con una onda folicular nueva	Emergencia de la onda folicular (día)	Rango (días)
EB	15/20 (75,0%)	3,8 ± 0,2 ^a	3 a 6
GnRH	18/20 (90,0%)	1,6 ± 0,2 ^b	1 a 4

^{ab} Las medias difieren significativamente (P<0,01).

En la Tabla 2, se muestra la cantidad de vacas que ovularon, el tiempo de ovulación y las características del folículo ovulatorio. El tratamiento (GnRH vs EB, P=0,55), eCG (P=0,22) o su interacción (P=0,24) no tuvieron efecto sobre el diámetro del folículo dominante en el momento de la remoción del dispositivo de liberación de progesterona. El tratamiento (GnRH vs EB, P=0,41), eCG (P=0,26) o su interacción (P=0,33) tampoco tuvieron un efecto significativo sobre el diámetro del folículo ovulatorio. Únicamente existió una tendencia a un intervalo más largo hasta la ovulación en las vacas tratadas con GnRH (P<0,09); pero el tiempo de ovulación no estuvo influenciado por eCG (P=0,84) ni por la interacción EB vs GnRH y eCG (P=0,45; Tabla 2).

Tabla 2. Tiempo de ovulación y características del folículo ovulatorio en vacas lecheras en lactancia tratadas con un dispositivo de liberación de progesterona y EB ó 50 µg de Lecirelina (GnRH) al momento de la inserción del dispositivo y luego de la remoción del mismo, con o sin la adición de eCG al momento de la remoción del dispositivo.

Efectos principales	Vacas que ovularon	Intervalo desde la remoción del dispositivo hasta la ovulación (h)	Diám. del fol. al momento de remoción del dispositivo (mm)	Diám. del fol. al momento de la ovulación (mm)	Crecimiento del fol. desde la remoción del dispositivo hasta la ovulación
EB	17/20 (85,0%)	71,3 ± 1,8 ^a	12,6 ± 1,0	15,5 ± 0,9	0,8 ± 0,2
GnRH	19/20 (95,0%)	75,2 ± 1,6 ^b	13,1 ± 0,5	15,6 ± 0,5	0,8 ± 0,1
eCG	18/20 (90,0%)	73,3 ± 1,8	12,2 ± 0,5	15,0 ± 0,7	0,9 ± 0,1
Sin eCG	18/20 (90,0%)	73,3 ± 1,8	13,5 ± 1,0	16,2 ± 0,7	0,7 ± 0,1

^{ab} las medias tendieron a diferir (P<0,09).

Estos resultados fueron diferentes a los obtenidos en los bovinos de carne. La diferencia más notoria es que en los bovinos de carne, entre el 90 y el 100% de las vacas tratadas con EB presentaron una onda folicular nueva, que emergió entre 2 y 5 d más tarde (Moreno et al., 2001, Bó et al., 2002), pero en el presente estudio sólo el 75% de los animales tratados presentaron una onda folicular nueva durante el periodo de tratamiento, lo que indica que estas vacas podrían tener menor fertilidad a la IATF debido a la ovulación de un folículo persistente. En comparación con los bovinos de carne, el motivo de la respuesta inferior al tratamiento está posiblemente relacionado con una tasa superior del metabolismo del estradiol en las vacas en lactancia (Wiltbank et al., 2006).

En el presente experimento, eCG no aumentó el diámetro del folículo ovulatorio, según se reportó en determinados experimentos realizados en bovinos de carne (Maraña et al., 2006; Baruselli et al., 2004). Sin embargo, otro experimento que se realizó recientemente en Brasil reveló que los tratamientos con eCG producen niveles superiores de progesterona sérica en la fase luteal siguiente, lo que sugiere que

eCG estimula el desarrollo de un CL más competente. Esto, a su vez, puede producir un incremento en la tasa de preñez (Souza et al., 2006), según mostramos en el caso de los bovinos de carne (Baruselli et al., 2004).

Aunque en este estudio en particular no se ha determinado la relación que existe entre la producción de leche y la emergencia de la onda, un experimento reciente realizado en Brasil mostró una correlación negativa significativa ($r = -0,40$; $P < 0,05$) entre la producción de leche y el intervalo hasta la emergencia de la onda después del tratamiento con ODB (Souza et al., 2007b). Las vacas con mayor producción de leche (>35 kg/día) poseen una emergencia más temprana ($P < 0,05$) de la onda folicular ($3,5 \pm 0,2$ días) que las que poseen una producción menor (<25 kg/día; $4,6 \pm 0,3$ días). Las vacas que producen entre 25 y 35 kg/día poseen un intervalo intermedio hasta la emergencia folicular ($4,0 \pm 0,2$) que no difirió de los otros grupos. Estos datos sugieren que el nivel de producción de leche afecta el tiempo de la emergencia folicular en vacas Holstein en lactancia tratadas con EB. Se deben realizar estudios en el futuro para evaluar la dosis de EB más adecuada para las vacas que producen más de 35 kg de leche por día.

En el Experimento 2, se utilizaron 394 vacas Holstein que tenían $61,7 \pm 13,6$ d posparto (rango entre 35 y 94 d), con una producción de leche de $30,7 \pm 6,8$ kg por día (rango entre 12,0 y 52,4 kg) y BCS entre 2,5 y 3,5 de 5. Las vacas se agruparon por días de posparto y se asignaron de manera aleatoria a los mismos cuatro grupos de tratamiento que en el Experimento 1. En este experimento, se obtuvieron muestras de sangre entre los Días -10 y 0 para determinar las concentraciones de progesterona en plasma; el 93 % de las vacas tenían >1 mg/mL de progesterona en al menos una muestra, lo que indica una tasa elevada de ciclicidad. Las vacas fueron examinadas mediante palpación rectal 50 d después de la IATF para determinar la condición de preñez y los datos se analizaron mediante regresión logística. Las tasas de preñez no estuvieron afectadas por BCS, días de posparto, ni por producción de leche ($P > 0,5$). Sin embargo, hubo una interacción con eCG ($P < 0,05$) que se le atribuyó a una tasa de preñez superior en el grupo P4+EB+eCG (44/98; 44,9%) que en el grupo P4+EB (sin eCG; 30/100; 30,0%) y que en el grupo P4-Synch+eCG (30/98; 30,6%); el grupo P4-Synch (sin eCG) presentó una tasa de preñez intermedia que no difirió de los otros grupos de tratamiento (37/98; 38,8%; Figura 2).

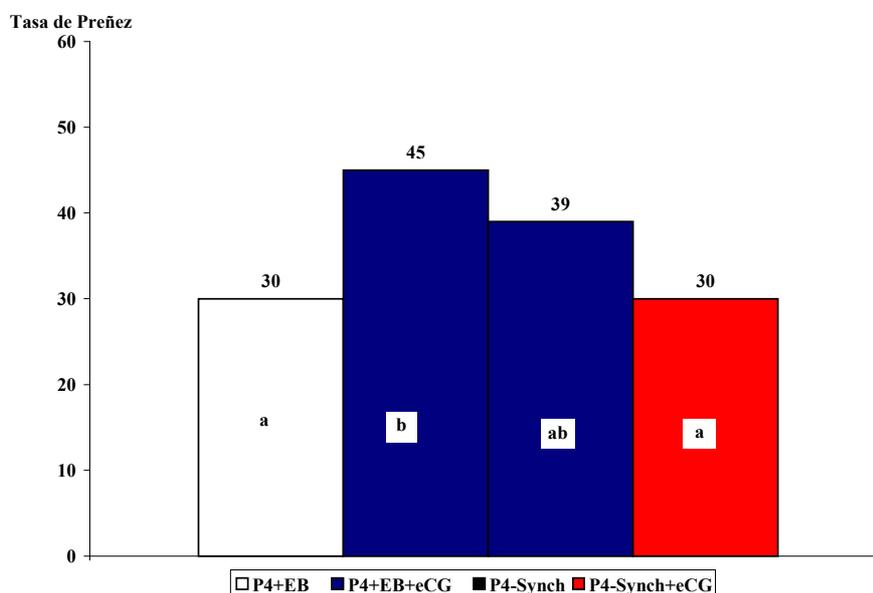


Figura 2. Tasas de preñez en vacas de leche en lactancia tratadas con dispositivos de liberación de progesterona y benzoato de estradiol (grupos P4+EB) o GnRH (grupos P4-Synch) con o sin la adición de 400 UI eCG en el momento de remoción del dispositivo (ab $P < 0,05$).

El Experimento 3 se diseñó para comparar aún más los dos grupos del Experimento 2 que presentaban tasas de preñez superiores. Por lo tanto, se trataron 200 vacas Holstein en lactancia del mismo establecimiento con los protocolos P4+EB+eCG o P4-Synch (sin eCG) mediante la utilización de DIB o CIDR en un diseño factorial 2 x 2. Al igual que en el Experimento 2, las vacas fueron examinadas

mediante palpación rectal 50 d después de la IATF para determinar la condición de preñez y los datos se analizaron mediante regresión logística. No se detectaron diferencias significativas ($P=0,40$) en las tasas de preñez entre las vacas tratadas con DIB (51/100; 51,0%) o CIDR (42/100; 42,0%). Sin embargo, existió una diferencia numérica ($P=0,18$) (aunque no significativa) en las tasas de preñez entre los grupos P4+EB+eCG (52/100; 52,0%) y P4-Synch (sin eCG; 41/100; 41,0%) (Figura 3).

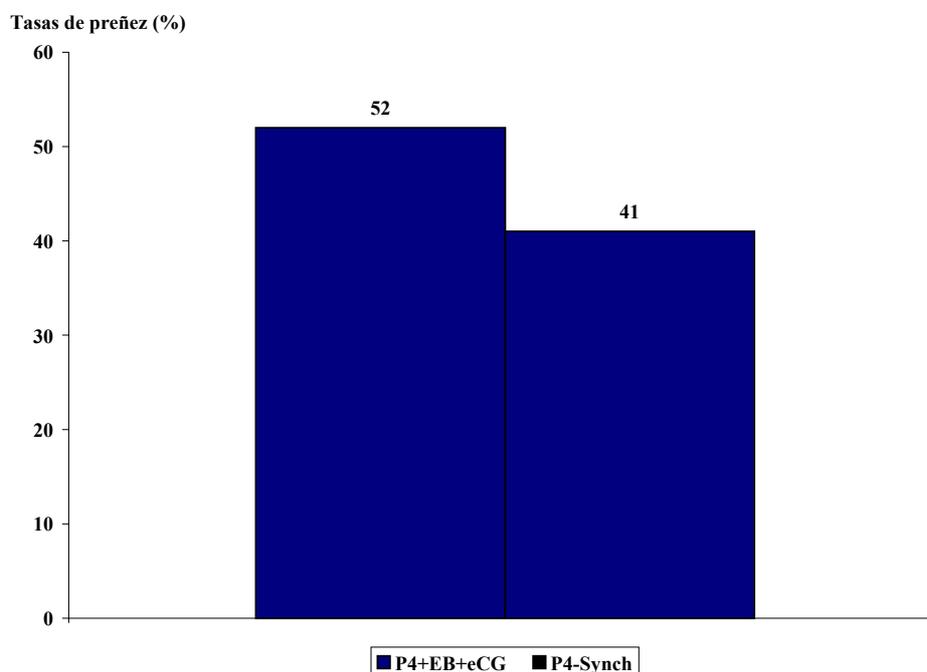


Figura 3. Tasas de preñez en vacas de leche en lactancia tratadas con dispositivos de liberación de progesterona y benzoato de estradiol y eCG (P4+EB+eCG) o GnRH (P4-Synch).

Dado que el tratamiento de presincronización mostró una mejora en las tasas de preñez de los protocolos Ovysynch (Moreira et al., 2001), se diseñó un cuarto experimento para comparar las tasas de preñez en las vacas tratadas con un programa de pre-synch con los tratamientos P4+EB+eCG y P4-Synch evaluados en los estudios anteriores (Veneranda et al., 2008). Se utilizaron quinientas vacas del mismo establecimiento que en los tres estudios anteriores. Las vacas tenían entre 30 y 51 d posparto (al momento de aplicar los tratamientos con PGF en los grupos de pre-synch), una producción de leche de $29,5 \pm 7,0$ kg por día (rango de 13,0 hasta 46,0 kg) y BCS entre 2,5 y 3,5 de 5. Las vacas se agruparon por días de posparto y se asignaron a cinco grupos de tratamiento de manera aleatoria. A las vacas del grupo de Pre-Synch se les aplicó PGF 28 y 14 días antes de la inserción de un dispositivo DIB y de la administración de 50 μ g de Lecirelina (GnRH) i.m. (Día 0). El Día 7, se retiraron los DIB y se les aplicó PGF. El Día 9, todas las vacas recibieron un segundo tratamiento con GnRH y se les realizó la IATF 16 h más tarde (60 h después de la remoción del dispositivo). Las vacas en el grupo Pre-Synch+P4 fueron tratadas de manera similar, con la excepción de que se les aplicó un DIB durante 7 d antes de la segunda inyección de PGF y no recibieron DIB en el momento de la primera GnRH.

Las vacas del grupo P4-Synch recibieron el mismo tratamiento que las del grupo Pre-synch pero no se les aplicaron las dos dosis de PGF 28 y 14 días antes. Las vacas de los dos últimos grupos recibieron un DIB y 2 mg de EB el Día 0. El Día 8, se retiraron los DIB y se les aplicó PGF y 400 UI eCG i.m. A las vacas del grupo P4+EB+eCG+EB se les aplicó 1 mg de EB el Día 9 mientras que a las del grupo P4+EB+eCG+GnRH se les aplicó GnRH el Día 10. Todas las vacas fueron inseminadas a tiempo fijo 60 h después de la remoción del dispositivo. Las vacas fueron examinadas mediante palpación rectal 50 d después de la IATF para determinar la condición de preñez y los datos se analizaron mediante regresión logística.

Según se muestra en la Figura 4, los dos grupos tratados con DIB, EB y eCG presentaron tasas de preñez más elevadas y el grupo en el que se colocó el DIB antes del segundo PGF (Pre-Synch+P4) presentó la menor tasa de preñez. Las tasas de preñez en los otros grupos fueron intermedias y no se diferenciaron de los extremos.

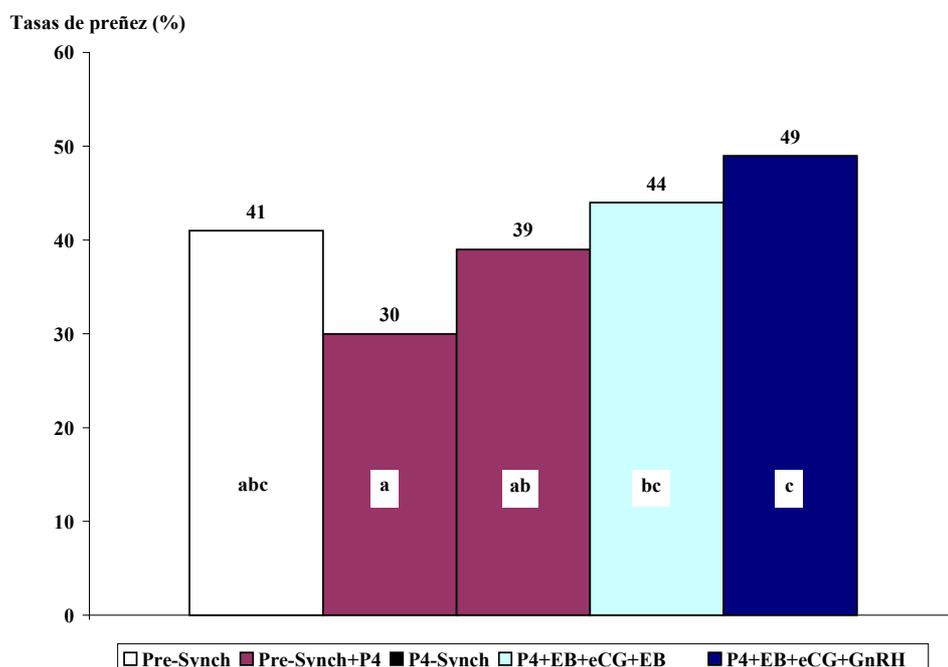


Figura 4. Tasas de preñez en vacas lecheras en lactancia tratadas con protocolos de IATF. Los porcentajes^{abc} con letras no compartidas son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Los resultados de estos experimentos sugieren que la incorporación de eCG mejorará las tasas de preñez después de la IATF en vacas lecheras en lactancia. Cuando se consideran los tres experimentos juntos, las tasas de preñez fueron significativamente superiores ($P < 0,008$) en las vacas tratadas con P4+EB+eCG (145/298; 48,7%) que en las vacas tratadas con P4-Synch (117/298; 39,3%). Por el contrario, eCG no mejoró las tasas de preñez en las vacas a las que se les aplicó GnRH en el momento de inserción del dispositivo de liberación de progesterona, lo que posiblemente se deba a las diferencias en la dinámica de las ondas foliculares entre las vacas tratadas con EB y las tratadas con GnRH. Se deben realizar más estudios para investigar el intervalo más adecuado entre la administración de GnRH y el tratamiento con eCG en vacas lecheras en lactancia. En estudios preliminares, el intervalo de 5 o 6 d entre GnRH y eCG podría ser más adecuado que el de 7 d para vacas lecheras en lactancia.

También se estudió el tratamiento de las vacas lecheras en lactancia con eCG junto con dispositivos de liberación de progesterona y EB en un sistema free stall en Brasil, en establecimientos de parición estacional en Argentina y más recientemente en Nueva Zelanda. El objetivo del estudio realizado en Brasil era evaluar los efectos del eCG y del cipionato de estradiol (ECP) en el pico de LH y en la tasa de concepción en vacas Holstein de alta producción en las que se utilizan protocolos para IATF (Souza et al., 2007a). Las vacas producían $36,2 \pm 0,4$ kg/día y tenían $151,6 \pm 3,5$ días en lactancia. Se utilizaron los mismos tratamientos hormonales en 22 rodeos lecheros (*Free-stall*). El Día 0, a todas las vacas se les aplicó 2 mg de ODB (Estrogin, Farmavet, Brasil) y un dispositivo de liberación de progesterona (CIDR, Pfizer Animal Health, Brasil). El Día 8, se retiró el CIDR y a todos los animales se les aplicó PGF (Lutalyse, Pfizer, Brasil). Las vacas se asignaron de manera aleatoria a 1 de 4 grupos de tratamiento. Grupo 1: eCG (400 UI; Folligon, Intervet, Brasil) + ECP (1 mg) el Día 8; Grupo 2: eCG el Día 8 + GnRH (Fertagyl, Intervet, Brasil) 48 h más tarde; Grupo 3: ECP (1 mg) el Día 8 y Grupo 4: GnRH 48 h más tarde. En la fase I ($n=31$), se examinó a las vacas por ecografía cada 12 h y se obtuvieron muestras de sangre cada 4 h a partir de 30 hasta 60 h luego de la remoción del CIDR. En la Fase II, se realizó un estudio de campo ($n=782$) con los mismos tratamientos hormonales. Se inseminó a todos los animales

entre 56 y 58 h después de la remoción del CIDR. El diagnóstico de preñez se realizó mediante ecografía entre 30 y 40 d después de la IATF. A pesar de la utilización de diferentes drogas para inducir la ovulación (ECP vs GnRH) al finalizar los tratamientos hormonales, no hubo diferencias en las características del pico de LH preovulatorio entre los grupos experimentales (media de $43,5 \pm 1,5$ h luego de la remoción del CIDR). Sin embargo, como ya se explicó antes, las vacas tratadas con eCG tuvieron mayores niveles de progesterona en el ciclo estral subsiguiente a la sincronización e IATF (Figura 5).

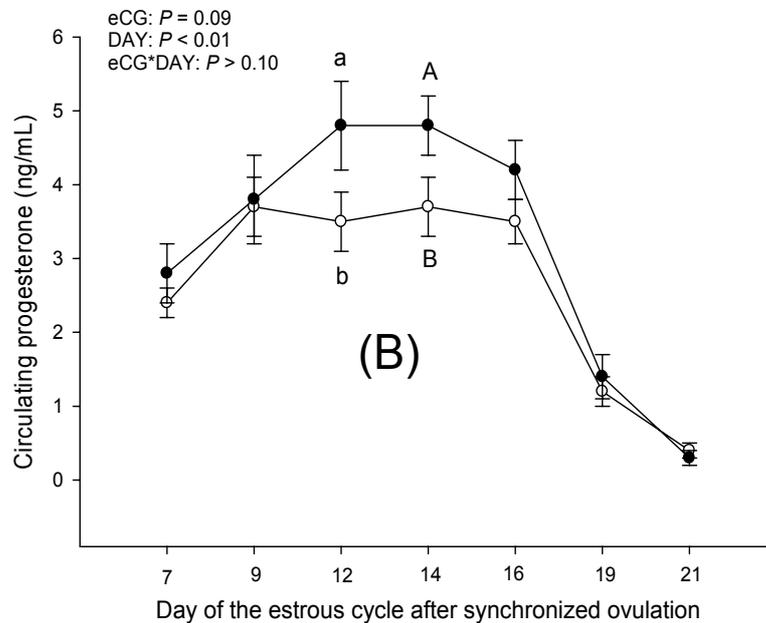


Figura 5. Niveles plasmáticos de progesterona en vacas lecheras en lactancia sincronizadas con dispositivos con progesterona y EB y que recibieron además eCG o no eCG en el momento de la remoción del dispositivo (^{a,b} $P < 0,05$; ^{A,B} $P < 0,10$).

Las tasas de preñez en Grupo 1 (29,1%), Grupo 3 (30,9%) y Grupo 4 (28,9%) no presentaron diferencias. Por otra parte, las vacas en el Grupo 2 presentaron tasas de preñez más altas (33,8%) que en el Grupo 4 ($P=0,02$). Además, las diferencias en las tasas de preñez fueron más evidentes entre las vacas con un BCS más bajo ($<2,75$); en las vacas tratadas con eCG (44,4%), las tasas fueron mayores que en las que no fueron tratadas con eCG (6,1%; $P < 0,05$; Figura 6). Por el contrario, las tasas de preñez no difirieron en las vacas con BCS $>2,75$ y tratadas (32,1%) o no tratadas (33,5%) con eCG. Estos resultados sugieren que eCG incrementa las tasas de preñez en las vacas de alta producción, especialmente en aquellas con BCS más bajo.

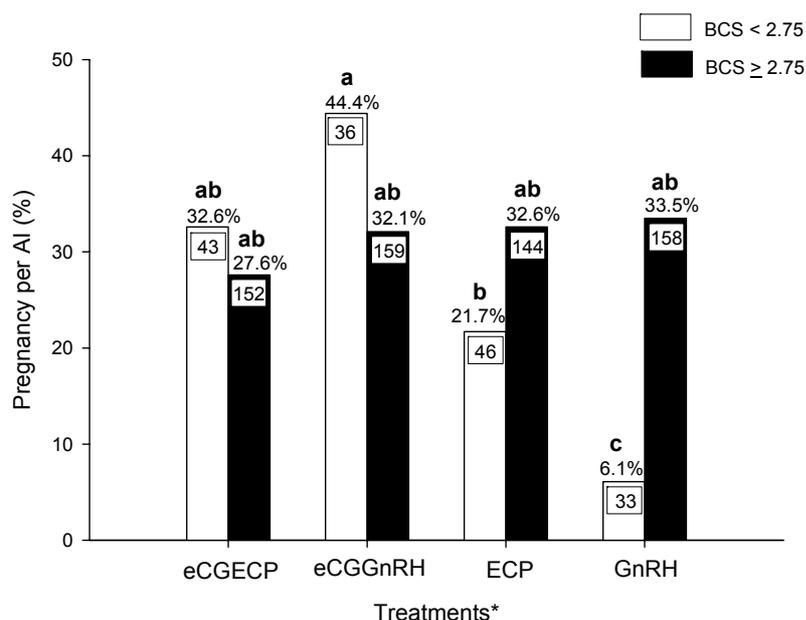


Figura 6. Tasas de preñez en vacas lecheras en lactancia con una condición corporal (BCS) mayor o menor a 2,75 y tratadas con diferentes protocolos de IATF, utilizando o no eCG en el momento de la remoción del dispositivo con progesterona y ECP o GnRH como inductores de la ovulación. Los porcentajes^{abc} con letras no compartidas son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Se realizó otro experimento en un rodeo pastoril y de parición estacional en Argentina (Mian et al., 2008). Las vacas ($n=81$) eran Holstein y Holstein x Jersey con un BCS de $2,7 \pm 0,3$ de 5, que producen $21,8 \pm 5,1$ kg de leche y tienen $132,8 \pm 86,2$ días en lactancia. Las vacas se agruparon por días en lactancia y fueron asignadas de manera aleatoria a 1 de los 2 grupos de tratamiento. El Día 0, las vacas recibieron un DIB y 2 mg de EB i.m. El Día 8, se retiró el DIB y se les aplicó PGF y se las subdividió para administrarles 400 UI eCG i.m. o no recibieron ningún otro tratamiento en ese momento. El Día 9, a todas las vacas se les aplicó 1 mg de EB y se les realizó la IATF entre 54 y 56 h después de la remoción del dispositivo. Para determinar la preñez se examinó a las vacas mediante ultrasonografía 35 d después de la IATF. Las tasas de preñez fueron significativamente mayores en las vacas tratadas con eCG (21/46; 45,6%) que en las que no recibieron eCG (8/35; 22,8%; $P < 0,05$).

Por último, el experimento realizado en Nueva Zelanda se diseñó para comparar la respuesta reproductiva de las vacas lecheras en lactancia y de parición estacional a las que se les diagnosticó anestro anovulatorio mediante palpación para los dos sistemas de tratamiento diferentes (Bryan et al., 2008). A las vacas de seis tambos comerciales se les pintó la base de la cola durante 3 semanas y se las seleccionó en base a la actividad de celo visible y a la ausencia de un CL mediante palpación rectal 7 d antes del inicio de servicio planificado (PSM). A todas las vacas se les aplicó un dispositivo de liberación de progesterona con 1,56 g de progesterona (Cue-Mate, Bioniche Animal Health) durante 8 d y 2 mg de EB en el momento de inserción del dispositivo (Día 0) y 1 mg de EB 24 h después de la remoción del dispositivo (Día 9). Aproximadamente la mitad de las vacas fueron asignadas de manera aleatoria y se les aplicaron 400 UI de eCG (Pregnenol, Bioniche Animal Health) el día de remoción del dispositivo (Día 8). Se sirvió a todas las vacas que fueron observadas en celo después de la remoción del Cue-Mate y si las no observadas en celo, fueron inseminadas a tiempo fijo 36 h después del EB (60 h después de la remoción del dispositivo). Los resultados contemplados fueron la tasa de concepción en las primeras 48 h, la tasa de preñez (ICR) durante primeros 7 d y durante los primeros 28 d. Las vacas tratadas con eCG tenían más posibilidades de concebir durante las primeras 48 h después del tratamiento (eCG: 48,9%; $n = 432$ vs Sin eCG: 43,1%; $n = 420$; $P = 0,059$); y tenían más posibilidades de estar preñadas dentro de los 7 d después del tratamiento (eCG: 47,3%; $n = 488$ vs Sin eCG: 41,7%; $n = 503$; $P = 0,073$). El efecto del eCG fue

mayor en las vacas con más de 5 años (Figura 7) de manera tal que este estrato de vacas tenía significativamente más posibilidades de concebir dentro de las 48 h ($P = 0,003$; RR 1,52; 95% CI: 1,15 a 2,01) o dentro de los 7 d ($P = 0,002$; RR 1,44; 95% CI: 1,42 a 1,82). Además, las vacas tratadas con eCG mayores de 5 años tenían significativamente más posibilidades de estar preñadas en las primeras 4 semanas de la temporada de servicio ($P = 0,02$; RR 1,21; 95% CI: 1,03 a 1,43). Se concluyó que la adición de una inyección de 400 UI de eCG en el Día 8 en un sistema estándar de progesterona y estradiol, incrementaba significativamente la posibilidad de preñez dentro de 48 h y 7 d, especialmente en las vacas con más de 5 años. Este experimento es especialmente importante para los rodeos de parición estacional en los que es muy importante que las vacas conciban lo más rápido posible dentro de los 90 d después de la parición para mantener un intervalo anual de parición de 365 días. Es posible que las tasas de anestro en determinados rodeos sean altas y es importante el incremento del 5% en las tasas de concepción después de la adición de eCG. Estos datos no sólo demuestran una mejora significativa en las tasas de preñez con sistemas actuales de tratamiento, sino que además ponen de manifiesto, desde el punto de vista práctico, cuáles son los grupos específicos de vacas que tienen más posibilidad de beneficiarse con el tratamiento con eCG.

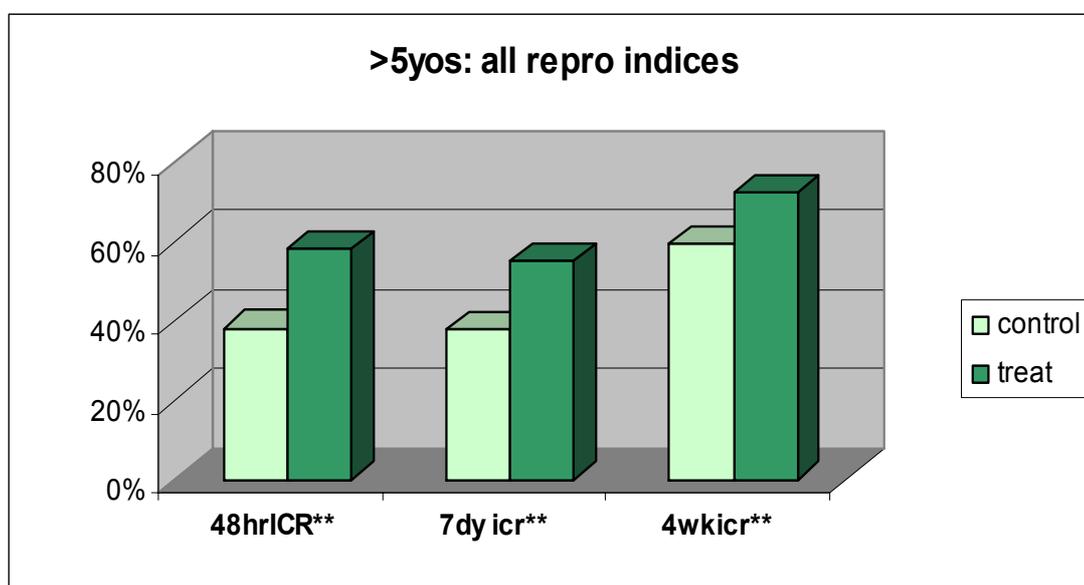


Figura 7. Tasas de preñez en vacas lecheras en anestro postparto sincronizadas con dispositivos con progesterona y EB y que recibieron además eCG (treat.) o no eCG (control) en el momento de la remoción del dispositivo (** $P < 0,05$).

Resincronización del celo y la ovulación

Los sistemas agresivos de manejo reproductivo para vacas lecheras en lactancia constan de tres estrategias que se pueden implementar a comienzos del periodo de servicio: 1) someter a todas las vacas a la primera IA postparto al finalizar el periodo de espera voluntario, 2) identificar a las vacas no preñadas lo más pronto que sea posible, y 3) volver a preñar a las vacas abiertas lo más rápido que sea posible después de la última preñez. Es muy importante volver a preñar oportunamente a las vacas lecheras en lactancia que no conciben en la primera IA para mejorar el desempeño reproductivo de un rodeo determinado. Se han utilizado exitosamente dos enfoques para volver a inseminar a las vacas que están abiertas después de la primera IA. Uno de los enfoques aplicado frecuentemente en América del Norte consiste en la utilización de ultrasonografía para el diagnóstico temprano de la preñez y utilizar tratamientos del tipo Ovsynch que comienzan en ese momento o 7 d antes del diagnóstico con ultrasonografía (es decir, a todas las vacas se les administra GnRH 26 o 33 días después de la primera IA y a las vacas no preñadas se les aplica PGF 7 d después del diagnóstico de preñez, seguido de GnRH 48 h más tarde y IATF 12 a 16 h más tarde). El otro enfoque consiste en la utilización de un dispositivo de liberación de progesterona que se reinserta en todas las vacas 13 ± 1 d después de la primera IA y se retira 7 u 8 d más tarde (Macmillan et al., 1999). Generalmente, la inserción del dispositivo de liberación de

progesterona se combina con la administración de 1 mg de EB en el momento de la inserción y 0,5 o 1 mg de EB 24 h después de la remoción del dispositivo (Burke et al., 2000, Macmillan et al., 1997, 1999). Las vacas no preñadas muestran signos de celo dentro de las 48 a 72 h después de la remoción del dispositivo y se las insemina 12 h más tarde. Este enfoque demostró ser muy eficaz en los rodeos de parición estacional en Australia, en los que las vacas fueron resincronizadas dos veces (es decir primer, segundo y tercer servicio). Más recientemente, hemos utilizado este protocolo para cinco ciclos consecutivos en rodeos de leche pastoriles en Argentina, con una tasa general de preñez del 30% por ciclo y se obtuvo una preñez del 80% a los 100 días en lactancia (Capitaine Funes et al., 2007). En un estudio posterior, las vacas fueron resincronizadas por 3 ciclos consecutivos después de la primera IA con una tasa de preñez acumulativa del 84% después del cuarto servicio, la que fue significativamente superior que la de las vacas que fueron servidas nuevamente durante el mismo periodo pero en base a observaciones de celo en forma natural después de la primera IA (Feresin et al., 2006, sin publicar). Con la utilización de estos protocolos en Australia, Cavalieri et al. (2006) reportaron tasas de preñez del 41,6; 63,3 y 71,5%, respectivamente después del primer, segundo y tercer servicio en 3717 vacas de leche. La ventaja de este tratamiento es que se espera que las vacas regresen al celo en un periodo de tiempo definido, por lo tanto, se pueden realizar observaciones con más precisión. Por el contrario, la desventaja del programa es que requiere de tratamientos hormonales continuos y el éxito depende de la eficacia de la detección del celo.

Resumen y conclusiones

Actualmente, la economía mundial requiere de prácticas de manejo eficaces para mejorar la rentabilidad de los establecimientos de producción de leche. La eficacia reproductiva óptima es crucial para incrementar los rendimientos netos. Es muy importante utilizar tecnologías reproductivas. Sin embargo, la variabilidad de las respuestas a los tratamientos tradicionales y el tiempo y esfuerzo que se requieren para realizar la detección del celo han afectado al rendimiento reproductivo de los rodeos lecheros. La incorporación de técnicas diseñadas para controlar la dinámica de la onda folicular y la ovulación en los últimos años ha reducido los problemas asociados con la detección del celo. Además, los tratamientos con dispositivos de liberación de progesterona, estradiol y eCG han brindado la posibilidad de aplicar la IATF con altas tasas de preñez en vacas de leche cíclicas y no cíclicas. No obstante, es muy importante reconocer que el éxito del programa reproductivo también depende de muchos factores de manejo tales como el manejo nutricional y de la salud, las instalaciones y la disponibilidad de personal calificado.

Agradecimientos

La investigación fue financiada por el FAPESP, Brasil y el Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC). Además agradecemos a Bioniche Animal Health, Canadá, Biotay S.A., Argentina, Pfizer Animal Health, Argentina y Brasil y Syntex S.A., Argentina por las hormonas utilizadas en los estudios. Agradecemos especialmente a nuestros colegas del IRAC y de la Universidad de São Paulo por la asistencia técnica. Correo electrónico: gabrielbo@iracbiogen.com.ar

Referencias

- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bó GA. The use of treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci* 82-83, 479-486, 2004.
- Bó GA, Baruselli PS, Moreno D, Cutaia L, Caccia M, Tribulo R, Tribulo H, Mapletoft RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* 57, 53-72, 2002a.
- Bó GA, Cutaia L, Tribulo R. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Primera Parte. *Taurus* 14, 10-21, 2002b.
- Bó GA, Cutaia L, Tribulo R. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo en bovinos para carne: algunas experiencias realizadas en Argentina. Segunda Parte. *Taurus* 15, 17-32, 2002c.

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

Bó GA, Cutaia LA, Veneranda G. Manejo de las Hormonas en los Programas Reproductivos del Ganado Lechero. 6º Congreso Internacional de Especialistas en Bovinos, Torreón, Coahuila, México, November 9 to 11, 2006.

Bó GA, Cutaia L, Peres LC, Pincinato D, Maraña D, Baruselli PS. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. En: *Reproduction in Domestic Ruminants VI*, Juengel JL, Murray JF and Smith MF (editors), Nottingham University Press, 223-236, 2007.

Bryan MA, Emslie R Heuer C. Comparative efficacy of an 8-day Cue-Mate/estradiol benzoate program with or without inclusion of equine chorionic gonadotropin in anestrous dairy cows. *Reprod Fertil Dev* 20, 85, 2008.

Burke CR., Day ML, Bunt C.R, Macmillan KL. Use of a small dose of estradiol benzoate during diestrus to synchronize development of the ovulatory follicle in cattle. *J Anim Sci* 78, 145-151, 2000.

Burke JM, de la Sota RL, Risco CA, Staples CR, Schmitt EJ-P, Thatcher WW. Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 8, 1385-1394, 1996.

Capitaine Funes A, Vater A, Acosta N. Análisis reproductivo de rodeos lecheros usuarios del Dairy Comp 305. *Taurus* 17, 14-28, 2003.

Capitaine Funes A., Martino F, Oyarzabal MI, Bó GA. Reproductive performance of pasture-based dairy cows treated with two estrus synchronization programs. *Theriogenology*, Submitted 2007.

Caraviello DZ, Weigel KA, Fricke PM, Wiltbank MC, Florent MJ, Cook NB. Survey of management practices related to the reproductive performance of dairy cattle on large commercial farms in the United States. *J. Dairy Sci* 89, 4723-4735, 2006.

Cavalieri J, Hepworth G, Fitzpatrick LA, Shepard RW, Macmillan KL. Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology* 65, 45-64, 2006.

De la Sota RL, Risco C, Moreira F, Thatcher WW. Efficacy of a timed insemination program in lactating dairy cows during summer heat stress. *Theriogenology* 49, 761-770, 1998.

Eicker S, Stewart S, Rapnicki P. Dairy Herd Reproductive Records. ABS Technical service Symposium, Madison, WI. USA, October 2000.

Fricke PM, Caraviello DZ, Weigel KA, Welle MC. Fertility in dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *J Dairy Sci*, 86, 3941-3950, 2003.

Geary TW, Whittier JC, Hallford DM, MacNeil MD. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and Co-synch protocols. *J Anim Sci* 79, 1-4, 2001.

Gumen AJ, Guenther M, Wiltbank MC. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J Dairy Sci*, 86, 3184-3194, 2003.

Kastelic JP, Ginther OJ. Factors affecting the origin of the ovulatory follicle in heifers with induced luteolysis. *Anim Reprod Sci* 26, 13-24, 1991.

Le Blanc S. Using DHI Records on-farm to evaluate Reproductive Performance. *Advances in Dairy Technology* 17, 319-330, 2005.

- Lucy MC. Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will it End? *J Dairy Sci* 84, 1277-1293, 2001.
- Lucy MC, McDougall S, Nation DP. The use of treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture based management systems. *Anim Reprod Sci* 82-83, 495-512, 2004.
- Macmillan KL, Henderson HV. Analyses of the variation in the interval from an injection of prostaglandin $F_2\alpha$ to estrus as a method of studying patterns of follicle development during diestrus in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 6, 245-254, 1984.
- 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* 33, 1-25, 1993.
- Macmillan KL, Burke CR. Effects of oestrus cycle control on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci* 42, 307-320, 1996.
- Macmillan, K.L., Taufa, V.K., Day, A.M. Manipulating ovaries follicle wave patterns can partially synchronise returns to service and increases the pregnancy rate to second insemination. *Proc NZ Soc Anim Prod* 1997; 57:237.
- Macmillan, K.L., Colson, D.D., Eagles, V.M. Modifications to improve whole herd synchrony programs in seasonal dairy herds. *Proc Australian Assoc of Cattle Vet* 1999; 121-129.
- Maraña D, Cutaia L, Peres L, Pincinato D, Borges LFK, Bó GA. Ovulation and Pregnancy rates in postpartum bos indicus cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate, with or without eCG and temporary weaning. *Reprod Fertil Dev* 18, 116-117, 2006.
- Martinez, M.F., Kastelic JP, Adams GP, Mapletoft RJ. The use of a progesterone-releasing device (CIDR) or melengestrol acetate with GnRH, LH or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. *J Anim Sci* 80, 1746-1751, 2002.
- Mian L, Brogliatti GM. Efecto de la aplicación de eCG en protocolos de IATF en vacas en lactancia. *Proc. VII Simposio Internacional de Reproducción Animal, IRAC-2007*, 29, 30 de Junio y 1 de Julio del 2007, Cordoba, Argentina, pp 243.
- Momont HW, Seguin BE. Influence of the day of estrous cycle on response to $PGF_2\alpha$ products: Implications for AI programs for dairy cattle. *10th International Congress on Animal Reproduction* 3, 336, 1984.
- Moreira F, Orlandi C, Risco CA, Mattos R, Lopes F, Thatcher WW. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 84, 1646-1659, 2001.
- Moreno D, Cutaia L, Villata ML, Ortisi F, Bó GA. Follicle wave emergence in beef cows treated with progesterone releasing devices, estradiol benzoate and progesterone. *Theriogenology* 55, 408, 2001.
- Odde KG. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J Anim Sci* 68, 817-830, 1990.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using $PGF_2\alpha$ and GnRH. *Theriogenology* 44, 915-923, 1995.
- Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronized ovulation. *J Dairy Sci*. 80, 301-306, 1997.

Pursley JR, Witbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverich HA, Anderson LL. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci* 80, 295-300, 1997.

Pursley JR, Fricke PM, Garverick HA, Kesler DJ, Ottobre JS, Stevenson JS, Wiltbank MC. NC-113 Regional Research Project. Improved fertility in noncycling lactating dairy cows treated with exogenous progesterone during Ovsynch. Midwest Branch ADSA 2001 Meeting, Des Moines, IA; 63, 2001.

Rogan D, Martinez MF, Bó GA, Chesta P, Feresin F, Mapletoft RJ. Progesterone release patterns from Cue-Mate in comparison to other intravaginal progesterone-releasing devices in lactating dairy cows. *Reproduction Fertility and Development* 19, 126-127, 2007.

Souza AH, Wosniacki AM, Torres-Junior JRS, Martins CM, Ayres H, Baruselli PS. Fatores que afetam o volume do corpo lúteo durante o ciclo estral de vacas Holandesas de alta produção. *Acta Scientiae Veterinariae (Proc. Annual Meeting of the Brazilian Society of Embryo Technology; SBTE)*, 34, 368, 2006.

Souza AH, Viechnieski S, Lima FA, Rodrigues CA, Teixeira AA, Valarelli RL, Wiltbank MC, Baruselli PS. Efeito do eCG e do cipionato de estradiol em protocolos para inseminação artificial em tempo fixo em vacas holandesas de alta produção. *Acta Scientiae Veterinariae (Proc. Annual Meeting of the Brazilian Society of Embryo Technology (SBTE))*, Submitted, 2007a.

Souza AH, Viechnieski S, Valarelli RL, Wiltbank MC, Baruselli PS. Efeito da produção de leite no momento da emergência folicular em vacas holandesas em lactação tratadas com benzoato de estradiol e CIDR®. *Acta Scientiae Veterinariae (Proc. Annual Meeting of the Brazilian Society of Embryo Technology (SBTE))*, Submitted, 2007b.

Stevenson JS, Kobayashi Y, Thompson KE. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combinations of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F₂α. *J Dairy Sci* 82, 506-515, 1999.

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* 89, 2567-2578, 2006.

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* 55, 75-90, 2001.

Thatcher WW, Bilby TR, Bartolome JA, Silvestre F, Staples CR, Santos JEP. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 65, 30-44, 2006.

Vasconcelos JLM, 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* 52, 1067-1078, 1999.

Veneranda G, Filippi L, Racca D, Romero G, Balla E, Cutaia L, Bó GA. Pregnancy rates in dairy cows treated with intravaginal progesterone devices and different fixed-time AI protocols. *Reprod, Fertil Dev* 18, 118, 2006.

Veneranda G, Filippi L, Racca D, Cutaia L, Bó GA. Pregnancy rates in dairy cows treated with intravaginal progesterone devices and GnRH or estradiol benzoate and eCG. *Reprod, Fertil Dev* 20, 91, 2008.

Wiltbank M, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gumen A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65, 17-29, 2006.

Wiltbank MC, Gumen A, Sartori R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57, 21-52, 2002.

Impact of Fixed Timed AI on Reproductive Efficiency of High-Producing Lactating Dairy Cows

José Eduardo P. Santos
Department of Animal Sciences, University of Florida
L.E. "Red" Larson Building, room 204A
1812 Shealy Drive, PO Box 110910
Gainesville, FL 32611-0910
jepsantos@ufl.edu

Introduction

Reproductive efficiency is a major component of economic success in dairy herds. The physiological and environmental stress of high producing dairy cows negatively affects estrous detection as well as establishment and maintenance of pregnancy. Recently, it was estimated that the average value of a pregnancy was US \$278 in high-producing herds in the US; whereas the cost of a pregnancy loss was substantially greater (De Vries, 2006).

There are multitudes of issues including management, the cow's reproductive physiology and metabolism, nutrition, genetics, and diseases that influence reproduction in the dairy cow. Furthermore, consolidation of the industry with larger herds poses new challenges with implementation of reproductive programs with large number of cows. In the past, most dairy herds used reproductive programs that relied upon observation of estrus up to a certain number of days in milk (**DIM**), and subsequent intervention was only implemented in cows with advanced DIM and no insemination. Typically, interventions were based on palpation per rectum of the reproductive tract and a decision was made based upon detection of ovarian structures. These more traditional reproductive programs focused on finding the *problem cow* and *fixing* her; however, in systems based on artificial insemination (**AI**), the focus should be on finding non-pregnant cows to get them pregnant in a timely manner. Quite often, key indicators of success of conventional programs were based on averages, such as for DIM at first AI, days open (**DO**), and calving interval (**CI**).

Nowadays, reproductive programs have taken a slightly different approach. The goal is to be proactive and work with groups of cows. In most cases, the focus is to increase the rate at which eligible cows become pregnant and, for that, use of systematic breeding protocols have become an integral portion of reproductive management in dairy herds (Caraviello et al., 2006). Ultimately, the goals are to minimize the variation in the interval from calving to first AI, increase the rate at which eligible cows become pregnant and, consequently, reduce the interval from calving to pregnancy in a consistent manner. Most of the reasons for change are related to the economic values of pregnancy and of when the cow becomes pregnant, the need to manage large groups of cows without creating systems that might not be implemented due to difficulty or lack of compliance, and the need to address deficiencies in cow fertility such as poor estrous expression and detection.

