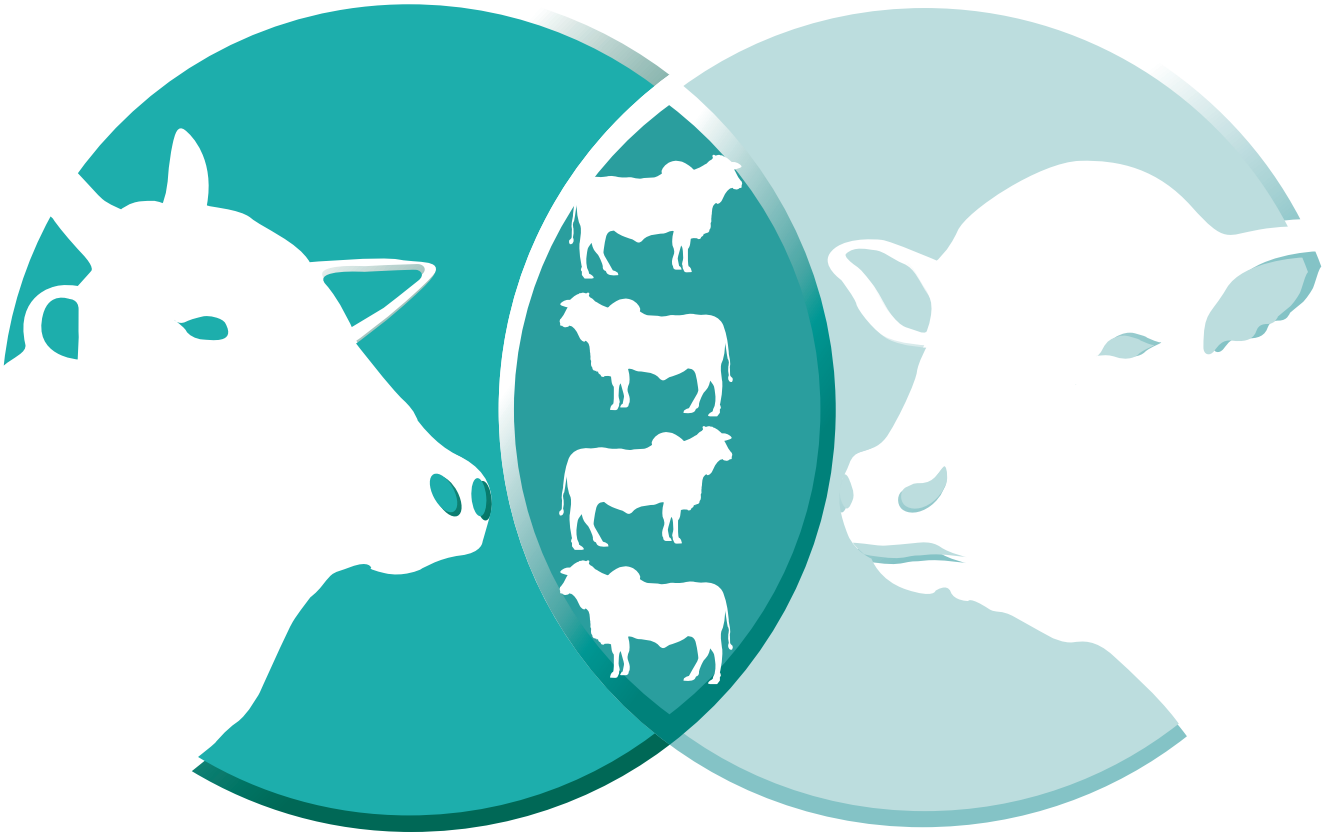


4º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

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

COORDENAÇÃO CIENTÍFICA

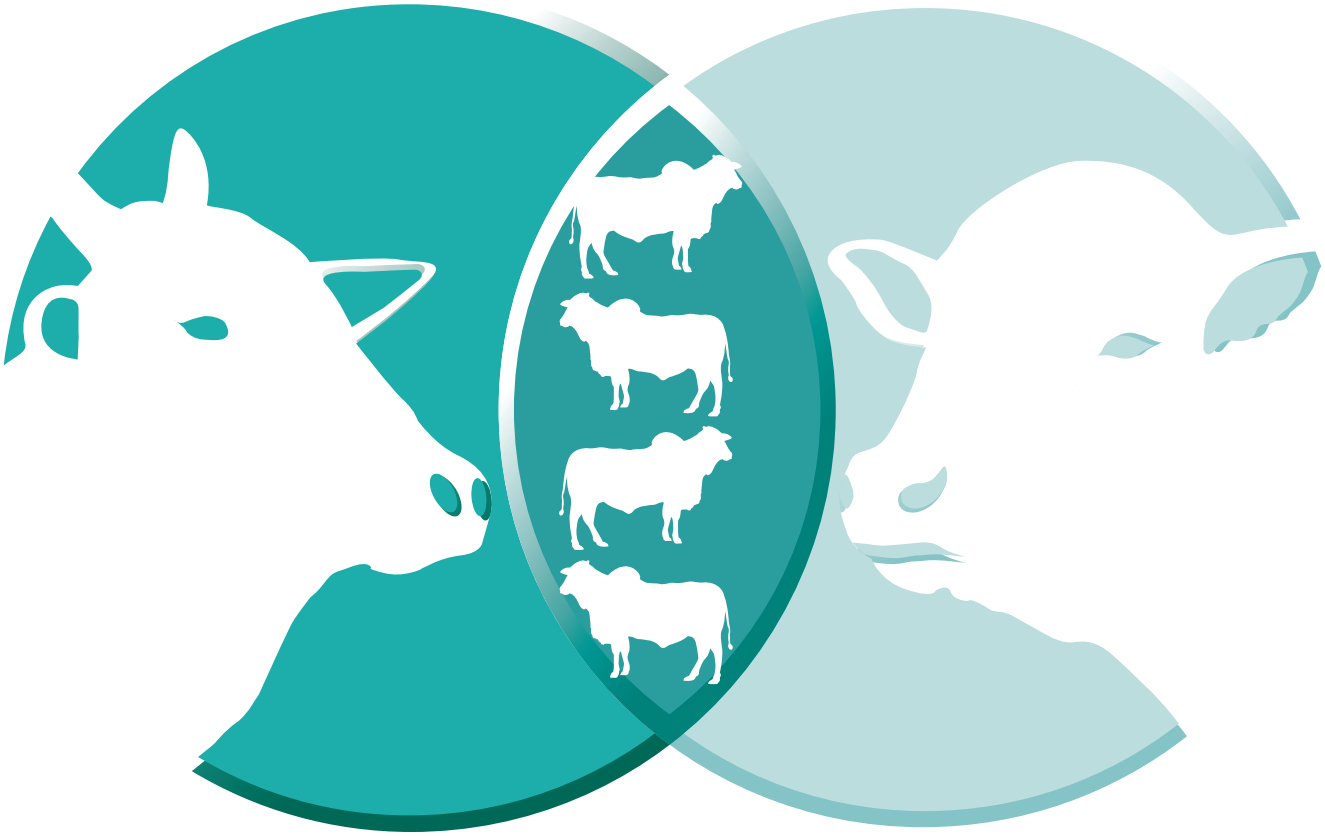
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli - USP
Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda - UEL

ORGANIZAÇÃO

Geraembryo
Reprodução Bovina

PATROCÍNIO

Intervet
Schering-Plough Animal Health



4° Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

Dias 23, 24 e 25 de setembro de 2010

Hotel Sumatra - Londrina/PR

COORDENAÇÃO CIENTÍFICA

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

ORGANIZAÇÃO

Geraembryo
Reprodução Bovina

PATROCÍNIO

Intervet
Schering-Plough Animal Health

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada (4. : 2010 : 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, 2010.
209 p.

Tema do Simpósio: Os melhores pesquisadores nacionais e internacionais gerando soluções para a pecuária brasileira, realizado nos dias 23 a 25 de setembro de 2010, Londrina/PR.

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

4º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

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

Local
Hotel Sumatra - Londrina/PR

Período
23 a 25 de setembro de 2010

Organização
Geraembryo

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

Palestrantes

Dr. Nelson Pineda - Pecuarista e Membro da Câmara Setorial da Carne - BA
pineda@terra.com.br

Prof. Dr. Francisco Vila - Consultor Internacional da Sociedade Rural Brasileira
prismapec@gmail.com

Prof. Dr. Lino N. Rodrigues Filho - FEA - USP e Presidente da ASBIA
lino.rodriguesfilho@gmail.com

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda - UEL - Londrina
mseneda@uel.br

Prof. Dr. Gabriel A. Bó - Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC) - Argentina
gabrielbo@iracbiogen.com.ar

Prof. Dr. Patrick Lonergan - School of Agriculture Food Science & Veterinary Medicine - University College Dublin - Irlanda
pat.lonergan@ucd.ie

Prof. Dr. Roberto Sartori Filho - ESALq - USP
sartori@esalq.usp.br

Prof. Dr. Flávio Canellas Canavez - Genoa Biotecnologia S. A. - São Paulo
fccanavez@genoabiotec.com.br

Prof. Sr. Guilherme de Paula Nogueira - UNESP - Araçatuba
gpn@fmva.unesp.br

M.V. Manuel Francisco de Sá Filho - USP - São Paulo
manoelsa@usp.br

Prof. Dr. Joseph C. Dalton - University of Idaho - EUA
jdalton@uidaho.edu

M. V. José Nélio de Souza Sales - USP - São Paulo
znlogan@yahoo.com.br

Prof. Dr. Peter Hansen - University of Florida - EUA
pjhansen@ufl.edu

Dr. Carlos Alberto Rodrigues - SAMVET - São Carlos
carlos.samvet@terra.com.br

Dr. Lucas Cutaia - Instituto de Reproducción Animal Cordoba (IRAC) e Syntex - Argentina
lcutaia@syntexar.com