Indicators of reproductive efficiency

Success of AI programs in dairy herds depends upon accurate and efficient detection of estrus; however, accuracy and efficiency of estrous detection are variable and depend upon animal, environmental, and management factors (Lucy, 2006). For the high-producing dairy cow the altered competence of follicles and the smaller circulating concentrations of estradiol during proestrus have been associated with reduced estrous detection rates and fertility (Wiltbank et al., 2006).

Four main factors affect reproductive efficiency in dairy herds: days postpartum at first AI, estrous detection rate, conception rate (**CR**), and pregnancy loss. For this manuscript, the estrous detection rate is defined as the number of eligible cows receiving an insemination every 21-d, which is the standard estrous cycle length for cattle. Eligible cows are those that have passed the voluntary waiting period (**VWP**), are not pregnant, and need to be inseminated. Conception rate is defined as the number of pregnancies divided by the number of AI, which is the typical measure of intrinsic fertility of the cow. Finally, pregnancy loss is defined as the proportion of pregnant cows that have experienced either an

embryonic or fetal loss. Table 1 depicts an example calculation of reproductive indices for every 21-d interval past the 50 DIM in a herd with 100 eligible cows for the first 134 DIM.

Of the factors outlined, the first two, days postpartum at first AI and estrous detection rate can be manipulated and controlled with a certain degree of efficacy. On the other hand, in high-producing dairy cows, CR and pregnancy loss are, in many instances, under little human control and more difficult to impact. An additional factor, culling, can bias reproductive indices without being directly related to reproductive activities in the dairy.

In order to maintain an adequate interval from calving to pregnancy and a large proportion of the herd with a CI < 13 mo, the VWP must be limited to the first 60 to 70 d postpartum. Once insemination starts, service rate should be 100 %, first AI pregnancy rate (**PR**) greater than 35 %, and PR for every 21-d estrous cycle above 20 %. Manipulation of the interval from calving to first postpartum AI impacts reproductive efficiency in dairy cows. Extending the interval usually increases DO when PR is maintained. Ferguson and Galligan (1993) indicated that PR at first postpartum AI explained 79 % of the variation in the CI of dairy cows. Such high impact is because all cows in the herd eligible for insemination have to receive a first AI. Therefore, optimizing first postpartum insemination PR is critical to improve reproductive efficiency in dairy herds. In the so called *well managed* high-producing herds, it is not uncommon to obtain 50 to 55 % of the lactating cows pregnant before 110 DIM, and achieve median DO of 105 d. These numbers are usually only achieved with manipulations of the interval from calving to first AI, and improvements in service rate and CR.

Voluntary waiting period and first postpartum AI

Duration of the VWP is, for the most part, a management decision that can be easily manipulated. Traditionally, it varies from 40 to 90 d postpartum in most dairy herds. Decisions on when to begin AI result from physiological windows to optimize conception and economic debate as to when it is best to first inseminate cows. There have been suggestions that the best interval from calving-to-conception in dairy herds is between 100 to 120 d postpartum. This topic will be addressed in this conference by Albert De Vries (see companion paper in proceedings). As production/cow increases, particularly when associated with increased persistence of lactation, delaying first postpartum AI and the time to when pregnancy is obtained has lesser impact on the value of the pregnancy and the impact of reproduction on the economics of the dairy (De Vries, 2006).

Insemination early postpartum usually resulted in a smaller CR, and delaying first postpartum AI up to 90 to 100 d postpartum usually increased fertility (Stevenson, 2006; Tenhagen et al., 2003). Part of the improvement in fertility of dairy cows, as first AI is delayed past the traditional 60 to 70 d postpartum, is the improved uterine health with completion of uterine involution. In addition, the prevalence of anovular cows is reduced as the lactation progresses.

Delaying first postpartum AI to 70 to 90 d postpartum increases CR, but does not necessarily reduce DO and improve overall reproductive performance of the herd. Veterinarians and dairy producers must decide what the main objective of their reproductive program is when choosing a VWP for the herd. Typically, for every delay of an estrous cycle, approx. 21 d, in the VWP, CR has to increase 8 to 10 percentage units to compensate for the delay in first postpartum insemination to obtain similar DO and proportion of cows pregnant at different intervals postpartum. In other words, if the VWP of a dairy herd is 60 d, and CR at first AI is 35 %, delaying the VWP to 81 d postpartum has to result in an increased CR to 43 % to maintain a similar median and mean DO. Figure 1 depicts an example of the average dairy herd in the state of California, with a VWP of 50 d postpartum and a 21-d PR of 15 % (CR of 30 % and 21-d estrous detection rate of 50 %).

In this example, ignoring pregnancy losses and culling of cows, the expected median and mean (\pm SD) DO for the average herd (PR 15 – CR 30) would be 140 and 158 ± 9 d, respectively. In the example herd, if the reproductive program is altered by increasing service rate the first 21-d past the VWP from 50 % to 100 % by manipulating the estrous cycle, but CR is maintained at 30%, thereby resulting in first AI PR of 30%, but subsequent estrous cycles are kept at 15% PR (PR 30/15 – VWP 50), then median and mean DO

change to 100 and 139 ± 8 d, respectively. When the VWP is delayed to 70 d, if CR increases from 30 to 40 % and all cows are inseminated in the first 21-d past the VWP (PR 40/15 – VWP 70), then median and mean DO change to 120 and 143 ± 8 d, respectively. Finally, if an additional delay in VWP is implemented, now to 90 d postpartum, and CR increases to 50 % with all cows again inseminated in the first 21-d past the VWP (PR 50/15 – VWP 90), then median and mean DO will be 100 and 156 ± 8 d, respectively. Therefore, these data illustrate that careful consideration must be taken when deciding on what the VWP should be for a given herd.

Although delaying the first postpartum AI might not maximize the proportion of pregnant cows at a specific interval postpartum, despite increased CR, inseminating cows very early in lactation might not be attractive either. Likely, there is an optimum time postpartum when first AI should be performed, in which improvements in fertility and maximization of pregnant cows with adequate DO reach a balance. In reality, discussions on the optimum time to inseminate a cow have to consider its impacts on: reproductive performance of the herd; risk for a cow to be culled or die with more calvings in a lifetime, as calving is the period of highest risk for culling and death; genetic progress of the herd, as more calvings in a lifetime results in more replacement heifers; and milk yield/d of CI, all of which impact the economics of the decision. Generally, for cows with lactation persistence past peak milk yield of < 95 % (decline in milk yield of > 5 %/month past peak production), it is a consensus that extending the interval from calving to pregnancy reduces milk yield/d of CI. On the other hand, for cows with high persistence of lactation, such as primiparous, or with high milk yield, becoming pregnant early can be a negative event (De Vries, 2006).

In order to illustrate the differences in control of interval to first AI, Figure 2 depicts scatter graphs of three different dairy herds with distinct reproductive management programs for first postpartum AI. Herd A has a short VWP, but it is clear that there is little control of the upper limit to DIM at first insemination. This is typical of herds that rely solely on estrous detection to inseminate cows. These herds usually begin inseminating cows early to compensate for their deficiency in estrous detection and the extended interval to first AI that some cows experience. Herd B begins to inseminate cows at approximately 50 d postpartum, but almost every cow receives their first AI no later than 80 DIM. This is typical of herds that initially rely on estrous detection for AI, but eventually cows not inseminated after a certain number of DIM receive a TAI. Finally, in herd C, almost every cow receives the first AI between 65 and 75 DIM. This is typical of herds that decide not to inseminate cows early postpartum, but every cow receives the first AI following an ovulation synchronization protocol.

The approach taken by herd A (Figure 2) is the least effective, as a large proportion of cows receive their first AI either too early or too late. Early inseminations result in poor CR and might compromise milk yield in current and future lactations. Cows that become pregnant very early postpartum have short lactations and might not have time to recover body condition for subsequent lactations. The approaches taken by herds B and C likely result in similar reproductive performance (Chebel et al., 2005). Both have their advantages and disadvantages. In herd B, expenses with labor and hormones for synchronization of estrus or ovulation are reduced, although CR is likely to be less for cows inseminated early in the VWP than those inseminated at 70 to 80 DIM (Chebel et al., 2006; Stevenson, 2006; Tenhagen et al., 2003).

Implementing reproductive programs for first AI

It is clear that high-producing lactating dairy cows have compromised duration and intensity of estrous expression (Wiltbank et al., 2006; Yaniz et al., 2006). Therefore, implementation of reproductive programs based on synchronization of estrus, ovulation, or both is needed to optimize reproductive efficiency in dairy herds.

Estrous synchronization protocols

Estrous synchronization protocols allow for insemination of cows with little control over time of insemination and the total number of cows serviced. Because estrous synchronization protocols do not control moment of ovulation, detection of estrus is required and these protocols only become effective when estrous detection rate is good to excellent. Two major impediments for the success of programs that

are based solely on estrous synchronization are the poor expression of estrus in high-producing cows and the high prevalence of anovular cows during the first 60 d postpartum (Santos et al., 2008; Wiltbank et al., 2006). Estrous expression and detection can be further compromised by environmental and animal factors such as poor footing and inadequate surface for mounting activity, lameness, and lack of individual animal attention as the industry consolidates and farms become larger with fewer employees per cow.

Synchronization of estrus can be accomplished simply by systematic use of prostaglandin $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$). Use of PGF $_{2\alpha}$ to synchronize estrus is the most common protocol implemented in most dairy farms. It consists of single or multiple injections of PGF $_{2\alpha}$ and analogues to regress a responsive corpus luteum (CL), which causes the cow to return to estrus in 2 to 7 d. The CL is generally responsive to PGF $_{2\alpha}$ only after d5 of the estrous cycle and a single injection of PGF $_{2\alpha}$ given at random should induce estrus in approximately 60 to 70 % of the cycling cows. When 2 injections of PGF $_{2\alpha}$ are given 10 to 14 d apart, over 90 % of the cycling cows are expected to respond to the second injection. However, frequency of anovular cows and lack of optimal estrous detection can have a major impact on the number of cows responding to PGF $_{2\alpha}$ and observed in estrus. On most dairy farms, utilization of 2 PGF $_{2\alpha}$ injections in the first 50 d postpartum results in an estrous detection rates following the second injection between 50 and 60 % (Bruno et al., 2005; Chebel et al., 2006). Because PGF $_{2\alpha}$ has no impact upon follicular development and, therefore, no control over follicle wave emergence, cows in this program come into estrus at different days following the injection, with little precision over time of insemination and ovulation.

Response to PGF $_{2\alpha}$ can be improved by controlling follicle growth and assuring that a responsive CL is present at the moment of treatment. Utilization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) followed 7 d later by PGF $_{2\alpha}$ is a simple program that increases response to PGF $_{2\alpha}$ and improves synchrony of estrus. Another method to improve estrous response to PGF $_{2\alpha}$ is to combine with an intravaginal progesterone insert. Inserts, such as the controlled internal drug releasing (CIDR; EAZI-BREEDTM CIDR[®], Pfizer Animal Health, New York, NY) result in sublethal concentrations of progesterone in high-producing dairy cows (Cerri et al., 2008a), which are sufficient to block estrus and ovulation and increase tightness of estrous detection (Chebel et al., 2006). When combined with an injection of PGF $_{2\alpha}$, the use of progesterone inserts should be limited to no longer than 7 d to avoid persistent follicle and reduction in fertility. The most common protocol is the insertion of the intravaginal device for 7 d, with an injection of PGF $_{2\alpha}$ on d6 or 7. Improvements in this protocol can be attained by the addition of an injection of GnRH at the CIDR insertion to recruit a new follicular wave. When postpartum cows were treated with CIDR for 7 d and received PGF $_{2\alpha}$ at insert removal, distribution of estrus was altered and cows were inseminated sooner when compared with PGF $_{2\alpha}$ alone (Chebel et al., 2006).

Timed artificial insemination

Manipulation of the estrous cycle to improve service rate and fertility usually impacts positively on PR. Timed AI protocols rely on control of the estrous cycle by synchronizing follicular development, CL regression and, ultimately, ovulation to allow for insemination at fixed time with adequate CR (Thatcher et al., 2001). Such programs have become an integral part of reproductive management in herds (Caraviello et al., 2006), because of the recognized problems with expression and detection of estrus in dairy cows (Lucy, 2006).

The most accepted TAI protocols in dairy herds in the US are the Ovsynch and Cosynch protocols, which consist of an injection of GnRH given at random stages of the estrous cycle, followed 7 d later by a luteolytic dose of PGF $_{2\alpha}$. For Ovsynch, a final GnRH injection is given at 48 to 56 h after PGF $_{2\alpha}$ and fixed-time AI is performed 12 to 16 h later. When Cosynch is utilized, cows are fixed-time inseminated 48 or 72 h after the PGF $_{2\alpha}$, and GnRH is given concurrently with TAI. These protocols have been implemented very successfully in many commercial dairy farms as a strategy for AI during the first postpartum service, as well as for re-insemination of non-pregnant cows. Although TAI protocols allow for insemination without the need for estrous detection, approximately 10 to 15 % of the cows display signs of estrus during the protocol. They should be inseminated promptly if maximum PR is to be achieved.

Pursley et al. (1997a) evaluated CR in lactating dairy cows ($n = 310$) and heifers ($n = 155$) when AI was performed following the Ovsynch protocol or a synchronization program utilizing only $\text{PGF}_{2\alpha}$ injections. Cow in the $\text{PGF}_{2\alpha}$ treatment received as many as 3 injections 14 d apart if signs of estrus had not been observed. All control cows not detected in estrus after the third injection of $\text{PGF}_{2\alpha}$ were TAI 72 to 80 h later. Conception rates for the two programs were similar, averaging 38 %. For the lactating cows, estrous detection rate after the first 2 injections of $\text{PGF}_{2\alpha}$ averaged 54.0 % following each injection, with an overall 81.8 % for the 28-d period. Because of the low estrous detection rate in the $\text{PGF}_{2\alpha}$ group, cows enrolled in the Ovsynch TAI protocol experienced greater PR. In a subsequent study by the same group (Pursley et al., 1997b), lactating dairy cows from 3 commercial herds ($n = 333$) were randomly assigned to either the Ovsynch protocol or AI based on estrous detection with periodic use of $\text{PGF}_{2\alpha}$. Non-pregnant cows were re-inseminated using the original treatment. Median days postpartum to first AI (54 vs. 83; $P < 0.001$) and DO (99 vs. 118; $P < 0.001$) were reduced in cows receiving Ovsynch compared with cows inseminated following detection of estrus.

It is important to note that the positive effects of TAI compared with more traditional reproductive programs based on detection of estrus on reproductive efficiency of a herd are only observed when CR are not reduced with TAI and detection of estrus is deficient (Tenhagen et al., 2004). When TAI was implemented in 2 herds with distinctly different reproductive performance, the benefits from a systematic breeding program were more clearly demonstrated in the herd with poor estrous detection rate (Tenhagen et al., 2004).

Improving response to TAI by presynchronization

Response to the Ovsynch protocol is optimized when cows ovulate to the first GnRH injection of the program, and when a responsive CL is present at the moment of the $\text{PGF}_{2\alpha}$ treatment (Chebel et al., 2006). Vasconcelos et al. (1999) initiated the Ovsynch protocol at different stages of the estrous cycle and observed that synchronization rate to the second GnRH injection was higher when cows received the first GnRH injection prior to d12 of the estrous cycle. Also, initiation of the Ovsynch protocol between d 5 and 9 of the cycle resulted in the greatest ovulation rate. Ovulation to the first GnRH injection and initiation of a new follicular wave should improve PR (Chebel et al., 2006), because an ovulatory follicle with reduced period of dominance is induced to ovulate. Furthermore, initiating the Ovsynch protocol prior to d12 of the estrous cycle should minimize the number of cows that come into estrus and ovulate prior to the completion of the program (Moreira et al., 2001).

The importance of inducing follicle turnover was demonstrated when Cerri et al. (2008b) evaluated embryo quality in nonsuperovulated early lactation dairy cows. The hypothesis was that initiating Ovsynch on d3 of the estrous cycle would lead to continued development of an ovulatory follicle that would result in poorer embryo quality compared to recruitment of a new ovulatory follicle following follicle turnover initiated by an injection of GnRH on d6 of the cycle. Cows receiving the Ovsynch protocol initiated on d3 of the estrous cycle had lesser ovulation rate to the initial GnRH than those initiating the program on d6 of the estrous cycle. The reduced ovulation rate (7.1 % vs. 83 %) was associated with smaller dominant follicles (9.5 vs. 14.8 mm) at the moment of the initial GnRH injection, and extended period of ovulatory follicle dominance. When embryos were flushed on d6 after AI, fertilization rate was similar among treatments, but cows initiating the Ovsynch on d3 had embryos that were less developed and with fewer cells than those of cows initiating the Ovsynch on d6 (Table 2).

Moreira et al. (2001) designed a presynchronization protocol to optimize response to the Ovsynch program by giving 2 injections of $\text{PGF}_{2\alpha}$ 14 d apart, with the second injection given 12 d prior to the first GnRH of the TAI protocol. This presynchronization program increased PR at 32 and 74 d after TAI in cyclic cows. El-Zarkouny et al. (2004) later reinforced the findings of Moreira et al. (2001) and demonstrated an increased proportion of cows with high progesterone concentrations at initiation of Ovsynch (59 vs. 72 %) and improved PR (37.5 vs. 46.8 %) regardless of cyclic status prior to initiation of the program. Because of the convenience of giving injections on the same day of the week, many producers have opted for administering the $\text{PGF}_{2\alpha}$ injections of the presynchronization protocol on the same day of the injections of the Ovsynch protocol, which results in an interval between presynchronization and initiation of Ovsynch of 14 d. Work at the University of Wisconsin (Navanukraw

et al., 2004) clearly demonstrated that a 14-d interval between presynchronization and initiation of the TAI was beneficial to PR; however, in all these studies (El-Zarkouny et al., 2004; Moreira et al., 2001; Navanukraw et al., 2004) cows assigned to the control groups did not receive PGF_{2α} during the postpartum period, which is known to improve uterine health and fertility of dairy cows. Furthermore, although presynchronizing cows 14 d before initiating the Ovsynch improved PR compared with no presynchronization (Navanukraw et al., 2004), the interval is not optimal and results in poor ovulation rate to the initial GnRH of the Ovsynch (Chebel et al., 2006; Galvão et al., 2007a).

Recently, Galvão et al. (2007a) demonstrated that reducing the interval between presynchronization and TAI from 14 to 11 d increased ovulation rate to the initial GnRH of the TAI protocol and PR (Table 3).

Alternative presynchronization methods

Presynchronization with PGF_{2α} is only effective in cyclic cows (Moreira et al., 2001). Because the prevalence of anovular cows is high in the first 60 d postpartum (Santos et al., 2008), it is possible that methods that incorporate GnRH or progesterone might benefit cows prior to first AI.

Two experiments evaluated the impact of CIDR containing progesterone during presynchronization on subsequent reproductive responses to the Ovsynch protocol (Bicalho et al., 2007; Chebel et al., 2006). Bicalho et al. (2007) initiated the Ovsynch protocol 14 d after presynchronization using PGF_{2α} in combination or not with CIDR. Although the CIDR improved the proportion of cows having high progesterone concentration at the initiation of Ovsynch, it did not increase PR at first AI (CIDR = 34.5 vs. Control = 36.4 %). Chebel et al. (2006) utilized a similar design, but cows in estrus after the second PGF_{2α} of the presynchronization were inseminated and those cows not in estrus received the Ovsynch protocol 13 d later. Although cows receiving CIDR were more likely to be detected in estrus, their PR were similar regardless of whether inseminated in estrus or following the Ovsynch protocol (Chebel et al., 2006). For cows receiving Ovsynch, ovulation to the initial GnRH was reduced when presynchronized with CIDR (CIDR = 52.9 vs. Control = 72.3 %), which might explain the lack of positive effects on pregnancy. Because of the pattern of estrous expression for cows receiving CIDR during presynchronization, it is likely that initiation of the TAI should be approximately 10 d after insert removal to optimize ovulation and pregnancy.

Rutigliano et al. (2008) evaluated 2 presynchronization programs prior to the Ovsynch protocol for first AI. Cows received the Presynch with 2 injections of PGF_{2α} 14 d apart, with the second injection given 12 d prior to the first GnRH of the Ovsynch protocol. The alternative presynchronization included CIDR for 7 d with an injection of PGF_{2α} at insert removal and initiation of the Ovsynch protocol 3 d later (CIDR-Presynch). Although method of presynchronization altered ovulatory responses to the first GnRH of the Ovsynch and increased double ovulation, PR and pregnancy loss were similar between the two treatments (Table 4). Although speculative, it is possible that starting the Ovsynch during proestrus, which improved ovulation to the initial GnRH as in the case of CIDR-Presynch, may not be optimum for fertility because it results in insemination of cows ovulating to a first follicular wave follicle.

Recent data from Bello et al. (2006) demonstrated that cows receiving GnRH 2 d after induced luteolysis had greater response to the initial GnRH of the Ovsynch protocol that was initiated 6 d later. Furthermore, their study demonstrated that synchronization of ovulation to the Ovsynch protocol was improved when the initial GnRH injection of Ovsynch was administered 8 d after induced luteolysis or 6 d after a previous GnRH injection (Bello et al., 2006). Galvão et al. (2007a) evaluated the use of GnRH given 7 d prior to initiation of the TAI protocol, when GnRH was given 4 d after Presynch and observed no benefit to pregnancy at first postpartum AI. Similarly, Peters and Pursley (2002) found no benefit from presynchronizing cows with PGF_{2α} followed 3 d later by GnRH and initiating the Ovsynch 7 d after the GnRH (Tables 3 and 5).

Timing of induction of ovulation and insemination in TAI programs

Timing of induction of ovulation after luteolysis and subsequent interval to insemination in TAI protocols influences PR. Pursley et al. (1998) observed that PR were reduced when cows were inseminated 32 h after the GnRH injection, and maximum pregnancy and calving rates were observed when cows received TAI 16 h after the final GnRH injection of the Ovsynch (Figure 3). However, insemination of lactating dairy cows 16 h after the final GnRH requires management of cattle twice the same day, which often is seen as inconvenient and resisted by dairy producers. Because of such restriction, Portaluppi and Stevenson (2005) evaluated modifications of Ovsynch and observed increased pregnancy and calving rates, as well as reduced pregnancy loss when cows received the final GnRH and TAI at 72 h after PGF_{2α} compared with cows that received the final GnRH 48 h after the PGF_{2α} and were TAI either at 48 or 72 h. However, recent studies by others have not observed differences in PR when cows were subjected to the Cosynch protocol either at 48 or 72 h (Brusveen et al., 2006; DeJarnette and Marshall, 2003; Sterry et al., 2007).

Preliminary work from Brusveen et al. (2006) suggested that maintaining an interval of 16 h between induction of ovulation with GnRH, when GnRH is given at 56 h after luteolysis, and TAI optimizes PR in presynchronized cows at first AI and resynchronized cows (Table 6).

Insemination or not during presynchronization

A common program adopted on many farms in the US is to administer 2 PGF_{2α} injections at 14 d interval, with the second injection given at approximately 50 to 55 d postpartum. Cows are then inseminated following the second injection, and those not inseminated in the following 11 d are enrolled in the TAI protocol. Because 45 to 55 % of the cows display estrus and are inseminated following the second PGF_{2α} of the presynchronization, these cows end up receiving their first AI early in the postpartum period. Studies have demonstrated that response to TAI programs improves as the lactation progresses up to 70 to 90 d postpartum (Pursley et al., 1997a; Tenhagen et al., 2003). Cows inseminated at estrus following the presynchronization have smaller CR than those inseminated after the completion of the entire program (presynchronized TAI), 3 weeks later (Bruno et al., 2005; Chebel et al., 2006). However, insemination of cows at estrus during presynchronization reduces the interval to first AI and costs associated with hormones and labor.

In an attempt to evaluate whether cows should be inseminated following presynchronization or subjected to TAI, Chebel et al. (2005, 2006) assigned 1,019 Holstein cows to a presynchronization with PGF_{2α} (control) or PGF_{2α} and CIDR (CTAI and CED). All cows received 2 injections of PGF_{2α} on d 35 ± 7 and 49 ± 7 after calving. Cows in CTAI and CED received a CIDR on d 42 ± 7. After the second PGF_{2α} and CIDR removal on d 49 ± 7, cows were observed for estrus, but only control and CED were inseminated. On d 62 ± 7 control and CED cows not inseminated in estrus and all CTAI received Ovsynch and were TAI on d 72 ± 7. Cows in control and CED had smaller CR than CTAI on d 31 after the first AI; however, because they were inseminated on average 2 weeks earlier, median d open for the first 300 d postpartum were similar between CED and CTAI (Figure 4). These results suggest that insemination of cows after the second PGF_{2α} of the presynchronization results in smaller CR, but because cows are inseminated earlier, DO are not affected. This gives flexibility to producers that might decide to inseminate cows that display estrus after the second PGF_{2α} of the presynchronization, or inseminate all cows at TAI. The first option reduces costs with treatments, but the latter optimizes first service CR, with both resulting in similar time to pregnancy. Of course, estrous detection efficiency of the herd would be an important factor for success of the estrous detection based program (Tenhagen et al., 2004).

It is important to emphasize that in order for systematic breeding programs to work, there must be high compliance at every step of the program. Each individual farm has to develop a system to assure that cows receive the correct hormonal treatment on the correct day. Failure to comply with the programs results in reduced insemination rate and CR. Because some programs require handling of cows multiple times to administer hormonal treatments, it is important that they be tailored to the needs of the farm, as long as critical steps are not ignored.

Resynchronization of nonpregnant cows

Resynchronization of nonpregnant cows is required if optimum pregnancy rates are to be achieved. At any given AI, only 30 to 45% of the inseminated cows are pregnant at 40 d after insemination, and the remainder needs to be reinseminated as quickly as possible. Protocols for resynchronizing cows may rely on increasing display of estrus for insemination of cows upon detection of a synchronized estrus, or they may utilize methods to control ovulation such that nonpregnant cows are enrolled in a timed AI program.

The use of CIDR devices was first introduced in New Zealand as a tool to deliver progesterone for estrous synchronization and induction of cyclicity in cattle. Resynchronization of lactating dairy cows with CIDR can be achieved by insertion of the device on d 14 after AI and removal 7 days later. This protocol resulted in increased return to estrus in nonpregnant cows in some (Chenault et al., 2004), but not all studies (Chebel et al., 2006), with mixed results on conception rates. In herds capable of reinseminating more than 55% of the nonpregnant cows prior to pregnancy diagnosis, it is unlikely that the use of the CIDR will improve reinsemination rates and reduce time to pregnancy.

Another strategy is to initiate the synchronization program before diagnosis of nonpregnancy. Treatment with GnRH 7 d prior to pregnancy diagnosis allows for faster reinsemination of nonpregnant cows when no estrous detection is implemented. Chebel et al. (2003) evaluated conception rates in 585 Holstein cows on two dairy farms assigned to resynchronization with GnRH 7 d prior to pregnancy diagnosis or at the moment of diagnosis of nonpregnancy. Nonpregnant cows were time-inseminated following the Ovsynch program. Cows that displayed estrus during the study were inseminated in the same day. The authors demonstrated that treatment with GnRH on d 21 after the pre-enrollment AI reduced detection of estrus in the next 7 d, but allowed for reinsemination of nonpregnant cows within 3 days of nonpregnancy diagnosis with no effect on conception rates during the pre-enrollment or resynchronized AI. Fricke et al. (2003) demonstrated that resynchronization of cows of unknown pregnancy status with GnRH 7 d prior to pregnancy diagnosis should not begin on day 19 after the initial AI. In that study, resynchronized pregnancy rates were smaller for cows initiating the timed AI on d 19 than 26 after the initial AI.

Recently, Galvão et al. (2007b) evaluated different methods to resynchronize estrus and ovulation in dairy cows with use of CIDR, ECP and GnRH given 7 d prior to diagnosis of nonpregnancy. Holstein cows were assigned to 1 of 3 treatments, Control (n = 167), resynchronization with a timed AI protocol upon diagnosis of nonpregnancy on d 31 after pre-enrollment AI, CIDR-G (n = 159), use of an intravaginal progesterone insert from d 14 to 21 after AI, with AI at estrus from d 21 to 24 and initiation of a timed AI protocol on d 24 after AI in cows not reinseminated; and CIDR-G + ECP (n = 169), same treatment as CIDR-G but with an injection of 1 mg of estradiol cypionate at the time of progesterone insert removal. Cows were continuously reenrolled in the same treatment until diagnosed pregnant, which resulted in a total of 1,148 AI. Conception rates for the pre-enrollment and resynchronized AI were similar among treatments. More importantly, the interval from study enrollment to pregnancy was not different among treatments, which indicate that reproductive performance of dairy cows did not differ among the 3 resynchronization treatments evaluated. Lack of positive effects from the more aggressive resynchronization programs were probably the result of the high estrous detection rate (60%) in Control cows. Therefore, it is likely that methods to expedite reinsemination of nonpregnant cows will only improve reproductive performance in herds with poor estrous detection.

Advantages of systematic breeding programs and concluding remarks

The reproductive program on a dairy herd should be simple to implement, robust, and result in predictable reproductive performance. Most farms, particularly large dairy herds, avoid complicated programs that require several handlings of cows to synchronize estrus or ovulation and deliver the AI. Producers are reluctant to handling cows more than once a day because of the perceived loss in production due to disturbances of normal cow activities. On the other hand, programs that are not properly implemented, in which convenience prevails over biology, can result in mediocre reproductive results. As herd size increases and more cows are confined to concrete, the efficiency of estrous detection declines. Furthermore, as we select animals to greater milk production, their ability to display signs of estrus is reduced (Lucy, 2006; Wiltbank et al., 2006). These combined effects of environment and animal biology

limit our ability to detect estrus and inseminate cows. This has forced producers to implement ovulation synchronization programs to assist in alleviating problems with suboptimal estrous detection.

Controlled breeding programs have allowed dairy producers to optimize service rate with little impact on conception and pregnancy losses in lactating dairy cows. In herds in which 21-d estrous detection rate is high (> 60%), implementation of timed AI protocols is expected to have little if any impact on reproductive efficiency, except during the first postpartum AI. Because pregnancy rate at first postpartum AI explains most of the variation in the calving interval, implementation of controlled breeding programs is expected to have the greatest impact during the first postpartum AI, when the entire herd is eligible to be inseminated. However, protocols that maximize returns to estrus and re-insemination of nonpregnant cows should optimize pregnancy rate and overall reproductive efficiency. Combining sequential injections of PGF_{2α} with timed AI programs, such as in the Presynch/Ovsynch program, gives producers the flexibility to inseminate cows at estrus, but it assures that all cows will be first inseminated at a given day postpartum. Furthermore, by presynchronizing the estrous cycle of cows, response to timed AI is optimized.

Literature cited

Bello, N. M., J. P. Steibel, and J. R. Pursley. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89:3413-3424.

Bicalho, R. C., S. H. Cheong, L. D. Warnick, and C. L. Guard. 2007. Evaluation of progesterone supplementation in a prostaglandin F_{2α}-based presynchronization protocol before timed insemination *J. Dairy Sci.* 90:1193-1200.

Brusveen, D. J., A. P. Cunha, C. D. Silva, P. M. Cunha, R. A. Sterry, E. P. B. Silva, J. N. Guenther, and M. C. Wiltbank. 2006. Effects on conception rates of lactating dairy cows by altering the time of the second GnRH and AI during Ovsynch. *J. Dairy Sci.* 89(Suppl. 1):150. (Abstr.)

Bruno, R.G.S., H.M. Rutigliano, R.L.A. Cerri, and J.E.P. Santos. 2005. Effect of addition of a CIDR insert prior to a timed AI protocol on pregnancy rates and pregnancy losses in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88(Suppl. 1):87. (Abstr.)

Caraviello, D. Z., K. A. Weigel, P. M. Fricke, M. C. Wiltbank, M. J. Florent, N. B. Cook, K. V. Nordlund, N. R. Zwald, and C. L. Rawson. 2006. Survey of management practices on reproductive performance of dairy cattle on large US commercial farms. *J. Dairy Sci.* 89:4723-4735.

Cerri, R.L.A., H.M. Rutigliano, R.G.S. Bruno, and J.E.P. Santos. 2008a. Progesterone concentration, follicular development and induction of cyclicity in dairy cows receiving intravaginal progesterone inserts. *Anim. Reprod.* 109: in press. *Sci. in press* doi:10.1016/j.anireprosci.2007.12.005.

Cerri, R.L.A., H.M. Rutigliano, R.C. Chebel, and J.E.P. Santos. 2008b. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. *Reproduction* 136: in press (Accepted September)

Chenault, J. R., J. F. Boucher, K. J. Dame, J. A. Meyer, and S. L. Wood-Follis. 2003. Intravaginal progesterone insert to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:2039-2049.

Chebel, R.C., J.E.P. Santos, S.O. Juchem, R.L.A. Cerri, K.N. Galvão, and W.W. Thatcher. 2003. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on conception rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology* 60:1389-1399.

Chebel, R. C., H. M. Rutigliano, R. L. A. Cerri, R. G. S. Bruno, and J. E. P. Santos. 2005. Economic evaluation of pre-synchronization and resynchronization protocols in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88(Suppl. 1):46. (Abstr.)

- Chebel, R. C., J. E. P. Santos, R. L. A. Cerri, H. M. Rutigliano, and R. G. S. Bruno. 2006. Reproduction in dairy cows following progesterone insert presynchronization and resynchronization protocols. *J. Dairy Sci.* 89:4205-4219.
- DeJarnette, J. M, and C. E. Marshall. 2003. Effects of pre-synchronization using combinations PGF_{2α} and (or) GnRH on pregnancy rates of Ovsynch- and Cosynch-treated lactating Holstein cows. *Anim. Reprod. Sci.* 77:51-60.
- De Vries, A. 2006. Economic value of pregnancy in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89:3876-3885.
- El-Zarkouny, S.Z., J.A. Cartmill, B.A. Hensley, and J.S. Stevenson. 2004. Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone. *J. Dairy Sci.* 87: 1024-1037.
- Ferguson, J. D., and D. T. Galligan. 1993. Reproductive programs in dairy herds. In *Proc. Centr. Vet. Conf.* pp. 161-178.
- Fricke, P. M., D. Z. Caraviello, K. A. Weigel, and M. L. Welle. 2003. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *J. Dairy Sci.* 86:3941-3950.
- Galvão, K.N. M.F. Sá Filho, and J.E.P. Santos. 2007a. Reducing the interval from presynchronization to initiation of timed AI improves fertility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90:4212-4218.
- Galvão, K.N. J.E.P. Santos, R.L. Cerri, R.C. Chebel, H.M. Rutigliano, R.G. Bruno, and R. C. Bicalho. 2007b. Effect of methods of resynchronization of lactating cows of unknown pregnancy status on reproductive performance. *J. Dairy Sci.* 90: 4240-4252.
- Hillegass, J., F.S. Lima, M.F. Sá Filho, and J. E. P. Santos. 2008. Effect of time of AI and supplemental estradiol on reproduction of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91: in press (accepted July 27, 2008).
- Lucy, M. C. 2006. Estrus: basic biology and improving estrous detection. In *Proc. Dairy Cattle Reproduction Council Conference*, November 6 to 8, Denver, CO, pp. 29-37.
- Moreira F., C. Orlandi, C. A. Risco, R. Mattos, F. Lopes, and W. W. Thatcher. 2001. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84:1646-1659.
- Navanukraw C., D. A. Redmer, L. P. Reynolds, J. D. Kirsch, A. T. Grazul-Bilska, and P. M. Fricke. 2004. A modified presynchronization protocol improves fertility to timed artificial insemination in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:1551-1557.
- Peters M. W., and J. R. Pursley. 2002. Fertility of lactating dairy cows treated with Ovsynch after presynchronization injections of PGF_{2α} and GnRH. *J. Dairy Sci.* 85:2403-2406.
- Portaluppi, M. A., and J. S. Stevenson. 2005. Pregnancy rates in lactating dairy cows after presynchronization of estrous cycles and variations of the Ovsynch protocol. *J. Dairy Sci.* 88:914-921.
- Pursley, J.R., R. W. Silcox, and M. C. Wiltbank. 1998. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81:2139-2144.
- Pursley, R. J., M. C. Wiltbank, J. S. Stevenson, J. S. Ottobre, H. A. Garverick, and L. L. Anderson. 1997a. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. *J. Dairy Sci.* 80:295-300.

- Pursley, J. R., M. R. Kosorok, and M. C. Wiltbank. 1997b. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J. Dairy Sci.* 80:301-306.
- Rutigliano, H.M., F.S. Lima, R.L.A. Cerri, L.F. Greco, J.M. Villela, V. Magalhães, F.T. Silvestre, W.W. Thatcher, and J.E.P. Santos. 2008. Effects of method of presynchronization and source of selenium on uterine health and reproduction in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 91:3323–3336.
- Santos, J.E.P., H.M. Rutigliano, and M.F. Sá Filho. 2008. Risk factors for resumption of postpartum cyclicity and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 109: in press. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.01.014.
- Sterry, R. A., P. J. Jardon, and P. M. Fricke. 2007. Effect of timing of Cosynch on fertility of lactating Holstein cows after first postpartum and Resynch timed-AI services. *Theriogenology* 67:1211-1216.
- Stevenson, J.S. 2006. Synchronization strategies to facilitate artificial insemination in lactating dairy cows. In *Proc. Dairy Cattle Reproduction Council Conference*, November 6 to 8, Denver, CO, pp. 39-50.
- Thatcher, W. W., F. Moreira, J. E. P. Santos, R. C. Mattos, F. L Lopes, and S. M. Pancarci. 2001. Effects of animal drugs on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55:75-89.
- Tenhagen, B. A., C. Vogel, M. Drillich, G. Thiele, and W. Heuwieser. 2003. Influence of stage of lactation and milk production on conception rates after timed artificial insemination following Ovsynch. *Theriogenology* 60:1527-1537.
- Tenhagen, B. A., M. Drillich, R. Surholt, and W. Heuwieser. 2004. Comparison of timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: reproductive and economic considerations. *J. Dairy Sci.* 87:85-94.
- Vasconcelos, J. L. M., R. W. Silcox, G. J. Rosa, J. R. Pursley, and M. C. Wiltbank. 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 52:1067-1078.
- Wiltbank, M., H. Lopez, R. Sartori, S. Sangsritavong, A. Gumen. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65:17-29.
- Yaniz, J. L., P. Santolaria, A. Giribet, and F. Lopez-Gatius. 2006. Factors affecting walking activity at estrus during postpartum period and subsequent fertility in dairy cows. *Theriogenology* 66:1943-1950.

Table 1. Calculation of reproductive indices at different days in milk (DIM)

DIM	Eligible cows	Detected in estrus	Estrous detection, %	Pregnant	Conception rate, %	Pregnancy rate, %
51 – 71	100	50	50.0	20	40.0	20.0
72 – 92	80	50	62.5	20	40.0	25.0
93 – 113	60	30	50.0	10	33.3	16.7
114 – 134	50	25	50.0	9	36.0	18.0
Total	290	155	53.5	59	38.1	20.3

Table 2. Effect of artificial insemination protocol on embryos recovered from uterine flushings at d 6 after AI¹

	Treatment ²			
	DE	OV3	OV6	OVE
Percent excellent and good structures ^b	61.0	40.0	72.0	65.9
Percent excellent and good embryos ^a	71.4	47.0	83.7	74.3
Number of blastomeres ^a	42.3+3.4	29.7+3.4	42.5+3.3	44.1+3.2
Proportion of live blastomeres ^b	94.3+2.2	90.1+2.4	97.7+2.1	97.6+2.0

¹ Adapted from Cerri et al. (2008b).

² Detected estrus (DE) = GnRH on d 6 of the estrous cycle, followed by PGF_{2α} 7 d later and AI at estrus; Ovsynch (GnRH, followed by PGF_{2α} 7 d later, then 2 d later GnRH followed by a timed AI 12 h later) as OV3, OV6 and OVE, which correspond to the injection of the first GnRH on d 3, 6 and 6 of the estrous cycle, respectively, but OVE also received an injection of 0.5 mg of estradiol cypionate 36 h before the timed AI.

^aP<0.01, ^bP<0.05

Table 3. Effect of presynchronization treatment on ovulatory responses to the first GnRH of the timed AI, pregnancy per AI and pregnancy loss in dairy cows¹

	Presynchronization ²			P ³	
	14 d	11 d	11 d & GnRH	Interva l	GnRH
Ovulation to 1st GnRH ⁴	----- % (no. cows) -----				
Overall	44.7 (340)	61.4 (337)	62.2 (323)	<0.001	0.28
Cows with CL	37.2 (274)	54.4 (250)	59.7 (285)	<0.001	0.29
Cows without CL	75.8 (66)	81.6 (87)	81.6 (38)	0.34	0.99
Pregnant					
D 38	33.5 (412)	40.5 (410)	39.8 (392)	0.02	0.60
D 66	30.2 (410)	36.4 (409)	36.2 (392)	0.04	0.70
Pregnancy loss					
D 38 to 66	8.8 (136)	9.7 (165)	9.0 (156)	0.88	0.85

¹ Adapted from Galvão et al. (2007a).

² 14 d = two injections of PGF_{2α} at 37 and 51 DIM, then enrolled in the timed AI 14 d later; 11 d = two injections of PGF_{2α} at 40 and 54 DIM, then enrolled in the timed AI 11 d later; 11 d + GnRH = same as 11 d, but with an injection of GnRH 7 d before the first GnRH of the timed AI.

³ Interval = contrast for the effect of 14 vs. 11 d interval (14 d vs. 11 d + 11 d & GnRH); GnRH = contrast for the effect of GnRH 7 d before initiation of timed AI (11 d vs. 11 d & GnRH).

⁴ Ovulation to GnRH was evaluated in cows with or without a CL on the day of treatment.

Table 4. Effect of method of presynchronization on reproductive responses of dairy cows subjected to Ovsynch¹

	Presynchronization ²		P
	Presynch	CIDR-Presynch	
Cows	255	240	
Ovulation during Ovsynch			
First GnRH, %	57.8	73.2	< 0.001
Final GnRH, %	84.9	83.3	0.85
Double ovulation ³ , %	9.0	18.7	0.005
Pregnancy rate, %			
D 28	32.6	32.9	0.90
D 56	25.6	26.3	0.90
Pregnancy loss, %			
D 28 to 56	20.7	20.3	0.59

¹ Adapted from Rutigliano et al. (2008).

² Presynch = two injections of 25 mg of PGF_{2α} at 37 and 51 d postpartum and the Ovsynch program started 12 d later; CIDR-Presynch = cows received an intravaginal insert containing 1.38g of progesterone from 53 to 60 d postpartum with an injection of PGF_{2α} at insert removal and the Ovsynch protocol started 3 d later.

³ Percentage of cows responding to the final GnRH injection of the Ovsynch protocol that ovulated two follicles within 48 hours of treatment.

Table 5. Effect of presynchronization with PGF_{2α} and GnRH before Ovsynch on pregnancy rates of dairy cows

Reference	Presynchronization ¹		P
	Control	PGF-GnRH	
	----- % (no. cows) -----		
Peters and Pursley (2002)	38.3 (209)	41.5 (218)	0.87
Bello et al. (2006)	27 (26)	50 (26)	0.08

¹ Control = no presynchronization before Ovsynch; PGF-GnRH = cows received an injection of PGF_{2α} followed 3 d later by an injection of GnRH and the Ovsynch was initiated either 7 d later (Peters and Pursley, 2002), or cows received an injection of PGF_{2α} followed 2 d later by an injection of GnRH and the Ovsynch was initiated either 6 d later (Bello et al., 2006).

Table 6. Effect of timing of induction of ovulation and AI after induced luteolysis on pregnancy rates of dairy cows

Reference	Cosynch ¹				P
	48 h	60 h	72 h	Ovsynch ²	
	----- % (no. cows) -----				
DeJarnette and Marshall (2003)	----	22.0 (173)	----	28.6 (175)	0.16
Portaluppi and Stevenson (2005)	22.8b (224)	----	31.4a (220)	23.5b (221)	0.05
Hillegass et al. (2008)	44.0 (486)	----	44.7 (485)	----	0.27
Brusveen et al. (2006) presynchronized AI	37.8	----	27.5	45.2	ND ³
Brusveen et al. (2006) resynchronized AI	23.6	----	27.3	33.1	ND
Sterry et al. (2006) presynchronized AI	29.5 (146)	----	36.9 (206)	----	0.13
Sterry et al. (2006) resynchronized AI	28.0 (236)	----	29.7 (222)	----	0.93

¹ Cows received the final GnRH and timed AI either at 48, 60, or 72 h after induced luteolysis.

² Cows received the final GnRH either at 48 (Portaluppi and Stevenson, 2005) or 56 h (Brusveen et al., 2006) after induced luteolysis and timed AI was performed 72 h after induced luteolysis.

³ Not described in the study.