Prof. DR. Pietro S. Baruelli - USP - São Paulo
barusell@usp.br

Prof. Dr. Ciro Moraes Barros - UNESP - Botucatu
cmbarros@ibb.unesp.br

Dr. José Henrique Fortes Pontes - Diretor de produção e pesquisa da In Vitro Brasil - Mogi Mirim
josehenrique@invitrobrasil.com.br

4º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

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

Programação

Dia 23/09/10 - Quinta-feira

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

*09:00 - **Expectativas para a pecuária brasileira a curto, médio e longo prazos***
Dr. Nelson Pineda
Pecuarista e Membro da Câmara Setorial da Carne - BA

*10:00 - **Sustentabilidade econômica e ambiental da pecuária***
Prof. Dr. Francisco Vila
Consultor Internacional da Sociedade Rural Brasileira

Intervalo - Coffee Break

*11:20 - **O mercado da reprodução animal***
Prof. Dr. Lino N. Rodrigues Filho
FEA - USP e Presidente da ASBIA

12:20 - Almoço

*14:00 - **Fisiologia do crescimento folicular em bovinos***
Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda - UEL - Londrina

*15:00 - **O estado da arte das técnicas de sincronização da ovulação para o emprego de biotecnologias da reprodução***
Prof. Dr. Gabriel A. Bó
Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC) - Argentina

Intervalo - Coffee Break

*16:20 - **Efeitos da progesterona no desenvolvimento embrionário e na manutenção da gestação***
Prof. Dr. Patrick Lonergan
School of Agriculture Food Science & Veterinary Medicine - University College Dublin - Irlanda

*17:20 - **Interrelações entre nutrição e reprodução: fatores que influenciam a qualidade embrionária***
Prof. Dr. Roberto Sartori Filho - ESALq - USP

*20:00 - **Evento Intervet/Schering-Plough Animal Health***

Dia 24/09/10 - Sexta-feira

*08:00 - **Emprego de marcadores moleculares para seleção de reprodutores***
Prof. Dr. Flávio Canellas Canavez
Genoa Biotecnologia S.A. - São Paulo

*09:00 - **Fisiologia da puberdade em novilhas taurinas e zebuínas***
Prof. Sr. Guilherme de Paula Nogueira
UNESP - Araçatuba

Intervalo - Coffee Break

*10:20 - **Técnicas para indução de ciclicidade para IATF em novilhas zebuínas***
M.V. Manuel Francisco de Sá Filho
USP - São Paulo

*11:20 - **Técnicas de avaliação do sêmen e suas correlações com a fertilidade no campo***
Prof. Dr. Joseph C. Dalton
University of Idaho - EUA

12:00 - Almoço

*14:00 - **A história, a evolução e os resultados práticos do emprego do sêmen sexado***
Prof. Dr. Joseph C. Dalton
University of Idaho - EUA

*15:00 - **Resultados aplicados do uso de sêmen sexado em programas de inseminação artificial e de transferência de embriões***
M.V. José Nélio de Souza Sales
USP - São Paulo

Intervalo - Coffee Break

16:20 - Estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva de vacas de leite no verão
Prof. Dr. Peter Hansen
University of Florida - EUA

*17:20 - **Aplicação prática das técnicas de reprodução em vacas de leite***
Dr. Carlos Alberto Rodrigues
SAMVET - São Carlos

Dia 25/09/10 - Sábado

*08:00 - **Tratamentos para diminuir a mortalidade embriónaria em vacas de leite e de corte***
Dr. Lucas Cutaia
Instituto de Reproducción Animal Cordoba (IRAC) e Syntex - Argentina

*09:00 - **Atualização dos protocolos de IATF e TETF***
Prof. DR. Pietro S. Baruelli
USP - São Paulo

Intervalo - Coffee Break

*10:20 - **Técnicas de sincronização para superovulação de doadores Bos taurus e Bos indicus***
Prof. Dr. Ciro Moraes Barros
UNESP - Botucatu

*11:20 - **Novas alternativas para aplicação em larga escala de embriões produzidos in vitro***
Dr. José Henrique Fortes Pontes
Diretor de produção e pesquisa da In Vitro Brasil - Mogi Mirim

Sumário

1. SUSTENTABILIDADE ECONÔMICA E AMBIENTAL DA PECUÁRIA 1
Francisco Vila

2. FISIOLOGIA DO CRESCIMENTO FOLICULAR EM BOVINOS 14
Marcelo Marcondes Seneda

3. ESTADO DEL ARTE DE LAS TECNICAS DE CONTROL DE DESARROLLO FOLICULAR Y LA OVULACION PARA EL EMPLEO DE LAS BIOTEC. 23
Gabriel A. Bó