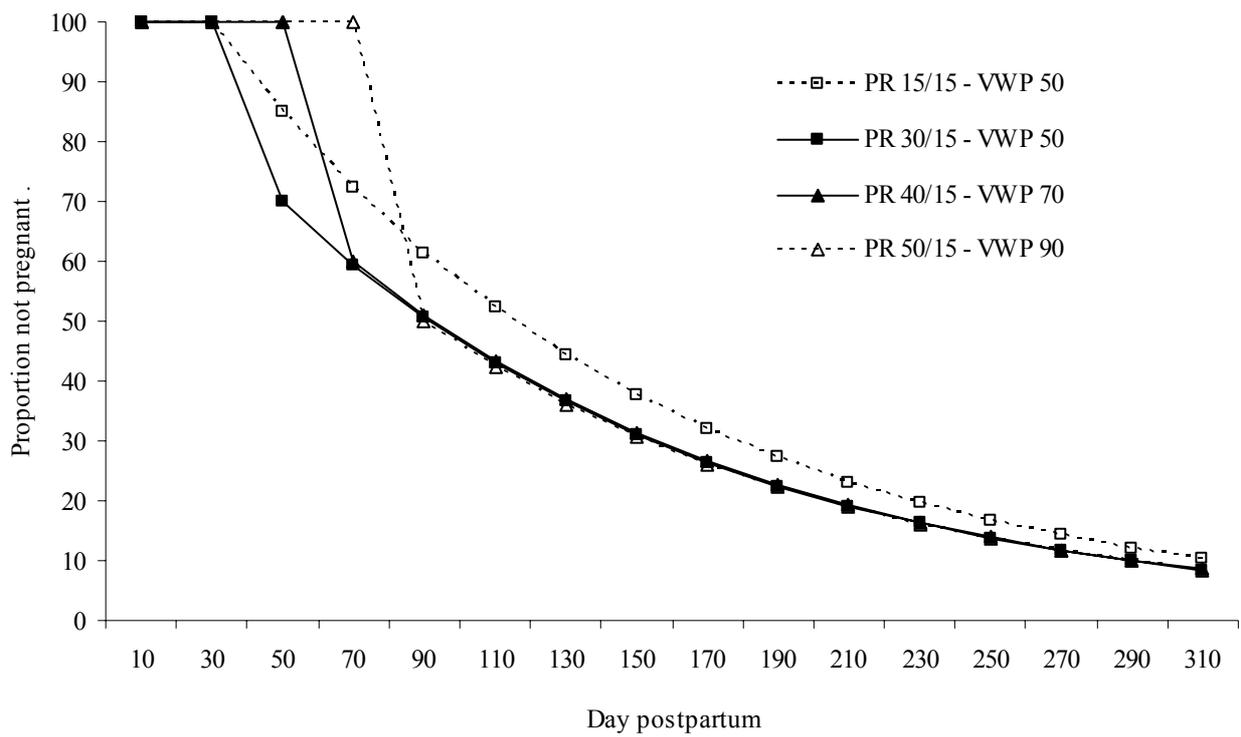
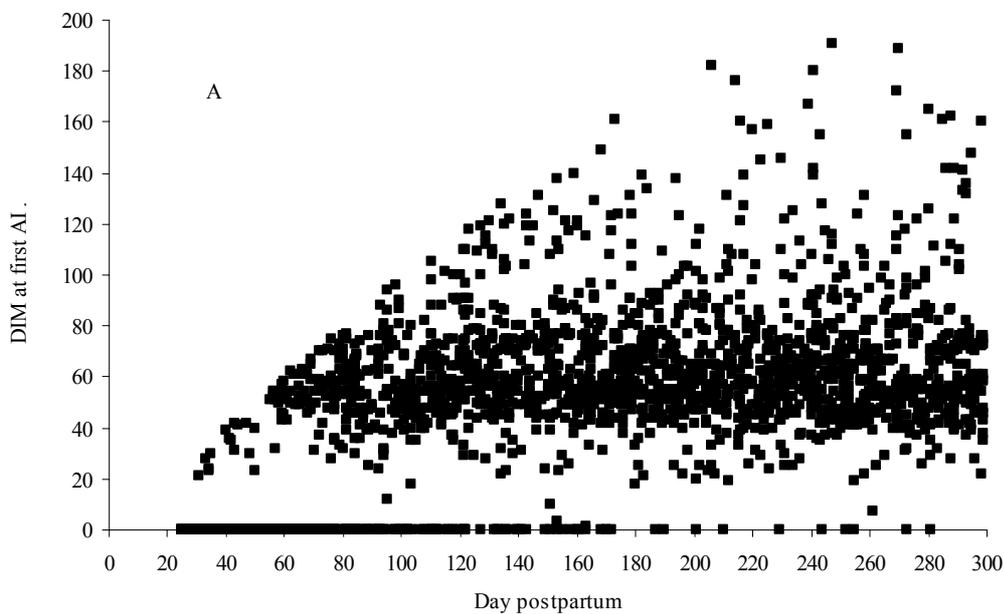


Figure 1. Impact of voluntary waiting period and 1st AI conception rate on days open. Legend indicates the pregnancy rate (PR) at first and subsequent AI (30/15 = 30 % at first AI, and 15 % thereafter) and the voluntary waiting period of 50, 70 or 90 d postpartum.



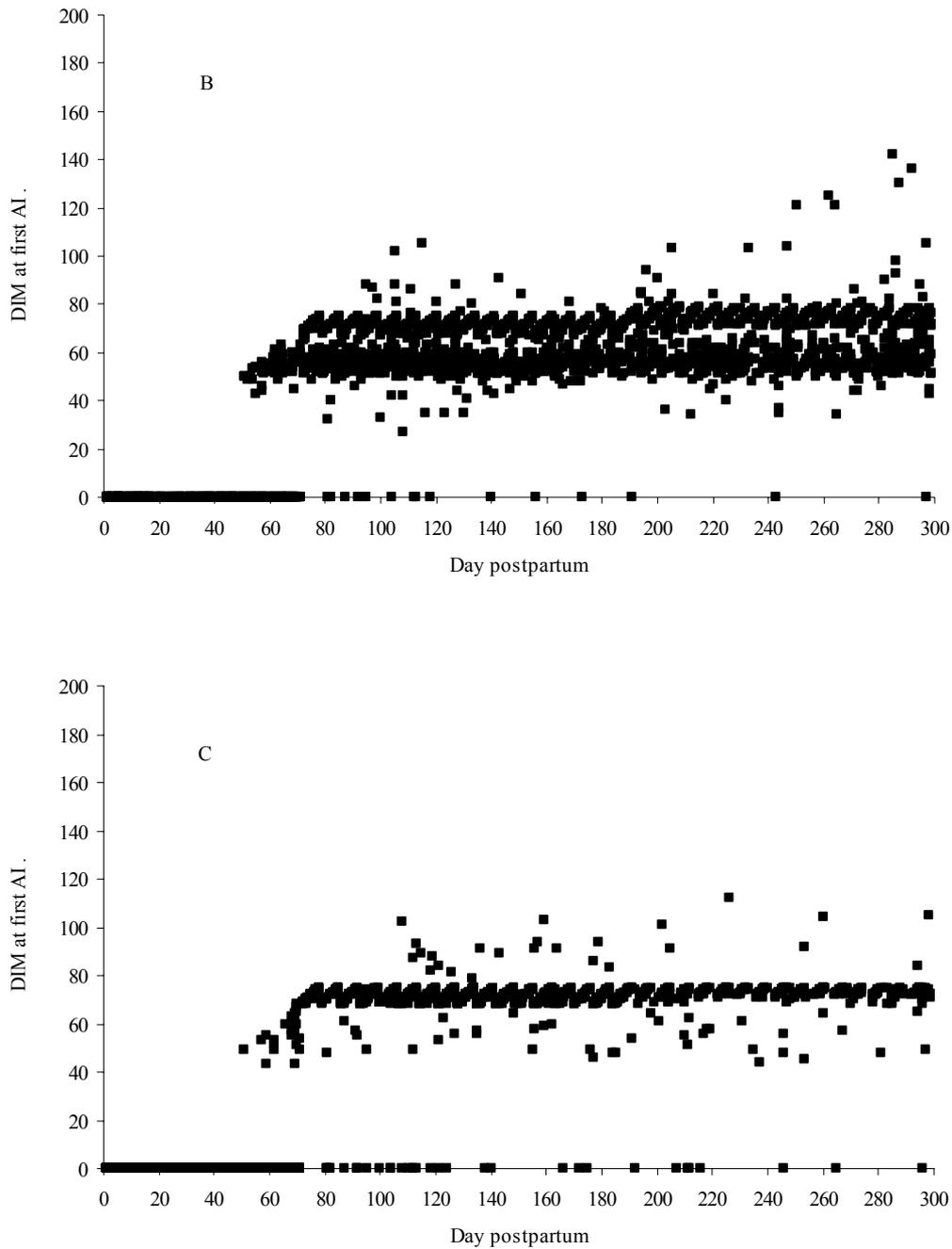


Figure 2. Scatter graphs of days in milk (DIM) at first AI relative to current day postpartum for cows in three dairy herds. Each square represents one or more cows. Squares on the x axis represent cows that have not received AI.

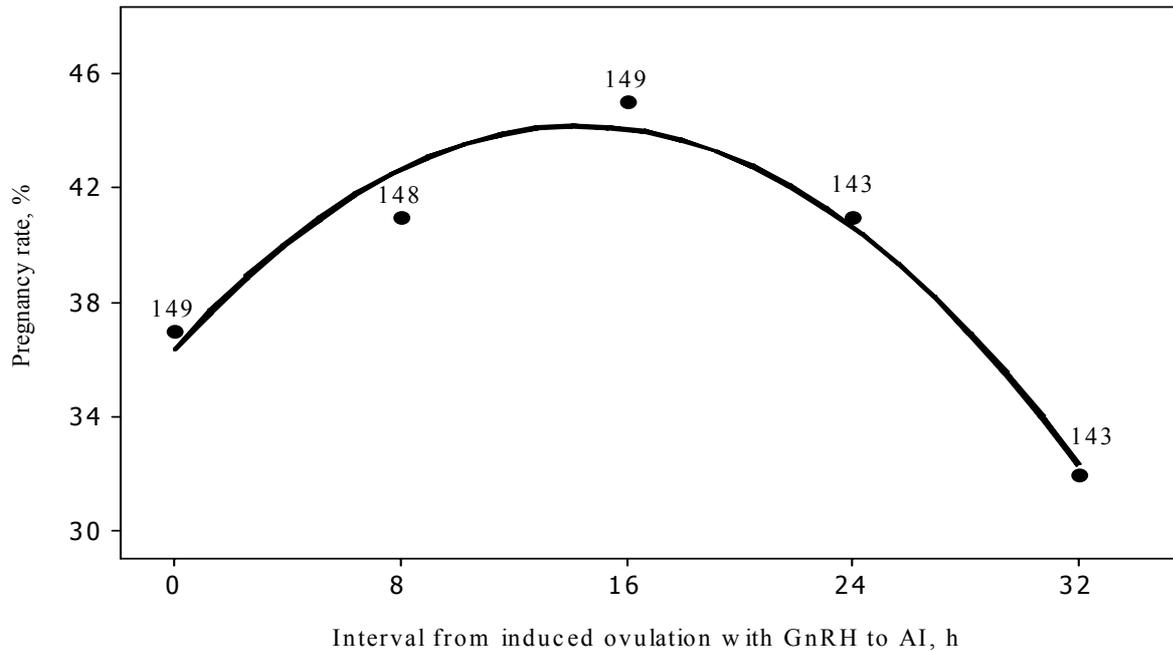


Figure 3. Pregnancy rates in cows time-inseminated at different intervals from induced ovulation with GnRH. Values represent number of cows in each treatment (adapted from Pursley et al., 1998).

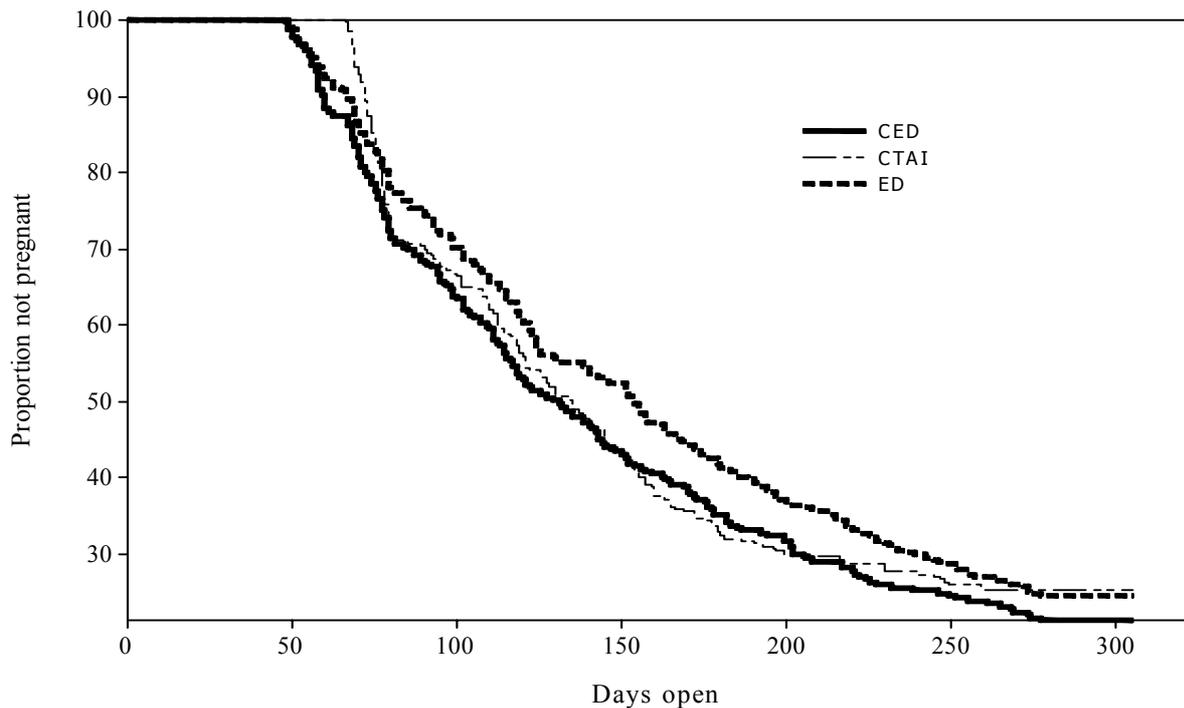


Figure 4. Survival curves for time to pregnancy in cows subjected to different insemination protocols for first AI. Median days open were 154, 131, and 135 for control, estrous detection with CIDR (CED), and timed AI with CIDR (CTAI), respectively (Adapted from Chebel et al., 2005).

Sexing Bovine Sperm

John L. Schenk
ABS Global, Inc.
1525 River Road
DeForest, WI 53532, USA

Abstract

Low dose inseminates containing sexed sperm are commercially available in numerous countries from licensed manufacturers and genetic company distributors. Sex separation of sperm using a flow cytometer is the only proven, repeatable and reliable method available. Other methods claiming to separate sperm by sex without causing severe damage have proven unsuccessful. The current technology has been described as costly, complex and results in lowered pregnancy rates than with unsexed sperm. Nevertheless, due to recent and rapid commercialization of the technology, and strong demand mostly from the global dairy industry and to a lesser extent the beef industry, the sexed sperm market share is growing. Herein, I will discuss the current benefits and limitations of sexed sperm. Appreciation of this product is mandated when determining “if” and “how” to apply sexed sperm successfully in a breeding program.

Introduction

Today’s commercialized sperm sex separation technology was pioneered by United States Department of Agriculture (USDA) researchers (Johnson et al., 1987) and subsequently patent protected by the United States government. This technology was licensed by the USDA to the Colorado State University Research Foundation (Fort Collins, Colorado) and then XY Inc., which supported additional research and future technology development, primarily in cattle in conjunction with university researchers. Many fundamental areas of bovine sperm research were investigated, and promising laboratory results required field-testing (Seidel et al., 1999; Schenk and Seidel, 2007; Seidel and Schenk, 2008 and; Schenk et al., 2008).

Sperm sex separation by flow cytometry is an effective means to skew the sex ratio to either sex; it remains the only reliable, repeatable, and proven sperm sex-selection method available, that results in live healthy and reproductively functional offspring (Tubman et al., 2004). Perhaps the most serious limitation of the current technology for widespread commercial use is that it takes considerable time to sex sufficient numbers of sperm needed to supply the overwhelming demands of the current global marketplace. Sperm are analyzed and sexed one at a time, serially, rather than sexing multiple sperm simultaneously (in parallel). Another constraint is that sexing works best with fresh sperm, so sorters usually are placed near the bulls, and sperm are cryopreserved after the sexing process. Concepts for mass separation of sperm have been proposed and continue to be evaluated. Unfortunately, none has been identified that meets two essential criteria: accuracy of sexing and retention of potential sperm fertilizing ability.

Sperm Sexing Procedures

Current sperm sorting methods are described in detail by Seidel and Garner (2002). The techniques used are well known, scientifically sound, and work for nearly all mammalian species including humans. The basic principle is that almost exactly half of mammalian sperm in any ejaculate have an X-chromosome and produce females, while the other half have a Y-chromosome and produce males. X-chromosome bearing sperm contain more DNA than the Y-chromosome bearing sperm (about 4% more for cattle). Except for this chromosomal difference, no discernible difference between X- and Y-sperm has been identified to date.

The flow cytometer/sperm sorter is complex, relatively expensive and requires highly trained personnel to operate. These instruments are capable of evaluating thousands of sperm per second. However, this

sorting speed remains too slow relative to the needs for routine sperm packaging rates used in bovine artificial insemination (AI). Therefore, for sexed sperm to be practical and offered commercially, fewer sperm are placed in each insemination dose than used normally.

Separation of sperm by flow cytometry involves staining sperm with the vital dye, Hoechst 33342. Pressure is used to push fluid containing stained sperm through the flow cytometer as a fine stream, and then sperm are interrogated at 351 and 364 nm with an argon laser; detection of the differing DNA content between X- and Y-chromosome-bearing sperm then is determined by two photon-detectors placed at right angles to one another (Seidel and Garner 2002). As the stream of fluid exits the flow cytometer, it is broken into tiny droplets (70 micron) by a vibrating crystal, forming approximately 70,000 to 80,000 droplets per second. About one-third of the droplets contain a sperm and about two-thirds do not contain any sperm. Opposing electrical charges are applied to droplets containing X- or Y-chromosome-bearing sperm. If the droplet contains no sperm, multiple sperm, membrane compromised sperm, or sperm that are indistinguishable relative to DNA content; no charge is placed on the droplet. Droplets free-fall at a velocity of 80 km/h when they exit the flow cytometer nozzle and pass through an electric field. Since opposite electrical charges attract each other, X- and Y-chromosome bearing sperm are deflected in opposite directions. Those droplets without an electrical charge pass directly through the electric field. Thus, three streams of droplets are produced, thereby separating the X- from the Y-sperm and removing unwanted or unidentifiable sperm from the initial population.

In practice, 4,000 to 5,000 sperm of each sex can be separated per second at ~ 90% accuracy. Both X- and Y-sperm can be sorted at the same time if desired. There is however, considerable variability in sorting speed due to the individual bull or ejaculate. There also are sperm losses in processing after sorting (Seidel and Garner, 2002), and only about 75% of the sorted sperm are packaged in straws for cryopreservation. Thus, the number of usable X- and Y-sperm produced per hour at 90% accuracy is approximately 11 to 14 million sperm of each sex, which is about the sperm package rate for one conventional dose of semen of each sex. Very importantly, for some ejaculates from some bulls this rate is considerably less and for others significantly more.

Low Dose Insemination

The number of sorted sperm produced per hour per sperm sorter limits widespread application of the technology. The main solutions to the limited sexed sperm production have been to have multiple sperm sorters at each sorting site and to decrease the number of sperm packaged per straw to approximately 2 million. Since it only requires a single sperm to fertilize an egg, 2 million sperm per inseminate is adequate for normal fertility of unsexed sperm for some bulls and only slightly reduces fertility for most others (Den Daas et al., 1998). However, fertility of 10 – 20% of bulls decreased 10 – 20 percentage points at 2 million unsexed sperm per dose as measured by non-return rates. Note that these data were obtained using professional inseminators with dairy cows in Europe. Seidel et al. (1996) reported for bulls above average fertility, 500,000 unsexed sperm per dose resulted in the same fertility as 10 million sperm when inseminating heifers into the uterine horns.

The potential fertilizing ability of sexed sperm is somewhat compromised as sperm are subjected to the sorting processes. Even when 10 million sexed sperm per dose are inseminated, pregnancy rates are slightly lower than unsexed sperm. Because 10 million sexed sperm per inseminate is impractical with today's sperm sorters, numerous field-studies inseminating cows and mostly heifers with a wide range of numbers of sorted cryopreserved sperm per inseminate (1×10^6 to 6×10^6) have been conducted (Seidel et al., 1999; Schenk and Seidel, 2007; Seidel and Schenk, 2008; Schenk et al., 2008; DeJarnette et al., 2008). Although in some of these studies individual bull fertility differences were observed, in general, pregnancy rates plateaued at 2 million total sorted sperm per inseminate, which, however, were lower than for higher numbers of unsexed sperm.

An inseminate dosage of 2 million total separated sperm maximizes the sorted sperm harvest, while achieving satisfactory pregnancy rates in heifers when used in well-managed herds. Thus, this dose has been adopted for many commercial applications worldwide. Recently, two large field studies (Schenk and Everett, 2007; and DeJarnette et al, 2008) have been conducted inseminating lactating dairy cows

with sexed sperm. Schenk and Everett (2007) reported a 12 percentage point reduction in pregnancy rate in lactating dairy cows resulting from sexed sperm compared to higher numbers of unsexed sperm.

It is not surprising that the potential fertilizing ability of sexed sperm is lower than unsexed sperm because the sorting and processing procedures introduce insults to sperm that can be detrimental to their cellular integrity, including:

1. Sperm are stored for up to half a day from ejaculation to accumulate a reasonable number of sexed sperm for processing and packaging.
2. Incubating with a high concentration of the DNA-binding dye may negatively affect sperm (Garner and Suh, 2002).
3. Sperm are exposed to a powerful laser light during sorting and exit the nozzle of the sperm sorter at 80 km/h (Garner et al., 2001; Suh et al., 2005).
4. Sperm must be centrifuged to concentrate them for packaging into 0.25-ml straws.

Success Rates

The majority of studies on sexed sperm have been done with breeding heifers, although some have been done with cows, and a few, with superovulation (Schenk et al., 2006) and in vitro fertilization (Lu et al., 1999; Zhang et al., 2003; Malcolm, et al., 2007). Success rates described are for 2 million frozen sperm per insemination using 0.25-ml straws and inseminating into the uterine body as is done normally; few studies are available using the more common 0.5-ml straw (Schenk and Everett, 2007). Importantly and not surprisingly, success varies enormously with management, female age and parity. Because sperm are slightly compromised in the process of sexing and the low number of sperm per dose, everything must be done optimally for good success rates. The following are especially important:

1. Well managed animals, including good nutrition.
2. Extremely careful handling of semen, including rapid transfer of straws from container to container, thawing in a 37.5 °C water bath, and inseminating within 10 minutes of thawing.
3. Excellent estrus detection. Generally, success using sexed sperm with fixed-time AI programs where animals are inseminated whether observed in estrus or not, have been poor. Schenk and Seidel (2008) recently presented very limited, but encouraging results with timed AI in heifers. The scope of their study requires experimental expansion and the optimal time of insemination following a fixed-time synchronization protocol remains to be identified. With conscientious detection of estrus and inseminating only those females actually standing to be mounted, success rates have been acceptable. Little difference in pregnancy rate has been reported when heifers were inseminated 0.5 or 1.0 day after first observing standing estrus (Seidel and Schenk, 2008; Schenk et al., 2008). Also, most commonly used estrus synchronization methods are appropriate as long as they are combined with estrus detection.
4. Well trained inseminators. Inseminators who get slightly lower pregnancy rates than average with unsexed semen likely will get much lower pregnancy rates with sexed sperm.

In nearly all trials conducted and reported by XY Inc. (Seidel et al., 1999; Schenk and Seidel, 2007; Seidel and Schenk, 2008; Schenk et al., 2008) with sexed sperm, a simultaneous control group was included in the experimental design that used normal numbers of unsexed sperm per inseminate from the same bulls. This provided the baseline-normal fertility for that herd under the conditions of the field trial. Success rates with sexed sperm ranged from about 35 to 100% of controls, depending on the particular herd management, the bulls used, whether animals were bred only after observing standing estrus, etc. The results fell into two categories: 1) Excellent management in which all four of the above items were done correctly, and 2) Average to below average conditions where one or more of these items were

compromised. With excellent management, pregnancy rates with sexed sperm were almost always 70-90% of controls, so if the control pregnancy rate is 70%, the sexed rate is 49 to 63% pregnant. With average conditions, the pregnancy rates usually are 50 to 70% of controls, but can be lower.

No matter what the pregnancy rates are, the accuracy is almost always 85 to 95% of the sex chosen. Note, however, that one needs at least 20 calves to get an unbiased estimate of the sex ratio. There will be an average of around 10% of the “wrong” sex, and having 1 or 2 calves of the “wrong” sex out of 4 or 5 calves is meaningless in determining the true accuracy.

One other extremely important observation is that despite lowered fertility, the calves actually born seem to be completely normal except for the sex ratio (Tubman et al., 2004). In that study, 1,169 calves resulting from sexed sperm were compared with 793 calves from control sperm. There were no differences in neonatal death rates, birth weights, weaning weights, gestation length, incidence of abnormalities, nor in any other trait studied. There also was no increase in abortion rates with sexed sperm compared to controls.

Recommendations

Despite all of the concerns with a relatively new product like sexed sperm, it already has a place in some breeding programs, and the opportunities will grow as the product improves and becomes more widely available. Early adopters are likely to benefit most. Fringe benefits also need to be considered, such as less dystocia in heifers having heifer calves and special cases such as wanting to expand a herd without introducing new animals because of bio-security issues. Another option being researched is producing embryos by in vitro fertilization with sexed sperm; it takes many fewer sperm per embryo produced in vitro than when breeding females (Lu et al., 1999; Zhang et al., 2003; Malcolm, et al., 2007).

Specific recommendations are:

1. Use sexed sperm in proven and successful AI programs. Do not use sexed sperm in AI programs that have below average pregnancy rates, as the results may be disastrous!
2. Don't be afraid to try sexed sperm in an AI program and inseminate enough females for an adequate test. Breeding 10 heifers resulting in 4 or 5 calves will not provide enough information about how well sexed sperm will work under specific conditions. At least 20-25 head need to be inseminated and preferably 40-50 to get a trustworthy evaluation.
3. Try sexed sperm where it is easiest to use and will not create a disaster if the resultant pregnancy rate is low. The best place to start is to breed replacement heifers to have heifer calves. This can be done with well-grown heifers that are most importantly, cycling.
4. Do not use sexed semen for superovulated cows, as this is the most difficult system for obtaining acceptable success using compromised sperm. Even with multiple inseminations and good management, the number of good embryos recovered when breeding superovulated donors with sexed sperm is about half that with unsexed semen (Schenk et al., 2006). However, pregnancy rates with the embryos produced appear to be normal. The one place that sexed sperm already may fit for superovulation is if one sex of calves is very valuable, and the value of the other sex is very low. Sexed sperm in this case, while producing only about half as many embryos, will produce just as many desired-sex embryos as unsexed sperm, and make the most efficient use of recipients.
5. Try sexed semen if it fits a particular application. With good management, results are most often quite satisfactory.

Future Considerations

As with any new technology, costs will decline and success rates will improve with time. Sexed sperm could eventually change the whole nature of the beef cattle industry, making it more like current swine breeding programs in which there are maternal lines and terminal cross lines for almost every breeding program. While this already is true in some cases for beef cattle, when breeding for maternal traits, the males are really a by-product, as are the females with terminal cross programs. Certainly terminal crossing would be more efficient with 90% males if costs of sexed sperm were low and fertility was normal.

One other characteristic of new technologies is that most of the benefit usually accrues to the early (not too early!) adopters. After the new technology becomes widespread, nearly everyone is forced to use it, so everyone has to incorporate it to remain profitable.

One final characteristic of sexed sperm, and indeed many other technologies, is that most of the investment in this technology was made by private industry, not by government grants or university resources. Private industry has patented key aspects of the technology, or licensed key patents held by the United States government or universities. There simply were no government grants available for the size of investment required to make sexed sperm a commercial reality. This has resulted in greater input from private industry in how sexed semen was developed, currently marketed and priced than producers are accustomed to for most cattle breeding goods and services (Seidel, 2003).

Acknowledgements

Many individuals contributed the advancement and eventual commercialization of sperm sexing technology including numerous graduate students at Colorado State University, colleagues, and producers who allowed for the use of their cattle in field experiments. Most importantly, I recognize Dr. George E. Seidel, Jr. for his unwavering support, guidance and expertise throughout the many years of developing this sperm sorting technology. I also wish to acknowledge XY, Inc. for research funding and the staff at XY, Inc. for assisting with experiments.

References

- Den Daas, J.H., G. DeJong, L.M. Lansbergen, A.M. Van Wagtenonk-De Leeuw. 1998. The relationship between the number of sperm inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. *J. Dairy Sci.* 81:1714-1723.
- DeJarnette, J.M., R.L. Nebel, C.E. Marshall, J.F. Moreno, C.R. McCleary and R.W. Lenz. 2008. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Sci.* 97:1778-1785.
- Garner, D.L., J.L. Schenk and G.E. Seidel, Jr. 2001. Chromatin stability in sex-sorted sperm. In: *Andrology in the 21st Century*, Proceedings of the VIIth International Congress of Andrology. pp. 3-7.
- Garner, D.L. and T.K. Suh. 2002. Effect of Hoechst 33342 staining and laser illumination on viability of sex-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 57:746 (Abstr.).
- Johnson, L.A., J.P. Flook, M.V. Look. 1987. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Res.* 17:203-212.
- Lu, K.H., D.G. Cran and G.E. Seidel, Jr. 1999. In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 52:1393-1405.

- Malcolm, V., M. Marfil, M. Calvi, F. Rigali, M. Pugliese, J. Gutierrez, M. Panarace and M. Medina. 2007. Comparison of invitro fertilizing capacity of frozen-thawed sex-sorted and sex-sorted frozen-thawed bull spermatozoa. *Repro. Fert. Develop.* 19:298 (Abstr.).
- Schenk, J.L., T.K. Suh and G.E. Seidel, Jr. 2006. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology* 65:299-307.
- Schenk, J.L. and R.W. Everett. 2007. Insemination of Holstein cows with sexed sperm. *J. Dairy Sci.* 90:(Suppl. 1):18 (Abstr.).
- Schenk, J.L. and G.E. Seidel, Jr. 2007. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of laser intensity, staining conditions, and catalase. In: *Domestic Animals VI*, J.L. Juengel, J.F. Murray and M.F. Smith (Eds.), Nottingham University Press, Nottingham, UK 64:165-177.
- Schenk, J.L., D.G. Cran and G.E. Seidel, Jr. 2008. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology*; In Press.
- Schenk, J.L. and G.E. Seidel, Jr. 2008. Timed insemination of heifers with sexed sperm. *Reprod. Fert. Develop.* 20:214 (Abstr.).
- Seidel, G.E., Jr., C.H. Allen, Z. Brink, M.D. Holland and M.B. Cattell. 1996. Insemination of heifers with very low numbers of frozen spermatozoa. *J. Anim. Sci.* 74 (Suppl. 1): 235 (Abstr.).
- Seidel, G.E., Jr., J.L. Schenk, L.A. Herickhoff, S.P. Doyle, Z. Brink, R.D. Green and D.G. Cran. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52:1407-1420.
- Seidel, G.E., Jr. and D.L. Garner. 2002. Current status of sexing mammalian sperm. *Reproduction* 124:733-743.
- Seidel, G.E., Jr. 2003. Sexing mammalian sperm – Intertwining of commerce, technology, and biology. *Anim. Reprod. Sci.* 79:145-156.
- Seidel, G.E., Jr. and J.L. Schenk. 2008. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Anim. Reprod. Sci.* 105:12-138.
- Suh, T.K., J.L. Schenk and G.E. Seidel, Jr. 2005. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology* 64:1035-1048.
- Tubman, L.M., Z. Brink, T.K. Suh and G.E. Seidel, Jr. 2004. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *J. Anim. Sci.* 82:1029-1036.
- Zhang, M., K.H. Lu and G.E. Seidel, Jr. 2003. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology* 60:1657-1663.

Fatores que influenciam o sucesso de programas de IATF em gado de leite

C. A. Rodrigues¹, A. A. Teixeira², A. H. Souza², R. M. Ferreira², H. Ayres², P. S. Baruselli²

¹SAMVET, São Carlos, SP, Brasil

²Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brasil;

Introdução

O declínio na fertilidade de vacas leiteiras nas últimas décadas tem sido associado ao aumento da produção de leite e à mudanças na fisiologia reprodutiva desses animais. Uma das causas da menor eficiência reprodutiva em rebanhos de alta produção é a diminuição da expressão e da detecção de estros (Dransfield et al., 1998; Lopez et al., 2004). Com o intuito de solucionar o problema da baixa taxa de serviço devido à ineficiência da detecção de estro, muitos protocolos hormonais que visam sincronizar a manifestação do comportamento de estro com o uso de prostaglandinas (PGF) foram desenvolvidos (Odde, 1990). Posteriormente, Pursley et al. (1995) desenvolveram o protocolo Ovsynch, no qual a associação de GnRH e PGF é utilizada, permitindo a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Recentemente, tratamentos que associam estrógenos e progestágenos têm sido utilizados para sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular em vacas (Bó et al., 1995). No entanto, em bovinos de leite de alta produção sob sistema de confinamento, baixas taxas de concepção (abaixo de 35% em vários países) continuam sendo alcançadas, mesmo com o uso desses protocolos. Além disso, a *performance* reprodutiva dessas vacas de alta produção em rebanhos comerciais pode ser influenciada por diversos outros fatores (Caraviello et al., 2006), entre eles a sanidade, o manejo adequado e a correta administração de fármacos, os quais afetam direta ou indiretamente o sucesso do programa de sincronização da ovulação para a IATF.

Sabe-se que altos níveis de estrógeno próximo a IA estão relacionados à maior fertilidade em bovinos (Perry et al., 2005) e podem estar envolvidos com o transporte espermático mais eficiente pelo trato reprodutivo da fêmea (Hawk et al., 1975). Ainda, têm-se observado que as altas taxas de metabolismo hepático dos esteróides (Sangsrivong et al., 2002) associadas ao problema de ovulação prematura em protocolos de IATF reduzem tanto as concentrações circulantes de estradiol (E₂) ao redor da IA (proestro) quanto as de progesterona (P₄) após a ovulação (diestro). Com base nessas informações, alguns estudos têm demonstrado o benefício da suplementação com E₂ ao final dos protocolos para IATF (Hanlon et al., 1996; Colazo et al., 2004; Souza et al., 2007). Nesse contexto, foi observado aumento de 15% na taxa de concepção em vacas de corte que receberam Cipionato de estradiol (CE) 24 horas após a remoção do implante de P₄ (Colazo et al., 2004). Portanto, existe a possibilidade de aumentar as taxas de concepção após a suplementação com estrógenos no período periovulatório.

Com relação à antecipação da ovulação ligada a alguns protocolos de IATF (Colazo et al., 2003), tem-se que, nesses casos, o tamanho do folículo ovulatório e, conseqüentemente do corpo lúteo (CL) que irá ser formado, é menor quando comparado ao de ovulações oriundas de cio natural. Vasconcelos et al. (1999) demonstraram que de fato existe relação entre o tamanho do folículo ovulatório e o volume do CL formado. Adicionalmente, diversos estudos mostraram a ocorrência de efeitos deletérios no desenvolvimento embrionário inicial e no reconhecimento materno da gestação, relacionados às baixas concentrações de progesterona (Mann and Haresign, 2001). Sendo assim, uma possível solução para evitar baixas concentrações de P₄ no diestro seria aumentar a produção desse hormônio pelo CL. Tendo isso em vista, alguns pesquisadores incorporaram a eCG em protocolos de IATF e relataram aumentos na fertilidade (Baruselli et al., 2004). Esses autores trabalharam com a hipótese de que a melhora na taxa de prenhez nos animais que receberam eCG na retirada do dispositivo intravaginal de P₄, estaria relacionada ao aumento da taxa de ovulação de animais em anestro e aos maiores níveis de P₄ circulante no diestro (Baruselli et al., 2004), minimizando falhas no reconhecimento fetal da gestação. Essa hipótese estaria embasada em estudos que verificaram associação entre o atraso no aumento de P₄ no início do diestro e o desenvolvimento embrionário, uma vez que embriões menores secretam menores quantidade de interferon- τ e comprometem o bloqueio da luteólise. (Mann e Haresign, 2001; Kerbler et al., 1997).

Outro importante aspecto a ser considerado são as fêmeas repetidoras de serviço, uma vez que apresentam considerável impacto econômico nas fazendas de leite (Lafi & Kaneene, 1992). Esses animais geralmente são definidos como subférteis, sem anormalidades anatômicas ou infecciosas, além de serem caracterizados por baixas taxas de fertilização (Graden et al., 1968; O'Farrell et al., 1983) e/ou mortalidade embrionária precoce (Linares, 1981; Gustafsson e Larsson, 1985). Em estudo realizado por Båge et al. (2002) foi verificado que novilhas repetidoras de serviço apresentam estro prolongado, folículos persistentes e atraso no pico de LH.

Além desses fatores, Sartori et al. (2002) relataram que vacas leiteiras em lactação apresentam pobre desenvolvimento embrionário inicial se comparadas às não lactantes, assim como uma maior porcentagem de

embriões degenerados (42%) comparados às vacas secas (18%) durante o verão. Outro fator que afeta negativamente a eficiência reprodutiva de vacas de leite é o estresse térmico, contribuindo para a baixa fertilidade desses animais. Nesse sentido, um estudo demonstrou que durante o verão, vacas em lactação têm baixas concentrações de E₂ no pró-estro comparadas às vacas secas (De La Sota et al., 1993). Ainda, baixas taxas de detecção de estro (Thatcher e Collier, 1986) e de concepção foram detectadas durante o estresse calórico (Badinga et al., 1985; Thatcher e Collier, 1986), provavelmente devido à elevação da temperatura corporal, que resulta em mortalidade embrionária precoce (Putney et al., 1988). De acordo com esses conceitos, a transferência de embrião (TE) se mostra uma ferramenta potencial para minimizar os eventuais efeitos do ambiente uterino e da lactação sobre o desenvolvimento embrionário inicial, evitando dessa forma, a mortalidade embrionária precoce e, consequentemente, promovendo maiores taxas de prenhez.

Contudo, o sucesso da transferência de embrião depende de alguns fatores como a eficiência do aproveitamento das receptoras. Sabe-se que em manejos baseados em detecção de estro, a taxa de observação não ultrapassa 50% das vacas em estro (Lyimo et al., 2000; Van Eerdenburg et al., 2002). Este quadro tende ainda a piorar quando as receptoras de embrião são vacas em lactação de alta produção, devido aos efeitos deletérios da produção leiteira na expressão de cio (Lopez et al., 2004). Sendo assim, recentes protocolos foram desenvolvidos para controlar a dinâmica folicular e luteínica, abolindo a necessidade de detecção de cio para a TE (Baruselli et al., 2000a; b ; 2001; Tribulo et al., 2000; Bó et al., 2001).

Recentemente, Rodrigues et al. (2006) e Ferreira et al. (2006) alcançaram satisfatórias taxas de aproveitamento e altas taxas de prenhez em novilhas de corte utilizadas como receptoras de embrião, diminuindo a frequência de manejo e facilitando a utilização da tecnologia da transferência de embrião.

Inseminação artificial em tempo fixo como ferramenta para aumentar a taxa de prenhez em vacas holandesas de alta produção

Objetivando aumentar a taxa de prenhez em vacas holandesas de alta produção, nosso grupo de pesquisa conduziu um experimento na Fazenda Santa Rita (município de Descalvado) para avaliar o efeito do uso do dispositivo intravaginal de P₄ novo e previamente utilizado por 8 dias. Além disso, o efeito da administração do CE em protocolos que utilizavam eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P₄ foi também avaliado em dois períodos do ano (verão x inverno; Souza et al., 2008). Todos os animais receberam 2 mg de Benzoato de estradiol (BE; Estrogin; Pharmatec, Brasil), sendo que metade recebeu um dispositivo intravaginal de progesterona novo (CIDR; 1,9 g; Pfizer, Brasil) e a outra metade recebeu CIDR previamente utilizado por 8 dias no D0. No momento da retirada do CIDR (D8), as vacas foram divididas em 4 diferentes grupos experimentais: **1) NeCGECP:** CIDR novo + eCG (400 UI; Folligon; Intervet, Brasil) + CE (1 mg; ECP; Pfizer, Brasil) no Dia 8; **2) UeCGECP:** CIDR usado + eCG (400 UI) + CE (1 mg) no Dia 8; **3) NeCG:** CIDR novo + eCG (400 IU) no Dia 8; **4) UeCG:** CIDR usado + eCG (400 IU) no D8. Todos os animais receberam uma dose de GnRH (100 mcg; Fertagyl; Intervet, Brasil) 48h após a remoção do dispositivo de progesterona e foram inseminados em tempo fixo 8 a 10h após administração de GnRH. O diagnóstico de prenhez foi realizado 30 e 60 dias após a IATF, por exame ultrassonográfico.

No verão, os resultados, não mostraram diferença significativa ($P > 0,10$) na taxa de concepção entre os diferentes tratamentos hormonais. Além disso, não houve interação entre o tipo de CIDR (novo vs usado) e o uso de ECP na retirada do dispositivo considerando-se a taxa de concepção ($P > 0,10$). Porém, inesperadamente, os dados analisados indicam uma tendência ($P = 0,09$) de melhora na taxa de concepção aos 30 dias e melhora ($P = 0,05$) na taxa de concepção aos 60 dias após IATF nas fêmeas tratadas com dispositivos intravaginais previamente usados quando comparada às taxas de fêmeas tratadas com dispositivos novos. Ainda, independentemente do tipo de CIDR empregado, o tratamento com 1mg de ECP no momento da retirada do CIDR não alterou ($P > 0,10$) a taxa de concepção de vacas de leite de alta produção (Tabela 1). As baixas taxas de concepção obtidas nesta fase experimental, provavelmente são devido ao estresse calórico pelo qual os animais passaram.

Tabela 1. Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após a IATF em vacas holandesas de alta produção inseminadas durante o verão, tratadas com CIDR novo ou previamente utilizados por 8 dias, com ou sem a adição de 1 mg de ECP no D8 (Adaptado de Souza et al., 2008).

Tratamento	N	TC* D30 (%)	TC* D60 (%)
CIDR novo com ECP	52	19,2	17,3
CIDR usado com ECP	49	24,5	24,5
CIDR novo sem ECP	49	12,2	10,2
CIDR usado sem ECP	48	22,9	22,9
Efeitos principais			
Com ECP	101	21,8	20,8
Sem ECP	97	17,5	16,5
CIDR novo	101	15,8 ^A	13,9 ^a
CIDR usado	97	23,7 ^B	23,7 ^b

*TC = taxa de concepção (número de animais que conceberam/ número total de IAs)

^{a,b} Médias diferem estatisticamente; $P < 0,05$.

^{A,B} Médias tenderam a ser diferentes estatisticamente; $P < 0,10$.

Outros estudos utilizando novilhas e vacas de corte, também compararam o uso de CIDRs novos ou reutilizados em protocolos para IATF (Colazo et al., 2004; Seneda et al., 2004). Em estudo conduzido por Seneda et al. (2004), não foi observada diferença na taxa de concepção entre novilhas de corte tratadas com CIDR novo (49,8%) em relação às tratadas com CIDR previamente utilizado por 8 dias (44%). Colazo et al. (2004), por sua vez, realizaram uma série de 3 experimentos comparando a taxa de concepção entre animais tratados com CIDRs novos ou reutilizados. No primeiro experimento, de forma semelhante ao estudo anteriormente citado (Seneda et al., 2004), os autores não encontraram diferença na taxa de concepção entre novilhas de corte tratadas com CIDR novo (48,3%) e CIDR usado (46,2%). Em outro experimento apenas com dispositivos reutilizados, os mesmos pesquisadores verificaram que novilhas e vacas de corte apresentaram maior taxa de concepção quando submetidas a tratamento com dispositivos intravaginais reutilizados por uma vez (62,4%) comparadas àquelas tratadas com dispositivos reutilizados por duas vezes (48,4%). Já em um terceiro experimento desses autores, foi comparado o uso de 1 CIDR novo, 1 CIDR reutilizado por uma vez, 1 CIDR reutilizado por duas vezes e 2 CIDRs reutilizados por duas vezes. Não foi encontrada diferença na taxa de concepção após a IATF entre os quatro grupos de tratamento.

Cerri et al. (2005), utilizando vacas de leite de alta produção, verificaram um efeito significativo do tipo de dispositivo, sendo que os animais tratados com dispositivos reutilizados apresentaram menores concentrações circulantes de P4 a partir do segundo dias após a inserção dos dispositivos intravaginais. Portanto, os diferentes níveis de P4 circulantes podem ter afetado a dinâmica folicular (Carvalho et al., 2008), provavelmente modificando o padrão de liberação de LH durante o período do implante. Neste sentido, diversos autores descreveram o aumento da pulsatilidade do LH em animais com menores concentrações circulantes de P4 (Kinder et al., 1996; Kim et al., 2003). Sendo assim, o grupo tratado com CIDR usado pode ter proporcionado menor concentração de P4 circulante e conseqüentemente um aumento na pulsatilidade do LH e na taxa de crescimento folicular. Nesse contexto, animais com folículos ovulatórios maiores normalmente apresentam maiores taxa de concepção se comparados a animais que ovulam folículos menores (Perry et al., 2005; Lopes et al., 2007; Souza et al., 2007).

Na tabela 2 está apresentada a taxa de concepção durante o inverno do experimento de Souza et al. (2008), de acordo com o grupo experimental. Semelhantemente ao verão, não houve diferença significativa ($P > 0,10$) na taxa de concepção entre os tratamentos hormonais. Também não houve interação entre o tipo de CIDR e o uso de ECP na retirada do dispositivo considerando-se a taxa de concepção ($P > 0,10$). Porém, ao contrário do observado anteriormente, a melhora na taxa de concepção nos animais tratados com dispositivos previamente utilizados não ocorreu durante o inverno. De forma similar aos resultados observados durante o verão, o tratamento com 1 mg de ECP no momento da retirada do CIDR não alterou ($P > 0,10$) a taxa de concepção de vacas holandesas de alta produção.

Em estudos recentes (Souza et al., 2005; Sellars et al., 2006) verificou-se aumento ou tendência de aumento nas concentrações circulantes de estradiol após os tratamentos com 0,25 mg (Sellars et al., 2006) ou 1 mg de ECP (Souza

et al., 2005) em vacas de alta produção. Com base nesses resultados, a utilização de 1 mg de ECP no momento da retirada do CIDR no estudo de Souza et al. (2008) provavelmente aumentou as concentrações circulantes de estradiol. No entanto, ao contrário do esperado, essa suplementação não melhorou significativamente as taxas de concepção das fêmeas sincronizadas (Souza et al., 2008). Esses resultados estão de acordo com outros autores, os quais não encontraram aumentos nas taxas de concepção após o uso de estrógenos próximo ao momento da ovulação sincronizada (Lopes et al., 2000; Pancarci et al., 2002; Sellars et al., 2006). Porém, um estudo recente (Souza et al., 2007) utilizando vacas holandesas de alta produção mostrou que eventuais aumentos nas taxas de concepção após suplementação com estrógeno antes da ovulação sincronizada podem estar relacionados ao escore de condição corporal, ao número de dias em lactação e ao tamanho do folículo ovulatório do animal.

Tabela 2. Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após a IATF em vacas holandesas de alta produção inseminadas durante o inverno, tratadas com CIDR novo ou previamente utilizados por 8 dias, com ou sem a adição de 1 mg de ECP no D8 (Adaptado de Souza et al., 2008).

Tratamento	N	TC* D30 (%)	TC* D60 (%)
CIDR novo com ECP	48	35,4	31,3
CIDR usado com ECP	48	41,6	35,4
CIDR novo com ECP	47	42,6	34,4
CIDR usado com ECP	47	44,7	38,3
Efeitos principais			
Com ECP	96	38,5	33,3
Sem ECP	94	43,6	36,2
CIDR novo	95	38,9	32,6
CIDR usado	95	43,2	36,8

*TC = taxa de concepção (número de animais que conceberam/ número total de IAs)

De acordo com a análise geral dos resultados, não houve interação CIDR*época do ano, ECP*época do ano ou CIDR*ECP*época do ano na taxa de concepção e perda gestacional ($P > 0,10$) dos animais utilizados. Sendo assim, os dados de concepção do período verão e inverno foram descritos de forma combinada. Nessa nova análise, também não houve efeito ($P > 0,10$) da adição do ECP no momento da retirada do CIDR na taxa de concepção e não foi verificada diferença na perda gestacional entre os 30 e 60 dias entre os grupos experimentais. Houve, no entanto, uma tendência na melhora na taxa de concepção aos 60 dias após a IATF no grupo tratado com CIDR reutilizado quando comparado aos animais tratados com CIDR novo (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa de concepção aos 30 e 60 dias após a IATF em vacas holandesas de alta produção inseminadas durante duas épocas do ano (inverno e verão), tratadas com CIDR novo ou previamente utilizado por 8 dias, com ou sem a adição de 1 mg de ECP no D8 (Adaptado de Souza et al., 2008).

Tratamento	N	TC* D30 (%)	TC* D60 (%)
CIDR novo com ECP	100	27,0	24,0
CIDR usado com ECP	97	33,0	29,9
CIDR novo com ECP	96	27,1	21,9
CIDR usado com ECP	95	33,7	30,5
Efeitos principais			
Com ECP	197	29,9	26,9
Sem ECP	191	30,4	26,2
CIDR novo	196	27,0	23,0 ^A
CIDR usado	192	33,3	30,2 ^B

*TC = taxa de concepção (número de animais que conceberam/ número total de IAs)

^{A,B} Médias tenderam a ser diferentes estatisticamente; $P < 0,10$.

Alguns relatos anteriores (Macmillan et al., 1991; Macmillan e Peterson, 1993) indicam que o CIDR libera P₄ por pelo menos 15 dias e, deste modo, este dispositivo intravaginal pode ser utilizado por pelo menos 2 vezes em protocolos de sincronização da ovulação. O presente estudo parece ter confirmado a possibilidade de utilização do CIDR previamente utilizado por 8 dias em associação com BE em protocolos para IATF. Porém, mais estudos são necessários para confirmar o possível benefício de menores concentrações de P₄ durante os protocolos para IATF em vacas de leite sob estresse térmico.

Outro interessante experimento conduzido por nossa equipe teve como objetivo antecipar a concepção no pós-parto, comparar o intervalo parto-concepção e a porcentagem de vacas prenhes aos 150 dias de lactação (DEL; Teixeira et al., 2008). Ainda, a taxa de prenhez de vacas holandesas de alta produção submetidas a dois protocolos de IATF com diferentes fontes de estradiol foi avaliada durante o inverno e a primavera. Assim, os efeitos da administração de Benzoato de estradiol (BE) ou Valerato de estradiol (VE) no início do protocolo de sincronização da ovulação foram comparados, antecipando a primeira inseminação para 60 dias (57 a 63 dias) no pós-parto. Os animais do grupo Controle (GC; n=150) tiveram o cio observado e foram inseminados 12h após a detecção visual do estro (natural ou induzido pela administração de uma dose de PGF). O Grupo Benzoato (GB; n=150) recebeu, em dia desconhecido do ciclo estral (D0), um implante auricular de Norgestomet (Crestar®) e 2 mg de BE. No D8, o implante foi retirado e eCG (400 UI), PGF (150 µg) e ECP (1 mg) foram Administrados. A IATF foi efetuada no D10 juntamente a administração de 100 µg de GnRH. No D0, as fêmeas do Grupo Valerato (GV; n=100), receberam implante auricular de Norgestomet e 5 mg de VE. Nove dias depois (D9) o implante foi retirado e administrou-se eCG (400 UI) e PGF (150 µg), seguido da IATF no D11. Após a IATF, todos os animais foram submetidos à detecção de estro, assim como no GC. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 e 60 dias após a IA. Os resultados estão mostrados na tabela 4 e figura 1.

Tabela 4. Taxa de concepção e prenhez aos 60 dias em lactação (DEL), intervalo entre parto e concepção, intervalo entre parto e 1ª IA, intervalo entre parto e 2ª IA e taxa de prenhez aos 150 DEL (Adaptado de Teixeira et al., 2008).

	GC	GB	GV	P
Taxa de concepção aos 60 DEL (%)	29,7 (11/37)	28,3 (41/145)	27,5 (27/98)	0,93
Taxa de prenhez aos 60 DEL (%)	6,0 (9/149) ^a	28,3 (41/145) ^b	27,5 (27/98) ^b	0,001
Intervalo Parto-1ª IA (d)	77,8±1,7 ^a	60,4±0,2 ^b	60,2±0,2 ^b	0,001
Intervalo Parto-2ª IA (d)	106,2±2,3 ^a	99,4±1,8 ^{ab}	96,9±2,4 ^b	0,058
Intervalo Parto-Concepção (d)	93,3±3,1 ^a	88,4±3,5 ^{ab}	79,3±3,8 ^b	0,003
Taxa de prenhez aos 150 DEL (%)	48,9 (73/149)	43,5 (63/145)	40,8 (40/98)	0,27

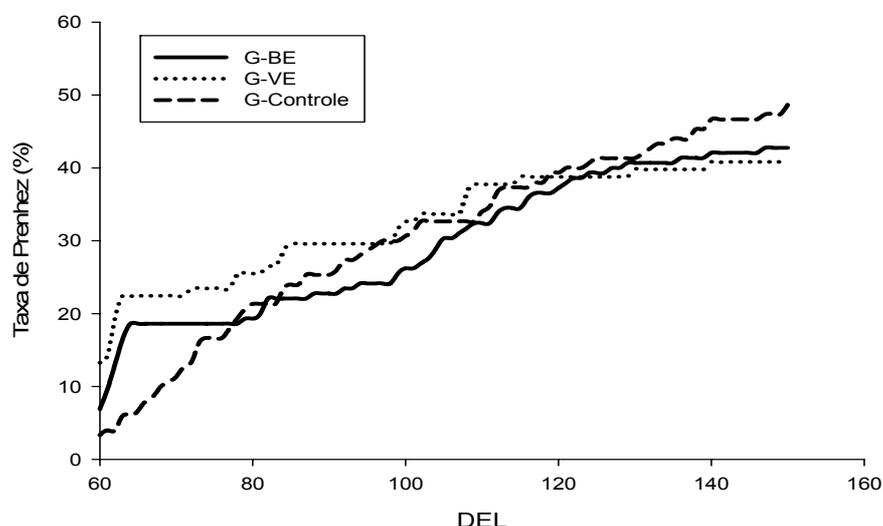


Figura 1. Prenhez acumulativa de vacas Holandesas submetidas à IATF seguida de detecção de cio e IA durante os períodos de inverno e primavera (Adaptado de Teixeira et al., 2008).

De acordo com os resultados, é possível concluir que os protocolos de IATF utilizando tanto BE quanto VE foram capazes de aumentar a taxa de prenhez aos 60 dias pós-parto, antecipando, dessa maneira, os intervalos Parto-Concepção, Parto-1ªIA e Parto-2ªIA. Contudo, não foi observada diferença entre os tratamentos e o grupo controle na taxa de prenhez aos 150 DEL. Porém, essa ausência de diferença pode não ocorrer em fazendas com deficiência na detecção de cio.

Como é sabido que o estresse térmico decorrente das altas temperaturas e umidade do verão contribui para a baixa fertilidade de vacas de leite, outro experimento está sendo desenvolvido para avaliar os efeitos desses mesmos tratamentos durante o verão. Talvez durante esse período maiores diferenças entre os tratamentos e grupo controle possam ser observadas.

Transferência de embrião como ferramenta para aumentar a taxa de prenhez em vacas holandesas

Vacas de leite criadas em condições tropicais, normalmente apresentam diminuição na qualidade oocitária e queda da taxa de concepção em programas de inseminação artificial (IA). Além disso, vacas de leite de alta produção apresentam altos índices de repetição de cio e decréscimo na taxa de prenhez, quando submetidas a IA. Um dos fatores responsáveis por essa diminuição é o estresse calórico. Conceitualmente, melhores taxas de concepção podem ser obtidas com a transferência de embriões (TE), principalmente quando comparada a IA em épocas quentes do ano (Rodrigues et al., 2004).

Assim, o objetivo de um estudo retrospectivo realizado por nosso grupo foi comparar a taxa de concepção de vacas Holandesas submetidas a IA ou a TE, em diferentes períodos (meses) do ano, de 2001 a 2006. Essa análise foi realizada para o rebanho como um todo (Rodrigues et al., 2007a) e para as vacas repetidoras de serviço (≥ 4 serviços; *repeat breeders*) isoladamente (Rodrigues et al., 2007b). Além disso, visou-se também comparar a taxa de concepção de vacas Holandesas de alta produção ($28,4 \pm 2,3$ kg/dia) que receberam embriões frescos ($n = 2634$) ou descongelados ($n = 2237$; Rodrigues et al., 2007c). Todos os embriões foram transferidos para receptoras que apresentaram comportamento de estro 24 h antes (Dia +1), no mesmo dia (Dia 0) ou 24 h após (Dia -1) o dia do cio presumido das doadoras (Rodrigues et al., 2007d).

Quando todas as vacas foram analisadas, não foi verificado efeito de ano, porém constatou-se interação entre o ano e o método (IA ou TE) utilizado. Além disso, foi verificado efeito significativo do método na taxa de concepção [IA= 28,5% (5292/18568)^a vs TE= 41,9% (2041/4871)^b; $P < 0,0001$, Figura 2]. Também foi observado efeito do mês na taxa de concepção para ambos, IA e TE, quando os meses foram avaliados separadamente (anos agrupados; Figura 3).

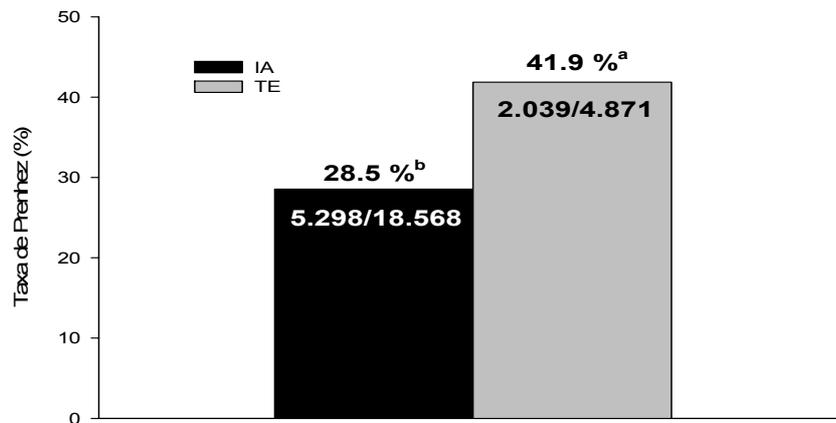


Figura 2. Efeito da inseminação artificial e da transferência de embrião na taxa de prenhez de vacas Holandesas de alta produção (Adaptado de Rodrigues et al., 2007^a).

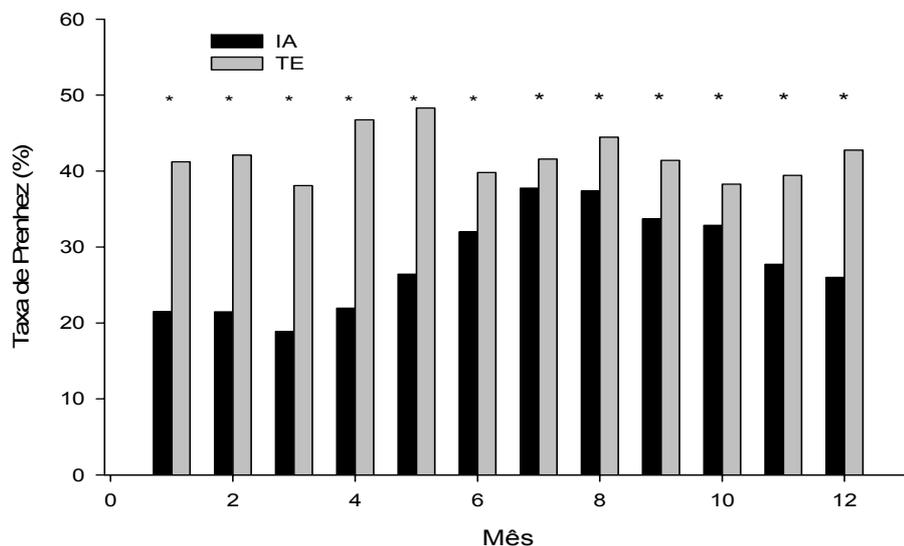


Figura 3. Efeito do mês na taxa de prenhez à inseminação artificial ($n=18.568$) e à transferência de embrião ($n=4.871$) em vacas Holandesas de alta produção (Adaptado de Rodrigues et al., 2007^a).

De forma semelhante, quando somente as vacas repetidoras de serviço foram analisadas, a taxa de concepção foi maior ($P < 0,0001$) em animais submetidos a TE (41,7%; 1609/3858) comparado aos animais submetidos a IA (17,9%; 1019/5693; Figura 4). No entanto, nessa categoria animal, essas diferenças se mostram ainda maiores. As taxas de concepção para IA e TE de Janeiro a Dezembro (anos agrupados) estão mostradas na figura 5.

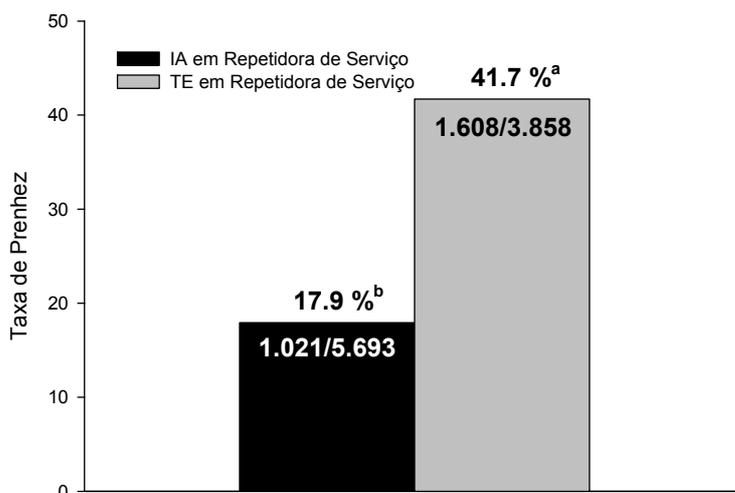


Figura 4. Efeito da inseminação artificial e da transferência de embrião na taxa de prenhez de vacas Holandesas de alta produção, repetidoras de serviço (Adaptado de Rodrigues et al., 2007b).

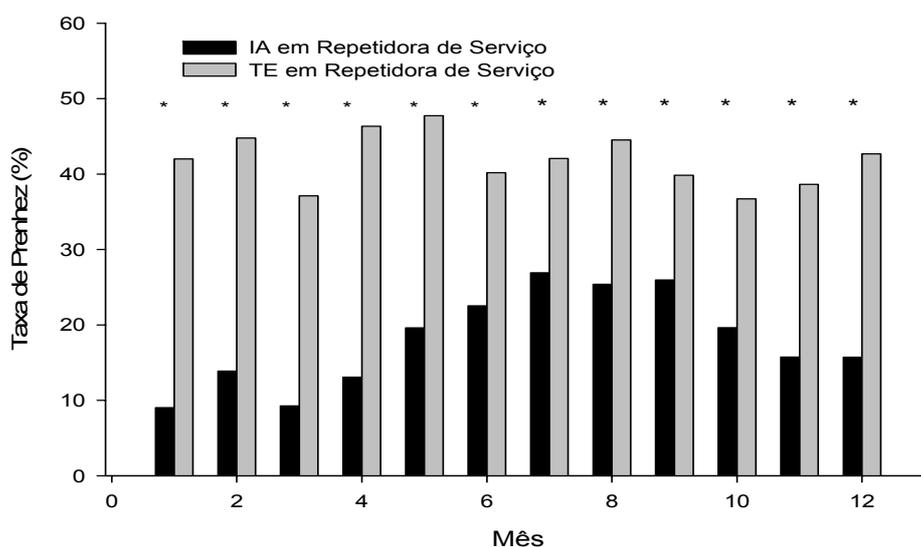


Figura 5. Efeito do mês na taxa de prenhez à inseminação artificial (n=5.693) e à transferência de embrião (n=3.858) em vacas Holandesas de alta produção, repetidoras de serviço (Adaptado de Rodrigues et al., 2007b).

A análise dos animais que receberam embriões frescos ou descongelados mostrou maior taxa de concepção ($P = 0,0013$) para receptoras inovuladas com embriões frescos (43,85%; 1155/2634)^a em relação as fêmeas que receberam embriões descongelados (39,52%; 884/2237)^b.

Em geral, os resultados obtidos indicam que a TE apresenta maiores taxas de concepção do que a IA ao longo de todo o ano em vacas Holandesas de alta produção, especialmente em vacas repetidoras de serviço. Esse efeito foi mais evidente nos meses mais quentes do ano. Também, maiores taxas de concepção foram alcançadas utilizando-se embriões frescos em relação aos embriões descongelados. Além disso, a sincronização rigorosa entre doadora e receptora (D0) mostrou maior eficiência, especialmente quando embriões criopreservados foram utilizados.

Portanto, o emprego dessa tecnologia mostra-se como uma alternativa eficaz para manutenção de satisfatórias taxas de concepção durante o ano todo, especialmente nos meses mais quentes, nos quais os animais apresentam menor eficiência reprodutiva. Contudo, o sucesso dessa técnica depende de fatores como eficiência na seleção de receptoras e o aperfeiçoamento de protocolos que permitam a transferência de embriões sem que haja necessidade de observação de estro.

Assim, objetivando comparar a administração de uma única dose de prostaglandina (PGF) associada à detecção de estro com um protocolo de sincronização da ovulação para TETF, nosso grupo desenvolveu o seguinte estudo (Rodrigues et al., 2008): vacas holandesas (*Bos taurus*) em lactação, repetidoras de serviço [inseminações ≥ 3 ou dias em lactação (DEL) ≥ 200] foram avaliadas por palpação retal e homogeneamente destinadas a um de três tratamentos, de acordo com a presença ou ausência de CL. Em dia aleatório do ciclo estral (D0), as fêmeas do Grupo-PGF+Estro (G-PGF+Estro; n= 234) que apresentavam CL receberam 150 μg de D-Cloprostenol (PGF; Preloban[®]; Intervet, Brasil) i.m. e foram submetidas à detecção de estro do D2 ao D5 após a administração de PGF. Os embriões foram transferidos sete dias após a observação do cio. As vacas no G-Nor+CL (n=221; presença de CL) e G-Nor-CL (n=221; ausência de CL) receberam implante auricular de Norgestomet (Crestar[®], Intervet, Brasil) juntamente a 2 mg de Benzoato de estradiol i.m. (Estrogin, Farmavet, Brasil) e 50 mg de progesterona i.m. (Progesterona, Index Farmacêutica, Brasil) no Dia 0. No Dia 8, o implante foi retirado e 400 UI de eCG i.m. (Folligon[®], Intervet, Brasil), 150 μg de d-cloprostenol i.m. (PGF; Preloban[®]; Intervet, Brasil) e 0,5 mg de cipionato de estradiol i.m. (E.C.P.[®]; Pfizer, Brasil) foram administradas. Não houve detecção de estro, sendo o D10 considerado como o dia do estro. A transferência de embriões foi feita no Dia 17.

A taxa de detecção de estro para o G-PGF+Estro foi de aproximadamente 60% (Tabela 5). Porém, mesmo com esta alta eficiência na detecção de cio, o grupo G-PGF+Estro apresentou menores taxas de aproveitamento (34,5%) se comparado aos grupos tratados com protocolos de sincronização da ovulação (ao redor de 70%). Além disso, a ausência de corpo lúteo no início dos tratamentos de sincronização da ovulação diminuiu cerca de 14% (Nor+CL ~75% vs Nor-CL ~61,2%) a taxa de aproveitamento das receptoras (Tabela 5). Adicionalmente, as taxas de prenhez aos 30 e aos 60 dias foram significativamente maiores ($P < 0,05$) para o G-Nor+CL comparado ao G-PGF+Estro. O grupo G-Nor-CL apresentou taxas de prenhez intermediárias (Tabela 5).

Tabela 5. Taxa de detecção de cio (%), de aproveitamento, de concepção (%) aos 30 e 60 dias, de prenhez (%) aos 30 e 60 dias, perda embrionária (%), número médio de CL (\pm desvio padrão), área média do CL (\pm desvio padrão) e concentração plasmática média de progesterona (ng/mL; \pm desvio padrão) em receptoras Holandesas repetidoras de serviço apresentando ou não CL no Dia 0 (Adaptado de Rodrigues et al., 2008).

	Grupos		
	G-PGF+Estro	G-Nor+CL	G-Nor-CL
Taxa de detecção de cio (%)	59,4 (229)	-----	-----
Taxa de aproveitamento (%)	34,5 ^a (229)	75,0 ^b (208)	61,2 ^c (214)
Taxa de concepção (30 dias; %)	53,2 ^A (79)	42,3 ^{AB} (156)	38,2 ^B (131)
Taxa de concepção (60 dias; %)	46,8 (79)	38,5 (156)	37,4 (131)
Taxa de prenhez (30 dias; %)	18,3 ^a (229)	31,7 ^b (208)	23,4 ^{ab} (214)
Taxa de prenhez (60 dias; %)	16,1 ^a (229)	28,8 ^b (208)	22,9 ^{ab} (214)
Número médio de corpo lúteo	0,92 ^a (134)	1,19 ^b (208)	0,98 ^{ab} (214)
Área média do corpo lúteo (cm ²)	4,23 \pm 0,21 ^a (37)	3,73 \pm 0,15 ^{ab} (78)	3,58 \pm 0,15 ^b (70)
Concentração Plasmática de progesterona na transferência de embrião (ng/mL)	3,7 \pm 0,4	3,3 \pm 0,3	4,0 \pm 0,4

*Somente animais apresentando concentração de progesterona acima de 1ng/mL foram utilizados na análise.

Concluindo, o protocolo hormonal utilizando BE, implante auricular de Norgestomet e eCG aumentou a proporção de receptoras aproveitadas para inovação e aumentou a taxa de prenhez em vacas de leite de alta produção de menor fertilidade (≥ 3 inseminações). Além disso, os protocolos que permitem a transferência de embriões em tempo fixo facilitam o manejo reprodutivo diminuindo a frequência de manejos do protocolo para TETF e eliminando a necessidade de detecção de cio.

Referências

Båge, R., Gustafsson, H., Larsson, B., Forsberg, M., Rodríguez-Martínez, H., 2002. Repeat breeding in dairy heifers: follicular dynamics and estrous cycle characteristics in relation to sexual hormone patterns. *Theriogenology*, 57, 2257-2269.

Badinga, L., Collier, R. J., Thatcher, W. W., Wilcox, C. J., 1985. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. *J. Dairy Sci.* 68, 78-85.

Baruselli, P. S., Marques, M. O., Carvalho, N. A. T., Valentim, R., Berber, R. C. A., Carvalho Filho, A. F., Madureira, E. H., Costa Neto, W. P., 2000a. Aumento da taxa de prenhez em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo "ovsynch" com inovação em tempo fixo. *Arq Fac Vet UFRGS*, 28, 216.

Baruselli, P. S., Marques, M. O., Madureira, E. H., Costa Neto, W. P., Grandinetti, R. R., Bó, G. A., 2000b. Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de P4 e taxa de prenhez. XV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões. *Arq Fac Vet UFRGS*, 28, 218 (abstract).

Baruselli, P. S., Marques, M. O., Madureira, E. H., Costa Neto, W. P., Grandinetti, R. R., Bó, G.A., 2001. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices and eCG. *Theriogenology*, 55, 157 (abstract).

Baruselli, P. S., Reis, E. L., Marques, M. O., Nasser, L.F., Bó, G.A., 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.* 82, 479-486.

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

Bó, G. A., Tríbulo, H., Caccia, M., Tríbulo, R., 2001. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and transferred without estrus detection. *Theriogenology*, 55, 357 (abstract).

Caraviello, D. Z., Weigel, K. A., Fricke, P. M., Wiltbank, M.C., Florent, M. J., Cook, N. B., Nordlund, K. V., Zwald, N. R., Rawson, C. L., 2006. Survey of Management Practices on Reproductive Performance of Dairy Cattle on Large US Commercial Farms. *J. Dairy Sci.* 89, 4723-4735.

Carvalho, J., Carvalho, N., Reis, E., Nichi, M., Souza, A., Baruselli, P. S., 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocol in *Bos indicus*, *Bos taurus* x *Bos indicus*, e *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 69, 167-175.

Cerri, R. L., Rutigliano, H. M., Bruno, R. G. S., Santos, J. E. P., 2005. Progesterone (P4) concentrations and ovarian response after insertion of a new or 7-d used intravaginal P4 insert (IPI) in proestrus lactating cows. *J. Dairy Sci.* 88, 37 (Supplement, 1).

Colazo, M. G., Kastelic, J. P., Mapletoft, R. J., 2003. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology*, 60, 855-865.

Colazo, M. G., Kastelic, J. P., Whittaker, P. R., Gavaga, Q. A., Wilde, R., Mapletoft, R. J., 2004. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol with or without progesterone. *Anim. Reprod. Sci.* 81, 25-34.

De La Sota, R. L.; Lucy, M. C.; Staples, C. R.; Thatcher, W. W., 1993. Effects of recombinant bovine somatotrophin (Sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76, 1002-1013.

- Dransfield, M. B. G., Nebel, R. L., Pearson, R. E., Warnick, L. D., 1998. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. *J. Dairy Sci.* 81, 1874-1882.
- Ferreira, R. M., Rodrigues, C. A., Ayres, H., Mancilha, R. F., Franceschini, P. H., Esper, C. R., Baruselli, P. S., 2006. Effect of synchronizing ovulation in cattle administered a norgestomet ear implant in association with eCG and estradiol treatments on pregnancy rate after fixed-time embryo transfer. *Anim. Reprod.* 3, 370-375.
- Graden, A. P., Olds, D., Mochow, C. R., Mutter, L.R., 1968. Causes of fertilization failure in repeat breeding cattle. *J. Dairy Sci.* 51, 778-781.
- Gustafsson, H., Larsson, K., 1985. Embryonic mortality in heifers after artificial insemination and embryo transfer-differences between virgin and repeat breeding heifers. *Res. Vet. Sci.* 39, 271-274.
- Hanlon, D. W., Williamson, N. B., Wichtell, J. J., Steffert, I. J., Craigie, A. L., Pfeiffer, D. U., 1996. The effect of estradiol benzoate administration on estrus response and synchronized pregnancy rate in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone. *Theriogenology*, 45, 775-785.
- Hawk, H. W., Cooper, B. S., 1975. Improvement of sperm transport by the administration of estradiol to estrous ewes. *J. Anim. Sci.* 41, 1400-1406.
- Kerbler, T. L., Buhr, M. M., Jordan, L. T., Leslie, K. E., Walton, J. S., 1997. Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology*, 47, 703-714.
- Kim, S., Tanaka, T., Kamomae, H., 2003. Different effects of subnormal levels of progesterone on the pulsatile and surge mode secretion of luteinizing hormone in ovariectomized goats. *Biology Reprod.* 69, 141-145.
- Kinder, J. E., Kojima, F. N., Bergfeld, E. G., Wehrman, M. E., Fike, K. E., 1996. Progesterin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *J. Anim. Sci.* 74, 1424-1440.
- Lafi, S. Q., Kaneene, J. B., 1992. Epidemiological and economic study of the repeat breeder syndrome in Michigan dairy cattle. I economic modeling. *Prev. Vet. Med.* 14, 87-98.
- Linares, T., 1981. Embryonic development in repeat breeder and virgin heifers seven days after insemination. *Anim. Reprod. Sci.* 4, 189-198.
- Lopes, A. S., Butler, S. T., Gilbert, R. O., Butler, W. R., 2007. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 99, 34-43.
- Lopes, F. L., Arnold, D. R., Williams, J., Pancarci, S. M., Thatcher, M. J., Drost, M., Thatcher, W. W., 2000. Use of estradiol cypionate for timed insemination. *J. Dairy Sci.* 83, 216.
- Lopez, H., Satter, L. D., Wiltbank, M. C., 2004. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 81, 209-223.
- Lyimo, Z. C., Nielen, M., Ouweltjes, W., Kruip, T. A., Van Eerdenburg F. J., 2000. Relationship among estradiol, cortisol and intensity of estrous behavior in dairy cattle. *Theriogenology*. 53, 1783-1795.
- Macmillan, K. L., Peterson, A. J., 1993. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrus synchronization, increasing pregnancy rates and treatment post-partum anoestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 33, 125.
- Macmillan, K. L., Taufá, V. K., Barnes, D. R., Day, A. M., 1991. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. *Anim. Reprod. Sci.* 21, 25-40.
- Mann, G. E., Haresign, W., 2001. Effect of oestradiol treatment during GnRH-induced ovulation on subsequent PGF α release and luteal life span in anoestrous ewes. *Anim. Reprod. Sci.* 67, 245-52.
- Odde, K. G., 1990. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. *J. Anim. Sci.* 68, 817-830.

- O'Farrell, K.J., Langley, O.H., Sreenan, J. M., 1983. Fertilisation and embryonic survival rates in dairy cows culled as repeat breeders. *Vet. Rec.* 112, 95-97.
- Pancarci, S. M, Jordan, E. R., Risco, C. A., Schouten, M. J., Lopes, F. L., Moreira, F., Thatcher, W. W., 2002. Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 1228-1231.
- Perry, G. A., Smith, M. F., Lucy, M. C., Green, J. A., Parks, T. E., Macneil, M. D., Roberts, A. J., Geary, T. W., 2005. From the Cover: Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 5268-5273.
- Pursley, J. R., Mee, M. O., Wiltbank, M. C., 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 and GnRH. *Theriogenology*, 44, 915-923.
- Putney, D. J., Drost, M., Thatcher, W. W., 1988. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperature between days 1 to 7 post insemination. *Theriogenology*, 30, 195-209.
- Rodrigues, C. A.; Ayres, H.; Reis, E. L.; Nichi, M.; Bó, G. A.; Baruselli, P. S., 2004. Artificial insemination and embryo transfer pregnancy rates in high production Holstein breedings under tropical conditions. In: 15th International Congress on Animal Reproduction. Porto Seguro. v. 2. p. 396.
- Rodrigues, C.A.; Mancilha, R.F.; Ferreira, R.M.; Santana, R.; Sá filho, M. F.; Ayres, H.; Madureira, E.H.; Baruselli, P.S. 2006. Synchronization of ovulation using ear implant associated to estradiol cypionate or benzoate for fixed time embryo transfer. In: XXIV World Buiatrics Congress, 2006, v. 1. p. 1-1.
- Rodrigues, C. A.; Ayres, H.; Ferreira, R. M.; Teixeira, A. A.; Mancilha, R. F.; Oliveira, M. E. F.; Souza, A. H.; Baruselli, P. S. 2007a. Taxa de concepção à inseminação artificial e à transferência de embriões em vacas holandesas de alta produção. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2007, v. 35. p. s1254.
- Rodrigues, C. A.; Ayres, H.; Ferreira, R. M.; Teixeira, A. A.; Mancilha, R. F.; Oliveira, M. E. F.; Souza, A. H.; Baruselli, P. S. 2007b. Comparação entre a taxa de concepção após inseminação artificial ou a transferência de embriões em vacas holandesas de alta produção repetidoras de serviço. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2007, v. 35. p. s1255.
- Rodrigues, C. A.; Ayres, H.; Ferreira, R. M.; Teixeira, A. A.; Mancilha, R. F.; Oliveira, M. E. F.; Souza, A. H.; Baruselli, P. S., 2007c. Taxa de concepção de embriões frescos e criopreservados transferidos em vacas holandesas de alta produção. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2007. v. 35. p. s1256.
- Rodrigues, C. A.; Ayres, H.; Ferreira, R. M.; Teixeira, A. A.; Mancilha, R. F.; Oliveira, M. E. F.; Souza, A. H.; Baruselli, P. S. 2007d. Efeito da sincronia entre a doadora e a receptora na taxa de concepção após transferência de embriões frescos e criopreservados em vacas holandesas de alta produção. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2007. v. 35. p. s1257.
- Rodrigues, C.A., A. A. Teixeira; R. M. Ferreira, R. F. Mancilha, A. H. Souza; P. S. Baruselli, 2008. Effect of fixed time embryo transfer on reproductive efficiency in high producing repeat breeder Holstein cows (em vias de publicação).
- Sangsrivong, S., Combs, D. K., Sartori, R., Armentano, L. E., Wiltbank, M.C. 2002. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 2831-2842.
- Sartori, R., Rosa, G. J. M., Wiltbank, M. C., 2002. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating cows and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.* 85, 2813-2822.
- Sellers, C. B., Dalton, J. C., Manzo, R., Day, J., Ahmadzadeh, A., 2006. Time and incidence of ovulation and conception rates after incorporating estradiol cypionate into a timed artificial insemination protocol. *J. Dairy Sci.* 89, 620-626.

- Seneda, M. M., Borsato, E. A., Ludwig JR, H. E., Rubin, K. C. P., Saut, J. P. E., Barreiros, T. R. R., 2004. Relationship between ovulatory follicle size and conception rate in timed artificial insemination *Bos taurus x Bos indicus* heifers. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 28, 137-142.
- Souza, A. H., Cunha, A. P., Caraviello, D. Z., Wiltbank, M. C., 2005. Profiles of circulating estradiol after different estrogen treatments in lactating dairy cows. *Anim. Reprod.* 4, 224-232.
- Souza, A. H., Gümen, A., Silva, E. P. B., Cunha, A. P., Guenther, J. N., Peto, C. M., Caraviello, D. Z., Wiltbank, M. C., 2007. Supplementation with estradiol-17 β before the last GnRH of the Ovsynch protocol in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90, 4623-4634.
- Souza, A. H., S. Viechnieski, F. A. Lima, C. T. S. Dias, Bó, G. A., Wiltbank, M. C., Baruselli, P. S., 2008. Effects of equine chorionic gonadotropin and estradiol cypionate on progesterone-based timed AI protocols in high producing cows. *Theriogenology*. (enviado para publicação)
- Teixeira, A.A.; Rodrigues, C.A.; Sales, J.N.S.; Pieroni, J.S.P.; Crepaldi, G.A.; Ferreira, R.M.; Baruselli, P.S. 2008. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva de vacas de leite de alta produção. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2008. v. 36. p. 593.
- Thatcher, W. W., Collier, R. J., 1986. Effects of climate on bovine reproduction. In: *Current Therapy in Theriogenology 2*. David Morrow, Ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, 301-309.
- Tribulo, H., Bó, G. A., Tegli, J. C., Cutaia, L., Moreno, D., 2000. Pregnancy rates in embryo recipients treated with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal device to eliminate the need for estrus detection, *In: Proceedings of the 14th International Congress on Animal Reproduction*, Stockholm. Sweden. Stockholm: ICAR. vol.2, pp.115 (abstract).
- Van Eerdenburg, F. J., Karthaus, D., Taverne, M. A., Merics, I., Szenci, O., 2002. The relationship between estrous behavioral score and time of ovulation in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 85, 1150-1156.
- Vasconcelos, J. L., Silcox, R. W., Rosa, G. J., Pursley, J. P., Wiltbank, M. C., 1999. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, 52, 1067-1078.

Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo

Pietro S. Baruselli¹, José Octavio Jacomini^{1,2}, José Nélio S. Sales¹, Gabriel A. Crepaldi¹

¹Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, São Paulo-SP, Brasil. ²Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil. barusell@usp.br

1. Introdução

O rebanho bovino brasileiro é composto por mais de 200 milhões de animais (MAPA, 2007), sendo que o gado zebu (*Bos indicus*) corresponde a aproximadamente 80% desse patrimônio. A predominância desse grupo genético se deve a maior adaptabilidade às condições climáticas (altas temperaturas e umidade) e a disponibilidade de alimentos (sazonalidade quali-quantitativa da produção de forrageiras) encontrados no Brasil tropical. Porém, apesar dessas características adaptativas dos zebrúinos às condições tropicais, na grande maioria dos rebanhos brasileiros observa-se comprometimento nos índices reprodutivos, principalmente devido ao prolongamento do período de anestro pós-parto. Além da baixa eficiência reprodutiva, o rebanho brasileiro apresenta baixo número de vacas inseminadas artificialmente (apenas 6% das vacas em idade reprodutiva). Historicamente, a inseminação artificial revelou-se como a ferramenta mais eficiente do melhoramento genético, tanto em bovinos de leite quanto em bovinos de corte. Dessa forma, torna-se necessária a adoção de boas técnicas de manejo (nutrição, sanidade, etc), associadas ao emprego da IA com sêmen de touros provados geneticamente com o objetivo de melhorar a eficiência reprodutiva, com conseqüente aumento na produção de bezerros de qualidade e na rentabilidade da propriedade.

Existe na atualidade tecnologia para sincronizar o crescimento folicular e a ovulação em bovinos. Com essa finalidade, emprega-se uma seqüência de tratamentos (protocolos) que tem como finalidade sincronizar a ovulação para o emprego da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que dispensa a necessidade de detecção do cio, colaborando sobremaneira para praticidade do emprego dessa biotecnologia. Os trabalhos científicos apontam que a IATF pode ser empregada mesmo em vacas em anestro, antecipando a ovulação pós-parto e melhorando a eficiência reprodutiva do rebanho (Baruselli et al., 2002). No entanto, nessas condições, as pesquisas indicam a importância do tratamento com eCG (gonadotrofina coriônica equina) para aumentar a taxa de ovulação e de prenhez após o emprego de protocolos de sincronização para IATF (Baruselli et al., 2003, Bo et al., 2003, Baruselli et al., 2004).

Além do emprego na IATF, a eCG tem importante papel em programas de superovulação e transferência de embriões em tempo fixo. No relatório da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (2007), apesar da crescente produção brasileira de embriões *in vitro* (196.000), ainda foram produzidos 70.000 embriões *in vivo* (Viana e Camargo, 2007), o que projeta aproximadamente 15.000 superovulações por ano. Esses resultados destacam o Brasil no cenário mundial como primeiro produtor de embriões bovinos.

Trabalhos recentes apontam a possibilidade do emprego da eCG para superovulação tanto em *Bos indicus* como em *Bos taurus*, com o objetivo de facilitar o manejo (dose única), sem comprometer a produção de embriões. Inúmeros fatores interferem na eficiência de programas de TE, com destaque especial às receptoras (Spell et al., 2001; Hasler, 2001). Isto porque, em geral, os programas de TE comerciais apresentam baixas taxas de aproveitamento (% de receptoras aptas à inovulação/total de receptoras tratadas). Normalmente, em um lote de receptoras tratadas com protocolos tradicionais (uso de prostaglandina associado à detecção de estro), somente 40 a 50% dos animais são aproveitados para a inovulação. Considerando-se uma taxa de concepção de 50% do total de animais aproveitados, obtém-se apenas 20 a 25% de gestações ao final do tratamento (Baruselli et al., 2000a e 2000b; Bó et al., 2002). Desta forma, o incremento das taxas de aproveitamento e de concepção das receptoras é fundamental para maximizar a taxa de prenhez e, com isso, elevar o retorno zootécnico e econômico da TE. Em receptoras foram apontados efeitos positivos da eCG em protocolos de transferência de embriões em tempo fixo aumentando a taxa de aproveitamento das receptoras e induzindo a formação de um corpo lúteo que produz mais progesterona no dia da inovulação dos embriões (Baruselli et al., 2000c; Bó et al., 2002).

Considerando os conhecimentos existentes sobre inseminação artificial, superovulação e transferência de embriões em tempo fixo o objetivo desta revisão é discutir os avanços nos protocolos de sincronização, enfatizando as possibilidades do emprego da eCG.

2. Fisiologia do pós-parto

Segundo o Anualpec de 2004, o rebanho bovino brasileiro é composto por mais de 73 milhões de vacas e novilhas em idade reprodutiva. Nesse mesmo ano a produção de bezerros foi de aproximadamente 42 milhões, 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). Esses dados são indicativos de que a baixa eficiência reprodutiva do rebanho brasileiro se deve principalmente ao longo intervalo entre o parto e a concepção.

Após o parto, a fêmea bovina tem que criar um bezerro saudável e estabelecer uma nova gestação. O padrão de desenvolvimento folicular ovariano que prevalece durante a gestação deverá agora ser substituído por uma seqüência de eventos que culminará no crescimento de um folículo dominante que produz estrógeno suficiente para manifestação do comportamento de estro, seguido de ovulação e formação de um corpo lúteo funcional. Esses requisitos são necessários para o restabelecimento da fertilidade no período pós-parto nos diversos tipos de criação (Rhodes *et al.*, 2003). No entanto, o que se observa em muitos casos nas condições brasileiras de manejo é um longo período de anestro pós-parto, tanto em *Bos indicus* quanto em *Bos taurus*, apesar de haver crescimento folicular durante essa fase (Wiltbank *et al.*, 2002). Existem pesquisas que indicam que logo após o parto, verifica-se baixa quantidade de LH armazenado na hipófise, sendo essa característica fisiológica limitante para o restabelecimento da atividade ovariana no período pós-parto (Yavas e Walton, 2000). Nesse período não foram relatadas alterações na liberação de FSH.

No final da gestação ocorre diminuição da concentração de gonadotrofinas devido à intensa retroalimentação negativa da progesterona e do estrógeno. Logo após o parto (~4 dias), nota-se elevação das concentrações de FSH e, conseqüentemente, emergência da primeira onda de crescimento folicular (Wiltbank *et al.*, 2002). No entanto, para que ocorra a ovulação do folículo dominante, a freqüência dos pulsos de LH deve ser de aproximadamente 1 pulso por hora (revisado em Bó *et al.*, 2003). A ausência ou a inadequada pulsatilidade de LH faz com que o folículo dominante não se desenvolva muito além do diâmetro da divergência folicular. Wiltbank *et al.* (2002) especularam que zebuínos podem apresentar deficiência de FSH no período pós-parto. Os autores se basearam no estudo de Ruiz-Cortez e Olivera-Angel (1999), no qual se verificou que folículos de vacas zebuínas não alcançavam diâmetros superiores a 6mm durante o anestro pós-parto. Contudo, estudos recentes sobre divergência folicular em Nelore (Gimenes *et al.* 2005b; Sartorelli *et al.*, 2005; Castilho *et al.*, 2006), constataram que o folículo de *Bos indicus* atinge a dominância com diâmetro inferior ao relatado para *Bos taurus* (8,5mm), com aproximadamente 6mm. Portanto, condições anovulatórias freqüentemente verificadas em zebuínos não parecem estar associadas à deficiência de FSH, que promove o crescimento até a divergência, e sim de LH, responsável pela continuidade do crescimento e indução da ovulação do folículo dominante. Sendo assim, especula-se que em fêmeas zebuínas em anestro severo, com comprometimento na liberação de LH, os folículos não atingem diâmetros superiores a 6mm. Já, em fêmeas taurinas nas mesmas condições de anestro os folículos crescem até 8,5mm de diâmetro.

Quanto ao padrão de liberação do LH no período pós-parto, existem indícios de que zebuínos e taurinos apresentem diferenças nas concentrações plasmáticas dessa gonadotrofina. Em um experimento, D'Occhio *et al.* (1990) observaram que, aos 40 dias pós parto, vacas *Bos taurus* (Hereford Shorthorn) apresentaram maior concentração plasmática de LH (0,66±0,04 ng/ml) do que vacas *Bos indicus* (0,56±0,03 ng/ml; Brahman). Essa diferença aumentou à medida que a análise se distanciou do parto. Nesse mesmo estudo, constatou-se que vacas *Bos taurus* tiveram maior secreção pulsátil de LH e taxa de prenhez entre 50 e 120 dias após o parto que vacas *Bos indicus*. Após o restabelecimento dos estoques hipofisários de LH (15 a 30 dias de pós-parto; Yavas e Walton, 2000), os principais fatores que comprometem a ovulação são a condição nutricional e a amamentação (Montiel e Ahuja, 2005).

Quanto à nutrição, sabe-se que animais criados em regiões tropicais apresentam comprometimento na atividade ovariana pós-parto devido principalmente ao inadequado conteúdo energético fornecido pelas pastagens. Dessa maneira, a energia ingerida pelo animal é priorizada para funções vitais de manutenção e de produção de leite, em detrimento das funções reprodutivas (revisado em Montiel e Ahuja, 2005). Os efeitos resultantes do comprometimento nutricional são a supressão na liberação de GnRH e, conseqüentemente, diminuição na frequência dos pulsos de LH (Schillo, 1992), reduzindo o diâmetro máximo do folículo dominante e a duração da onda de crescimento folicular (Rhodes *et al.*, 1995; Wiltbank *et al.*, 2002). De acordo com esses achados, a avaliação do escore de condição corporal (ECC) e da nutrição do rebanho tornam-se importantes ferramentas do manejo reprodutivo (Montiel e Ahuja, 2005).

Outro fator que pode inibir a ovulação no pós-parto é a amamentação, por reduzir a liberação de GnRH e a secreção de LH (Williams, 1990). Essa inibição é exercida pela secreção de um peptídeo opióide hipotalâmico (β -endorfina) em resposta ao estímulo da amamentação. O efeito da amamentação na regulação da liberação tônica de LH é determinado pela habilidade da vaca em identificar seu bezerro. A visão e o olfato exercem um papel crítico no desenvolvimento da relação da mãe com o bezerro, permitindo que a vaca identifique o seu bezerro. A remoção de ambos os sentidos atenua os efeitos negativos da amamentação na secreção de LH. Assim, existem trabalhos que apontam que a relação da vaca com o bezerro é responsável por prolongar o anestro pós-parto. Esse efeito supressivo é independente de estímulos neurosensoriais no úbere (Montiel e Ahuja, 2005).