4. EFFECT OF PROGESTERONE ON EMBRYO DEVELOPMENT AND PREGNANCY MAINTENANCE IN CATTLE 49
Patrick Lonergan

5. FATORES NUTRICIONAIS QUE INFLUENCIAM A QUALIDADE EMBRIONÁRIA EM BOVINOS 56
Roberto Sartori

6. FISIOLOGIA DA PUBERDADE EM NOVILHAS TAURINAS E ZEBUÍNAS 68
Guilherme de Paula Nogueira

7. INDUÇÃO DE CICLICIDADE E IATF EM NOVILHAS ZEBUINAS 79
Manoel F. Sá Filho

8. SEMEN EVALUATION AND FERTILITY IN THE FIELD 101
Joseph C. Dalton

9. HISTORY, EVOLUTION AND PRACTICAL RESULTS OF THE USE OF SEXED SEMEN 117
Joseph C. Dalton

10. SÊMEN SEXADO EM PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES 129
José Nélio S. Sales

11. APLICAÇÃO PRÁTICA DAS TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO EM VACAS DE LEITE 143
Carlos Alberto Rodrigues

12. NUEVOS TRATAMIENTOS PARA DISMINUIR LA MORTALIDAD EMBRIONARIA EN VACAS DE CARNE Y LECHE 157
Lucas E. Cutaia

13. ATUALIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE IATF E TETF 166
Pietro Sampaio Baruselli

14. TÉCNICAS DE SINCRONIZAÇÃO PARA SUPEROVULAÇÃO DE DOADORAS BOS TAURUS E BOS INDICUS 186
Ciro Moraes Barros

15. NOVAS ALTERNATIVAS PARA A APLICAÇÃO EM LARGA ESCALA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS IN VITRO 204
José Henrique Fortes Pontes

SUSTENTABILIDADE ECONÔNMICA E AMBIENTAL DA PECUÁRIA

Uma abordagem sistêmica

Francisco Vila - Economista

O CONCEITO

CONTEXTO

A questão da Sustentabilidade passou a ocupar um espaço importante na vida cotidiana. A sociedade pós-moderna orienta-se em grandes metáforas como "globalização", "direitos humanos", "avanço tecnológico", etc. que são citadas em milhões de mensagens diárias, seja em comunicações da imprensa, seja nas redes sociais. Não se trata, portanto, de um modismo passageiro, mas sim um dos fundamentos da arquitetura de sobrevivência da espécie humana e da Terra como um todo.

Numa comunidade global que, num só dia, produz mais informações do que no total dos últimos 20 séculos acumulados, a compreensão dos grandes temas da humanidade não se tornou mais fácil, antes pelo contrário. A ampliação geométrica do conhecimento combinada com a aceleração do tempo induzem a formulações simplistas da realidade complexa que o cérebro humano não consegue mais enxergar em suas múltiplas dimensões.

Como resultado dessa simplificação construiu-se na questão da sustentabilidade um conflito artificial entre "humano" e "natureza". Porém, não se trata de dois fenômenos estanques e, por conseqüência, situações que hoje podem parecer incompatíveis podem amanhã encontrar o equilíbrio dinâmico se o eixo do tempo for introduzido no julgamento dos fatos. Nem a natureza, nem os humanos, seguem um traçado linear de desenvolvimento. Com ritmos distintos alcançam patamares qualitativos e quantitativos mais altos de forma dessincronizada. Isto provoca tensões que podemos comparar às "dores de crescimento" dos adolescentes.

Além dessa dualidade entre os interesses do presente e do futuro, a sustentabilidade depara-se com outros interesses contraditórios, fazendo com que devamos avaliar os patamares abaixo separadamente e, a seguir, de forma integrada. Trata-se de

- Conflito de interesses entre o presente e o futuro
- Conflito entre interesses econômicos, ambientais e sociais
- Diferenciação geográfica na intensidade desses interesses e potencialidades

Todos esses fatores e interesses encontram-se em evolução qualitativa e quantitativa contínuas. Desta forma, a configuração complexa e dinâmica da sustentabilidade obriga-nos a analisar sua natureza sistêmica e, antes de tudo, seu histórico ao longo da evolução humana.

HISTÓRICO

Ao contrário da opinião generalizada, a preocupação com a sustentabilidade do sistema de vida na terra é quase tão antiga quanto a própria espécie humana. Na Genesis 1, versículo 28 do Antigo Testamento encontramos a súmula do entendimento

das culturas da época sobre a ordem da natureza. O postulado "O homem deve dominar sobre todas as criaturas de Deus" representa uma indicação clara de que os humanos entenderam que, além do Criador, o homem deveria exercer um papel de domínio sobre a natureza.
Grandes obras de regularização de rios no Egito dos faraós, sistemas sofisticados de rotação de culturas na Ásia antiga, modelos avançados de cooperativas na Noruega do século IX, a obrigação de intercalar culturas de 2 em 2 anos e deixar a terra descansar no 3º que foi seguida com rigor durante muito tempo na Idade Média, a estratégia da plantação do Pinhal de Leiria pelo rei Afonso III no século XIII e, finalmente, o início da sustentabilidade organizada através do livro do engenheiro florestal alemão Hans Carl von Carlowitz, publicado em 1713, que ordenou o uso econômico e preservacionista das florestas plantadas na Europa central, mostram que a grande maioria dos povos ao longo da história procuraram soluções que asseguraram a sobrevivência das populações crescentes mediante aumento da produtividade agropecuária através de novas técnicas e medidas de preservação.
Verifica-se, assim, que a preocupação com a continuação da vida é um componente tradicional da história do homem e que o renascimento midiático dessa questão possui raízes filosóficas, técnicas e sistêmicas bastante profundas.

DEFINIÇÕES

As cerca de 500 definições da sustentabilidade gravitam em torno da observação da Comissão Brundtland que em 1987 caracterizou a questão como segue: *"O desenvolvimento sustentável serve, ao mesmo tempo, para atender as necessidades da geração presente, sem prejudicar a capacidade de futuras gerações de suprir as suas*". Trata-se, assim, de equilibrar o mundo de hoje com a capacidade de sobrevivência das espécies.
Essa visão sugere a existência de um conflito estrutural entre a oferta e demanda de recursos naturais. Ao postular que os presentes só podem consumir tanto para que sobre o suficiente para futuras gerações, parte-se da suposição de que recursos são finitos e que a demanda cresce mais do que o estoque desses recursos.

EIXO: HISTÓRIA

A história, no entanto, ensina que essa percepção estática não corresponde à realidade. A sustentabilidade não é um 'fato', mas sim um 'estado' e, como tal, uma situação mutável. Isto se deve à elasticidade que se observa tanto na oferta de recursos quanto em qualidade, perfil e quantidade da demanda.
As reservas de petróleo hoje conhecidas contradizem as previsões do Club of Rome que, em 1968, prognosticou o esgotamento de todas as reservas até o ano de 1990. Entretanto, o mundo consumiu de forma desenfreada energias fósseis e as reservas de petróleo hoje conhecidas são as maiores de todos os tempos. No caso do Brasil podemos lembrar a total dependência de importações na altura do 1º choque de petróleo em 1973, com graves impactos para a economia, enquanto hoje as reservas de petróleo e gás tornam o País uma potência energética em todas as categorias (hídrica, solar, eólica, bio-energia e fóssil).
Verifica-se que a estreita análise de alguns dados ou tendências isoladas não faz jus à complexidade e dinâmica que caracterizam o assunto da sustentabilidade do desenvolvimento. Para a construção de teorias sólidas que possam ser debatidas pela

sociedade e fundamentar políticas públicas, é necessário integrar as seguintes mega-tendências:

- análise histórica da gestão da limitação dos recursos naturais;
- reflexão sobre a direção e o ritmo do progresso tecnológico; e
- antecipação do pensamento coletivo da população mundial e prováveis mudanças de comportamento cultural (consciência coletiva).

Primeiro convém analisar a elasticidade dos recursos em função das suas reservas reais conhecidas e de sua potencialização em função de novas tecnologias. Um exemplo marcante é o salto quantitativo da humanidade em função da invenção do fertilizante.
No início do século XVIII o cientista Thomas Malthus decretou que a Terra não teria mais condições de alimentar o número crescente de humanos e que parcelas crescentes das populações passariam a morrer de fome. Na altura, o planeta era ocupado por 1 bilhão de pessoas, dos quais 80% subnutridas. Um rigoroso controle de natalidade, com questionável viés elitista e racista, foi evitado pelo progresso da invenção de Justus Liebig que, em 1850, introduziu o adubo.

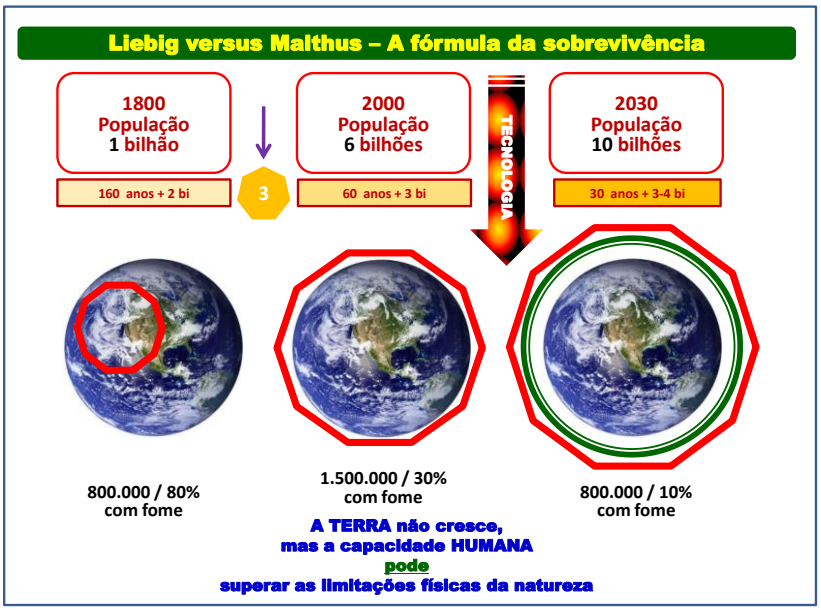


Figura 1. Etapas de superação das limitações naturais pelo homem. **Fonte:** autor