Essas alterações fisiológicas podem afetar a maturação final e a ovulação do folículo dominante. Além do ato de amamentar, o olfato, a visão, o estímulo tátil e a audição podem também induzir essas alterações fisiológicas (Williams *et al.*, 1996). Para atenuar o efeito da presença do bezerro, realiza-se desmame total, parcial (permitir ao bezerro acesso à mãe uma ou duas vezes ao dia) ou temporário (remoção do bezerro durante 48 a 96h; revisado em Yavas e Walton, 2000; Montiel e Ahuja, 2005). Essas técnicas de manejo podem ser empregadas para aumentar a pulsatilidade de LH e promover o crescimento folicular e a ovulação de rebanhos em anestro, isoladamente ou em conjunto com tratamentos hormonais.

Assim, os dados acima apresentados demonstram a importância do conhecimento das particularidades da fisiologia reprodutiva de *Bos indicus* e de *Bos taurus* para empregar biotécnicas que buscam a multiplicação de indivíduos geneticamente superiores e a melhoria da eficiência reprodutiva.

3. Propriedades farmacológicas da eCG

A eCG é um fármaco de meia vida longa (até 3 dias), produzido nos cálices endometriais da égua prenhe (40 a 130 dias; Murphy e Martinuk, 1991), que se liga aos receptores de FSH e LH dos folículos e aos receptores de LH do corpo lúteo (Stewart e Allen, 1981). Em eqüinos, a eCG causa ovulação ou luteinização de folículos durante a gestação, com conseqüente aumento da progesterona circulante (revisado por Murphy e Martinuk, 1991).

A eCG é composta de duas subunidades (α - composta por 96 aminoácidos; e β - composta por 149 aminoácidos). Uma característica importante da molécula de eCG é a existência de grande quantidade de carboidratos (aproximadamente 45% de sua massa) principalmente a N-acetil neuramina (ou ácido siálico), primordialmente presente na subunidade β da molécula de eCG, o que proporciona uma grande meia vida a este composto químico (Murphy and Martinuk, 1991). Ainda, devido ao alto peso molecular e à presença de ácido siálico, a molécula de eCG é carregada negativamente, o que dificulta a sua filtração glomerular e aumenta ainda mais sua meia-vida. Devido a todos estes fatores, a meia-vida da eCG quando aplicado em bovinos é longa (revisado por Souza 2008).

A eCG quando administrada vacas em anestro cria condições para estimular o crescimento folicular e a ovulação, mesmo em vacas que tenham comprometimento na liberação de gonadotrofinas. Seu uso tem apresentado efeito positivo em rebanhos com baixa taxa de ciclicidade (anestro), em animais recém paridos (período pós parto inferior a 2 meses), em animais com condição corporal comprometida ($\leq 2,5$ na escala de 1 a 5; Baruselli et al., 2004a) e em animais que apresentam comprometimento no crescimento do folículo dominante devido à altos níveis de progesterona ao final do tratamento de

sincronização da ovulação (aumenta a taxa de ovulação; Baruselli et al., 2004b e aumenta a taxa de prenhez; Marques et al., 2005). Ainda, devido sua ação de LH e FSH e longa meia vida, a eCG pode ser utilizada em dose única em protocolos para superovulação em bovinos (Baruselli et al., 2008). O emprego da eCG também tem sido relatado em receptoras de embrião. Receptoras que recebem eCG durante o tratamento de sincronização apresentam aumento da taxa de ovulação e de aproveitamento, além de possuírem maiores níveis de progesterona circulante no diestro (Baruselli et al., 2000c), minimizando falhas no reconhecimento da gestação (Binelli et al., 2001) e aumentando a eficiência da transferência de embriões.

4. Utilização da eCG em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo

Existem na literatura científica controvérsias sobre o emprego da eCG em protocolos de sincronização para IATF. Alguns trabalhos indicam efeito positivo e outros demonstram que a eCG não aumenta a taxa de concepção à IATF. Os resultados de nosso grupo de pesquisa também apresentam variação quanto ao efeito da eCG na IATF. Após realização de inúmeros trabalhos com grande número de animais verificamos que em alguns experimentos o tratamento com eCG (400UI na retirada do dispositivo de P4) aumentou significativamente a taxa de concepção à IATF. No entanto, em outros experimentos nenhum efeito positivo foi encontrado (Tabela 1).

Tabela 1. Taxa de concepção à IATF (%) de vacas tratadas ou não com eCG no momento da retirada dos dispositivos de progesterona e ou progestágenos.

Publicação		Com eCG	Sem eCG	Valor de P
<i>Baruselli et al., (2003)</i>	Nelore	55,1 (59/107) ^a	38,9 (42/108) ^b	< 0,05
<i>Baruselli et al., (2003)</i>	Brangus	61,8 (199/332)	59,6 (192/332)	> 0,05 NS
<i>Marques et al., (2004)</i>	Nelore	58,1 (172/296)	61,9 (179/289)	> 0,05 NS
<i>Silva et al., (2004)</i>	Nelore	51,7 (155/300) ^a	33,8 (101/299) ^b	< 0,05
<i>Rodrigues et al., (2004)</i>	Nelore	50,9 (56/110) ^a	37,8 (37/98) ^b	< 0,05
<i>Penteadó et al., (2004)</i>	Nelore	55,6 (125/225) ^a	42,2 (98/232) ^b	< 0,05

NS=não significativo

Para tentar compreender o motivo da grande variação nos resultados da literatura iniciamos trabalhos procurando estudar o efeito do tratamento com eCG conforme o padrão de ciclicidade dos animais no início do protocolo de sincronização. Em 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., 2003), verificou-se efeito positivo da eCG conforme o grau de anestro. Em animais em anestro (sem CL; tanto com folículos grandes quanto pequenos) houve efeito positivo do tratamento com eCG, enquanto que, nos animais cíclicos (com presença de CL), não se notou aumento na taxa de concepção à IATF (Tabela 2). O efeito positivo da eCG foi mais evidente conforme aumentou a intensidade do anestro. Os resultados positivos da utilização da eCG somente em animais em anestro também foram constatados em pesquisa realizada na Argentina (Cutaia et al., 2003) e estão também apresentados e discutidos em revisões científicas (Bo et al., 2003 e Baruselli et al., 2004).

Tabela 2. Taxa de prenhez à inseminação artificial em tempo fixo conforme classificação da funcionalidade ovariana de vacas Nelore lactantes tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona (DP4) associado ou não ao tratamento com eCG na retirada do dispositivo (Dia 8).

Classificação dos ovários	Taxa de prenhez		Diferença (eCG – controle)	Valor de P
	DP4	DP4 + eCG		
A (presença de CL)	55,5 (15/27)	64,0 (16/25)	+ 8,5%	0,37
B (fol (s) ≥ 8mm)	34,4 (22/64)	50,0 (29/58)	+ 15,6%	0,06
C (fol (s) < 8mm)	29,4 (05/17)	56,5 (13/23)	+ 27,1%	0,08

Nosso grupo de pesquisa realizou outros experimentos para confirmar o efeito positivo do tratamento com eCG conforme a ciclicidade. Rodrigues et al. (2004) verificaram que apenas os animais em anestro (ausência de CL no início da sincronização) responderam positivamente ao tratamento com eCG [52,2% (47/90) vs 36,5% (27/74); $P < 0,05$]. Nos animais ciclando (presença de CL no início da sincronização) não foi verificado aumento da taxa de concepção após o tratamento com eCG.

Em outro estudo realizado por nosso grupo com o objetivo de avaliar os efeitos do uso do eCG na dinâmica folicular de vacas Nelore (*Bos indicus*) comprovadamente em anestro e sincronizadas para IATF, verificou-se que o tratamento com eCG na retirada do implante auricular de progestágeno aumentou o diâmetro do folículo dominante (Figura 1), além de aumentar as taxas de ovulação e de concepção (Tabela 3). Esse efeito também foi verificado em novilhas Nelore ciclando tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR; Baruselli et al., 2004a). Animais cliclando (presença de CL no início do protocolo) apresentam aumento significativo nos níveis circulantes de progesterona durante o tratamento, o que pode comprometer a pulsatilidade de LH e o crescimento final do folículo dominante (Carvalho et al., 2008). As novilhas ciclando tratadas com eCG na retirada do dispositivo de progesterona apresentaram aumento significativo na taxa de ovulação [sem eCG = 50,0% (10/20) vs com eCG = 76,2% (16/21); $P < 0,05$; Baruselli et al., 2004a]. Verificamos que o tratamento com eCG também aumentou a taxa de prenhez de novilhas Nelore cliclando tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona para IATF [sem eCG = 15,7% (31/197) vs com eCG = 34,9% (68/195); $P < 0,05$; Marques et al., 2004]. Apesar do aumento significativo do tratamento com eCG na taxa de prenhez os resultados foram abaixo do esperado, indicando que outros efeitos estão influenciando a eficiência da IATF em novilhas Nelore.

Tabela 3. Dinâmica folicular de vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes em anestro tratadas com implante auricular contendo progestágeno (Crestar) associado ou não ao eCG.

	Com eCG (n=26)	Sem eCG (n=24)	P
Taxa de ovulação (%)	73,1 (19/26) ^a	50,0 (12/24) ^b	0,04
Intervalo entre a retirada da P4 e a ovulação (h)	72,0 ± 1,1	73,0 ± 1,9	0,72
Diâmetro máximo do folículo dominante (mm)	1,22 ± 0,06	1,04 ± 0,07	0,04
Diâmetro máximo do folículo ovulatório (mm)	1,24 ± 0,05	1,21 ± 0,04	0,70
Taxa de concepção (%)	46,2 (12/26) ^a	20,8 (5/24) ^b	0,02
Taxa de concepção dos animais que ovularam (%)	63,2 (12/19)	41,7 (5/12)	0,12

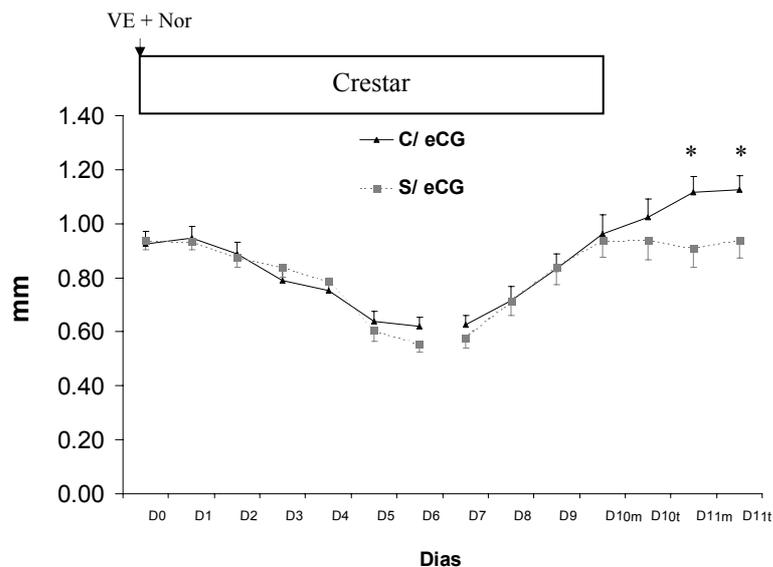


Figura 1. Dinâmica folicular de vacas Nelore em anestro tratadas com protocolo Crestar associado ou não a 400 UI de eCG no momento da retirada do implante auricular (dia 9).

Com o objetivo de compreender melhor o efeito da eCG na IATF em vacas de corte realizamos um estudo retrospectivo (Baruselli et al. 2004) para avaliar o efeito do tratamento com eCG em função da condição corporal (escala 1-5) dos animais no momento do tratamento de sincronização da ovulação. Nesse estudo foram avaliadas 1987 IATFs realizadas em vacas Nelore tratadas ou não com eCG no momento da retirada do dispositivo de progesterona (Figura 2). Verificou-se efeito positivo do tratamento com eCG somente nos animais com ECC ≤ 3 . Em animais com satisfatória condição corporal (> 3) não foi constatado efeito positivo do tratamento com eCG na taxa de concepção. A condição corporal está frequentemente relacionada à ciclicidade (D'Acchio et al., 1990; Viscarra et al., 1998). Assim, animais com boa condição corporal apresentam alta taxa de ciclicidade, o que dispensa o tratamento com eCG, conforme discutido anteriormente.

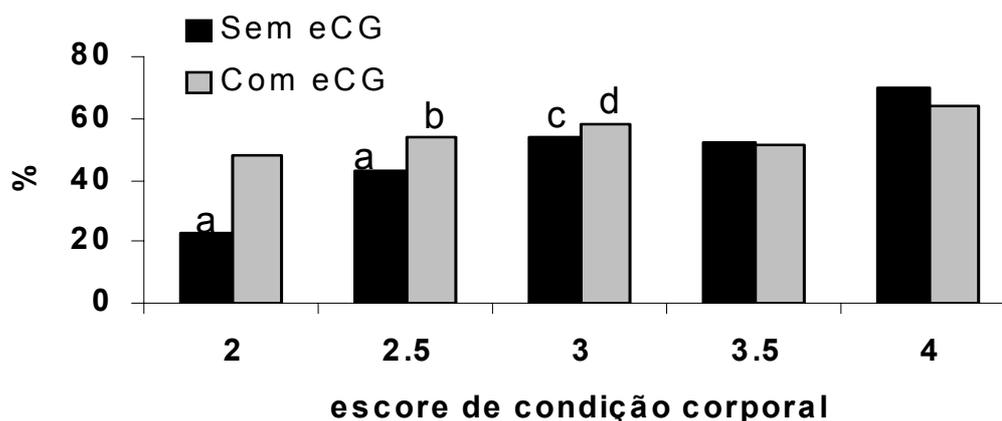


Figura 2. Taxa de concepção de vacas *Bos indicus* (Nelore) lactantes (n= 1.984) tratadas com ou sem eCG no momento da retirada do dispositivo intravaginal de progesterona conforme o escore de condição corporal.

Para verificar se o tratamento com eCG no momento da retirada dos dispositivos de progesterona interfere no intervalo entre a retirada do dispositivo e a ovulação, o que poderia influenciar os resultados da IATF, realizamos uma seqüência de experimento que estão apresentados na Tabela 4. Os resultados das investigações demonstraram que o tratamento com eCG na retirada dos dispositivos de progesterona não influencia o intervalo entre a retirada dos dispositivos e a ovulação nas várias categorias estudadas, sugerindo que vacas que recebem eCG devem ser inseminadas no mesmo momento que vacas que não receberam eCG.

Tabela 4. Intervalo entre a retirada do dispositivo de progesterona e ou progéstágeno e a ovulação (horas) em animais tratados ou não com eCG na retirada do dispositivo.

	Categoria	Sem eCG	Com eCG	Valor de P
<i>Marques et al., 2003</i>	50 (vacas ½ sangue)	78,0 ± 3,1	74,2 ± 4,0	> 0,05
<i>Baruselli et al., 2004a</i>	41 (novilhas Nelore)	72,0 ± 3,1	72,0 ± 2,5	> 0,05
<i>Sá Filho et al., 2004</i>	50 (vacas Nelore)	72,0 ± 1,1	73,0 ± 1,9	> 0,05
<i>Souza et al., 2006</i>	45 (vacas Holandesas)	77,3 ± 2,2	72,3 ± 2,8	> 0,05

Essa seqüência de estudos é sugestiva de que a eCG tem efeito positivo somente em animais em anestro. Isso se deve, provavelmente, a ausência de pulsatilidade adequada de LH para promover o crescimento folicular do folículo dominante e para criar condições de ovulação ao final do protocolo de sincronização. Pela ação prolongada (~3 dias) de FSH e LH após o tratamento com eCG, o comprometimento na liberação de LH seria minimizado e o folículo dominante teria condições de crescer e de ovular. No caso de vacas que apresentam condições fisiológicas de liberação adequada de LH (vacas ciclando e em boas condições de manejo) o tratamento com eCG se torna dispensável.

Em outros estudos observamos que os animais que receberam eCG apresentaram maiores concentrações plasmáticas de progesterona no diestro subsequente ao protocolo de sincronização da ovulação (Tabela 5). Resultados semelhantes foram observados em vacas de leite de alta produção (Figura 3). Esses dados sugerem que o aumento na taxa de concepção após o tratamento com eCG pode também ser devido à elevação nas concentrações plasmáticas de progesterona. Mann et al (1999) demonstraram que vacas que apresentam maiores concentrações de progesterona no diestro apresentam melhores condições de crescimento embrionário e de reconhecimento materno da gestação, culminando em maiores taxas de concepção. No Brasil, já existem trabalhos que também relataram correlação positiva entre a concentração plasmática de progesterona e a taxa de concepção em receptoras de embrião bovino (Reis et al., 2004).

Tabela 5. Concentração plasmática de progesterona (ng/mL) após a ovulação sincronizada de em animais tratados ou não com eCG.

	Número de animais e categoria	Dia da avaliação da [P4] após a ovulação	Sem eCG	Com eCG
<i>Baruselli et al., 2000c</i>	59 (receptoras)	Dia 7	1,4 ± 0,8 ^a	4,2 ± 3,7 ^b
<i>Marques et al., 2003</i>	50 (vacas ½ sangue)	Dia 12	6,4 ± 0,5 ^a	8,6 ± 0,4 ^b
<i>Baruselli et al., 2004a</i>	41 (novilhas Nelore)	Dia 12	2,2 ± 0,2 ^a	4,3 ± 0,6 ^b
<i>Sá Filho et al., 2005</i>	172 (novilhas Nelore)	Dia 5	3,6 ± 0,7 ^a	6,6 ± 1,0 ^b

Assim, pode-se supor que 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.

4.1 Emprego da eCG para IATF em vacas Holandesas de alta produção

Vacas de leite de alta produção apresentam maior taxa de ciclicidade que vacas de corte criadas a pasto. Provavelmente devido a essa característica, os trabalhos que realizamos não evidenciaram aumento na taxa de ovulação após o tratamento com eCG em vacas Holandesas em lactação (Souza et al., 2006, Souza, 2008). No entanto, verificou-se, como em vacas e novilhas de corte, aumento nas concentrações de progesterona no diestro subsequente a sincronização com eCG (Figura 3). O eCG parece estar aumentando a capacidade esteroidogênica do CL em uma fase crítica do desenvolvimento embrionário, minimizando falhas no reconhecimento fetal da gestação, uma vez que vacas de leite de alta produção possuem alto metabolismo hepático dos esteróides (Sartori et al., 2002).

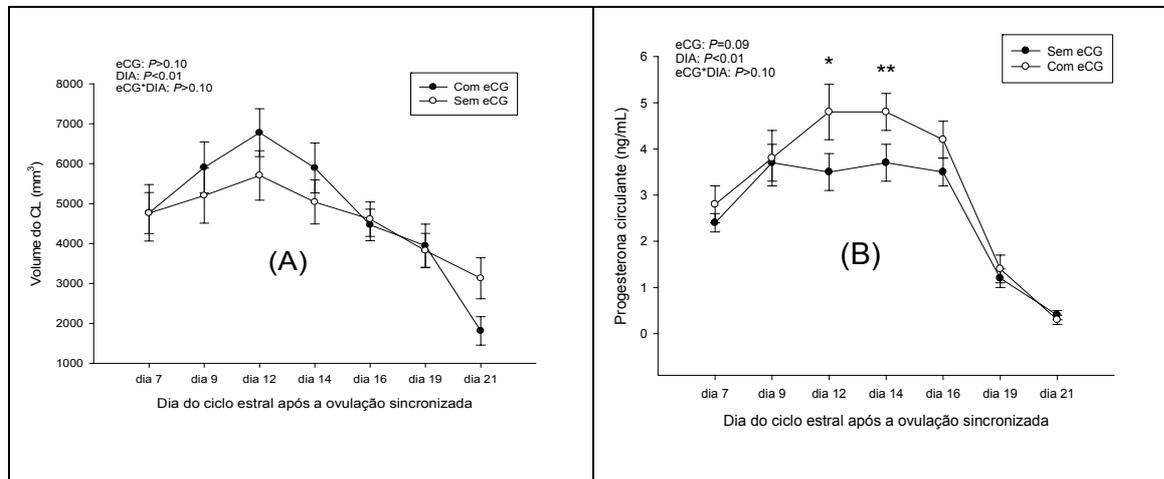


Figura 3. Efeito da eCG no volume do CL (A) e da P4 circulante (B) durante o ciclo estral subsequente ao uso de protocolos de IATF em vacas de leite de alta produção. * $P < 0.05$; ** $P < 0.10$ (Souza, 2008).

A taxa de concepção à IATF das vacas Holandesas variou conforme o tratamento e a condição corporal. Os animais de menor escore de condição corporal ($< 2,75$) que não receberam eCG no final do protocolo hormonal, apresentaram reduzidas taxas de concepção que os animais de menor ECC tratados com eCG (Figura 4). Constatou-se, também, efeito positivo do tratamento com cipionato de estradiol nos animais com ECC $< 2,75$ que não receberam eCG (Figura 4). Nos animais com escore de condição corporal superior a 2,75 não se verificou efeito positivo do tratamento com eCG (Souza, 2008).

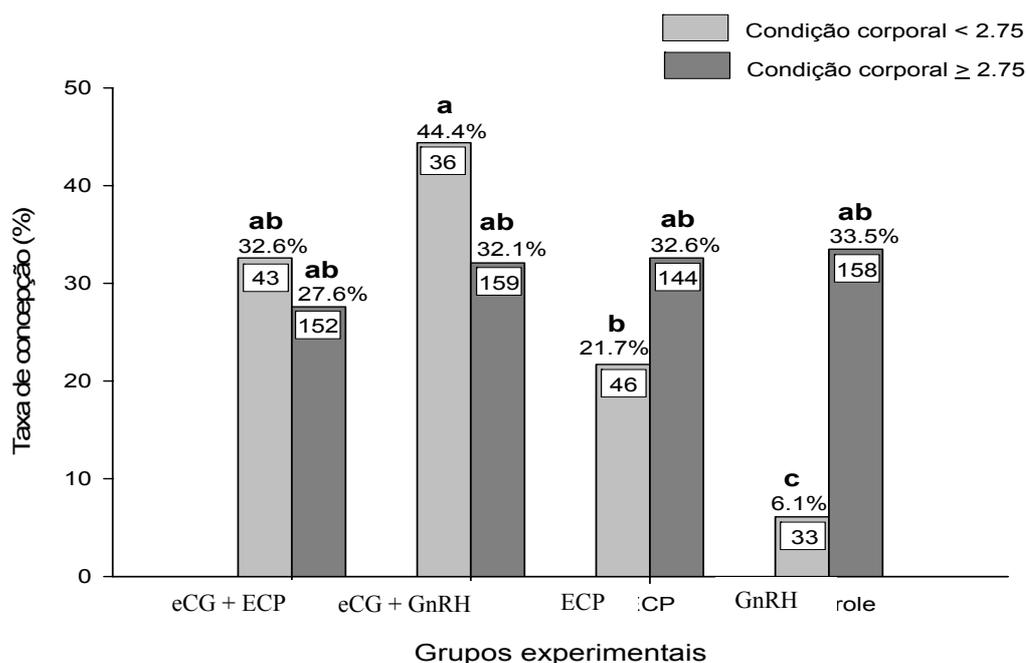


Figura 4. Taxa de concepção para animais com condição corporal <2,75 e ≥2,75 (escala de 1 a 5) conforme o grupo experimental. Letras diferentes entre colunas diferem estatisticamente; $P < 0.05$. (Souza, 2008)

5. Uso da eCG e do desmame temporário associado aos programas de IATF

O uso do desmame temporário associado a programas de sincronização de estro tem sido estudado com intuito de aumentar a eficiência reprodutiva em bovinos (Quesada et al. 2001). A retirada temporária dos bezerros aumenta a pulsatilidade de LH (Willians et al., 1996) e pode colaborar para o crescimento folicular e a ovulação. Com o objetivo de estudar o efeito do desmame temporário (desde a retirada do implante até a IATF= 54 horas) e da eCG (no momento da retirada do implante) em vacas Nelore submetidas à IATF, foram sincronizadas 459 vacas paridas há mais de 60 dias em um experimento fatorial 2x2 (Tabela 6; Penteadó et al., 2004). Os resultados são sugestivos de que tanto o tratamento com eCG quanto o desmame temporário foram efetivos em aumentar a taxa de concepção à IATF, provavelmente devido ao elevado percentual de anestro do rebanho empregado no experimento.

Tabela 6. Taxa de prenhez de vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes tratadas com implante auricular contendo progesterona, com ou sem eCG e com ou sem desmame temporário por 54 horas.

eCG	Desmama	N	Taxa de Prenhez (%)
S/ eCG	S/ Desmama	118	37,3 (44/118) ^c
	C/ Desmama	114	47,5 (54/114) ^{bc}
C/ eCG	S/ Desmama	112	52,7 (59/112) ^{ab}
	C/ Desmama	115	58,3 (67/115) ^a
EFEITOS PRINCIPAIS			
S/ eCG		232	42,2 (98/232) ^b
C/ eCG		227	55,5 (126/227) ^a
	S/ Desmama	230	44,8 (103/230) ^b
	C/ Desmama	229	52,8 (121/229) ^a

a ≠ b ≠ c na mesma coluna (P < 0,05)

4.3 Redução do intervalo entre o parto e a IATF empregando o tratamento com eCG

O intervalo de partos recomendado zootecnicamente é de aproximadamente 12 meses. Para alcançar esse índice, as vacas devem tornar-se gestantes rapidamente após o parto (entre 70 e 90 dias). Assim, para atingir a meta de 12 meses, as vacas necessitam ser sincronizadas e inseminadas precocemente.

Com o objetivo de reduzir o intervalo entre o parto e a IATF estudamos (Ayres et al. (2007) o efeito da eCG conforme o período pós-parto e o escore de condição corporal. Foi observado aumento na taxa de concepção à IATF, tanto em animais com alto quanto com baixo escore de condição corporal, quando tratados com eCG no período pós parto precoce (entre 30 e 60 dias). No entanto, o efeito positivo da eCG em animais com escore de condição corporal satisfatório ($\geq 3,0$) desapareceu conforme aumentou a distância do parto (Figura 5). Os dados são indicativos de que quando o tratamento de sincronização da ovulação para IATF é realizado antes de 60 dias pós-parto sugere-se a utilização de eCG em todos os animais, independentemente da condição corporal.

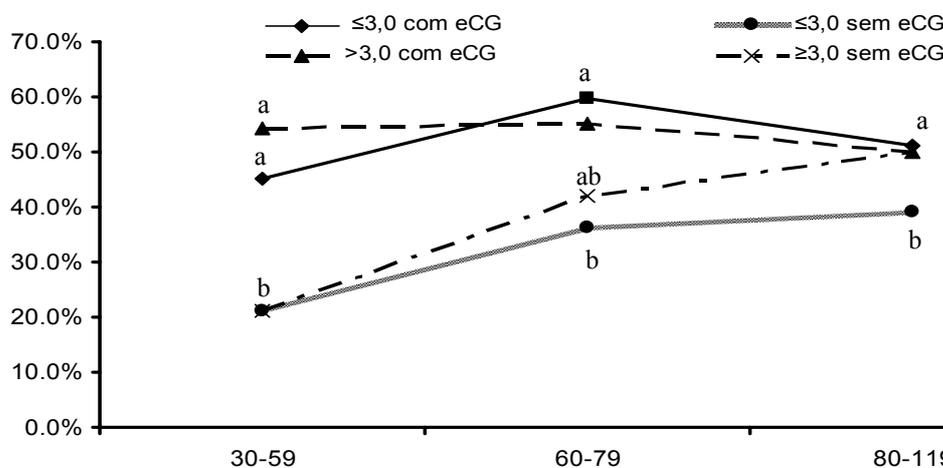


Figura 5. Distribuição da taxa de concepção conforme o período pós-parto, o escore de condição corporal e o tratamento com eCG em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo (n=617).

Com finalidade de avaliar a possibilidade de se obter satisfatórias taxas de concepção em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo no pós-parto precoce (40 a 60 dias), foram inseminadas em tempo fixo 2489 vacas Nelore em diferentes períodos pós-parto (Penteado et al. (2006). Verificaram-se semelhantes taxas de concepção, independentemente do período pós-parto no qual foi realizada a IATF (Figura 6). É importante ressaltar que todos os animais foram tratados com eCG na retirada do implante. Esses dados indicam que é possível realizar a IATF precocemente no período pós parto, associando o emprego da inseminação artificial como ferramenta de melhoramento genético com elevados índices de fertilidade dos rebanhos que empregam essa biotecnologia.

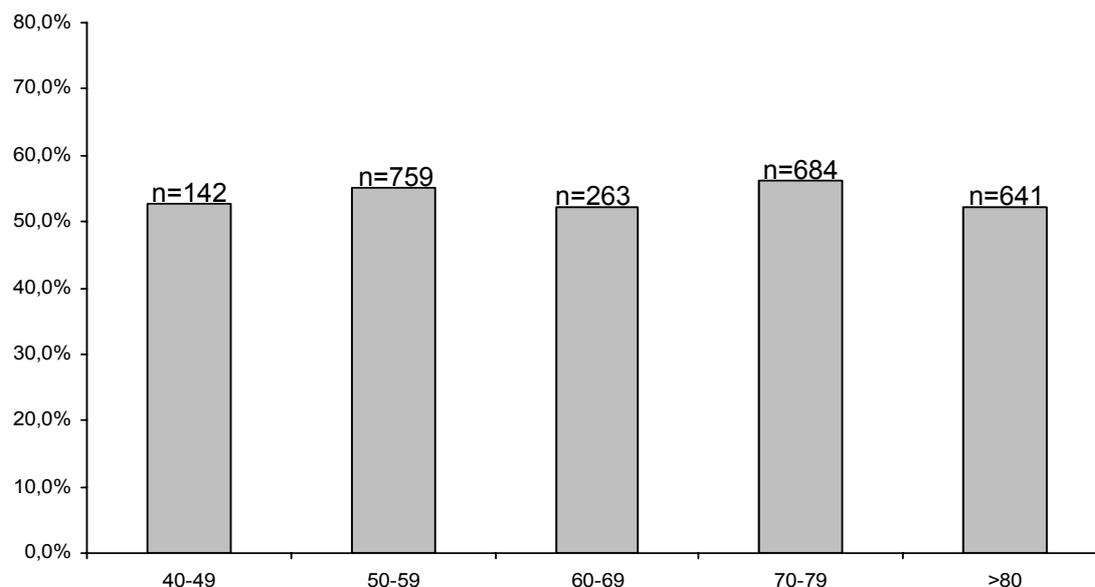


Figura 6. Distribuição da taxa de concepção conforme o período pós-parto (2489 inseminações) em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo.

Os trabalhos científicos apresentados são indicativos de que é possível sincronizar eficientemente o crescimento folicular e a ovulação para a IATF durante o período pós-parto. O tratamento com BE associado a um dispositivo de progesterona e ou progestágeno sincroniza a emergência da onda de crescimento folicular 3 a 4 dias após o tratamento. Os folículos crescem sob ação do FSH e, após a divergência, na presença de concentrações adequadas de LH atingem diâmetros compatíveis com altas taxas de ovulação. No entanto, em vacas em anestro, devido à baixa pulsatilidade de LH verifica-se comprometimento no crescimento folicular e baixa taxa de ovulação ao final do protocolo de sincronização com dispositivos de progesterona e ou progestágenos. Nessa condição, o tratamento com eCG proporciona suporte gonadotrófico para impedir a atresia do folículo dominante e estimular o crescimento folicular e promover a ovulação. Assim, o efeito positivo do tratamento com eCG em protocolos de IATF é dependente do grau de ciclicidade do rebanho. Vacas em anestro necessitam de eCG para estimular o crescimento folicular e criar condições de ovulação ao final do protocolo. No entanto, vacas ciclando (com liberação adequada de LH), apresentam condições fisiológicas para responder com altas taxas de ovulação ao final do tratamento de sincronização sem a necessidade do tratamento com eCG.

6. Superovulação de doadoras de embrião com eCG

6.1 Fatores que afetam a resposta superovulatória em bovinos

A variabilidade na resposta das doadoras ao tratamento superestimulatório com gonadotrofinas continua sendo um dos maiores problemas nos programas comerciais de TE (Mapletoft et al., 2002, Barros e Nogueira, 2004; Baruselli et al., 2006). Esta variação individual ao tratamento superovulatório foi relatada tanto em vacas Nelore (*Bos indicus*; Baruselli et al. 2003), quanto em vacas Holandesas de alta produção (*Bos taurus*; Martins, 2005).

No protocolo tradicional de superovulação (SOV), o tratamento com gonadotrofinas é iniciado na metade do ciclo estral (8-12 dias após ovulação). Esta metodologia apresenta algumas dificuldades por requerer a detecção do “estro base” para o início do tratamento superestimulatório (Mapletoft et al., 2002).

A ausência do folículo dominante e a realização da superovulação no início da onda de crescimento folicular aumentam a eficiência dos programas de SOV (Mapletoft et al., 2002). Sendo assim, alternativas para o controle da emergência da onda de crescimento folicular em momentos aleatórios do ciclo estral, sem a necessidade de detecção do estro para o estabelecimento do “estro base” podem facilitar o manejo

de doadoras tanto *Bos taurus* quanto *Bos indicus*, bem como aumentar a eficiência dos programas de transferência de embriões (Baruselli et al, 2006; Bo et al., 2006).

6.2 Controle da dinâmica folicular para a superovulação em bovinos

O tratamento eletivo para a indução da emergência da nova onda de crescimento folicular é feito com a associação de estradiol (E2) e progesterona (P4). A eficiência desta associação tem sido descrita em diversos trabalhos em fêmeas *Bos taurus* (Bó et al., 1991; Bó et al., 1995; Colazo et al., 2003). Nosso grupo de pesquisa tem estudado o efeito do tratamento com estradiol e progesterona na emergência da onda folicular em *Bos indicus*, *Bos taurus x Bos indicus* e *Bos taurus* mantidas nas mesmas condições de manejo (Carvalho et al., 2008). Não foi observada diferença no intervalo entre o tratamento com benzoato de estradiol e a emergência folicular entre *Bos indicus*, *Bos taurus indicus* e *Bos taurus* (3 a 4 dias).

6.3 Uso da eCG para superestimulação

Estudamos a hipótese de que é possível obter resultados satisfatórios quando do emprego de eCG para superovulação, associado ao protocolo de sincronização da onda de crescimento folicular e da ovulação em doadoras Nelore e Holandesas. Um total de 12 doadoras Nelore (Martins et al., 2006) foi dividido em três grupos: eCG-2500UI; eCG-2000UI e FSH-100mg (*cross-over*; 36 superovulações). Os animais receberam um dispositivo de P4 associado a 2 mg de BE no Dia 0. Nos tratamentos com eCG (Novormon[®]), a superestimulação foi realizada com a administração única de 2500 ou 2000 UI de eCG no Dia 4. No tratamento com FSH, administrou-se 100mg de Folltropin-V[®] em 8 doses decrescentes de 12/12 horas, a partir do Dia 4. No Dia 6, administrou-se PGF. Os dispositivos foram retirados 36 horas após a administração de PGF2 α , e o LH aplicado 48 horas após a PGF2 α (Dia 8 M). Foi realizada uma única inseminação 16 horas após o tratamento com LH. A colheita dos embriões foi realizada no Dia 15. Não foram observadas interações, sendo os efeitos dos tratamentos eCG-2500UI; eCG-2000UI e FSH-100mg, apresentados na Tabela 7 O tratamento com 2000UI de eCG produziu número semelhante de embriões transferíveis comparado ao grupo tratado com FSH.

Tabela 7. Efeito do tratamento superovulatório com diferentes doses de eCG na eficiência de programas de TE com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos indicus*), Poços de Caldas, 2006.

VARIÁVEIS	FSH (100mg)	eCG (2000 UI)	eCG (2500 UI)	Valor P (Teste F)
Nº de animais	12	12	12	
Nº de fol.>8mm (LH)	11,2 \pm 2,7b	18,4 \pm 2,9ab	24,4 \pm 3,9a	0,01
Taxa de ovulação (%)	65,9 (89/135)a	58,4 (129/221)a	33,1 (97/293)b	<0,001
Nº de CL (D15)	7,4 \pm 1,5	9,1 \pm 1,5	8,1 \pm 1,1	0,68
Nº de fol.>8mm (D15)	3,6 \pm 0,8b	7,7 \pm 1,4ab	16,3 \pm 4,3a	<0,01
Taxa recuperação	77,5 (69/89)	70,5 (91/129)	73,2 (71/97)	0,93
Total estruturas	5,7 \pm 1,4	7,6 \pm 1,0	5,9 \pm 1,0	0,50
Embrião grau 1	3,5 \pm 0,7	5,8 \pm 0,9	3,4 \pm 0,7	0,06
Embrião grau 2	0,7 \pm 0,3	0,9 \pm 0,2	0,4 \pm 0,1	0,31
Embrião grau 3	0,4 \pm 0,2	0,2 \pm 0,1	0,6 \pm 0,2	0,37
Embr. Degenerados	0,4 \pm 0,2	0,0 \pm 0,00	0,4 \pm 0,2	0,16
Embr. não fertilizados	0,4 \pm 0,2	0,0 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1	0,19
Embr. Transferíveis	4,6 \pm 0,9	6,9 \pm 1,0	4,4 \pm 0,7	0,08
Embr. Congeláveis	4,2 \pm 0,8ab	6,7 \pm 1,0a	3,8 \pm 0,7b	0,03

Realizamos outro tratamento para verificar a possibilidade de superovular doadoras Nelore com 1.500UI de eCG (Martins et al., 2007). Empregou-se o mesmo delineamento experimental do experimento anterior (*cross-over*; 36 superovulações), diferindo apenas na dose para superovulação: eCG-1500UI, eCG-2000UI e FSH-133mg. Os resultados estão apresentados na Tabela 8. O tratamento com 1500UI de eCG apresentou melhor produção de embriões. Entretanto, a dose de 2000UI de eCG apresentou novamente a mesma eficiência que os animais superovulados com FSH, mostrando ser uma alternativa viável para programas de TE com inseminação artificial em tempo fixo em zebuínos, com vantagens significativas quanto ao manejo das doadoras.

Tabela 8. Efeito do tratamento superovulatório com diferentes doses de eCG na eficiência de programas de TE com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos indicus*), Poços de Caldas, 2007.

	133mg FSH)	1500UI eCG	2000UI eCG	P
Número de animais	12	12	12	
Total estruturas	8,67 ±1,29	4,75 ±1,04	7,67 ±0,98	0,001
Embriões viáveis	7,42±1,11	3,08±0,61	6,67±1,08	0,003
Embriões degenerados	0,75 ±0,35	0,50 ± 0,23	0,42 ±0,19	0,99
Estruturas não fecundadas	0,50 ± 0,15	1,17 ± 0,50	0,58 ± 0,36	0,97
Embriões congeláveis	6,50±1,19	2,83±0,53	6,33±1,09	0,009

Em experimento recente (revisado por Baruselli et al., 2008), avaliamos o efeito da eCG na resposta superovulatória em doadoras Holandesas (*Bos taurus*). Um total de 12 vacas foi dividido em três grupos de acordo com o tratamento superestimulatório: 200mg FSH, 2000UI eCG e 2500UI eCG. Utilizou-se o mesmo delineamento experimental do estudo anterior em doadoras Nelore (*cross-over*; 36 superovulações). Os resultados estão apresentados na Tabela 9. Apesar do grupo 2000UI eCG apresentar menor número de corpos lúteos que o grupo 200mg FSH, não foi observado diferença estatística na produção de embriões entre os tratamentos, indicando que é possível também superovular doadoras Holandesas com dose única de eCG.

Tabela 9. Efeito da eCG (2000UI e 2500UI) na resposta superovulatória de vacas Holandesas (*Bos taurus*) inseminadas em tempo fixo, Poços de Caldas-MG (Martins et al., 2008).

	200mg FSH	2000UI eCG	2500UI eCG	P
Número de animais	12	12	12	
Nº de CLs no D15	13,42±1,26 ^a	9,91±1,29 ^b	12,3±1,18 ^{ab}	0,04
Total de estruturas	9,58±1,21	7,67±0,98	10,41±0,82	0,10
Emb. Transferíveis	7,92±1,05	6,67±1,07	8,08±0,74	0,35
Emb. Congeláveis	7,00±1,06	6,33±1,09	6,75±0,51	0,57
Emb. não fertilizados	0,75±0,13	0,58±0,36	0,25±0,18	0,77
Emb. Degenerados	0,91±0,34	0,42±0,19	2,08±0,67	0,56

Para avaliar a eficiência de sucessivos tratamentos com eCG na produção de embriões, realizamos um experimento com 10 doadoras Nelore superovuladas por 4 vezes consecutivas, com intervalos de 35 dias (Martins et al., 2008). O grupo controle (n=10) foi superovulado simultaneamente com FSH. Verificou-se que até o terceiro tratamento superovulatório as vacas do grupo eCG produziram quantidades semelhantes de embriões em relação à primeira superovulação comparadas as vacas do Grupo FSH. No entanto, a partir do quarto tratamento superovulatório o grupo eCG produziu reduzidas quantidades de embriões transferíveis. Devido à significativa redução na produção de embriões a partir do quarto tratamento com eCG, as doadoras desse grupo foram superovuladas pela quinta vez com FSH. Verificou-se que as doadoras voltaram a produzir semelhantes quantidades de embriões comparadas ao grupo controle. Os resultados estão apresentados na Figura 7. Esses dados são sugestivos de que é possível superovular

doadoras com eCG por 3 vezes consecutivas. A partir da quarta superovulação, os animais deveriam ser superovulados com FSH. Novos trabalhos devem ser conduzidos para verificar o duração do efeito negativo da superovulação contínua com eCG.

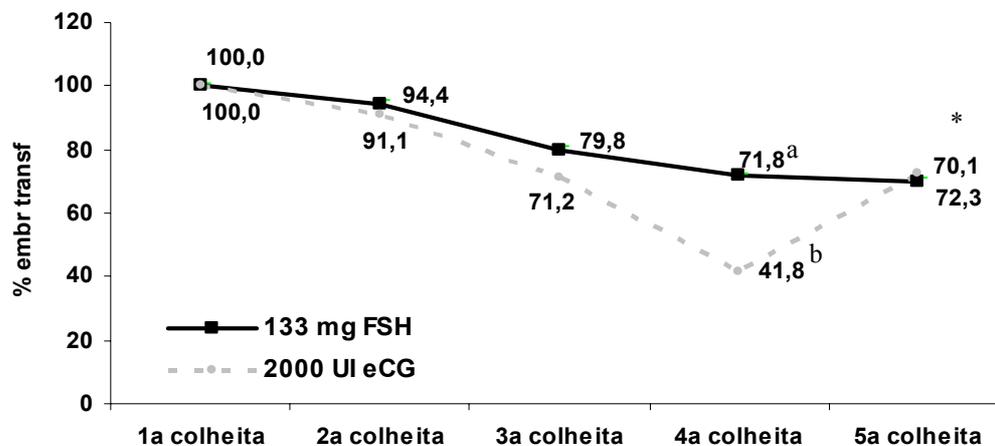


Figura 7. Percentual do número de embriões transferíveis (grau 1, 2 e 3) em relação à primeira colheita em doadoras Nelore (*Bos indicus*) superovuladas por 4 vezes (intervalo de 35 dias) com FSH (n=10) ou com eCG (n=10) e inseminadas em tempo fixo.*No quinto tratamento superovulatório todos animais foram superovulados com FSH.

Os resultados das pesquisas apresentadas são indicativos de que é possível utilizar eCG para superovular doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus*.

7. Programas de inovulação de embriões em tempo fixo

Alguns investigadores demonstraram que as taxas de aproveitamento são maiores em receptoras submetidas a protocolos de TE em tempo fixo do que naquelas tratadas com uma ou duas administrações de PGF2 α com posterior detecção de estro (Baruselli et al., 2000b, 2000c e 2001; Tríbulo et al., 2000; Bó et al., 2002). Como as taxas de concepção de tais protocolos são similares àquelas obtidas em receptoras tratadas exclusivamente com PGF2 α , resulta em aumento das taxas de prenhez dos programas de TE em tempo fixo, além da vantagem de possibilitarem a programação do dia da inovulação e de evitarem o trabalho com a detecção de estro.

7.1 Uso da eCG na formação do CL e na produção de progesterona em receptoras cruzadas *Bos taurus* x *Bos indicus*

A relação entre a taxa de concepção, a concentração plasmática de progesterona e o tamanho do CL em receptoras de embrião bovino é objeto de controvérsias entre os estudiosos. Vários pesquisadores têm verificado correlação positiva entre tais variáveis. De acordo com Vasconcelos et al. (2001), quanto maior o volume do corpo lúteo, maior será a concentração de progesterona, e, conseqüentemente, maior taxa de concepção será obtida em vacas inseminadas em tempo fixo. Esses achados concordam com experimento realizado por nosso grupo (Baruselli et al., 2000c), no qual se verificou que a área do CL está associada à concentração plasmática de progesterona e à taxa de concepção de receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus* (Tabela 10).

Tabela 10. Concentração de progesterona e taxa de concepção conforme a área do corpo lúteo no dia 6 do ciclo estral em receptoras de embrião bovino (*Bos indicus* x *Bos taurus*).

Área do CL (ultra-sonografia)	Número de receptoras	Concentração de P4 (ng/ml)	Área média (cm ²)	Taxa de concepção (%)
CL1 (> 2,0 cm ²)	77	2,44 ± 0,86 ^a	2,66 ± 0,51	58,4 (47/77) ^d
CL2 (1,5 a 2,0 cm ²)	41	1,75 ± 0,69 ^b	1,74 ± 0,10	41,5 (17/41) ^e
CL3 (< 1,5 cm ²)	22	0,96 ± 0,56 ^c	1,19 ± 0,20	31,8 (7/22) ^e

(a ≠ b ≠ c; P < 0,01 e d ≠ e; P < 0,05).

Outros trabalhos confirmaram a relação entre a concentração plasmática de progesterona e a taxa de concepção (Reis et al., 2004; Figura 8). Os dados são indicativos de que receptoras com menores concentrações de progesterona do dia da transferência apresentam menores taxas de concepção. No entanto, aparentemente, o efeito positivo da progesterona se verifica somente até determinadas concentrações. O aumento das concentrações plasmáticas de progesterona no diestro foi correlacionado com o crescimento embrionário, pelo maior aporte de nutrientes para o lúmen uterino (Binelli et al., 2001; Geisert et al., 1992), e com sua capacidade de secretar interferon- τ (Mann et al., 1999; Kerbler et al., 1996; Mann e Lamming, 2001). A secreção de interferon- τ está correlacionada à diminuição da secreção de PGF_{2 α} pelo endométrio uterino e bloqueio da luteólise (Mann et al., 1995, 1999; Wathes et al., 1998). Esse fenômeno foi associado ao aumento das taxas de concepção em bovinos (MacMillan et al., 1994; Baruselli et al., 2000c). No entanto, alguns pesquisadores não observaram esse efeito (Nogueira et al., 2004; Spell, et al., 2001).