Mesmo com esse recurso multiplicador, foram necessários 150 anos até o mundo chegar à população de 2 bilhões em 1950.
O contexto histórico mostra uma tendência muito clara. Em 200 anos a população mundial aumentou de 1 bilhão para 6 bilhões enquanto a proporção dos subnutridos baixou de 80% para 30%, e continua decrescendo, devendo chegar a 10%. Esse índice só não é mais baixo ainda devido à questão da distribuição da comida. Perante essa trajetória notável, os desafios da integração dos aspectos ambientais e sociais na doutrina econômica parecem perfeitamente gerenciáveis.
O cenário simplificado é: temos muito mais humanos, reduzimos drasticamente a proporção dos famintos e ocupamos a mesma terra. A explicação é dupla: a Terra possui mais recursos do que se imaginava e a tecnologia multiplica de forma

geométrica o uso desses recursos. Em alguns casos, recursos escassos passam a ser transformados em recursos infinitos.
Do lado da demanda por recursos temos outro exemplo de sucesso. A estratégia da China, política e humanamente corajosa, de limitar o número de filhos por família a 1 nas cidades e a 2 no campo, diminuiu, em apenas 3 décadas, o crescimento previsível daquele país no equivalente da população inteira dos EUA. Por outro lado, nos anos 60, a Índia tentou desestimular a fertilidade da população com resultados apenas modestos.
O cenário do estresse sobre os recursos naturais depende de uma enorme variedade de fatores que, conforme impacto isolado ou efeitos de cadeia, pode mudar significativamente o equilíbrio dinâmico da sustentabilidade. No entanto, como regra básica, é importante lembrar que o equilíbrio constrói-se em função de duas variáveis que são a oferta e a demanda. Quase sempre se fala em limitar o uso dos recursos enquanto a outra perspectiva de conter o crescimento da população continua um tabu, com exceção do caso chinês.
Com esse percurso histórico e a previsão de que a produtividade da terra agrícola será novamente dobrada até o ano 2030 e, ainda, contando com uma curva de crescimento populacional em declínio, o nervosismo de futurologias duvidosas deve ser substituído por análises científicas da provável evolução do complexo 'sistema Terra'.
A visão das escritas bíblicas relativamente ao domínio do homem sobre as outras espécies encontra sua comprovação na história da humanidade. Isto não significa que não tenham existido períodos de estresse sistêmico, guerras ou que esses desequilíbrios entre recursos e demanda não possa representar um perigo constante à vida na Terra no futuro. No entanto, o histórico e, nomeadamente, a curva do progresso tecnológico sugerem que, mais uma vez, o ser humano conseguirá gerenciar os destinos do seu habitat Terra.

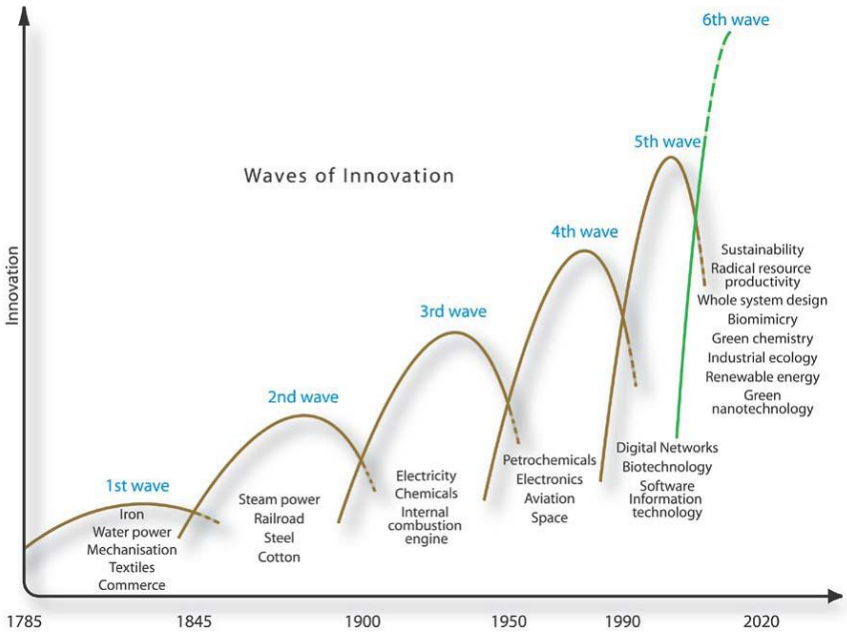


Figura 2. Ondas de inovação tecnológica.
Fonte: Hargroves, K. e Smith, M (2005) p 17