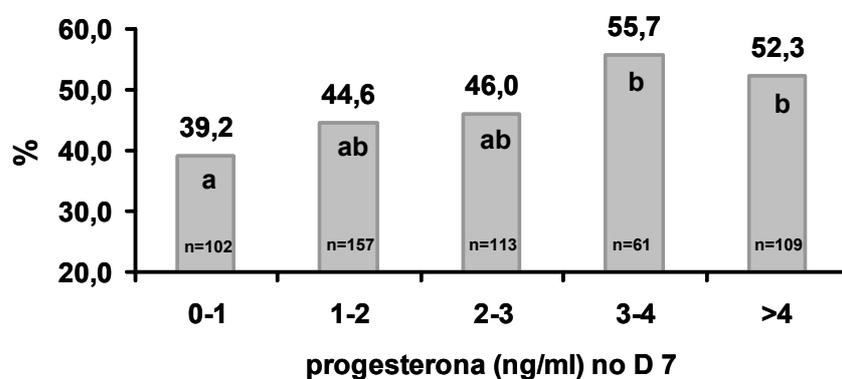


Figura 8. Taxa de concepção de receptoras de embrião bovino de acordo com a concentração plasmática de progesterona no dia da transferência (Dia 7; n=542; Reis et al., 2004).

Em outra investigação por nós realizada com o objetivo de tratar as receptoras com eCG no início da onda de crescimento folicular para a inovulação de embriões em tempo fixo (Baruselli et al., 2000c e 2001), verificou-se relação positiva entre o número de corpos lúteos, a concentração plasmática de progesterona e a taxa de concepção após a transferência de embriões congelados em etileno-glicol. Nesse estudo, foram utilizadas novilhas mestiças *Bos taurus* x *Bos indicus* (Tabelas 11e 12).

Tabela 11. Número médio de CL, concentração plasmática de progesterona (P4) e taxas de prenhez em receptoras *Bos taurus x Bos indicus* tratadas com dispositivos CIDR-B + Estradiol/progesterona no Dia 0, com ou sem 800 UI de eCG no Dia 5 e inovuladas em tempo fixo.

Grupo	n	Nº CL	P4 (ng/ml)	Taxa de aprov (%)	Taxa Conc (%)	Taxa Prenhez (%)
Controle	50	0,5±0,5 ^a	1,3±0,8 ^a	17/50 (34,0) ^a	5/17 (29,4) ^c	5/50 (10,0) ^a
eCG	50	2,6±2,9 ^b	4,2±3,7 ^b	42/50 (84,0) ^b	21/38 (55,3) ^d	21/50 (42,0) ^b

^{ab}Médias ou porcentagens nas colunas com diferentes sobrescritos diferem significativamente (P<0,05).

^{cd}Médias ou porcentagens nas colunas com diferentes sobrescritos diferem (P=0,07)

Tabela 12. Área do CL, concentração plasmática de progesterona e taxa de concepção de receptoras de embrião portadoras de corpo lúteo único tratadas ou não com eCG.

CL Único	n	Área (cm ²)	Concentração de P4 (ng/mL)	Taxa de Concepção (%)
Controle	17	2,15 ± 0,46 ^a	1,35 ± 0,78	29,4 (5/17)
eCG	8	2,86 ± 0,63 ^b	2,30 ± 1,60	50,0 (4/8)

(a ≠ b na mesma coluna; P < 0,05)

Assim, o tratamento com eCG no momento esperado da emergência da nova onda de crescimento folicular foi eficaz para superestimular o crescimento folicular e o desenvolvimento de um único folículo dominante de maior diâmetro e determinou, além de maior número de corpos lúteos (ou corpo lúteo único maior), maior concentração plasmática de progesterona e maiores taxas de aproveitamento, concepção e prenhez. Em outros estudos pôde-se também evidenciar o efeito da eCG no aumento das concentrações plasmáticas de progesterona no diestro após a ovulação sincronizada (Tabela 5 e Figura 3).

Bó et al. (2002) avaliaram um protocolo semelhante, e verificaram que a utilização de 400UI de eCG no momento da emergência da onda de crescimento folicular determinou apenas 2% de dupla ovulação em receptoras cruzadas. No entanto, esse tratamento formou corpos lúteos únicos maiores e incrementou a taxa de concepção e de prenhez (Tabela 13).

Tabela 13. Diâmetro do CL e taxa de prenhez em receptoras tratadas com dispositivos de P4 + estradiol/progesterona no Dia 0, com ou sem 400UI de eCG administrados no Dia 5 e inovuladas em tempo fixo.

Grupo	N	CL ^a (mm)	Transferidas/Tratadas (%)	Prenhes/Transferidas (%)	Prenhes/tratadas (%)
Controle	156	17,7 ± 0,4 ^b	127/156 (81,4%) ^b	53/127 (41,7%) ^b	53/156 (33,9%) ^b
eCG	156	18,5 ± 0,4 ^c	132/156 (84,6%) ^b	76/132 (57,6%) ^c	76/156 (48,7%) ^c

^a Diâmetro do CL aferido por ultra-sonografia em receptoras transferidas (CL ≥ 10 mm).

^{bc} Médias ou porcentagens nas colunas com diferentes sobrescritos diferem significativamente (P<0,02).

Na seqüência dos experimentos, Reis (2004a) comparou diferentes doses de eCG (400 vs 500 vs 600 UI) administradas no protocolo de transferência de embriões em tempo fixo. Foram utilizadas 600 receptoras nulíparas *Bos taurus indicus x Bos taurus taurus* mantidas a pasto no Brasil Central. Os resultados estão demonstrados na Tabela 14. Não foi verificado efeito da dose de eCG sobre a eficiência dos protocolos empregados, indicando que a dose de 400UI de eCG é suficiente para obtenção de resultados satisfatórios em receptoras de embrião tratadas com o protocolo para TETF.

Tabela 14. Número de CL, taxas de aproveitamento, de concepção, de prenhez de embriões PIV em receptoras tratadas com diferentes doses de eCG (Novormon®) no protocolo de TETF. Fazenda Sonho Real, Campo Grande - MS, 2004.

Dose	Dia	N	Taxa de aproveitamento (%)	Taxa de concepção (%)	Taxa de prenhez (%)	N CL
400		201	82,1(165/201)	51,8 (85/164)	42,3 (85/201)	1,17 ± 0,03 ^b
500		197	83,8 (165/197)	44,1 (71/161)	36,0 (71/197)	1,33 ± 0,06 ^b
600		196	87,2 (171/196)	49,4 (84/170)	42,9 (84/196)	1,82 ± 0,12 ^a

As médias ou proporções nas colunas com letras sobrescritas diferentes apresentam diferença estatística (a,b P<0,05; x,y P<0,1)

8. Conclusão

Os trabalhos de pesquisa apresentados são indicativos da importância do emprego da eCG para aumentar a eficiência dos protocolos de sincronização para inseminação artificial, superovulação e transferência de embriões em tempo fixo. Para utilização correta desse fármaco, cabe ao técnico responsável analisar as condições fisiológicas do rebanho para tomada de decisão.

9. Referências bibliográficas

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA (ANUALPEC), 2004.

AYRES, H.; MARQUES, M. O.; SILVA, R. C. P.; RODRIGUES, C.A.; FERREIRA, R. M.; BARUSELLI, P. S. Influência do uso de eCG em diferentes períodos pós parto e do escore de condição corporal na taxa de prenhez de vacas nelore inseminadas em tempo fixo. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2007. (submetido para publicação).

BARROS, C.M.,; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulação em zebuínos de corte. In: 1o. Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina, p. 212-222, 2004.

BARUSELLI, P. S. ; MADUREIRA, E. H. ; MARQUES, M.O.; RODRIGUES, C.A.; NASSER, L. F.T. ; 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). In: XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 2004, Barra Bonita. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2004aa. v. 32. p. 228.

BARUSELLI, P. S., MARQUES, M. O.; MADUREIRA, E. H.; COSTA NETO, W.P.; GRANDINETTI, R. R.; BO, G. A. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices. *Theriogenology*, v. 55, p. 355, 2001 (abst.).

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; 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.; CARVALHO, N. A. T.; VALENTIM, R.; BERBER, R. C. A.; CARVALHO FILHO, A. F.; MADUREIRA, E. H.; COSTA NETO, W. P. Dinâmica folicular em novilhas receptoras de embrião bovino submetidas à sincronização da ovulação para inovulação em tempo fixo. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 28, p. 217, 2000a.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; VALENTIM, R.; BERBER, R. C. A.; CARVALHO FILHO, A. F.; MADUREIRA, E. H.; COSTA NETO, W. P. Aumento da taxa de prenhez

em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo “Oovsynch” com inovação em tempo fixo. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, v. 28, p. 216, 2000b.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; MELLO, J. E.; CAMPOS FILHO, E.P. 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: Simpósio Internacional de Reprodução Animal, 5., Proceedings, v.1, p.380, 2003.

BARUSELLI, P. S.; MARTINS, C.M.; SALES, J.N.S.; FERREIRA, R.M. Novos avanços na superovulação de bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 36-SUP. p. 433-448, 2008.

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 anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.479-486, 2004.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F. T.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BO, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle *Theriogenology*, v.65, p.77-88, 2006b.

BARUSELLI, P.S., REIS, E.L., CARVALHO, N.A.T., CARVALHO, J.B.P. eCG increases ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: Proceedings of the XIV International Congress on Animal Reproduction, vol. 1, Porto Seguro, BA, p. 117, 2004b.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; BÓ, G.A.; COSTA NETO, W.P.; GRANDINETTI, R.R. Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de P4 e taxa de prenhez. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, v. 28, p. 218, 2000c.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; NASSER, L.F.T.; SILVA, R.C.P; MENEGATTI, J.A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I.C.C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.244-245, 2003.

BINELLI, M.; THATCHER, W.W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1451-1463, 2001.

BO, G. A. ; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.307-326, 2003.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progesterone and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.39, p.193-204, 1995.

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

BÓ, G.A; BARUSELLI, P.S. ; CHESTA, P.M ; MARTINS, C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. *Theriogenology*, v.65, p.89-101, 2006.

- CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* × *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, v.69, p.167-175, 2008.
- CASTILHO, C.; GARCIA, J. M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G. P.; BRITO, L. F. C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Animal Reproduction Science*, v.98, p.189-96, 2006.
- COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology*, v.60, p.855-865, 2003.
- CUTAIA L, MORENO D, VILLATA ML, BÓ GA. Synchrony 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. *Animal Reproduction Science.*, v. 22, p. 311-317, 1990.
- GEISERT, R.D.; MORGAN, G.L.; SHORT, E.C.; ZAVY, M.T. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reproduction Fertility and Development*, 4:301-305, 1992.
- GIMENES LU, SÁ FILHO MF, MADUREIRA EH, TRINCA LA, BARROS CM, BARUSELLI PS. Estudo ultra-sonográfico da divergência folicular em novilhas Nelore (*Bos indicus*). *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, supl.1, p.210, 2005b [Resumo].
- HASLER JF. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*, 56: 1401-1415, 2001.
- KERBLER, T.L.; BUHR, M.M.; JORDAN, L.T.; LESLIE, K.E.; WALTON, J.S. Relationship maternal plasma progesterone concentration and interferon tau synthesis by the conceptus in cattle. *Theriogenology* 47: 703-714, 1996.
- MACMILLAN KL, PETERSON AJ. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for estrous synchronisation, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. *Animal Reproduction Science*. V. 33, p. 1-25, 1993.
- MANN, G.E.; LAMMING, G.E. Relationship between amternal endocrine environment early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 121: 175-180, 2001.
- MANN, G.E.; LAMMING, G.E; FRAY, M.D. Plasma oestradiol and progesterone during early pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. *Animal Reproduction Science* 37: 121-131, 1995.
- MANN, G.E.; LAMMING, G.E; ROBINSON, R.S.; WATHES, D.C. The regulatory of interferon- τ production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *Journal Reproduction and Fertility* 54: 317-328, 1999.
- MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. *Reprod. Nutr. Dev.*, v.42, p.601-11, 2002.

MARQUES, M.O; REIS, E.L.; MELLO, J.E.; CAMPOS FILHO, E P; BARUSELLI, P.S. Taxa de concepção de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore lactantes. 2004 .MARQUES MO, REIS EL, CAMPOS FILHO EP, BARUSELLI PS. Efeitos da administração de eCG e de Benzoato de Estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebrúinas no período pós-parto. In: Proceedings 5º Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina: pp. 392, 2003.

MARQUES, M.O.; SÁ FILHO, M.F.; GIMENES, L.U.; FIGUEIREDO, T B; SORIA, G F; BARUSELLI, P.S. Efeito do tratamento com PGF2a na inserção e/ou tratamento com eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas nelore. In: Acta Scientiae Veterinariae, 2005, Angra dos Reis/RJ. Acta Scientiae Veterinariae. v. 1, p. 287-287, 2005.

MARQUES, M.O; REIS, E.L.; BARUSELLI, P.S. Taxa de concepção de vacas Nelore subentendas a protocolos com ou sem eCG com diferentes indutores de ovulação ((BE, hCG e GnRH). Appud in: BARUSELLI, P.S.; BÓ, G.A.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 10., Londrina, 2004. **Anais**, p.155-165, 2004.

MARTINS, C. M. Adequação do protocolo de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus*. Tese de mestrado, 2005.

MARTINS, C. M.; OLIVEIRA, L. G.; CREPALDI, G.A.; SALES, J.N.S.; BARUSELLI, P.S. Efeito de diferentes doses de eCG na resposta superovulatória de doadoras Nelore (*bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. Acta. Sci. Vet., v.35, p.1237, 2007.

MARTINS, C. M.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.H.; SOUSA, M.G.; BARUSELLI, P.S. Superovulação com eCG ou FSH em doadoras Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. Acta. Sci. Vet., v.34, p.227, 2006.

MARTINS, C.M.; SANTOS, I.C.C.; VALENTIM, R.; SALES, J.N.S.; REIS, P.O.; CREPALDI, G.A.; BARUSELLI, P.S.; D'OCCHIO, M.J. Efeito da redução do número de administrações de FSH na resposta superovulatória e na produção de embriões de doadoras nelore. Acta Sci Vet 2008, *in press*.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Disponível no site www.agricultura.gov.br. Acessado em 10 de maio de 2007.

MONTIEL, F.; AHUJA, C. Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review. Animal Reproduction Science, v.85, p.1-26, 2005.

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

NOGUEIRA, M.F.G.; MELO, D.S.; CARVALHO, L.M.; FUCK, E.J.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Do high progesterone concentrations in embryos recipients synchronized with PGF2 α and eCG? Theriogenology, 61: 1283-1290, 2004.

PENTEADO, L.; AYRES, H.; MADUREIRA, E. H. ; REIS, E.L.; BARUSELLI, P. S. . Efeito do eCG e do desmame temporário na taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo. In: XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 2004, Barra Bonita. Acta Scientiae Veterinariae, 2004. v. 32. p. 223.

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, 2006. v. 34. p. 402[Resumo].

QUESADA, Y.; ESTRADA, S.; CUBERO, M.; GARCÍA, F.; GALINA, C.S.; MOLINA, R.; ORIHUELA, A. A note on the effects of calf stimuli on the response of Zebu cows to Synchro-mate-B. *Applied Animal Behaviour Science*, v. 71, p. 183-189, 2001.

REIS, E.L. Adequação da dose e do momento da administração de eCG no protocolo de sincronização de receptoras de embrião bovino. (Tese de Mestrado, 2004a). Em vias de publicação.

REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T., NASSER, CL.F.; COSTA NETO, W.P.; BARUSELLI, P.S. Aumento da taxa de concepção em receptoras de embrião bovino com maiores concentrações plasmáticas de progesterona no dia da inovulação. *Acta Scientiae Veterinariae*, 32: 88, 2004.

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

RHODES, F.M.; MCDOUGALL, S.; BURKE, C. R.; VERKERK.; G. A.; MACMILLAN, K. L. Invited review: Treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *Journal Dairy Science*, v.86, p.1876-1894, 2003.

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 uso de eCG em diferentes períodos pós-parto. In: XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 2004, Barra Bonita. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2004. v. 32. p. 220.

RUIZ-CORTES, Z. T.; OLIVERA-ANGEL, M. Ovarian follicular dynamics in suckled zebu (*Bos indicus*) cows monitored by real time ultrasonography. *Animal Reproduction Science*, v.54, p.211-220, 1999.

SÁ FILHO, M.F. ; REIS, E.L. ; NICHI, M.; MADUREIRA, E. H. ; BARUSELLI, P. S. . Dinâmica folicular de vacas Nelore lactantes em anestro tratadas com progestágeno, eCG e GnRH. In: XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 2004, Barra Bonita. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2004. v. 32. p. 235.

SÁ FILHO, M.F.; PENTEADO, L.; REIS, E.L.; GIMENES, L.U.; BARUSELLI, P. S. Efeito da ciclicidade e do tratamento com eCG na dinâmica folicular na taxa de concepção de novilhas nelore tratadas com implante auricular de norgestomet e benzoato de estradiol. In: *Acta Scientiae Veterinariae*, 2005, Angra dso Reis/RJ. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2005. v. 1. p. 265-265.

SARTORELLI ES, CARVALHO LM, BERGFELT DR, GINTHER OJ, BARROS CM. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, v.63, p.2382-2394, 2005.

SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biologic Reproduction*, v.65, p.1403-1409, 2001.

SARTORI, R.; ROSA, G. J.M.; WILTBANK, M. C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating cows and dry cows in winter. *J Dairy Sci*, 85:2813-2822, 2002.

SCHILLO, K. K. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *Journal Animal Science*, v.70, p.1271-1282, 1992.

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

Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo. In: XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 2004, Barra Bonita. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2004. v. 32. p. 221

SOUZA, A.H. Inseminação artificial em tempo fixo em vacas holandesas de alta produção. São Paulo, 2008, 152 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.

SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M.; TORRES JUNIOR, J.R.S.; AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. Efeito do eCG e do cipionato de estradiol em protocolos para inseminação artificial em tempo fixo em vacas holandesas de alta produção. In: I Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação do Departamento de Reprodução Animal, 2006, Pirassununga, SP. Anais do 1º Simpósio de Pesquisa e Pós-Graduação do Departamento de Reprodução Animal, 2006. v. 1.

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

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.

TRIBULO, H.; BO, G. A.; GATTI, G.; TEGLI, J. C.; CUTAIA, L.; MORENO, D.; BRITO, M.; TRIBULO, R. Pregnancy rates in embryo recipients treated with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices to eliminate the need for estrus detection. 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Sweden, 2000; 2:115 (abstr).

VASCONCELOS, J.L.M; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.N.; GUENTHER, J.G.; WILTBANK, M. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*; v. 56, p. 307-314, 2001.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.915-924, 2007.

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.

WATHES, D.C.; ROBINSON, R.S.; MANN, G.E.; LAMMING, G.E. The establishment of early pregnancy in cows. *Reproduction Domestic Animals* 33: 279-284, 1998.

WILLIAMS, G. L. Suckling as a regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. *Journal Animal Science*, v.68, p.8331-852, 1990.

WILLIAMS, G. L.; GAZAL, O.S.; GUZMÁN VEGA, G. A.; STANKO, R. L. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.289-297, 1996.

WILTBANK, M.C.; GÜMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.21-52, 2002.

YAVAS, Y.; WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: a review. *Theriogenology*, v.54, p.25-55, 2000.

Atualidades na superovulação de doadoras *Bos taurus* e *Bos indicus**

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

¹Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP) 18618-000 Botucatu, São Paulo - Brasil e ²Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências e Letras (UNESP-Assis). E-mail: cmbarros@ibb.unesp.br

Resumo

A América do Sul desempenha um papel importante na produção mundial de embriões bovinos. Entretanto, diversos fatores continuam a influenciar a produção de embriões, tais como a técnica de colheita e transferência, os hormônios e protocolos para superovulação, a resposta das doadoras aos tratamentos superovulatórios, a nutrição, o manejo dos animais, o bem estar e saúde do rebanho, etc. Neste breve artigo de revisão será dada ênfase à utilização de protocolos hormonais que dispensam a observação do estro e, portanto, facilitam o manejo das doadoras de embriões.

Palavras chave: transferência de embriões, progesterona, FSH, LH, bovino, *Bos indicus*.

Introdução

O gado zebuino (sub-espécie *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*). A raça Nelore representa a maioria do gado de corte no Brasil e a indução de ovulação múltipla para a transferência de embriões (MOET, ou transferência de embriões = TE) é uma das biotécnicas da reprodução utilizadas para acelerar o melhoramento genético (ao redor de 20%; Lohuis, 1995) desta e outras raças.

Vários fatores como a sanidade e o estado nutricional do rebanho, a técnica de colheita e transferência de embriões e o manejo dos animais, podem ser controlados adequadamente, entretanto, a variabilidade de resposta das doadoras de embriões aos tratamentos superestimulatórios 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 zebuino 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 propostos para controlar o crescimento folicular e o momento da ovulação, a fim de permitir a inseminação artificial em tempo-fixado (Bó et al., 2003; Barros et al., 2004; 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 breve revisão será dada ênfase a protocolos superestimulatórios que permitem a realização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em doadoras de embriões.

* A maior parte desta revisão foi apresentada durante a Reunião Anual da SBTE-2007, Costa do Saúpe (BA) e publicada na revista *Acta Scientiae Veterinariae*, 2007, v.34(supl.3).

TRATAMENTOS PARA INDUZIR OVULAÇÃO MÚLTIPLA

Vários tratamentos 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 equina (eCG ou PMSG) administrada isoladamente (Rowson et al., 1972; Boland et al., 1978) ou associada a soro anti-PMSG (Dieleman et al., 1987; Gonzalez et al., 1994) e o hormônio folículo estimulante (FSH) proveniente de extrato de pituitárias de suínos, ovinos e equinos (Donaldson, 1989) ou ainda, FSH recombinante bovino (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), 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) e sincronizar o início das ondas foliculares (Bó et al., 1995, 2003).

Já foi amplamente demonstrado que o uso de uma fonte de progesterona (dispositivos intravaginais), associada à 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 intravaginal e administração de estrógeno. Dois dias após a primeira injeção de FSH, é administrada uma dose luteolítica de PGF2 α e 12 horas mais tarde o dispositivo intravaginal 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 Leemput et al., 2001) ou ainda para viabilizar a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) após a superovulação (Barros & Nogueira, 2001, 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 foi desenvolvido 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 PGF2 α (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 PGF2 α). Uma vez que a ovulação ocorre entre 24 e 36 horas após a administração de LH (Nogueira et al., 2003) a IATF é realizada 12 e 24 h após a injeção de LH, evitando a inconveniência da detecção do estro.

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). Além disso, podem ser utilizadas diversas fontes exógenas de progesterona (ex: 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; Nogueira et al. 2007). Em publicação recente, Nogueira et al. (2007) reportaram em 136 colheitas a média de 13,3 \pm 0,75 estruturas totais e de 9,4 \pm 0,63 embriões

viáveis, com 71,0% (1279/1807) 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 PGF2 α (protocolo P-24) e o LH continua a ser administrado no dia 9 (48 h após a PGF2 α), também pode ser utilizada em fêmeas Nelore, com resultados comparáveis aos 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 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 et al., 2007).

Surpreendentemente a utilização do protocolo P-36 em raças européias diminuiu o número de embriões viáveis quando comparado a protocolos convencionais com observação do estro. Esta observação motivou pequenos ajustes no protocolo P-36. Nas raças Holandesa (Martins et al., 2005; Baruselli et al., 2006) e Angus (Chesta et al., 2007) o protocolo P-36 se mostrou mais eficaz quando o agente indutor da ovulação (LH ou GnRH), foi aplicado 60 horas (P36/LH60), ao invés de 48 horas (P36/LH48), após a administração de PGF2 α . De forma similar, resultados obtidos por Barcelos et al. (2006), na raça Bonsmara ($\frac{5}{8}$ Africâner e $\frac{3}{8}$ Hereford e Shorthorn) indicam que a aplicação de LH 60 h após a PGF2 α , pode ser vantajosa também para esta raça. Além disso, estes autores testaram uma outra modificação no protocolo P-36, ou seja, substituíram as duas últimas doses de FSH por uma única aplicação de eCG (200 UI) para estimular tanto o crescimento final (após a fase de divergência) quanto à maturação dos folículos ovarianos (atividade LH da eCG). Apesar de não haver diferença significativa entre os tratamentos, os resultados promissores estimularam novos experimentos com a eCG na raça Nelore.

Deve-se destacar que o atraso no momento da ovulação (P-36/LH60) foi benéfico para raças européias, porém o mesmo não ocorreu com a raça Nelore, onde esta modificação no protocolo P-36 promoveu diminuição no número de embriões viáveis (Baruselli et al., 2006).

Recentemente, Barcelos et al. (2007) testaram se a substituição do pFSH por eCG, no último dia do tratamento superestimulatório, aumentaria o crescimento folicular, a taxa de ovulação e a produção de embriões. Vacas Nelore (n=20) foram divididas ao acaso em dois grupos: P-36 e P-36/eCG, e cada fêmea recebeu os dois tratamentos de forma alternada (cross-over). Os animais do grupo P-36 receberam o tratamento P-36 “original” já descrito anteriormente e no grupo P-36/eCG as duas últimas aplicações de pFSH foram substituídas por duas doses de 200 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG, Novormon[®], total de 400 UI IM – Figura 1). Tanto o número de folículos com diâmetro superior a 6 mm presentes no momento da administração de pLH quanto o número de estruturas totais colhidas foram superiores (p<0,03) nos animais que receberam eCG (Tabela 1). Estes dados são indicativos de que a eCG estimulou o crescimento folicular final, resultando em maior número de folículos capazes de ovular em resposta a administração exógena de LH e, conseqüentemente, aumentou o número total de estruturas recuperadas. Apesar de não ter ocorrido aumento estatisticamente significativo na média de embriões viáveis nas vacas tratadas com eCG (7,30 \pm 1,20) quando comparadas as que não receberam esta gonadotrofina (5,10 \pm 1,10), o número total de embriões viáveis produzidos pelas vacas tratadas com o protocolo P-36/eCG (146) vs P-36 (102) evidencia a vantagem de se substituir as duas últimas doses de pFSH por eCG (Tabela 1).

Em resumo, o protocolo P-36/LH48 facilitou o manejo de doadoras de embriões e originou taxas de embriões viáveis pelo menos tão boas quanto às obtidas após a utilização de outros tratamentos superovulatórios, que requerem a detecção do cio. A substituição das duas últimas aplicações de FSH por

eCG mostrou resultados promissores que devem ser confirmados em maior número de animais. Nas raças européias testadas até o momento (Holandesa e Angus), e também na raça Bonsmara, o atraso de 12 h, na administração do LH, aumentou a produção de embriões viáveis (protocolo P-36/LH60 vs P-36/LH48).

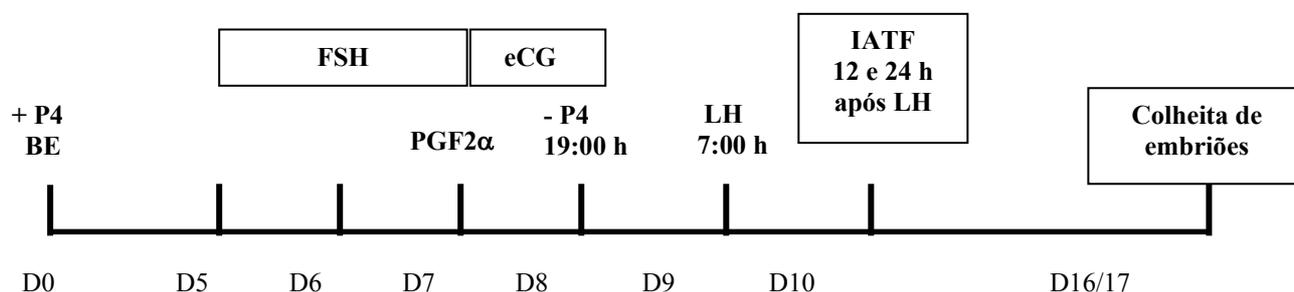


Figura 1. Protocolo superestimulatório P-36/eCG. Em dia aleatório do ciclo estral uma fonte de progesterona (dispositivo intravaginal, exemplo: CIDR[®] ou DIB[®] = P4) foi associada a 2,5 mg de benzoato de estradiol (BE) administrado por via intramuscular (Estrogin[®], Dia 0 = D0). Quatro ou cinco dias depois (D5), na emergência de uma nova onda folicular, iniciou-se o tratamento com FSH (4 dias consecutivos, em doses decrescentes, administradas duas vezes ao dia). No D7 pela manhã (ex. 7:00 h) foi administrada uma dose luteolítica de PGF2α e no D8 a eCG foi administrada por via intramuscular pela manhã (ex: 7:00 h, 200 UI) e a noite (ex: 19:00 h, 200 UI), quando o dispositivo intravaginal foi removido, logo após a segunda dose da eCG. No dia seguinte pela manhã (ex: 7:00 h, D9), foi administrado 12,5 mg de LH (Lutropin[®], IM) e as doadoras foram inseminadas em tempo fixo (IATF) 12 e 24 h após o LH. Os embriões foram recuperados 7 a 8 dias após administração de LH.

Tabela 1. Número total de estruturas colhidas e de embriões viáveis (Média±EPM), taxa de viabilidade (%) e total de embriões viáveis produzidos em vacas Nelore superestimuladas com os protocolos P-36 e P-36/eCG (n=20 vacas por grupo).

	Grupo Experimental	
	P-36	P-36/eCG
Total de estruturas colhidas	6,65 ± 1,18	10,00 ± 1,48 **
Embriões viáveis	5,10 ± 1,10	7,30 ± 1,20
Taxa de viabilidade (%)	76,7	73,0
Total de embriões viáveis	102	146

** Diferença significativa entre colunas (p<0,03).

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Sr. Renato Eugênio de Rezende Barbosa por permitir a realização de vários experimentos em sua fazenda (Agropecuária Campanário), a FAPESP pelo auxílio financeiro e a CAPES e FAPESP pelas bolsas para A.C.Z. Barcelos e M.F.G. Nogueira, respectivamente. Somos especialmente gratos aos veterinários Lucas Maciel Gouvêa, Laudelino Novaes Barcelos e Dari da Silveira Barcelos Neto por auxiliarem na execução do experimento cujos resultados estão sumariados na tabela 1.

Referências bibliográficas

- Alfurajji 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).
- Barcelos ACZ, Gouvêa LM, Meneghel M, Barcelos DS, Barcelos LN, Trinca LA, Barros CM. Efeito benéfico da substituição das duas últimas doses de pFSH por eCG no protocolo superestimulatório P-36, em vacas Nelore. *Acta Scientiae Veterinariae* 2007; supl. 3, (resumo).
- Barros CM, Nogueira MFG. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology* 2001;56:1483-1496.
- Barros CM, Ereno RL. Recent advances in hormonal treatments used for fixed-time artificial insemination (FTAI) in beef cattle. *Acta Scientiae Veterinariae* 2004; supl.32:23-34.
- 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 anestrus 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.
- 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.
- Chesta P, Tribulo L, Tribulo H, Balla E, Baruselli PS, Bó, GA. Effect of time of ovulation induction by gonadotropin-releasing hormone or pituitary luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef cows inseminated at a fixed time. *Reproduction, Fertility and Development* 2007; 307 (abstract).
- 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, Mapletoft RJ. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. *Can. Vet. J.* 1994;35:158-62.

Gordon I. Controlled reproduction in cattle & buffaloes. Cambridge: CAB Internacional, 1996. 492p.

Goulding D, Williams DH, Duffy P, Boland MP, Roche JF. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. *Theriogenology* 1990;34:767-78.

Guibault LA, Grasso F, Lussier JG, Roullier P, Matton P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. *J Reprod Fertil* 1991;91:89.

Liu J, Sirois J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. *Biol Reprod* 1998;58:1527-32.

Lussier JP, Lamothe P, Pacholek X. Effects of follicular dominance and different gonadotrophin preparations on the superovulatory response in cows. *Theriogenology* 1995;43:270.

Martins CM, Castricini ESC, Reis EL, Torres-Júnior JRS, Gimenes LU, Sá Filho MF, et al. Produção embrionária de vacas holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. *Acta Sci Vet* 2005; 3 (Supl 1):286 (resumo).

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 (resumo).

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 superestimulatory protocol in Nelore cattle. *Theriogenology* 2007; 67:655-660.

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, Echterkamp 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.

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.

Mortalidade embrionária na IA, TE, FIV e clonagem

Roberto Sartori e Margot Alves Nunes Dode

Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil;
E-mail: sartori@cenargen.embrapa.br, margot@cenargen.embrapa.br

Introdução

Na reprodução de bovinos, além dos aspectos relacionados ao sêmen e técnicas de inseminação ou monta natural, alterações na qualidade ovocitária, ou no ambiente uterino e de ovidutos também podem afetar os índices de fecundação e de desenvolvimento embrionário. Dentre os fatores que podem comprometer o transporte de gametas, fecundação dos ovócitos, integridade ovocitária, ou a viabilidade embrionária e fetal em bovinos, encontram-se fatores ambientais, genéticos, metabólicos, nutricionais e infecciosos. Esta revisão procura descrever e discutir resultados de diversos estudos que avaliaram taxas de fecundação e de morte embrionária em bovinos com ovulação única ou superovulados. Além disso, apresenta dados de morte embrionária em receptoras de embriões produzidos *in vivo*, *in vitro* e clonados por transferência nuclelar (TN).

Taxas de fecundação em fêmeas bovinas com ovulação única (não superovuladas)

Durante a monta, o touro deposita bilhões de espermatozoides na vagina da vaca. Entretanto, devido ao fato da cérvix ser o maior obstáculo ao transporte espermático, o número de espermatozoides que alcançam o corpo uterino não ultrapassa 1% (Harper, 1982). Na IA, o sêmen é depositado diretamente no útero, ultrapassando a cérvix e permitindo o uso de um número reduzido de espermatozoides. Após a monta ou IA, o sêmen é exposto a uma série de ambientes distintos que alteram significativamente o número e a função espermática. Muitos espermatozoides são perdidos no trato genital feminino pelo transporte retrógrado (Mullins e Saacke, 1989). Espermatozoides viáveis que são retidos no trato genital feminino devem atravessar o útero, passar para o oviduto pela junção útero-tubárica, interagir com o epitélio do oviduto e sofrer capacitação antes de poder fecundar o ovócito (Berger, 1996).

Na fêmea bovina, ao início do estro, altas concentrações de LH desencadeadas pelas elevadas concentrações circulantes de estradiol (E₂) induzem o reinício da meiose no ovócito (revisado por Mermillod et al., 1999) e iniciam uma seqüência de eventos que levam à ovulação. Quando o folículo se rompe, o ovócito rodeado por células do cumulus é liberado na cavidade peritoneal e capturado pelas células epiteliais ciliadas do infundíbulo. O ovócito é então transportado através da ampola para a junção istmo-ampolar, onde ocorre a fecundação.

Diversos estudos têm relatado que a taxa de fecundação após IA de estruturas colhidas de oviduto ou útero de vacas não superovuladas é alta, independente de idade ou raça (Tabela 1). Estudos com novilhas de corte ou leite observaram 82 a 100% de taxa de fecundação após uma única IA. Taxas de fecundação similares (75 a 100%) foram também relatadas em vacas de corte (Tabela 1). Resultados inferiores de taxa de fecundação, entretanto, foram observados em algumas circunstâncias específicas. Vacas com alta produção leiteira sob condições de estresse térmico apresentaram taxas de fecundação de apenas 55% (Tabela 1). Vacas leiteiras repetidoras de serviço ("repeat-breeders") tiveram 62 e 72% de fecundação, como descrito por Almeida (1995) e O'Farrell et al. (1983), respectivamente. Em um experimento em que vacas holandesas não lactantes foram inseminadas somente no momento do início do estro, a taxa de fecundação foi ao redor de 67% (Tabela 1). Portanto, embora em geral as taxas de fecundação são elevadas em bovinos, algumas condições especiais tais como estresse térmico, ou momento inadequado da IA, podem comprometer a fecundação.

Após a fecundação, o zigoto passa por uma série de divisões celulares (clivagem) e permanece no oviduto até o dia 3 ou 4, quando então entra no útero. A porcentagem de ovócitos que não são capturados pelo infundíbulo após a ovulação ou a porcentagem de embriões/óvulos que não são transportados ao útero após 3 a 4 dias do pico de LH, não é conhecida, mas é muito provável que alguns embriões/óvulos são

perdidos antes de alcançarem o útero. De fato, diversos estudos que lavaram o oviduto ou útero de bovinos com o propósito de avaliar taxa de fecundação ou qualidade embrionária entre os dias 3 e 14 após IA em vacas não superovuladas (Breuel et al., 1993; Ryan et al., 1993; Almeida, 1995; Dunne et al., 2000; Dalton et al., 2001a; Sartori et al., 2002b) ou superovuladas (Kelly et al., 1997; Sartori et al., 2003b; 2004b) colheram abaixo de 85% de embriões e/ou óvulos por corpo lúteo (CL). Caso de fato nem todos os óvulos alcançam o sítio de fecundação, é provável que as taxas de fecundação relatadas na literatura estejam superestimadas. Além disso, os estudos que avaliaram taxas de fecundação em bovinos foram conduzidos sob condições experimentais controladas, que podem não refletir completamente a realidade nas fazendas.

Tabela 1. Taxa de fecundação em vacas e novilhas não superovuladas.

Referência	Animal	Taxa de fecundação; % (n/n)
Ahmad et al. (1995)	Vacas de corte	95,0% (19/20)
Ahmad et al. (1995)	Vacas de corte com folículo persistente	100,0% (14/14)
Almeida (1995)	Vacas de leite lactantes repetidoras de cio	62,4% (63/101)
Almeida (1995)	Vacas de leite lactantes não repetidoras de cio	74,5% (70/94)
Breuel et al. (1993)	Vacas de corte pós parto	75,0% (30/40)
Cerri et al. (2004)	Vacas de leite lactantes	80,2% (69/86)
Dalton et al. (2001a)	Vacas de leite não lactantes (IA no início do cio)	66,7% (52/78)
Dalton et al. (2001a)	Vacas de leite não lact. (IA 12 h após início do cio)	78,2% (61/78)
Dalton et al. (2001a)	Vacas de leite não lact. (IA 24 h após início do cio)	82,1% (32/39)
Diskin e Sreenann (1980)	Novilhas de corte	91,2% (156/171)
Dunne et al. (2000)	Novilhas de corte	89,2% (33/37)
Hawk e Tanabe (1986)	Vacas em primeiro serviço	97,6% (41/42)
Hawk e Tanabe (1986)	Vacas repetidoras de cio	88,5% (23/26)
O'Farrell et al. (1983)	Vacas de leite lactantes repetidoras de cio	72,0% (13/18)
Roche et al. (1981)	Novilhas de corte	82,2% (88/107)
Ryan et al. (1993)	Vacas de leite lactantes (inverno)	85,9% (73/85)
Ryan et al. (1993)	Vacas de leite lactantes (verão)	84,9% (90/106)
Saacke et al. (1998)	Vacas	83,8% (26/31)
Sartori et al. (2002b)	Vacas de leite não lactantes (inverno)	89,5% (34/38)
Sartori et al. (2002b)	Vacas de leite lactantes (inverno)	87,8% (36/41)
Sartori et al. (2002b)	Novilhas de leite (verão)	100,0% (32/32)
Sartori et al. (2002b)	Vacas de leite lactantes (verão)	55,3% (21/38)
Tanabe et al. (1994)	Vacas de leite lactantes	87,0% (87/100)
Wiebold (1988)	Vacas de leite lactantes	100,0% (25/25)
Média	Todos	82,1% (1188/1447)

Taxas de fecundação em fêmeas bovinas superovuladas

Vacas e novilhas submetidas a tratamentos hormonais com o propósito de produzirem ovulações múltiplas, geralmente apresentam uma alta porcentagem de ovócitos não fecundados no lavado uterino (Tabela 2). Entre os trabalhos citados na Tabela 2, as menores taxas de fecundação após superovulação foram observadas em vacas repetidoras de serviço (Hawk e Tanabe, 1986), vacas inseminadas no início do estro (Dalton et al., 2000), e novilhas inseminadas com espermatozoides sexados (Sartori et al., 2004b). Em contraste, quando fêmeas superovuladas foram inseminadas com sêmen de alta qualidade e no momento apropriado em relação ao estro (Dalton et al., 2000; Sartori et al., 2004b), as taxas de fecundação relatadas foram superiores a 80%. Apesar disso, nos estudos que compararam diretamente vacas não superovuladas às superovuladas (Elsden et al., 1976; Saacke et al., 1998 [Tabelas 1 e 2]), taxas menores de fecundação ocorreram nas superovuladas. Como discutido por Kafi e McGowan (1997), a

menor taxa de fecundação em bovinos superovulados pode ser decorrente de distúrbios no transporte de espermatozóides e ovócitos, além da qualidade inferior dos ovócitos. De fato, conforme citado por Hyttel et al. (1991), tratamentos superovulatórios têm efeitos adversos na maturação ovocitária ou das células da granulosa, comprometendo não somente a fecundação mas também a viabilidade embrionária.

Tabela 2. Taxa de fecundação em vacas e novilhas superovuladas.

Referência	Animal	Taxa de fecundação; % (n/n)
Hawk e Tanabe (1986)	Vacas em primeiro serviço	73,8% (267/362)
Hawk e Tanabe (1986)	Vacas repetidoras de cio	43,0% (55/128)
Saacke et al. (1998)	Vacas	64,5% (100/155)
Dalton et al. (2000)	Vacas de leite não lactantes (IA no início do cio)	29,2% (57/195)
Dalton et al. (2000)	Vacas de leite não lact. (IA 12 h após início do cio)	59,9% (124/207)
Dalton et al. (2000)	Vacas de leite não lact. (IA 24 h após início do cio)	81,1% (103/127)
Sartori et al. (2003b)	Novilhas de leite	67,8% (99/146)
Sartori et al. (2004b)	Novilhas de leite	87,9% (124/141)
Sartori et al. (2004b)	Novilhas de leite (IA com espermatozóide sexado)	56,0% (112/200)
Média	Todos	62,7% (1041/1661)

Taxas de fecundação em ovócitos maturados e fecundados *in vitro* e taxa de ativação de ovócitos receptores após a transferência nuclear

A fecundação *in vitro* (FIV) é uma das etapas da produção *in vitro* de embriões (PIV), que envolve a manipulação dos gametas e a obtenção de embriões em laboratório. Para a PIV são utilizados ovócitos imaturos recuperados de folículos antrais de ovários de animais vivos e/ou de ovários obtidos logo após o abate dos animais. Quando os ovócitos são aspirados dos folículos ovarianos (em geral de 2 a 6 mm de diâmetro) para serem utilizados na PIV, eles ainda são imaturos e necessitam sofrer o processo de maturação *in vitro*. Essa é realizada cultivando os ovócitos, logo após a aspiração folicular, em meio de maturação com temperatura e atmosfera apropriadas, por um período de 22 a 24 horas. A maturação envolve mudanças nucleares e citoplasmática que devem ocorrer simultaneamente e que conferem aos ovócitos a capacidade de serem fecundados e terem desenvolvimento embrionário normal (Dode, 2006). Após a maturação, os ovócitos são transferidos para gota de fecundação e o sêmen, previamente preparado, é adicionado na gota em uma concentração final de 1 a 2 milhões de espermatozóides/mL de meio (Parrish et al., 1985; Gordon, 2003). Ovócitos maduros e espermatozóides são incubados por um período de 12 a 18 horas (Dode et al., 2002). Após a co-incubação as estruturas são transferidas para o meio de cultivo embrionário onde permanecem por um período de sete dias, quando então, são transferidas para as receptoras, de forma semelhante ao realizado com os embriões produzidos *in vivo*.

Após a penetração no ovócito, o espermatozóide inicia uma série de eventos envolvendo os componentes nucleares e citoplasmáticos de ambos os gametas. Ocorre a descondensação da cabeça, a formação do envelope nuclear e do pró-núcleo masculino. Concomitantemente, o ovócito retoma a meiose, expulsa o segundo corpúsculo polar e forma o pró-núcleo feminino. Após a formação dos pró-núcleos, esses se aproximam e ocorre a singamia e a formação do novo indivíduo com início das divisões meióticas.

A taxa de fecundação após a FIV pode ser avaliada pela presença do espermatozóide no citoplasma do ovócito, pela descondensação da cabeça, pela formação dos pró-núcleos e pela taxa de clivagem. Em bovinos devido à presença de vesículas de lipídeos e outros pigmentos, a presença do espermatozóide no citoplasma e a formação dos pró-núcleos não são visíveis, a não ser que outras técnicas como coloração e/ou centrifugação e avaliação em microscopia de contraste de fase ou interferência sejam empregadas (Gordon, 2003). Portanto, o parâmetro mais utilizado para avaliar a fecundação é a taxa de clivagem. A taxa de fecundação avaliada pela formação dos pró-núcleos às 18 horas após a inseminação é, em geral,

acima de 70% (Alomar et al., 2006; Alomar et al., 2007). Resultados semelhantes foram relatados quando a taxa de fecundação (> 70%) foi avaliada pela taxa de clivagem (Bousquet et al., 1999; Dode et al., 2002; Palma e Sinowatz, 2004; Pereira et al., 2005; Cesari et al., 2006; Corrêa et al., 2008). Apesar da maioria dos ovócitos obtidos por aspiração folicular terem capacidade de clivar (Sirard et al., 2005), essa taxa pode variar significativamente, pois além dos fatores que normalmente afetam a fecundação *in vivo*, outros como a qualidade do ovócito, preparação do sêmen e condições de cultivo podem também influenciar. Entretanto, o fator de maior impacto na taxa de clivagem e/ou fecundação é o touro utilizado, sendo a grande variabilidade na fertilidade *in vitro* de touros um dos problemas na utilização comercial da PIV. Essa variação tem sido demonstrada em diversos estudos, em que a taxa de clivagem variou de 26% a 94% quando diferentes touros foram utilizados na FIV (Kochher et al., 2003; Palma e Sinowatz 2004; Alomar et al., 2006; Alomar et al., 2007).

Na clonagem por TN, ovócitos maturados *in vitro* são enucleados para remoção do material genético e, então utilizados como citoplasmas receptores. A seguir, é realizada a reconstrução do embrião, utilizando como fonte doadora de núcleo células embrionárias (Heyman et al., 1994), células fetais (Hill et al., 2000) ou de animais adultos (Iguma et al., 2005). A célula doadora de núcleo, que é introduzida no espaço perivitelinico, deve fundir-se com o citoplasma receptor, o que é realizado pela aplicação de pulsos elétricos. Finalmente, a ativação do citoplasma pode ser induzida por métodos físicos ou químicos. Esse passo é também fundamental para o sucesso da TN, pois simula a ação do espermatozoide. As estruturas então, são transferidas para o cultivo embrionário onde permanecem por sete dias, semelhante aos embriões PIV.

Portanto, no caso da TN a taxa de clivagem também pode ser utilizada para avaliar o sucesso da fusão e ativação. Em bovinos a taxa de clivagem após a TN pode ser influenciada por vários fatores tais como qualidade do ovócito, tipo de célula doadora de núcleo e método utilizado para a ativação. Entretanto, os resultados relatados na literatura não são inferiores aos obtidos na PIV, variando de 60 a 80% (Iguma et al., 2005; Hussein et al., 2007; Moura et al., 2007).

Desenvolvimento e sobrevivência embrionária

Diversos estágios do desenvolvimento embrionário inicial são importantes para o desenvolvimento e sobrevivência do embrião. O embrião move-se do oviduto para o útero no estágio de 8 a 16 células (Grealy et al., 1996). Com 5 a 6 dias de idade o embrião atinge o estágio de 16 a 32 células e estas células começam a se juntar para se formar uma esfera compacta denominada mórula. A compactação celular e as junções intercelulares representam o primeiro estágio crítico em que o embrião começa a atuar como um organismo individual. Nos dias 7 ou 8 uma cavidade se forma e as células do blastocisto inicial diferenciam-se em massa celular interna, destinada a formar o feto, e trofoblasto, destinado a formar a placenta (revisado por Sreenan et al., 2001). Entre os dias 9 e 10, o blastocisto expandido eclode da zona pelúcida e continua a se expandir antes de começar a alongar por volta do dia 13. O alongamento ocorre ao redor do momento do reconhecimento materno da gestação e é acompanhado por um aumento na atividade metabólica e secreção de interferon τ (revisado por Mann et al., 1999; Thatcher et al., 2001). A fixação do embrião ao endométrio começa aproximadamente no dia 19. A implantação embrionária está completa no dia 42. A sobrevivência do embrião e estabelecimento da gestação envolvem comunicação ativa e passiva entre o embrião e o útero. A manutenção do CL, como resultado dos sinais embrionários para a mãe, garante a produção continuada de progesterona (P₄), a qual é necessária para preparar o endométrio para implantação e nutrição embrionária. A presença do embrião por volta do dia 16 do ciclo inibe a síntese e liberação de PGF₂ α do endométrio (revisado por Geisert et al., 1994; Mann et al., 1999; Thatcher et al., 2001; Okuda et al., 2002), prevenindo assim a luteólise e o conseqüente declínio na produção de P₄.

Embora falha na fecundação após inseminação não pareça ser um grande problema para o estabelecimento da gestação em bovinos, mortalidade embrionária é considerada a principal causa responsável pelo aumento no intervalo de partos nos bovinos. A maioria das perdas embrionárias ocorre durante o período embrionário da gestação (< 45 d) tanto em bovinos de corte quanto de leite (Thatcher et

al., 1994; Vanroose et al., 2000; Sreenan et al., 2001) e, de acordo com Wathes (1992), a maioria das mortes embrionárias ocorre nos primeiros dias após fecundação e durante o processo de implantação.

As condutas utilizadas para avaliar mortalidade embrionária precoce em bovinos têm sido abater animais em intervalos específicos após a inseminação e colher embriões/óvulos do oviduto ou útero, e mais recentemente, colher embriões *in vivo* do útero utilizando-se lavados uterinos. Diversos estudos sobre perda embrionária inicial foram realizados há mais de 20 anos (Boyd et al., 1969; Ayalon et al., 1978; Diskin e Sreenan, 1980; Roche et al., 1981; Maurer e Chenault, 1983). Estudos que avaliaram vacas de corte com alta incidência de infertilidade (“repeat-breeders”), observaram em torno de 30% de perda embrionária até o dia 7 após o estro (Ayalon et al., 1978; Maurer e Chenault, 1983). Por outro lado, estudos com novilhas de corte de fertilidade elevada, descreveram altas taxas de sobrevivência embrionária até o dia 8. A maioria das mortes embrionárias nesses estudos ocorreu entre o dia 8 e 18 após IA (Diskin e Sreenan, 1980; Roche et al., 1981). Em um estudo mais recente, Dunne et al. (2000) não observaram diferenças na sobrevivência embrionária nos dias 14, 30 ou ao parto em novilhas de corte. Os autores sugeriram que a maioria das perdas embrionárias nas novilhas havia ocorrido antes do dia 14. A Tabela 3 resume resultados de diversos estudos sobre desenvolvimento e sobrevivência embrionária inicial em bovinos de corte, novilhas de leite e vacas de leite não lactantes. Em geral, com exceção de vacas que ovularam folículos persistentes, a porcentagem de embriões viáveis colhidos entre os dias 3 e 16 foi elevada na maioria dos estudos (78% de média).

Tabela 3. Porcentagem de embriões viáveis colhidos de bovinos não superovulados (exceto vacas leiteiras lactantes).

Referência	Animal	Dias após IA	Embriões viáveis; % (n/n)
Ahmad et al. (1995)	Vacas de corte	6	73,7% (14/19)
Ahmad et al. (1995)	Vacas de corte com folículo persistente	6	14,3% (2/14)
Diskin e Sreenann (1980)	Novilhas de corte	4 ou 8	95,3% (61/64)
Diskin e Sreenann (1980)	Novilhas de corte	12	56,0% (9/16)
Diskin e Sreenann (1980)	Novilhas de corte	16	65,7% (23/35)
Dunne et al. (2000)	Novilhas de corte	14	86,5% (32/37)
Roche et al. (1981)	Novilhas de corte	3 ou 8	82,2% (88/107)
Sartori et al. (2002b)	Vacas de leite não lactantes (inverno)	6	82,3% (28/34)
Sartori et al. (2002b)	Novilhas de leite (verão)	6	71,9% (23/32)
Média	Todos	3 a 16	78.2% (280/358)

Contrastando com o elevado número de embriões viáveis observado em bovinos de corte, e fêmeas de leite não lactantes, estudos que avaliaram o desenvolvimento embrionário inicial em vacas de leite lactantes, demonstraram índices muito mais baixos de sobrevivência embrionária entre os dias 3 e 14, especialmente em vacas com alta produção leiteira (Tabela 4). Um estudo mais antigo (Boyd et al., 1969) relatou 70% de sobrevivência embrionária até o dia 26 da gestação. Entretanto, estudos mais recentes que colheram embriões do útero de vacas com alta produção de leite não superovuladas (Wiebold, 1988; Ryan et al., 1993; Sartori et al., 2002b; Cerri et al., 2004) demonstraram uma incidência muito mais elevada de mortalidade embrionária precoce. Wiebold (1988) coletou 25 embriões de 23 vacas lactantes no dia 7 e notou que todas as estruturas estavam fertilizadas (Tabela 1), sendo que 12 eram embriões normais e 13 anormais. Dos 13 anormais, pelo menos 9 eram degenerados e possuíam ≤ 8 células. Ryan et al. (1993) colheram embriões nas estações quente e fria do ano na Arábia Saudita e observaram uma porcentagem baixa de embriões viáveis nos dias 6 ou 7 (59% durante o verão e 52% durante o inverno). Vacas com embriões colhidos nos dias 13 ou 14 durante o inverno demonstraram porcentagens similares de embriões viáveis em relação aos dias 6 ou 7 (60%). Entretanto, vacas com embriões colhidos nos dias 13 ou 14

durante o verão tiveram uma porcentagem ainda menor de embriões viáveis (27%). Nos experimentos relatados por Sartori et al. (2002b), entre os embriões colhidos no dia 6 após IA de vacas holandesas com alta produção leiteira não superovuladas, 67% não estavam viáveis no experimento durante o verão e 52% não eram viáveis no experimento do inverno (Tabela 4). No mesmo estudo, novilhas holandesas geraram 72% de embriões viáveis no verão e vacas holandesas não lactantes geraram 82% de embriões viáveis no inverno (Tabela 3). Um outro estudo (Cerri et al., 2004) que avaliou os efeitos de dietas com fontes de gordura com diferentes perfis de ácidos graxos na taxa de fecundação e qualidade embrionária em vacas lactantes sincronizadas com o protocolo Ovsynch (Pursley et al., 1995), relatou que 26 a 48% dos embriões colhidos no dia 5 após IA eram de qualidade pobre ou degenerados. Quando os dados apresentados na Tabela 4 foram agrupados, apenas 51% dos embriões colhidos de vacas lactantes entre os dias 3 e 14 eram viáveis. Portanto, em vacas com alta produção leiteira, a maioria dos embriões pode estar com sua viabilidade comprometida antes do dia 13 da gestação. Além disso, a maior parte desses embriões parece já estar comprometida antes do dia 7 em vacas com alta produção leiteira não superovuladas.

Tabela 4. Porcentagem de embriões viáveis colhidos de vacas leiteiras lactantes não superovuladas .

Referência	Animal	Dias após IA	Embriões viáveis; % (n/n)
Cerri et al. (2004)	Vacas de leite lactantes	5	62,3% (43/69)
Ryan et al. (1993)	Vacas de leite lactantes (inverno)	6 ou 7	51,6% (16/31)
Ryan et al. (1993)	Vacas de leite lactantes (verão)	6 ou 7	58,5% (24/41)
Ryan et al. (1993)	Vacas de leite lactantes (inverno)	13 ou 14	59,5% (25/42)
Ryan et al. (1993)	Vacas de leite lactantes (verão)	13 ou 14	27,1% (13/48)
Sartori et al. (2002b)	Vacas de leite lactantes (inverno)	6	52,8% (19/36)
Sartori et al. (2002b)	Vacas de leite lactantes (verão)	6	33,3% (7/21)
Wiebold (1988)	Vacas de leite lactantes	7	48,0% (12/25)
Média	Todos	3 a 14	50,8% (159/313)

Estudos que avaliaram mortalidade embrionária em bovinos entre os dias 25-28 e 42 com auxílio de ultrasonografia transretal e mortalidade fetal precoce entre os dias 42 e 60-70 observaram resultados muito distintos, que em geral estavam associados à raça, idade, lactação, ou procedência dos embriões (Tabela 5). Quando mortalidade embrionária tardia foi comparada à mortalidade fetal precoce, a maioria das perdas ocorreu antes do estágio fetal (Beal et al., 1992; Vasconcelos et al., 1997; Tabela 5). Os poucos estudos que avaliaram mortalidade embrionária tardia/fetal precoce em bovinos de corte, ou novilhas de leite descreveram incidências baixas ($\leq 10\%$) de perda (Tabela 5), com exceção de novilhas e vacas de corte receptoras de embriões produzidos *in vitro* (Reis et al., 2004). Contrastando com a baixa perda embrionária/fetal em bovinos de corte e novilhas de leite, trabalhos recentes em vacas de leite lactantes têm demonstrado uma incidência mais elevada de mortalidade embrionária tardia/fetal precoce. Valores entre 15 e 30% de mortalidade foram os mais comumente observados na maioria dos estudos (Tabela 5), mesmo quando embriões congelados produzidos em novilhas superovuladas e de esperada fertilidade alta foram transferidos em vacas lactantes (Sartori et al., 2003a). Após exaustiva pesquisa na literatura, encontramos apenas um estudo recente em vacas leiteiras lactantes que descreveu baixas taxas de mortalidade entre os dias 28 e 42 de gestação (Silke et al., 2002; Tabela 5). Uma peculiaridade desse estudo, entretanto, foi que as vacas eram manejadas a pasto, diferentemente dos demais estudos descritos na Tabela 5. Esses resultados conflitantes sugerem que níveis de produção de leite, e especialmente fatores nutricionais e de manejo (conforto animal) possam estar influenciando direta ou indiretamente na sobrevivência embrionária/fetal em bovinos.

Nos embriões produzidos *in vitro*, seja a partir de ovócitos maturados e fecundados *in vitro* e/ou por TN, o desenvolvimento ocorre em ambiente artificial fora do organismo materno. Portanto, além dos fatores já mencionados, a sobrevivência desses embriões também está influenciada por condições ambientais durante o cultivo. O zigoto recém formado depende de transcritos e proteínas estocados no ovócito até o estágio de 8 a 16 células, quando ocorre a transição materno-zigótica (TMZ) e o genoma do embrião é ativado. Muitos embriões PIV não chegam ao estágio de blastocisto e são bloqueados nesse período, sugerindo que a falha em ativar o genoma do embrião se deve, na maioria das vezes, à incompetência dos

ovócitos utilizados. Entretanto, outros fatores tais como a composição do meio e atmosfera gasosa também afetam a capacidade de desenvolvimento *in vitro* dos embriões. Atualmente, com sistemas de cultivo estabelecidos existe um limite consistente de produção de blastocisto de 30 a 50% (Hasler et al., 2000; Farin et al., 2001; Pereira et al., 2005; Corrêa et al., 2008). Apesar dos inúmeros problemas decorrentes da TN no desenvolvimento embrionário pós-eclosão, as taxas de produção de blastocisto de embriões clones são semelhantes (Kato et al., 2000; Iguma et al., 2005; Moura et al., 2007) às observadas em embriões PIV.

A mortalidade embrionária precoce, como mencionado acima, é uma causa reconhecida de falha reprodutiva em bovinos provocando grandes perdas econômicas. Essa, pode resultar de um defeito intrínseco do embrião, de um ambiente materno inadequado, da assincronia entre o embrião e o útero ou da falha da mãe em responder apropriadamente aos sinais do embrião (Hansen, 2002). Com o advento das novas biotecnologias essas falhas se tornaram mais evidentes, principalmente devido a defeitos intrínsecos do embrião, sendo que quanto maior o grau de artifícios da técnica utilizada maiores são as perdas embrionárias.

Existem vários relatos na literatura de taxa de prenhez de embriões bovinos produzidos em diferentes sistemas de cultivo, com médias variando de 30 a 50% (Hasler et al., 2000; van Wagtenonk et al., 2000; Farin et al., 2001; Lane et al., 2003; Schmidt, 2007), que são mais baixas do que as taxas obtidas com embriões produzidos *in vivo*. Semelhante ao que ocorre nos *in vivo*, a perda dos embriões *in vitro* é mais alta nos primeiros 21 dias de gestação, sendo que a maioria ocorre nos dias 14 e 15 ou uma semana após a transferência (Farin et al., 1995; McMillan et al., 1997). Farin e colaboradores (2001) relataram que no dia 17 da gestação 19% dos embriões produzidos *in vitro* estavam degenerados, sugerindo que os embriões PIV podem ser deficientes em iniciar os mecanismos essenciais para o reconhecimento materno da prenhez. As perdas em estágios mais tardios da gestação (dia 42 a 280), são menores do que no período inicial, mas ainda são mais altas do que as observadas para embriões *in vivo*, podendo variar de 7% a 13% (Hasler et al., 2000; van Wagtenonk et al., 2000).

Entretanto, quando embriões clones são transferidos, as perdas são significativamente superiores. Cerca de 60% ou mais das prenhez são perdidas no primeiro trimestre da gestação (Heyman et al., 2002). O que é seguido por uma menor, mas constante perda na prenhez até o oitavo mês de gestação (Schmidt, 2007). Essas observações foram confirmadas em estudo recente que mostrou resultados de cinco anos de produção comercial de clones em três países distintos avaliando um total de 3374 embriões transferidos. Nesse estudo, a taxa média de prenhez aos 30 dias foi de 37%, aos 60 dias de 22%, aos 90 dias de 17% e somente 11% chegaram a termo (Panarace et al., 2007). A hipótese mais aceita para explicar esses resultados é que o desenvolvimento anormal do trofoblasto levando a placentação anormal, é a maior causa de mortalidade no primeiro trimestre da gestação (Hill et al., 2000; De Sousa et al., 2001; Arnold et al., 2006; Yang et al., 2007). Além disso, alterações na reprogramação do núcleo doador podem afetar o desenvolvimento da placenta e do feto causando problemas como hidropsia e síndrome do bezerro grande.

Tabela 5. Mortalidade embrionária tardia/fetal precoce em bovinos.

Referência	Animal	Dias de gestação	de Perda embr./fetal; % (n/n)
Beal et al. (1992)	Vacas de corte	25 a 45	6,5% (9/138)
Beal et al. (1992)	Vacas de corte	45 a 65	1,6% (2/129)
Chebel et al. (2003)	Vacas holandesas lactantes (IA)	28 a 42	19,5% (38/195)
Fricke et al. (2003)	Vacas holandesas lactantes (IA)	26-33 a 68	23,4% (67/286)
Lamb et al. (1997)	Novilhas de corte	30-35 a 60-75	4,0% (17/420)
Panarace et al. (2007)	Novilhas/vacas de corte (TE – Embr. prod. por TN)	30 a 60	40,5% (506/1248)
Reis et al. (2004)	Novilhas/vacas de corte (TE – Embr. prod. <i>in vitro</i>)	30 a 60	15,5% (37/238)
Rivera et al. (Com. pes.)	Novilhas de leite (IA)	30 a 65-75	9,3% (19/205)
Rodrigues (1995)	Novilhas de corte (TE – Embr. prod. <i>in vivo</i>)	28-32 a 55-65	5,5% (32/582)
Sartori et al. (2003a)	Vacas holandesas lactantes (IA)	25-32 a 60-66	18,6% (13/70)
Sartori et al. (2003a)	Vacas holandesas lactantes (TE – Embr. prod. <i>in vivo</i>)	25-32 a 60-66	26,2% (22/84)
Silke et al. (2002)	Novilhas de leite (IA)	28 a 42	1,5% (2/131)
Silke et al. (2002)	Novilhas de leite (IA)	42 a 56	2,3% (3/129)
Silke et al. (2002)	Vacas de leite lactantes a pasto (IA)	28 a 42	3,2% (23/705)
Silke et al. (2002)	Vacas de leite lactantes a pasto (IA)	42 a 56	2,0% (~14/682)
Stevenson et al. (2003)	Vacas de corte lactantes (IA)	29-33 a 54-61	10,8% (24/223)
Vasconcelos et al. (1997)	Vacas holandesas lactantes (IA)	28 a 42	10,9% (56/512)
Vasconcelos et al. (1997)	Vacas holandesas lactantes (IA)	42 a 56	6,4% (29/456)
Zanenga e Pedroso (1995)	Novilhas/vacas de corte (TE – Embr. prod. <i>in vivo</i>)	23-30 a 53-60	4,4% (10/229)

Discussão

Como mencionado anteriormente, há diversos fatores que podem estar envolvidos com a falha na fecundação ou mortalidade embrionária/fetal em bovinos. Problemas de fecundação ou abortamentos podem ser causados por doenças infecciosas (Bearden e Fuquay, 2000; Vanroose et al., 2000), ou infecções localizadas e restritas a órgãos específicos tais como útero (Nakao et al., 1992; Loeffler et al., 1999a,b; Gröhn e Rajala-Schultz; 2000), ou glândula mamária (Moore et al., 1991; Loeffler et al., 1999a,b; Schrick et al., 2001; Santos et al., 2004). Causas não infecciosas, entretanto, provavelmente contribuem para a maioria das perdas (Christianson, 1992; Thatcher et al., 1994; Labèrnia et al., 1996; Vanroose et al., 2000). Algumas dessas causas são anormalidades cromossômicas, fatores externos (por exemplo, estresse, produtos tóxicos, teratogênicos ou abortivos, e nutrição) e fatores maternos (por exemplo, desbalanços hormonais, lactação e idade). Aspectos técnicos ou relacionados à anatomia e fisiologia que estão associados à fertilidade reduzida em bovinos também foram estudados e incluem: ambiente tubárico e/ou uterino inapropriados (Wiebold, 1988; Binelli et al., 1999), fertilidade ovocitária reduzida devido a anormalidades foliculares (Eicker et al., 1996; Emanuelson e Oltenacu, 1998), técnica de IA inapropriada em relação ao momento do estro (Senger et al., 1988; López-Gatius, 2000; Dalton et al., 2001a,b), e problemas espermáticos ou de fecundação (López-Gatius, 2000; Dalton et al., 2001a,b; López-Gatius et al., 2002).

A maior incidência de mortalidade embrionária/fetal, e conseqüentemente, baixa fertilidade em vacas de alta produção leiteira quando comparadas às demais fêmeas bovinas, tem estimulado pesquisadores a

investigar com maiores detalhes os aspectos fisiológicos que possam estar associados à subfertilidade neste grupo distinto de animais. Raça não parece ser o fator mais relevante associado à baixa fertilidade de bovinos leiteiros, porque estudos sobre associações genéticas com fertilidade têm demonstrado que a hereditariedade para caracteres de fertilidade é baixa (Weller e Ezra, 1997; Dematawewa e Berger, 1998). Além disso, a continuada fertilidade elevada em novilhas de leite sugere que qualquer componente genético relacionado à fertilidade reduzida nas vacas lactantes teria interações com lactação, manejo, ou idade. Diversos estudos avaliaram possíveis causas nutricionais da baixa fertilidade em gado leiteiro, incluindo: balanço energético negativo evidenciado pela perda de escore de condição corporal (Nebel e McGilliard, 1993; Ruegg e Milton, 1995; Domecq et al., 1997; Loeffler et al., 1999a,b; Moreira et al., 2000; Butler, 2001; López-Gatius et al., 2002), efeitos detrimenais de níveis elevados de energia na dieta (Dunne et al., 1999), efeitos tóxicos da uréia e nitrogênio (Ferguson e Chalupa, 1989; Butler, 1998; Sinclair et al., 2000; Dawuda et al., 2002), e deficiências de vitamina e/ou minerais (Ingraham et al., 1987; Arechiga et al., 1994; 1998). Alguns peptídeos, tais como a leptina e fatores de crescimento (IGF-1 e IGF-2), cujas concentrações variam na circulação em função do estado metabólico do animal, especialmente durante o período pós parto em vacas leiteiras, aparentemente estão envolvidos na mediação dos efeitos da nutrição na função reprodutiva (O'Callaghan e Boland, 1999; Boland et al., 2001; Lucy, 2001).

Vacas leiteiras em lactação têm capacidade reduzida de responder a aumentos de temperatura ambiente ou outras formas de estresse (Lucy et al., 1986; Sartori et al., 2002b). Estresse térmico reduz a eficiência reprodutiva, particularmente em vacas lactantes, através da redução da expressão/detecção de estro e pela diminuição nas taxas de concepção (Stevenson et al., 1984; Ryan et al., 1993). O efeito do estresse térmico na fertilidade parece estar associado a quedas na taxas de fecundação e elevação na perda embrionária (Al-Katanani et al., 1999, 2002; Hansen et al., 2001; Rivera e Hansen, 2001; Sartori et al., 2002b).

Muitos dos mecanismos envolvidos no transporte de gametas, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial sofrem influência dos hormônios esteróides ovarianos E₂ e P₄. Alterações nas concentrações séricas de esteróides, que ocorrem em vacas de alta produção leiteira podem comprometer a eficiência reprodutiva. Pesquisadores relataram que o crescimento prolongado do folículo ovariano em vacas com baixos níveis circulantes de P₄ resultou em fertilidade reduzida (Mihm et al., 1994; Ahmad et al., 1995). Por exemplo, em um experimento (Ahmad et al., 1996), a produção de um folículo persistente dramaticamente reduziu a taxa de concepção de 54% para 15% em vacas lactantes. Essa persistência do folículo dominante (que talvez ocorra naturalmente na vaca de alta produção leiteira) está associada à exposição prolongada de elevadas concentrações de E₂ antes da ovulação (Ahmad et al., 1996; Bigelow e Fortune, 1998), porém, ainda está por ser determinado se essa elevação prolongada de E₂ circulante ou intra-folicular antes da ovulação compromete a fertilidade. O E₂ também está associado à retenção do ovócito no oviduto, enquanto que a P₄ acelera o transporte (Bearden e Fuquay, 2000). Alteração nas concentrações séricas dos esteróides pode afetar fecundação ou transporte do embrião/óvulo. Além disso, proteínas secretórias dependentes de E₂ parecem ser parte essencial de um ambiente tubárico de suporte para capacitação espermática, fecundação e desenvolvimento embrionário inicial (King et al., 1994; DeSouza e Murray, 1995; Binelli et al., 1999). Binelli et al. (1999) observaram alterações no ambiente tubárico em vacas com folículos dominantes persistentes e sugeriram que esse microambiente inapropriado contribui com a fertilidade reduzida em vacas com folículos persistentes. É esperado que vacas de alta produção leiteira tenham concentrações séricas de P₄ mais baixas do que novilhas (Sartori et al., 2002a; 2004a). Reduzidas concentrações séricas de P₄ no período periovulatório poderiam ser responsáveis, pelo menos em parte, pela redução na fertilidade de vacas leiteiras. Vacas com concentrações mais baixas de P₄ antes da IA tiveram fertilidade reduzida (Folman et al., 1973; Fonseca et al., 1983) e suplementação de P₄ antes da IA aumentou a taxa de concepção (Folman et al., 1990; Wehrman et al., 1993; Xu et al., 1997). Baixas concentrações séricas de P₄ permitem um aumento na frequência de pulsos de LH (Roberson et al., 1989; Bergfelt et al., 1991; Adams et al., 1992), causando maturação prematura dos ovócitos (Revah e Butler, 1996), queda na qualidade ovocitária no momento da ovulação e conseqüente qualidade embrionária inferior após a fecundação (Ahmad et al., 1995). Concentrações reduzidas de P₄ após a IA também estão associadas à fertilidade reduzida (Lukaszewska e

Hansen, 1980; Mann et al., 1995; Ahmad et al., 1996; Larson et al., 1997). Essa redução na fertilidade pode ser devido às baixas concentrações séricas de P4 que talvez atrasem o desenvolvimento embrionário (Mann et al., 1998; Mann e Lamming, 2001), e/ou permitam uma indução precoce da luteólise (Mann e Lamming, 1995; Mann et al., 1995).

Com relação aos embriões PIV e TN, além das situações já mencionadas acima, outros fatores devem ser considerados como envolvidos nas perdas embrionárias, visto que o cultivo e a TN não somente afetam o desenvolvimento pré-implantação como também o desenvolvimento fetal.

A mais alta taxa de mortalidade em embriões PIV ocorre nas primeiras 2 a 3 semanas após a fecundação (Farin et al., 2001) e cerca de 60% ou mais das prenhez de embriões TN são perdidas no primeiro trimestre da gestação (Heyman et al., 2002). A explicação para essa alta taxa de falha no desenvolvimento com relação a defeitos intrínsecos dos embriões ainda não está esclarecida. Entretanto, a extensão e a regulação da expressão alterada de genes durante o desenvolvimento pré-implantação parece ser crítica para o desenvolvimento posterior do conceito (Rodríguez-Zas, 2008). Isso tem sido demonstrado em vários estudos usando a técnica de microarranjos para avaliar a expressão de milhares de genes simultaneamente em embriões PIV e TN (Cocoran et al., 2006; El-Sayed et al., 2006; Cui et al., 2007).

O efeito das condições de cultivo no padrão de expressão de genes tem sido amplamente reconhecido e pode ser responsável por alterações epigenéticas que são prejudiciais ao desenvolvimento do embrião e do feto (Kang et al., 2001). Existem inúmeras evidências de que o ambiente de cultivo que os embriões são expostos *in vitro* pode afetar a expressão de genes e causar as diferenças encontradas entre os embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* (Wrenzycki et al., 2005; Lonergan et al., 2006). Isso se refere não só à composição do meio mas também às condições de cultivo como, por exemplo, a tensão de oxigênio. Os defeitos em embriões clones se manifestam de forma mais severa do que nos PIV pois além dos efeitos do cultivo *in vitro*, podem ocorrer falhas na reprogramação do núcleo doador que afetam o desenvolvimento e diferenciação resultando em anormalidades na placenta, principal responsável pelas perdas de embriões TN.

Além da alteração na expressão gênica, é importante mencionar que as anormalidades cromossômicas também são causas comuns de falhas na prenhez. Células com anormalidades cromossômicas são comumente encontradas em embriões PIV e clones (Schmidt, 2007). A anormalidade mais freqüente é a mixoploidia, resultante de divisões celulares anormais causando poliploidia em uma proporção variável de células do embrião (Viuff et al., 1999).

Considerações finais

A elevada morte embrionária durante os primeiros dias de gestação é considerada a principal causa da baixa eficiência reprodutiva, especialmente em vacas de alta produção de leite. A utilização de biotecnologias reprodutivas tais como tratamentos hormonais e transferência de embriões provenientes de animais com elevada fertilidade tem se mostrado alternativas viáveis para o incremento da eficiência reprodutiva. Além disso, o uso de técnicas adequadas de IA e a redução de problemas sanitários, nutricionais e ambientais são condições essenciais para a obtenção de elevados índices de fecundação e manutenção da gestação, culminando no sucesso dos programas reprodutivos em bovinos. Entretanto, quando tecnologias com maior grau de artificios são utilizadas, as perdas embrionárias são mais acentuadas. O embrião pré-implantação é altamente influenciado por fatores do ambiente externo e, em situações extremas tais como as que podem ocorrer no cultivo *in vitro* e na TN, a capacidade do embrião de se adaptar às condições ambientais ou à reprogramação da cromatina, pode exceder sua própria capacidade adaptativa e resultar em perdas ou em desenvolvimento anormal.

Referências bibliográficas

- Adams GP, Matteri RL, Kastelic JP, Ko JC, Ginther OJ. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 1992; 94: 177-188.
- Ahmad N, Beam W, Butler WR, Deaver DR, Duby RT, Elder DR, Fortune JE, Griel LC, Jones LS, Milvae RA, Pate JL, Revah I, Schreiber DT, Townson DH, Tsang PCW, Inskeep EK. Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. Cooperative Regional Research Project. *J Anim Sci* 1996; 74: 1943-1952.
- Ahmad N, Schrick FN, Butcher RL, Inskeep EK. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. *Biol Reprod* 1995; 52: 1129-1135.
- Al-Katanani YM, Paula-Lopes FF, Hansen PJ. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J Dairy Sci* 2002; 85: 390-396.
- Al-Katanani YM, Webb DW, Hansen PJ. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J Dairy Sci* 1999; 82: 2611-2616.
- Almeida LAP. Early embryonic mortality in "repeat-breeder" cows. *ARS Veterinaria* 1995; 11: 18-34.
- Alomar M, Mahieu J, Verhaeghe B, Defoin L, Donnay I. Assessment of sperm quality parameters of six bulls showing different abilities to promote embryo development in vitro. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18: 395-402.
- Alomar M, Tasiaux H, Remacle S, George F, Paul D, Donnay I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. *Anim Reprod Sci* 2008; 107 :48-61.
- Arechiga CF, Ortiz O, Hansen PJ. Effect of prepartum injection of vitamin-E and selenium on postpartum reproductive function of dairy-cattle. *Theriogenology* 1994; 41: 1251-1258.
- Arechiga CF, Vazquez-Flores S, Ortiz O, Hernandez-Ceron J, Porras A, McDowell LR, Hansen PJ. Effect of injection of beta-carotene or vitamin E and selenium on fertility of lactating dairy cows. *Theriogenology* 1998; 50: 65-76.
- Arnold DR, Bordignon V, Lefebvre R, Murphy BD, Smith L. Somatic cell nuclear transfer alters peri-implantation trophoblast differentiation in bovine embryos. *Reproduction* 2006; 132: 279-290.
- Ayalon N. Review of embryonic mortality in cattle. *J Reprod Fertil* 1978; 54: 483-493.
- Beal WE, Perry RC, Corah LR. The use of ultrasound in monitoring reproductive physiology of beef-cattle. *J Anim Sci* 1992; 70: 924-929.
- Bearden HJ, Fuquay JW. Applied animal reproduction. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall; 2000.
- Berger T. Fertilization in ungulates. *Anim Reprod Sci* 1996; 42: 351-360.
- Bergfelt DR, Kastelic JP, Ginther OJ. Continued periodic emergence of follicular waves in non-bred progesterone-treated heifers. *Anim Reprod Sci* 1991; 24: 193-204.
- Bigelow KL, Fortune JE. Characteristics of prolonged dominant versus control follicles: follicle cell numbers, steroidogenic capabilities, and messenger ribonucleic acid for steroidogenic enzymes. *Biol Reprod* 1998; 58: 1241-1249.

Binelli M, Hampton J, Buhi WC, Thatcher WW. Persistent dominant follicle alters pattern of oviductal secretory proteins from cows at estrus. *Biol Reprod* 1999; 61: 127-134.

Boland MP, Lonergan P, O'Callaghan D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. *Theriogenology* 2001; 55: 1323-1340.

Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 1999; 51: 59-70.

Boyd H, Bacsich P, Young A, McCracken JA. Fertilization and embryonic survival in dairy cattle. *Br Vet J* 1969; 125: 87-97.

Breuel KF, Lewis PE, Schrick FN, Lishman AW, Inskeep EK, Butcher RL. Factors affecting fertility in the postpartum cow - Role of the oocyte and follicle in conception rate. *Biol Reprod* 1993; 48: 655-661.

Butler WR. Nutritional effects on resumption of ovarian cyclicity and conception rate in postpartum dairy cows. In: 26 Occ Publ Br Soc Anim Sci (ed.) *Fertility in the high producing dairy cow*. 2001; 133-145.

Butler WR. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1998; 81: 2533-2539.

Cesari A, Kaiser GG, Mucci N, Mutto A, Vincenti A, Fornés MW, Alberio RH. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology* 2006; 66:1185-93.

Cerri RLA, Bruno R, Chebel RC, Galvão KN, Rutigliano H, Thatcher WW, Luchini D, Santos JEP. Effect of source of fatty acids on fertilization rate and embryo quality in early postpartum high producing dairy cows. *J Dairy Sci* 2004; 87(Suppl 1):297. (Abstract).

Chebel RC, Santos JEP, Cerri RLA, Galvao KN, Juchem SO, Thatcher WW. Effect of resynchronization with GnRH on day 21 after artificial insemination on pregnancy rate and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2003; 60: 1389-1399.

Christianson WT. Stillbirths, mummies, abortions, and early embryonic death. *Vet Clin North Am* 1992; 8: 623-639.

Corcoran D, Fair T, Park S, Rizos D, Patel OV, Smith GW, Coussens PM, Ireland JJ, Boland MP, Evans AC, Lonergan P. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction* 2006; 131: 651-660.

Corrêa GA, Rumpf R, Mundim TC, Franco MM, Dode MA. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim Reprod Sci* 2008; 104: 132-142.

Cui XS, Li XY, Shen XH, Bae YJ, Kang JJ, Kim NH. Transcription profile in mouse four-cell, morula, and blastocyst: Genes implicated in compaction and blastocoel formation. *Mol Reprod Dev* 2007; 74: 133-143.

Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftsinger M, Nebel RL, Saacke RG. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. *J Dairy Sci* 2001a; 84: 2413-2418.

Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftsinger M, Saacke RG. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. *J Anim Sci* 2000; 78: 2081-2085.

- Dalton JC, Nadir S, Bame JH, Noftsinger M, Saacke RG. Towards the enhancement of pregnancy rate: The effect of insemination time on sperm transport, fertilization rate and embryo quality in dairy cattle. In: *Fertility in the high producing dairy cow*. 26 Occ Publ Br Soc Anim Sci; 2001b: 161-174.
- Dawuda PM, Scaramuzzi RJ, Leese HJ, Hall CJ, Peters AR, Drew SB, Wathes DC. Effect of timing of urea feeding on the yield and quality of embryos in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2002; 58: 1443-1455.
- Dematawewa CMB, Berger PJ. Genetic and phenotypic parameters for 305-day yield, fertility, and survival in Holsteins. *J Dairy Sci* 1998; 81: 2700-2709.
- DeSouza MM, Murray MK. An estrogen-dependent secretory protein, which shares identity with chitinases, is expressed in a temporally and regionally specific manner in the sheep oviduct at the time of fertilization and embryo development. *Endocrinology* 1995; 136: 2485-2496.
- DeSouza PA, Walker S, King TJ, Young LE, Harkness L, Ritchie WA. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol Reprod* 2001; 65:23-30.
- Diskin MG, Sreenan JM. Fertilization and embryonic mortality-rates in beef heifers after artificial-insemination. *J Reprod Fertil* 1980; 59: 463-468.
- Dode MA, Rodovalho NC, Ueno VG, Fernandes CE. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. *Anim Reprod Sci*. 2002; 69:15-23.
- Dode, MAN. Avanços na maturação ovocitária em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 2006; 4 (Supl 1): 115-130.
- Domecq JJ, Skidmore AL, Lloyd JW, Kaneene JB. Relationship between body condition scores and conception at first artificial insemination in a large dairy herd of high yielding Holstein cows. *J Dairy Sci* 1997; 80: 113-120.
- Dunne LD, Diskin MG, Boland MP, O'Farrell KJ, Sreenan JM. The effect of pre- and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. *Anim Sci* 1999; 69: 411-417.
- Dunne LD, Diskin MG, Sreenan JM. Embryo and foetal loss in beef heifers between day 14 of gestation and full term. *Anim Reprod Sci* 2000; 58: 39-44.
- Eicker SW, Grohn YT, Hertl JA. The association between cumulative milk yield, days open, and days to first breeding in New York Holstein cows. *J Dairy Sci* 1996; 79: 235-241.
- Elsden RP, Hasler JF, Seidel GE, Jr. Non-surgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology* 1976; 6: 523-532.
- El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol Genomics* 2006; 28: 84-96.
- Emanuelson U, Oltenacu PA. Incidences and effects of diseases on the performance of Swedish dairy herds stratified by production. *J Dairy Sci* 1998; 81: 2376-2382.
- Farin PW, Farin CE. Transfer of bovine embryos produced in vivo or in vitro: survival and fetal development. *Biol Reprod* 1995; 52: 676-682.
- Farin PW, Crosier AE, Farin CE. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 2001; 55: 151-170.

Ferguson JD, Chalupa W. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy-cows. *J Dairy Sci* 1989; 72: 746-766.

Folman Y, Kaim M, Herz Z, Rosenberg M. Comparison of methods for the synchronization of estrous cycles in dairy cows. 2. Effects of progesterone and parity on conception. *J Dairy Sci* 1990; 73: 2817-2825.

Folman Y, Rosenberg M, Herz Z, Davidson M. The relationship between plasma progesterone concentration and conception in post-partum dairy cows maintained on two levels of nutrition. *J Reprod Fertil* 1973; 34: 267-278.

Fonseca FA, Britt JH, McDaniel BT, Wilk JC, Rakes AH. Reproductive traits of Holsteins and Jerseys. Effects of age, milk yield, and clinical abnormalities on involution of cervix and uterus, ovulation, estrous cycles, detection of estrus, conception rate, and days open. *J Dairy Sci* 1983; 66: 1128-1147.

Fricke PM, Caraviello DZ, Weigel KA, Welle ML. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *J Dairy Sci* 2003; 86: 3941-3950.

Geisert RD, Short EC, Morgan GL. Establishment of pregnancy in domestic species. In: Geisert RD, Zavy MT (eds.), *Embryonic mortality in domestic species*. Florida: CRC Press; 1994: 23-53.

Gordon I. Laboratory Production of Cattle Embryos. In: Gordon I (eds). *Oxon: CABI Publishing*; 2003, 548p.

Grealy M, Diskin MG, Sreenan JM. Protein content of cattle oocytes and embryos from the two-cell to the elongated blastocyst stage at day 16. *J Reprod Fertil* 1996; 107: 229-233.

Grohn YT, Rajala-Schultz PJ. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2000; 60: 605-614.

Hansen PJ, Drost M, Rivera RM, Paula-Lopes FF, al-Katanani YM, Krininger CE, 3rd, Chase CC, Jr. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. *Theriogenology* 2001; 55: 91-103.

Hansen PJ. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. *J Anim Sci* 2002; 80: 33-44.

Harper MJK. Sperm and egg transport. In: Austin CR, Short RV (eds.), *Reproduction in mammals: 1. Germ Cells and Fertilization*. Cambridge: Cambridge University Press; 1982: 102-127.

Hasler JF. In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Anim Reprod Sci* 2000; 60-61: 81-91.

Hasler JF. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 2001; 56: 1401-1415.

Hawk HW, Tanabe TY. Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single-ovulating cattle. *J Anim Sci* 1986; 63: 551-560.

Heyman Y, Chesné P, Lebourhis D, Peynot N, Renard JP. Developmental ability of bovine embryos after nuclear transfer based on the nuclear source: In vivo versus in vitro. *Theriogenology*. 1994; 42:695-702.

Heyman Y, Chavatte-Palmer P, LeBourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod*. 2002; 66: 6-13.

- Hill JR, Burghardt RC, Jones K, Long CR, Looney CR, Shin T, Spencer TE, Thompson JA, Winger QA, Westhusin ME. Evidence for placental abnormalities as the major cause of mortality in first trimester somatic cell cloned bovine fetuses. *Biol Reprod* 2000; 63:1787-94.
- Hosseini SM, Hajian M, Moulavi F, Shahverdi AH, Nasr-Esfahani MH. Optimized combined electrical-chemical parthenogenetic activation for in vitro matured bovine oocytes. *Anim Reprod Sci* 2007; Aug 6. [Epub ahead of print].
- Hyttel P, Callesen H, Greve T, Schmidt M. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology* 1991; 35: 91-108.
- Iguma LT, Lisauskas SF, Melo EO, Franco MM, Pivato I, Vianna GR, Sousa RV, Dode MA, Aragão FJ, Rech EL, Rumpf R. Development of bovine embryos reconstructed by nuclear transfer of transfected and non-transfected adult fibroblast cells. *Genet Mol Res.* 2005; 4: 55-66.
- Ingraham RH, Kappel LC, Morgan EB, Srikandakumar A. Correction of subnormal fertility with copper and magnesium supplementation. *J Dairy Sci* 1987; 70: 167-180.
- Kafi M, McGowan MR. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Anim Reprod Sci* 1997; 48: 137-157.
- Kang YK, Koo DB, Park JS, Choi YH, Chung AS, Lee KK, Han YM. Aberrant methylation of donors genome in cloned bovine embryos. *Nature Genetics* 2001; 28: 173-177.
- Kato Y, Tani T, Tsunoda Y. Cloning of calves from various somatic cell types of male and female adult, newborn and fetal cows. *J Reprod Fertil* 2000; 120: 231-237.
- Kelly P, Duffy P, Roche JF, Boland MP. Superovulation in cattle: Effect of FSH type and method of administration on follicular growth, ovulatory response and endocrine patterns. *Anim Reprod Sci* 1997; 46: 1-14.
- King RS, Anderson SH, Killian GJ. Effect of bovine oviductal estrus-associated protein on the ability of sperm to capacitate and fertilize oocytes. *J Androl* 1994; 15: 468-478.
- Kochhar HS, Kochhar KP, Basrur PK, King WA. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Anim Reprod Sci* 2003; 77: 33-49.
- Labernia J, López-Gatius F, Santolaria P, López-Bejar M, Rutllant J. Influence of management factors on pregnancy attrition in dairy cattle. *Theriogenology* 1996; 45: 1247-1253.
- Lamb GC, Miller BL, Traffas V, Corah LR. Estrus detection, first service conception, and embryonic death in beef heifers synchronized with MGA and prostaglandin. *Kansas AES Report of progress.* 1997; 783:97.
- Lane M, Gardner DK, Hasler MJ, Hasler JF. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology* 2003; 60: 407-419.
- Larson SF, Butler WR, Currie WB. Reduced fertility associated with low progesterone postbreeding and increased milk urea nitrogen in lactating cows. *J Dairy Sci* 1997; 80: 1288-1295.
- Loeffler SH, de Vries MJ, Schukken YH, de Zeeuw AC, Dijkhuizen AA, de Graaf FM, Brand A. Use of AI technician scores for body condition, uterine tone and uterine discharge in a model with disease and milk production parameters to predict pregnancy risk at first AI in holstein dairy cows. *Theriogenology* 1999a; 51: 1267-1284.

- Loeffler SH, de Vries MJ, Schukken YH. The effects of time of disease occurrence, milk yield, and body condition on fertility of dairy cows. *J Dairy Sci* 1999b; 82: 2589-2604.
- Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*. 2006; 65:137-52.
- López-Gatiús 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-Gatiús F. Site of semen deposition in cattle: A review. *Theriogenology* 2000; 53: 1407-1414.
- Lucy MC, Stevenson JS, Call EP. Controlling 1st service and calving interval by prostaglandin-f2-alpha, gonadotropin-releasing-hormone, and timed insemination. *J Dairy Sci* 1986; 69: 2186-2194.
- Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J Dairy Sci* 2001; 84: 1277-1293.
- Lukaszewska J, Hansel W. Corpus luteum maintenance during early pregnancy in the cow. *J Reprod Fertil* 1980; 59: 485-493.
- Mann GE, Lamming GE, Robinson RS, Wathes DC. The regulation of interferon-t production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J Reprod Fertil (Suppl.)* 1998; 317-328.
- Mann GE, Lamming GE, Fray MD. Plasma estradiol and progesterone during early-pregnancy in the cow and the effects of treatment with buserelin. *Anim Reprod Sci* 1995; 37: 121-131.
- Mann GE, Lamming GE. Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* 2001; 121: 175-180
- Maurer RR, Chenault JR. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef-cattle. *J Anim Sci* 1983; 56: 1186-1189.
- McMillan WH, Peterson AJ, Hall DRH, Donnison MJ. Embryo and recipient contributions to embryo loss to day 60 in heifers receiving either one or two in vitro-produced embryos. *Theriogenology* 1997; 47: 370.
- Mermillod P, Oussaid B, Cognie Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil* 1999: 449-460.
- Mihm M, Baguisi A, Boland MP, Roche JF. Association between the duration of dominance of the ovulatory follicle and pregnancy rate in beef heifers. *J Reprod Fertil* 1994; 102: 123-130.
- Moore DA, Cullor JS, Bondurant RH, Sisco WM. Preliminary field evidence for the association of clinical mastitis with altered interestrus intervals in dairy-cattle. *Theriogenology* 1991; 36: 257-265.
- Moreira F, Risco C, Pires MFA, Ambrose JD, Drost M, DeLorenzo M, Thatcher WW. Effect of body condition on reproductive efficiency of lactating dairy cows receiving a timed insemination. *Theriogenology* 2000; 53: 1305-1319.
- Moura MT, de Sousa RV, de Oliveira Leme L, Rumpf R. Analysis of actinomycin D treated cattle oocytes and their use for somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* 2007; Nov 9 [Epub ahead of print].
- Mullins KJ, Saacke RG. Study of the functional anatomy of bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. *Anat Rec* 1989; 225: 106-117.