EIXO: TECNOLOGIA

O progresso tecnológico é o principal recurso infinito para assegurar condições de sobrevivência das espécies na Terra. Enquanto o olhar no retrovisor histórico encoraja os otimistas que acreditam na capacidade de adaptação dos humanos às condições da natureza, a previsão do percurso da evolução tecnológica para as próximas décadas deve tirar as últimas dúvidas sobre esse cenário.
Após a 1º Guerra Mundial ocorreu uma reunião dos principais cientistas internacionais que formulou uma previsão sobre a direção e o ritmo do desenvolvimento tecnológico. A estimativa era de que em 100 anos seria possível dobrar o estoque total do conhecimento que a humanidade tinha acumulado ao longo de alguns milênios. Em reunião semelhante nos anos 50, a previsão para a duplicação do estoque de conhecimento já baixou de 100 para 50 anos, sendo corrigida mais uma vez após surgimento do computador e da internet para algo em torno de 10 anos. Ou seja, na passagem do século já se tinha quadruplicado o conhecimento que o mundo possuía na altura da 1ª Guerra.
Com as ferramentas da inteligência artificial e a combinação de nano e biotecnologia, a comunidade científica conta com a seguinte aceleração da produção tecnológica: em 2020 todo o conhecimento humano será dobrado cada 90 dias!
Para entender bem os desafios e o potencial de soluções para o complexo fenômeno da sustentabilidade (da vida na Terra), os olhares para o passado e para o futuro reforçam a convicção de que a humanidade terá capacidade para abastecer atuais e futuras gerações com o estoque limitado dos recursos naturais através do melhor uso dessas riquezas. Mais pessoas terão acesso a mais bens de consumo, sem colocar em risco o equilíbrio entre as espécies. Mesmo com esta perspectiva construtiva devemos continuar a cuidar da melhor forma possível dos recursos, evitar desperdícios e focar na maior racionalidade do uso da terra e da água.

A PECUÁRIA NO CONTEXTO DA SUSTENTABILIDADE

No domínio da pecuária a sustentabilidade ganhou notoriedade devido principalmente a 3 fatores. A carne bovina é um alimento importante cobiçado por novas classes sociais que estão chegando ao mercado de consumo. Outro ponto é seu sistema de produção extensivo que faz com que a maior parte da terra economicamente explorada seja pasto e não agricultura. Porém, no novo arranjo flexível de uso múltiplo entre agricultura, pecuária e florestas plantadas, é possível encontrar uma solução para esse peso absoluto do pasto no passivo do uso da terra. E, finalmente, o suposto papel de grande poluidor atrai a atenção da sociedade como um todo. Assim, a pecuária, com um rebanho mundial de 1,5 bilhões de cabeças, ou seja, 1 bovino para cada 5 humanos, é uma questão de relevo simplesmente pela sua magnitude.
A produção bovina combina os fatores terra (pasto), genética (animal), homem (manejo) e tecnologia para produzir proteína animal num ciclo bastante longo quando comparado com suínos (6 meses) ou aves (60 dias). O risco da atividade é bem menor do que na agricultura e o mesmo vale para sua rentabilidade. É dentro desse contexto que precisam ser avaliados os aspectos da sustentabilidade.
O debate sobre o tema peca, por um lado, pela abordagem superficial da mídia e, por outro, pela reduzida amplitude da base e pelo uso excessivo da metodologia ‘ceteris paribus’ (‘tudo, exceto o objeto em estudo, é constante’) na análise científica de causas

e efeitos. Pelo fato de o problema ser complexo e dinâmico a abordagem deve ser abrangente e sistêmica.

Perante esse desafio metodológico, á recomendado avaliar as principais polêmicas ao longo de vários passos:

1. Quais as acusações que pairam sobre a bovinocultura?
2. Quais informações são equivocadas?
3. Quais os argumentos que precisam ser levados a sério?
4. Quais as soluções para contornar os perigos ambientais?
5. Existem práticas confiáveis e experimentadas?
6. Já foram iniciados programas de esclarecimento e de implantação?
7. O que falta para atingir ganhos substanciais na sustentabilidade?

As acusações concentram-se em 3 grandes segmentos: desmatamento e queima, efeitos nocivos do pasto e poluição 'provocada' pelos animais.