- 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, Mcgilliard ML. Interactions of high milk-yield and reproductive-performance in dairy-cows. *J Dairy Sci* 1993; 76: 3257-3268.
- O'Callaghan D, Boland MP. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. *Anim Sci* 1999; 68: 299-314.
- O'Farrell KJ, Langley OH, Hartigan PJ, Sreenan JM. Fertilization and embryonic survival rates in dairy-cows culled as repeat breeders. *Vet Rec* 1983; 112: 95-97.
- Okuda K, Miyamoto Y, Skarzynski DJ. Regulation of endometrial prostaglandin F(2alpha) synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. *Domest Anim Endocrinol* 2002; 23: 255-264.
- Palma GA, Sinowatz F. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. *Anat Histol Embryol* 2004; 33: 257-62.
- Panarace M, Agüero JI, Garrote M, Jauregui G, Segovia A, Cané L, Gutiérrez J, Marfil M, Rigali F, Pugliese M, Young S, Lagioia J, Garnil C, Forte Pontes JE, Ereno Junio JC, Mower S, Medina M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology* 2007; 67: 142-151.
- Parrish JJ, Krogenaes A, Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*. 1995; 44:859-69.
- Pereira DC, Dode MA, Rumpf R. Evaluation of different culture systems on the in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology* 2005; 63: 1131-1141.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology* 1995; 44: 915-923.
- Reis EL, Nasser LF, Nichi M, Baruselli PS. Embryonic mortality in recipients (*Bos indicus* x *Bos taurus*) superovulated with eCG. *Acta Sci Vet* 2004; 32: 198. (Abstract).
- Revah I, Butler WR. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. *J Reprod Fertil* 1996; 106: 39-47.
- Rivera RM, Hansen PJ. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction* 2001; 121: 107-115.
- Roberson MS, Wolfe MW, Stumpf TT, Kittok RJ, Kinder JE. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. *Biol Reprod* 1989; 41: 997-1003.
- Roche JF, Bolandl MP, Mcgeady TA. Reproductive wastage following artificial-insemination of heifers. *Vet Rec* 1981; 109: 401-404.
- Rodrigues CFM. Ocorrência de mortalidade embrionária em programa de transferência de embriões. *ARS Veterinaria* 1995; 11: 76-78.
- Rodriguez-Zas SL, Schellander K, Lewin HA. Biological interpretations of transcriptomic profiles in mammalian oocytes and embryos. *Reproduction* 2008; 135: 129-39.

Ruegg PL, Milton RL. Body condition scores of Holstein cows on Prince-Edward-Island, Canada - Relationships with yield, reproductive-performance, and disease. *J Dairy Sci* 1995; 78: 552-564.

Ryan DP, Prichard JF, Kopel E, Godke RA. Comparing early embryo mortality in dairy-cows during hot and cool seasons of the year. *Theriogenology* 1993; 39: 719-737.

Saacke RG, DeJarnette JM, Bame JH, Karabinus DS, Whitman SS. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology* 1998; 50: 117-128.

Santos JEP, Cerri RLA, Ballou MA, Higginbotham GE, Kirk JH. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004; 80: 31-45.

Sartori R, Gümen A, Guenther JN, Souza AH, Wiltbank MC. Comparison of artificial insemination (AI) versus embryo transfer (ET) in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2003a; 86: 238-239 (Abstract).

Sartori R, Haughian, J. M., Shaver, R. D., Rosa, G. J. M., Wiltbank M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 2004a; 87: 905-920.

Sartori R, Rosa GJM, Wiltbank MC. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002a; 85: 2813-2822.

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* 2002b; 85: 2803-2812.

Sartori R, Souza AH, Guenther JN, Caraviello D, Geiger LN, Schenk JL, Wiltbank MC. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. *Anim Reprod* 2004b; 1: 86-90.

Sartori R, Suárez-Fernández CA, Monson RL, Guenther JN, Rosa GJM, Wiltbank MC. Improvement in recovery of embryos/ova using a shallow uterine horn flushing technique in superovulated Holstein heifers. *Theriogenology* 2003b; 60: 1319-1330.

Schmidt M. Perinatal death associated with ET, IVP and cloning in cattle. *Acta Vet Scand* 2007; 49: 13.

Schrick FN, Hockett ME, Saxton AM, Lewis MJ, Dowlen HH, Oliver SP. Influence of subclinical mastitis during early lactation on reproductive parameters. *J Dairy Sci* 2001; 84: 1407-1412.

Senger PL, Becker WC, Davidge ST, Hillers JK, Reeves JJ. Influence of cornual insemination on conception in dairy-cattle. *J Anim Sci* 1988; 66: 3010-3016.

Silke V, Diskin MG, Kenny DA, Boland MP, Dillon P, Mee JF, Sreenan JM. Extent, pattern and factors associated with late embryonic loss in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2002; 71: 1-12.

Sinclair KD, Kuran M, Gebbie FE, Webb R, McEvoy TG. 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* 2000; 78: 2670-2680.

Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*. 2006; 65:126-36.

- Sreenan JM, Diskin MG, Morris DG. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. In: Fertility in the high producing dairy cow. 26 Occ Publ Br Soc Anim Sci; 2001: 93-104.
- Stevenson JS, Johnson SK, Medina-Britos MA, Richardson-Adams AM, Lamb GC. Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both. J Anim Sci 2003; 81: 1681-1692.
- Stevenson JS, Schmidt MK, Call EP. Stage of estrous cycle, time of insemination, and seasonal effects on estrus and fertility of Holstein heifers after prostaglandin F2 alpha. J Dairy Sci 1984; 67: 1798-1805.
- Tanabe TY, Deaver DR, Hawk HW. Effect of gonadotropin-releasing-hormone on estrus, ovulation, and ovum cleavage rates of dairy-cows. J Anim Sci 1994; 72: 719-724.
- Thatcher WW, Binelli M, Arnold D, Mattos R, Badinga L, Moreira F, Staples CR, Guzeloglu A. Endocrine and physiological events from ovulation to establishment of pregnancy in cattle. In: Fertility in the high producing dairy cow. 26 Occ Publ Br Soc Anim Sci; 2001: 81-91.
- Thatcher WW, Staples CR, Danet-Desnoyers G, Oldick B, Schmitt E-P. Embryo health and mortality in sheep and cattle. J Anim Sci 1994; 72 (Suppl. 3): 16-30.
- Vanroose G, de Kruif A, Van Soom A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. Anim Reprod Sci 2000; 60: 131-143.
- van Wagtenonk-de Leeuw AM, Mullaart E, de Roos AP, Merton JS, den Daas JH, Kemp B, de Ruigh L. Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. Theriogenology 2000; 53: 575-597.
- Vasconcelos JLM, Silcox RW, Lacerda JA, Pursley JR, Wiltbank MC. Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to head stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. Biol Reprod 1997; 56: 140 (Abstract).
- Viuff D, Rickords L, Offenbergh H, Hyttel P, Avery B, Greve T, Olsaker I, Williams JL, Callesen H, Thomsen PD. A high proportion of bovine blastocysts produced in vitro are mixoploid. Biol Reprod 1999; 60: 1273-1278.
- Wathes DC. Embryonic mortality and the uterine environment. J Endocrinol 1992; 134: 321-325.
- Wehrman ME, Roberson MS, Cupp AS, Kojima FN, Stumpf TT, Werth LA, Wolfe MW, Kittok RJ, Kinder JE. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 beta-estradiol and increases conception in cows. Biol Reprod 1993; 49: 214-220.
- Weller JJ, Ezra E. Genetic analysis of somatic cell score and female fertility of Israeli Holsteins with an individual animal model. J Dairy Sci 1997; 80: 586-593.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. Reprod Fertil Dev. 2005; 17:23-35.
- Wiebold JL. Embryonic mortality and the uterine environment in 1st-service lactating dairy-cows. J Reprod Fertil 1988; 84: 393-399.
- Xu ZZ, Burton LJ, Macmillan KL. Reproductive performance of lactating dairy cows following estrus synchronization regimens with PGF2 alpha and progesterone. Theriogenology 1997; 47: 687-701.

Yang X, Smith SL, Tian XC, Lewin HA, Renard JP, Wakayama T. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet* 2007; 39: 295-302.

Zanenga CA, Pedroso MF. Early pregnancy check by ultrasound scanning in bovine embryo transfer. *ARS Veterinaria* 1995; 11: 151 (Abstract).

Perspectivas para as técnicas de FIV, clonagem e transgenia

Flávio Vieira Meirelles, Giovana Krempel Fonseca Merigue; Weruska Karina Santos-Biase; Fernando Henrique Biase; Isabeli E. Picada; José Rodrigo Valim Pimentel, Felipe Perecin, Moyses Santos Miranda, Thiago Camera DeBem, Fabiana Bressan, Juliano Rodrigues Sangalli ; Flávia Devechio Providelo.

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos (FZEA) Universidade de São Paulo (USP)
Pirassununga, SP Brasil. e-mail: meirellf@usp.br

Resumo

As técnicas de Fecundação *in vitro*, transferência de núcleo de célula somática (clonagem animal) estão sendo exploradas comercialmente em muitos países e espécies. Centenas de milhares de animais já foram produzidos por FIV e milhares de animais clonados já foram produzidos e entregues aos seus proprietários em todo o mundo. As modificações gênicas, embora em um ritmo muito mais lento, estão se espalhando para diversos laboratórios de pesquisa na Universidade e em empresas farmacêuticas. Essa exploração comercial tem contribuído para a evolução das tecnologias, à medida que traz recursos do complexo privado para investir em ciência. No entanto, alguns interesses comerciais dificultam a troca de experiências entre os membros da comunidade científica.

Esta apresentação pretende discutir o estado da arte das tecnologias, abordar alguns problemas enfrentados em nossa experiência e, finalmente, discutir a possível contribuição da FIV, clonagem final, isto é, aquela em que os clones são destinados à produção, e transgenia para o ganho genético, para a seleção genética nuclear e citoplasmática nos animais, com ênfase no rebanho bovino. Temas como seleção baseada em características aditivas e não aditivas, bem como seleção ou modificação são discutidos visando suas possíveis aplicações no futuro.

Abstract

In vitro fertilization, somatic cell nuclear transfer (animal cloning) are being commercially explored in many countries and species. Hundred thousands of IVF produced calves and thousands of cloned animals have already been produced and delivered to their owners worldwide. The genetic modifications are slowly been spread to universities and pharmaceutical companies. The commercial exploration of these technologies are contributing to the evolution of the technology, as far as brings funds from the private sector to support scientific development, however, other commercial interests challenge the exchange of experiences and knowledge among members of scientific community.

This talk intends to discuss the state of the art of the technologies, to depict some of the problems seen in our experience and, finally, to discuss the possible contribution of cloning, to the genetic improvement, and nuclei and cytoplasmic genetic selection in animals, with special emphasis in cattle. Selection based in additive and non-additive traits, as well as genetic modifications are discussed focusing their possible applications in the future.

Introdução

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos por fecundação *in vitro* ou transferência nuclear vem sendo aplicada amplamente com propósitos científicos ou comerciais a sua evolução, nas últimas duas décadas em especial, tem sido marcante. Neste cenário particularmente o Brasil, tem desenvolvido um papel principal, permitiu a aplicação da PIV em larga escala e a exportação deste modelo para vários países latino-americanos e de outros continentes. Esta evolução da aplicação da tecnologia aumenta a demanda por inovações e pesquisas básicas no sentido de aumentar a eficiência, baixar custos e abrir novas perspectivas de mercados. Embora as empresas sejam altamente competentes para o desenvolvimento de aprimoramentos tecnológicos com vistas a aplicação no curto e no médio prazo, as Universidades e Centros de pesquisas públicos são, no entanto, a maior fonte de massa crítica desenvolvendo estudos científicos e desenvolvimento tecnológico de longo prazo. Esta apresentação pretende discutir o estado da arte da tecnologia, abordar alguns problemas enfrentados em nossa

experiência e divulgar algumas estratégias que estão sendo desenvolvidas em nosso grupo visando contribuir com a PIV de embriões.

Variabilidade da produção de oócitos

Uma das características que mais influencia a produção de embriões *in vitro* naturalmente é a disponibilidade de oócitos. Esta característica é de grande variabilidade individual e sua obtenção depende de diversas variáveis fisiológicas ou patológicas que incluem idade, padrão nutricional, estação do ano, temperatura, entre outras características como, por exemplo, as de origem genética (Watanabe *et al.*, 2007). Apesar dos avanços no conhecimento das bases fisiológicas que controlam o desenvolvimento folicular, no que diz respeito à genética ainda há muito a se estudar. Existem descritos diversos estudos genéticos ligados ao número de folículos ovulados em ovinos, suínos e inclusive bovinos (baseado em seleção de fêmeas que produziram partos gemelares), entretanto, até pouco tempo não havia uma indicação clara de que o número de folículos antrais presentes no ovário de um determinado animal pode ser selecionado geneticamente.

Recentemente, um estudo retrospectivo em 1426 aspirações foliculares em 193 rezes (figura 1) realizado pela nossa equipe, selecionou animais de alta produção, média e baixa produção de oócitos e aplicou estes estudos no sentido de identificar variações gênicas por seqüenciamento de genes candidatos possivelmente correlacionadas com o número de folículos aspirados (Santos-Biase *et al.*, 2008). Durante este estudo foram parcialmente seqüenciados os genes GDF9, FGF8, BMP15, Receptor do BMP15 entre outros.

Os resultados deste trabalho sugerem um efeito claro de uma variação de nucleotídeo no gene FGF8 que responde pela variação de até $2,26 \pm 1,08$ oócitos e efeito claramente aditivo. Outros possíveis marcadores encontrados no mesmo estudo indicam a possibilidade de haverem outros marcadores ligados ao número de folículos disponíveis no momento da aspiração, e que estariam sendo herdados com um desvio de aditividade possivelmente por uma interação epistática com outras regiões. Em conjunto, os marcadores estudados neste trabalho poderiam responder por uma variação de até $7,36 \pm 1,12$ oócitos por aspiração folicular por doadora. Estes marcadores poderia ter uma idéia da produtividade da doadora antes mesmo de entrar na fase reprodutiva.

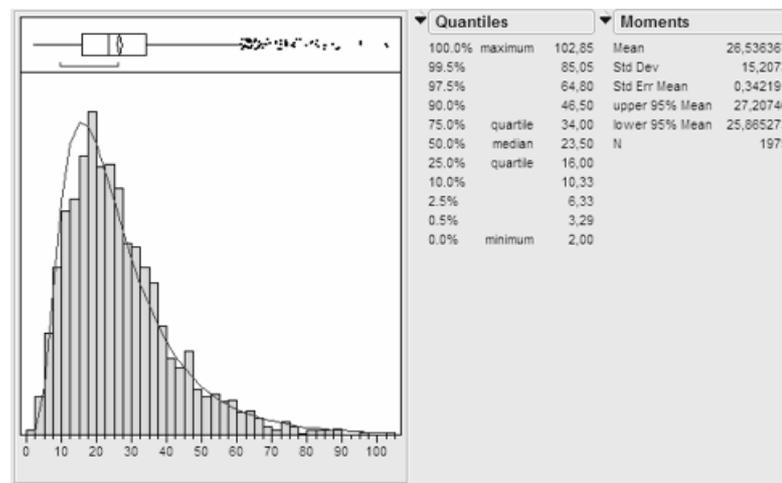


Figura 1. Distribuição da produção de oócitos viáveis entre fêmeas bovinas de diferentes raças zebuínas aspiradas comercialmente ao longo de 2002 à 2006 geradas pelo software JMP – instituto SAS. O eixo Y representa a quantidade de animais aspirados e o eixo X o número médio de oócitos produzidos em no mínimo três aspirações foliculares e que resultaram em taxa não inferior à 20% de blastocisto. Os quadros ao lado indicam as distribuições em quantis média, desvio e erro padrão dos dados obtidos.

Variabilidade na qualidade dos COCs

Outra característica de conhecimento geral que pode influenciar no resultado de uma produção de embriões *in vitro* é a qualidade dos complexos *cumulus*-oócitos (COCs) recuperados. Via de regra os COCs podem ser divididos em quatro graus relativa a qualidade: Qualidade 1- *cumulus* sem expansão, completo, com mais de três camadas de células, ooplasma de coloração marrom e com granulações finas e homogêneas; Qualidade 2- *cumulus* parcialmente presente, ooplasma com granulação heterogênea; Qualidade 3- *cumulus* presente, mas expandido, ooplasma contraído; Qualidade 4: oócitos desnudos sem a presença de *cumulus* e oócitos degenerados portadores de *cumulus oofurus* já expandidos e bastante granuloso (Leibfried and First, 1979; Lonergan et al., 1992; Madison et al., 1992; Brackett and Zuelke, 1993).

Em nossa experiência, utilizando oócitos obtidos à partir de ovários de vacas abatidas, há um efeito da morfologia dos COCs sobre o desenvolvimento e sobre a qualidade dos embriões derivados. Em um estudo, realizado em nosso laboratório, observamos que os COCs de qualidade 1, 2 e 3 (representados como grupos A, B e C respectivamente; Emanuelli et al., 2001) já apresentam desde o momento de sua colheita algumas características que indicam seu menor potencial. Entre as características estudadas esta o estado da cromatina que indica a progressão no ciclo meiótico.

É patente que no momento após a aspiração folicular, os COCs de grau C já apresentem um número significativamente maior de oócitos em Metáfase I (MI). O mesmo também é válido para os COCs de grau B, que desde o momento pós colheita já apresentam a maioria dos oócitos em uma fase mais avançada da quebra da vesícula germinal (VGf) diferentemente dos oócitos controles (grupo A) que encontram-se, na maioria, na fase inicial de Vesícula germinativa (VGi; Tabela 1)

Tabela 1 - Estádio de maturação nuclear de oócitos não maturados (0h) nas 3 qualidades morfológicas estudadas.

Qualidade Morfológica	Nº de COCs	VGi	VGf	MI	MII
		% ± Erro Padrão	% ± Erro Padrão	% ± Erro Padrão	% ± Erro Padrão
COC-A	34	57.7 ± 6.7 ^a	42.3 ± 6.7 ^a	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0
COC-B	33	12.3 ± 3.4 ^b	87.7 ± 3.4 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	0.0 ± 0.0
COC-C	36	0.0 ± 0.0 ^b	77.1 ± 8.5 ^b	22.9 ± 8.5 ^a	0.0 ± 0.0

^{a-b-c} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$)

Apesar desta diferença no momento da colheita as taxas de maturação nuclear não são distintas ($p > 0,05$) indicando que os três grupos têm os requerimentos mínimos para completar a meiose e atingir a fase de metáfase II (tabela 2).

Tabela 2 - Estádio de maturação nuclear de oócitos maturados *in vitro* por 24h nas 3 qualidades morfológicas estudadas.

Qualidade Morfológica	Nº de COCs	VGi	VGf	MI	MII
		% ± Erro Padrão	% ± Erro Padrão	% ± Erro Padrão	% ± Erro Padrão
COC-A	57	5.6 ± 5.9	0.0 ± 0.0 ^a	12.3 ± 2.5	82.2 ± 4.9
COC-B	46	6.6 ± 1.0	7.2 ± 7.7 ^b	13.1 ± 6.0	73.1 ± 10.3
COC-C	46	3.9 ± 3.4	2.8 ± 2.4 ^c	8.6 ± 2.4	84.7 ± 2.4

^{a-b-c} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Na fase do desenvolvimento pré-maturação é possível analisar outras características dos COCs/oócitos. São vários os aspectos de maior interesse que podem influenciar o desenvolvimento destes COCs. Uma das possíveis hipóteses é que os COCs de menor qualidade poderiam estar em uma fase de início da atresia folicular. Sendo assim nós desenvolvemos um estudos visando a informação em relação a qualidade das células do *cumulus* baseados em sua taxa de fragmentação nuclear. Nossos resultados indicam uma maior taxa de fragmentação nuclear medidas pelas técnicas de ensaio cometa (que estuda a quantidade de DNA que migra para fora do núcleo em estudos de microeletroforese; Tabela 3) e por TUNEL (técnica que mede a incorporação de nucleotídeos em DNA danificados, Tabela 4). Neste estudo, no entanto é possível observar um efeito da origem do COCs sobre a taxa de fragmentação nuclear nas células do *cumulus* após 24 horas de cultivo para maturação do oócito (tabelas 3 e 4).

Tabela 3 - Grau de fragmentação do DNA nas CC das 3 qualidades morfológicas antes e após o período de 24h *in vitro* maturação

Qualidade Morfológica	Tempo de Maturação	Nº de CC	Grau 1	Grau 2	Grau 3
			% ± Erro Padrão	% ± Erro Padrão	% ± Erro Padrão
A	0h	125	98.7 ± 1.7 ^a	1.3 ± 1.7 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
B	0h	117	89.7 ± 2.8 ^b	4.3 ± 1.7 ^a	6.0 ± 4.3 ^b
C	0h	117	92.2 ± 2.2 ^b	0.0 ± 0.0 ^b	7.8 ± 2.2 ^b
A	24h	135	92.4 ± 5.5 ^a	3.1 ± 3.6 ^a	4.5 ± 3.7 ^a
B	24h	125	50.5 ± 11.0 ^{b*}	10.2 ± 11.8 ^b	39.3 ± 6.35 ^{b*}
C	24h	125	81.4 ± 9.4 ^{a*}	4.8 ± 9.7 ^a	13.8 ± 6.9 ^{a*}

^{a-b-c} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$)

* grupos onde houve diferença estatística no grau de fragmentação, após o período de 24 horas de maturação *in vitro*.

Tabela 4 - Grau de fragmentação internucleossômica do DNA pela técnica de TUNEL nas CC de 3 qualidades morfológicas antes e após o período de 24h de maturação *in vitro*.

Qualidade Morfológica	Tempo de Maturação	Nº de COCs	Nº de CC	% CC TUNEL + %± Erro Padrão	% CC TUNEL +/- COC %± Erro Padrão
COC-A	0h	18	2510	0,38 ±0,03 ^a	0,67± 0,82 ^a
COC-B	0h	18	1940	21,46± 0,45 ^b	20,28± 1,08 ^b
COC-C	0h	18	2224	12,44±0,18 ^c	14,22±0,51 ^c
COC-A	24h	12	1390	2,9± 0,12 ^a	3,3±0,78 ^a
COC-B	24h	12	1169	68, ± 0,84 ^b	66,8±1,13 ^b
CCO-C	24h	12	1579	49,0± 0,55 ^c	63,8± 1,16 ^b

^{a, b, c} Letras diferentes na mesma coluna apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$).

Em relação à presença de fragmentação nuclear é clara a diferença entre o grupo controle e os grupos de qualidade inferior, sendo que enquanto o primeiro apresenta um baixo grau de fragmentação nuclear inicialmente e mantém esta condição após 24 horas de maturação, os demais grupos já apresentam células com fragmentação nuclear no momento da colheita e aumento significativamente na proporção de células afetadas após 24 horas de cultivo.

Outra característica avaliada em nosso laboratório é a quantidade de mRNA (Biase et al., 2008). Sabe-se que o oócito armazena um grande volume de RNA durante a oogenese, para suprir o desenvolvimento embrionário durante os primeiros ciclos celulares até que o embrião ative seu genoma que ocorre, nos bovinos, geralmente com oito células. Para fazer esta análise desenvolvemos um sistema de amplificação global do cDNA derivado do mRNA portador de uma cauda poli A (acDNA), juntamente com a medida de conteúdo de mensagem para o gene constitutivo GAPDH (Biase et al., 2008). Este estudo mostrou claramente uma diferença de aproximadamente 5 vezes a quantidade de mRNA armazenada em oócitos do grupo controle (COC A) e do grupo COC B (figura 2).

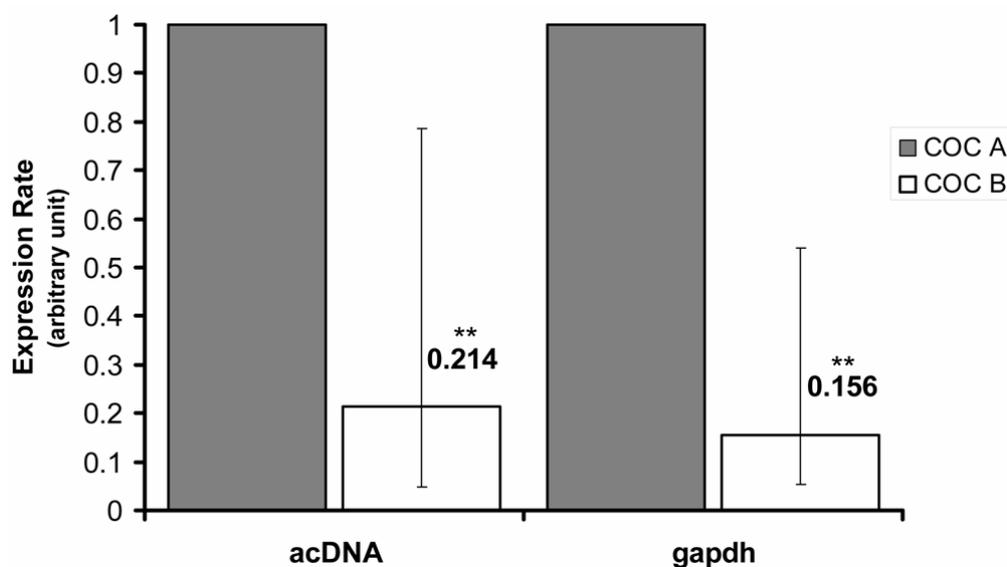


Figura 2. Gráfico mostrando a variação da expressão relativa de mRNAs genéricos medidos pela amplificação global do cDNA poli A e a expressão também relativa do gene GAPDH indicando em ambos os casos uma quantidade aproximadamente cinco vezes maior de RNA nos oócitos derivados de COCs grau A em relação ao Grau B.

Estes dados de variação de qualidade estão de acordo com a taxa de desenvolvimento a blastocisto após a ativação partenogenética dos COCs, que resultaram em maiores taxas em oócitos derivados de COCs do grupo A (Tabela 6). Na mesma tabela, baseado na taxa de eclosão, há um indicativo de que os blastocistos produzidos pelos COCs A são também de melhor qualidade.

Tabela 6 - Taxa de clivagem, desenvolvimento até blastocisto no dia 7 sobre a taxa de clivagem e sobre o total de oócitos e eclosão no dia 9 após a ativação dos grupos morfológicos COC-A, COC-B e COC-C.

Grupos	Nº de Oócitos (n)	Clivagem	Blastocisto (oócitos)	Blastocisto (8 células)	Eclosão
		% ± Erro Padrão			
COC-A	205	70,7 ± 0,74 ^a	20,6 ± 0,42 ^a	41,1 ± 0,76 ^a	82,3 ± 0,86 ^a
COC-B	205	50,0 ± 0,71 ^b	12,9 ± 0,38 ^b	30,5 ± 0,89 ^a	70,0 ± 1,09 ^b
COC-C	205	57,3 ± 0,66 ^b	15,3 ± 0,14 ^b	32,6 ± 0,79 ^a	74,9 ± 1,40 ^b

^{a-b} Letras diferentes na mesma coluna mostram diferenças significativas ($P < 0,05$)

Obviamente que estes resultados indicam uma vantagem para os COCs de qualidade A, todavia do ponto de vista prático não se espera que um COC de qualidade inferior seja desprezado. Principalmente porque eles resultam em blastocistos e também em gestações.

Entretanto há de se considerar algo importante: Se pretendemos trabalhar com criopreservação, a exemplo do que é feito na colheita de embriões in vivo, os melhores devem ser destinados para este fim. Sendo assim, na nossa experiência, estão sendo criopreservados embriões das mais variadas origens em relação aos oócitos e esta variação de qualidade não tem sido considerada no momento da seleção dos embriões para criopreservação.

Estados da arte da clonagem e evolução da biotecnologia

Tem-se discutido muito sobre a evolução das biotecnologias da reprodução in vitro, em especial a transferência de núcleo de células somática que completa mais de uma década. A maioria dessas discussões teve início com a publicação do nascimento da ovelha Dolly, o primeiro mamífero derivado de transferência de núcleo de célula somática (TNCS; Wilmut et al., 1997). Muitos outros animais *a posteriori* foram produzidos por diversos laboratórios. A possibilidade de produzir indivíduos idênticos na pecuária remete ao que observamos na agricultura, onde clones são comuns. Frequentemente, em rodovias, atravessamos florestas imensas de clones de *Eucalyptus sp.* Então porque não usar a clonagem para beneficiar a produção animal?

Desde o final da década de 90, muitos laboratórios vêm aplicando com sucesso a TNCS para produzir clones de diferentes espécies (Polejaeva et al., 2000; Pace et al., 2002; Heyman, 2005). Alguns relatos mostram um processo caminhando para uma eficiência satisfatória para aplicação no campo, mas na maioria dos casos, os resultados da TNCS são baixos, com taxas variáveis de gestação e viabilidade reduzida dos animais nascidos. Em nossos trabalhos a eficiência do processo, observando-se as taxas de nascimento, fica em torno de 7% para as fêmeas e 12% para os machos (Bertolini e Anderson 2002; Batchelder et al., 2007a, 2007b; Miglino et al., 2007; Panarace et al., 2007). Além disso, há maior mortalidade neonatal entre as fêmeas, o que resulta em aproximadamente o dobro de eficiência da clonagem de machos em relação à clonagem de fêmeas.

As gestações desses animais são problemáticas, com freqüente presença de distúrbios placentários responsáveis por elevadas perdas neste período (Wrenzycki e Niemann, 2003; Wrenzycki et al., 2004;

Lucifero et al., 2006). Apesar disso, animais clonados estão sendo gerados aos milhares, e grande parte com desenvolvimento saudável.

A evolução dessa ciência é, todavia, de difícil estimativa e, a qualquer momento, dentro dos próximos dez a vinte anos, podemos estar vivenciando uma explosão da clonagem comercial. Um primeiro sinal deste interesse é a recente divulgação de um relatório pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA, afirmando, com base numa série de estudos, que não há risco à saúde humana associado ao consumo de produtos derivados (carne e leite) de clones bovinos, quando comparado à animais não clonados (Takahashi e Ito, 2004; Tomé et al., 2004; Tian et al., 2005; Heyman et al., 2007; Rudenko e Matheson, 2007). Estudos na espécie suína têm apontado os mesmos resultados (Walker et al., 2007).

Do ponto de vista genético, um clone é uma cópia genética nuclear. Fatores reprogramadores presentes no citoplasma do oócito, ainda não completamente conhecidos, são capazes de modificar o núcleo somático, tornando-o capaz de garantir o desenvolvimento embrionário e gerar um animal a termo (Campbell et al., 1996; Wimut et al., 1997). Os embriões reconstituídos no processo de clonagem herdaram componentes do oócito receptor que contribuem, de modo majoritário ou total, com a herança citoplasmática, incluindo o DNA mitocondrial (mtDNA) (Steinborn et al., 1998a, 1998b, 2000, 2002; Evans et al., 1999; Hiendleder et al., 1999, 2003; Takeda et al., 1999, 2003; Meirelles et al., 2001). Sendo assim, é importante ressaltar que clones são cópias genéticas nucleares, com possíveis variações epigenéticas, citoplasmáticas e fenotípicas (revisado por Smith e Murphy, 2004). Tais variações fenotípicas decorrentes da clonagem podem ser explicadas levando-se em conta os efeitos do ambiente, das receptoras, e os mecanismos epigenéticos.

Atualmente, várias empresas já produziram e entregaram animais clonados saudáveis à seus clientes. A iniciativa privada tem produzido, com variável taxa de sucesso, clones de bovinos, ovinos, caprinos, suínos, eqüinos, caninos, felinos, e mesmo de animais silvestres. A crescente necessidade de tornar a clonagem mais eficiente tem estimulado empresas do ramo a alocarem recursos financeiros e mão-de-obra qualificada na busca por aprimoramentos ou inovações no processo de clonagem. Embora se saiba que experimentos científicos importantes e avanços consistentes tenham sido gerados, a difusão desse conhecimento é limitada pelos interesses comerciais e pela competitividade inerente a esse mercado.

Certamente, a bovinocultura responde pela maioria dos clones produzidos comercialmente. É difícil estimar o número total de animais produzidos para fins comerciais; todavia, uma estimativa de 2005 indicava 1500 animais nascidos, no mundo, até então (Heyman, 2005).

No que diz respeito aos animais de produção, os alvos para clonagem são animais superiores para alguma característica fenotípica específica, de alto valor comercial, de alto valor afetivo ou de alto mérito genético. Do ponto de vista de produção animal, o processo de clonagem só é justificado se os animais forem geneticamente superiores em algumas características para as quais foram selecionados (Van Vleck, 1998). Touros com alta diferença esperada de progênie (DEP) e suas mães são bons exemplos de como a clonagem pode acelerar o ganho genético. No entanto, cabe lembrar que no sistema comercial, o proprietário é quem decide o animal a ser clonado nem sempre baseando sua decisão em mérito genético. A título de exemplo, dos clones produzidos no mundo até o momento, cerca de 100 são animais com boa performance em rodeio, e não há evidências de que o comportamento na arena seja mantido nos clones.

A clonagem favoreceu a multiplicação de animais famosos (vivos e mortos), de animais que foram castrados para prática de esportes (especialmente eqüinos) e finalmente de animais com demanda de gametas maior do que a produção.

No Brasil, aproximadamente 48 animais das raças Nelore, Holandesa, Simental e Junqueira, bem como alguns mestiços foram produzidos por TNCS e estão vivos. Esses clones são oriundos de 11 animais (mais de uma cópia por animal clonado) e há vários outros prestes a nascer ou em fase inicial de gestação. Dentre os clones nacionais, o animal mais velho tem aproximadamente 5 anos de idade. Esses dados mostram, por um lado a competência da pesquisa e da tecnologia nacional, e por outro, uma pequena contribuição para o ganho genético e melhoramento do nosso rebanho (Meirelles et al., 2006, 2007).

Finalmente, a aplicação da clonagem está atualmente restrita a rebanhos de elite e a animais com características especiais. De nenhuma maneira a técnica poderia ser aplicada em rebanhos comerciais, salvo se modificações importantes no processo melhorassem a eficiência da técnica. Sendo assim, para a produção animal, a clonagem de reprodutores é, atualmente, sua única aplicação comercialmente viável.

Apesar disto uma clonagem animal em larga escala começa a ser pensada baseada em perspectivas de automatização e evolução das técnicas de clonagem animal.

A figura 1 sugere uma possível aplicação da clonagem nos próximos anos.

Conclusões e perspectivas

Como mencionado, a aplicação da clonagem final na produção animal é uma grande oportunidade para o futuro, no entanto, até o momento somente poucos reprodutores foram clonados. Os animais clonados, embora tenham contribuído pouco para o melhoramento genético, favoreceram o estudo de alterações nas gestações e no desenvolvimento, incluindo aspectos da genética citoplasmática, epigenética, placentação, obstetrícia, e na neonatologia de clones. Espera-se que uma contribuição à produção animal ocorra quando a clonagem final em larga escala se tornar possível.

No futuro, a clonagem será certamente acompanhada da produção de animais transgênicos, e proteínas recombinantes (lactoferrina, fator IX, por exemplo) serão produzidas no leite desses animais, contribuindo para aumentar a produção e diminuir o custo quando comparado a outros métodos de produção/purificação de proteínas. A modificação dos indivíduos também poderá permitir a produção de animais para xenotransplantes.

Sendo assim, no futuro, as biotecnologias da reprodução e do DNA recombinante como a inseminação artificial (IA), transferência de embrião (TE), FIV, TNCS, transgênese, além do melhoramento assistido por marcadores, serão utilizadas em conjunto para produção, seleção e multiplicação de animais mais produtivos. Os animais selecionados serão multiplicados por clonagem final, modificados ou não por recombinação, e depois de avaliados, distribuídos aos produtores. Os últimos poderão produzir animais em sistema de manejo definido, à semelhança de outras criações com linhagens genéticas homogêneas, e vender seus produtos para empresas especializadas de alimento ou da cadeia farmacêutica.

Agradecimentos

À FAPESP pelo auxílio financeiro, e a CAPES e ao CNPq pelo auxílio recebido para manutenção dos bolsistas.

Referências Bibliográficas

Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Petkov SG, Famula TR, Angelos J, George LW, Anderson GB. Perinatal physiology in cloned and normal calves: physical and clinical characteristics. *Cloning Stem Cells*, v.9, p.63-82, 2007a.

Batchelder CA, Bertolini M, Mason JB, Moyer AL, Hoffert KA, Petkov SG, Famula TR, Angelos J, George LW, Anderson GB. Perinatal physiology in cloned and normal calves: hematologic and biochemical profiles. *Cloning Stem Cells*, v.9, p.83-96, 2007b.

Bertolini M, Anderson GB. The placenta as a contributor to production of large calves. *Theriogenology*, v.57, n.1, p.181-187, 2002.

Biase, Fernando H. ; Merighe, Giovana Krempel Fonseca ; Biase, Weruska Karyna F S ; Martelli, L ; Meirelles, F. V. Global poly(A) mRNA expression profile measured in individual bovine oocytes and cleavage embryos. *Zygote (Cambridge)*, v. 16, p. 28-38, 2008.

Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, v.,380, n.6569, p.64-66, 1996.

Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, Kane JJ, Jerry J, Blackwell C, Ponce de Leon FA, Robl JM. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol.*,v.16, p.642-646, 1998.

Evans MJ, Gurer C, Loike JD, Wilmut I, Schnieke AE, Schon EA. Mitochondrial DNA genotypes in nuclear transfer-derived cloned sheep. *Nat Genet.*, v.23, p.90-93, 1999.

Heyman Y, Chavatte-Palmer P, Berthelot V, Fromentin G, Hocquette JF, Martignat L, Renard JP. Assessing the quality of products from cloned cattle: an integrative approach. *Theriogenology*, v.67, p.134-141, 2007.

Heyman Y, Richard C, Rodriguez-Martinez H, Lazzari G, Chavatte-Palmer P, Vignon X, Galli C. Zootechnical performance of cloned cattle and offspring: preliminary results. *Cloning Stem Cells*, v.6, n.2, p.111-120, 2004.

Heyman Y. Nuclear transfer: a new tool for reproductive biotechnology in cattle. *Reprod Nutr Dev.*, v.45, p.353-361, 2005.

Hiendleder S, Schmutz SM, Erhardt G, Green RD, Plante Y. Transmitochondrial differences and varying levels of heteroplasmy in nuclear transfer cloned cattle. *Mol Reprod Dev.*, v.54, p.24-31, 1999.

Hiendleder S, Zakhartchenko V, Wenigerkind H, Reichenbach HD, Bruggerhoff K, Prella K, Brem G, Stojkovic M, Wolf E. Heteroplasmy in bovine fetuses produced by intra- and inter-subspecific somatic cell nuclear transfer: neutral segregation of nuclear donor mitochondrial DNA in various tissues and evidence for recipient cow mitochondria in fetal blood. *Biol Reprod.*, v.68, p.159-166, 2003.

Keefer CL, Keyston R, Lazaris A, Bhatia B, Begin I, Bilodeau AS, Zhou FJ, Kafidi N, Wang B, Baldassarre H, Karatzas CN. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. *Biol Reprod.*, v.66, p.199-203, 2002.

Lucifero D, Suzuki J, Bordignon V, Martel J, Vigneault C, Therrien J, Filion F, Smith LC, Trasler JM. Bovine SNRPN methylation imprint in oocytes and day 17 in vitro-produced and somatic cell nuclear transfer embryos. *Biol Reprod.*, v.75, p.531-538, 2006.

Meirelles FV, Providelo FD, Merighe GFK, Miranda M, Traldi A, Birgel E, Valim JR, Watanabe YF. Desafios para clonagem comercial – planejando o futuro. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, p.235-242, 2006. Suppl.1

Meirelles FDP, Costa EJX, Ferraz JBS. Modelo Computacional de um rebanho virtual utilizando simulação Monte Carlo. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Campo Grande. 41ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2004.

Meirelles FV, Bordignon V, Watanabe Y, Watanabe M, Dayan A, Lobo RB, Garcia JM, Smith LC. Complete replacement of the mitochondrial genotype in a *Bos indicus* calf reconstructed by nuclear transfer to a *Bos taurus* oocyte. *Genetics*, v.158, p.351-356, 2001.

Meirelles, F. V. ; Providelo, Flávia Devechio ; Percin, F ; Merighe, G. K. F. ; Ferreira, Christina Ramires ; Ferraz, J. B. S. ; Eler, J. P. ; Miranda, M S ; Chiaratti, M R ; DeBem, Tiago Henrique Câmara. Transferência de núcleo: potenciais aplicações no controle genético nuclear e citoplasmático. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 382-390, 2007.

Miglino MA, Pereira FTV, Visintin JA, Garcia JM, Meirelles FV, Rumpf R, Ambrósio CE, Papa PC, Santos TC, Carvalho AF, Leiser R, Carter AM. Placentation in cloned cattle: structure and, microvascular architecture. *Theriogenology*, in press, 2007.

Pace MM, Augenstein ML, Betthausen JM, Childs LA, Eilertsen KJ, Enos JM, Forsberg EJ, Golueke PJ, Graber DF, Kemper JC, Koppang RW, Lange G, Lesmeister TL, Mallon KS, Mell GD, Misica PM, Pfister-Genskow M, Strelchenko NS, Voelker GR, Watt SR, Bishop MD. Ontogeny of cloned cattle to lactation. *Biol Reprod.*, v.67, p.334-339, 2002.

Panarace M, Aguero JI, Garrote M, Jauregui G, Segovia A, Cane L, Gutierrez J, Marfil M, Rigali F, Pugliese M, Young S, Lagioia J, Garnil C, Forte Pontes JE, Ereno Junio JC, Mower S, Medina M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. *Theriogenology*, v.67, p.142-151, 2007.

Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A, Campbell KH. Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature*, v.407, p.86-90, 2000.

Smith LC, Murphy BD. Genetic and epigenetic aspects of cloning and potential effects on offspring of cloned mammals. *Cloning Stem Cells*, v.6, n.2, p.126-132, 2004.

Steinborn R, Schinogl P, Wells DN, Bergthaler A, Muller M, Brem G. Coexistence of *Bos taurus* and *B. indicus* mitochondrial DNAs in nuclear transfer-derived somatic cattle clones. *Genetics*, v.162, p.823-829, 2002.

Steinborn R, Schinogl P, Zakhartchenko V, Achmann R, Schernthaner W, Stojkovic M, Wolf E, Muller M, Brem G. Mitochondrial DNA heteroplasmy in cloned cattle produced by fetal and adult cell cloning. *Nat Genet.*, v.25, p.255-257, 2000.

Steinborn R, Zakhartchenko V, Jelyazkov J, Klein D, Wolf E, Muller M, Brem G. Composition of parental mitochondrial DNA in cloned bovine embryos. *FEBS Lett.*, v.426, p.352-356, 1998a.

Steinborn R, Zakhartchenko V, Wolf E, Muller M, Brem G. Non-balanced mix of mitochondrial DNA in cloned cattle produced by cytoplasm-blastomere fusion. *FEBS Lett.*, v.426, p.357-61, 1998b.

Takahashi S, Ito Y. Evaluation of meat products from cloned cattle: biological and biochemical properties. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.165-171, 2004.

Takeda K, Akagi S, Kaneyama K, Kojima T, Takahashi S, Imai H, Yamanaka M, Onishi A, Hanada H. Proliferation of donor mitochondrial DNA in nuclear transfer calves (*Bos taurus*) derived from cumulus cells. *Mol Reprod Dev.*, v.64, p.429-437, 2003.

Takeda K, Takahashi S, Onishi A, Goto Y, Miyazawa A, Imai H. Dominant distribution of mitochondrial DNA from recipient oocytes in bovine embryos and offspring after nuclear transfer. *J Reprod Fertil.*, v.116, p.253-259, 1999.

Tamassia M, Heyman Y, Lavergne Y, Richard C, Gelin V, Renard JP, Chastant-Maillard S. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development in vitro. *Reproduction*, v.126, p.629-637, 2003.

Tamassia M, Nuttinck F, May-Panloup P, Reynier P, Heyman Y, Charpigny G, Stojkovic M, Hiendleder S, Renard JP, Chastant-Maillard S. In vitro embryo production efficiency in cattle and its association with oocyte adenosine triphosphate content, quantity of mitochondrial DNA, and mitochondrial DNA haplogroup. *Biol Reprod.*, v.71, p.697-704, 2004.

Tian XC, Kubota C, Sakashita K, Izaike Y, Okano R, Tabara N, Curchoe C, Jacob L, Zhang Y, Smith S, Bormann C, Xu J, Sato M, Andrew S, Yang X. Meat and milk composition of bovine clones. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*, v.102, p.6261-6266, 2005.

Tomé D, Dubarry M, Fromentin G. Nutritional value of milk and meat products derived from cloning. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.172-177, 2004.

Van Vleck LD. Implications of cloning for breed improvement strategies. Are traditional methods of animal improvement obsolete? *J. Dairy Sci.*, v.77, p.111-121, 1998.

Walker SC, Christenson RK, Ruiz RP, Reeves DE, Pratt SL, Arenivas F, Williams NE, Bruner BL, Polejaeva IA. Comparison of meat composition from offspring of cloned and conventionally produced boars. *Theriogenology*, v.67, p.178-184, 2007.

Wells DN, Forsyth JT, McMillan V, Oback B. The health of somatic cell cloned cattle and their offspring. *Cloning Stem Cells*, v.6, p.101-110, 2004.

Wells DN. Animal cloning: problems and prospects. *Rev Sci Tech.*, v.24, n.1, p.251-264, 2005.

Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.

Woods GL, White KL, Vanderwall DK, Li GP, Aston KI, Bunch TD, Meerdo LN, Pate BJ. A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer. *Science*, v.301, p.1063, 2003.

Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Lemme E, Korsawe K, Niemann H. Gene expression patterns in in vitro-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome? *Anim Reprod Sci.*, v.82-83, p.593-603, 2004.

Wrenzycki C, Niemann H. Epigenetic reprogramming in early embryonic development: effects of in-vitro production and somatic nuclear transfer. *Reprod Biomed Online*, v.7, p.649-656, 2003.

PATROCÍNIO



APOIO



A informação contida nesse material é de responsabilidade dos autores.