Acusação 1: Desmatamento

Conforme relatório AR4 WGI do IPCC de 2007, as emissões de gás carbônico equivalente de origem fóssil representam 82% das emissões anuais, enquanto as emissões causadas pela mudança do uso de terra (principalmente desflorestamento) são de 18%. É importante lembrar essa proporção.
Será que a pecuária é o principal causador do desmatamento? Ultimamente, isto não procede, pois o ciclo de desmatamento costuma começar com o objetivo de explorar madeiras nobres, minérios ou garimpar outros recursos. Depois passa para a produção de carvão vegetal ou de madeira para queima ou construção civil e, somente após esses estágios, a terra desmatada é aproveitada para formar pasto que, depois alguns anos, e conforme localização geográfica, com infra-estruturas adequadas pode ceder lugar à agricultura. Além disso, com o abate acelerado de vacas nos últimos anos, sobra pasto em muitas regiões da fronteira agrícola que pode ser recuperado (para a bovinocultura) ou transformado em florestas plantadas ou agricultura.
A combinação de custo de desmatamento, custo logístico e compromissos do setor com a preservação da floresta em pé (política do "Desmatamento Zero" do governo de MT) tornaram o desmatamento desinteressante para a pecuária. Isto não significa que em casos isolados e, nomeadamente em pequenas propriedades familiares ou de assentados, desconhece-se essa lógica econômica.
A queima do pasto não faz sentido, pois destrói a base orgânica da qual as gramínea se alimenta. São outras culturas que encontram maiores vantagens na queima. No entanto, essa prática está sendo monitorada e sucessivamente multada.

Acusação 2: Pasto é emissor de CO2

O Brasil possui em torno de 200 milhões de hectares de pasto, dos quais metade em estado de degradação. É de lembrar que no bioma amazônico 76% são terras públicas que pertencem ao governo federal.
Pastagens não adequadamente manejadas emitem CO2. No entanto, pasto em condições adequadas para a pecuária rentável seqüestram CO2! Desta forma, é preciso fazer o balanço dos efeitos negativos e positivos relativamente aos GEE (gases de efeito estufa), exercício que nem os organismos internacionais ainda começaram a fazer.

O pasto degradado ou está abandonado ou vai perder seu destino como fonte de alimento para a bovinocultura. Cerca de 50 milhões de hectares estarão disponíveis e em localizações adequadas para uso agrícola. O restante pode ser gradativamente convertido em floresta plantada com efeito ambiental positivo e como fonte para a economia e o emprego local.
Enquanto os Estados Unidos (30%), a Austrália (32%) e a Argentina (26%) apresentam índices de desfrute elevados, o Brasil continua com 22% na taxa de abate. Cálculos do CNA indicam que, caso esse índice nacional passe para patamares internacionais de 30% o País terá que aumentar em 38% seu consumo interno e em 158% a exportação. Com a mesma área de pasto, o mesmo rebanho e introduzindo técnicas mais eficientes de produção, o Brasil produzirá mais carne do que o crescimento previsto da demanda. O raciocínio inverso permite concluir que com menos pasto e um rebanho reduzido é possível crescer os 3% ao, ano que é a previsão da expansão do mercado.
A tendência geral de redução de efeitos sobre o ambiente é favorável, pois entre 1990 e 2008, conforme o CNA, a produtividade do hectare de pasto saltou de 28 para 47 kg/ha/ano. Com a crescente tecnificação da bovinocultura, o uso de terra e água, bem como os estragos ambientais (pisoteio, emissão de metano), tendem a melhorar consideravelmente. As atuais tecnologias de genética e alimentação em sistemas avançados de produção permitem terminar um boi com 500 kg em 18 meses, ou seja, em metade do tempo da pecuária tradicional.
A perspectiva é bastante clara. Por motivos econômicos, e não ambientais, o Brasil passará a produzir mais carne bovina com menos animais e muito menos área de pasto. O excesso de pasto será ocupado em proporção menor pela da agricultura e em grande escala por programas de reflorestamento.

Acusação 3: O boi é grande consumidor de água e emissor de metano

Sem entrar na polêmica sobre o consumo de água, convém lembrar que o boi não é concorrente do consumidor humano, pois os dois se encontram em geografias diferentes. Só se bebe água onde ela existe, e o Brasil possui amplos recursos hídricos. Além disso, dos 80 litros/dia consumidos por um animal, 50 litros voltam diretamente ao solo. O cidadão urbano utiliza diariamente entre 50 e 150 litros de água, dependendo do número de banhos e do sistema de descarga nos vasos sanitários. No caso de São Paulo existe ainda o agravante que 40% da água se perde entre a saída do sistema de abastecimento Cantareira e a torneira do consumidor.
Avanços na genética, na alimentação e no manejo de animais tendem a reduzir a idade de abate de uma crescente parcela do rebanho nacional. Mesmo com suplementos especiais (redutores de CH4) que tendem a diminuir a produção de metano, o efeito negativo da existência dos bovinos continua a existir, no entanto em proporção pequena quando comparado com outras fontes de poluição humana.
Os efeitos ambientais de urina (óxido nitroso) e fezes também são exagerados nos cálculos das agências internacionais. Novamente, é preciso avaliar a totalidade dos impactos de cada elemento e depois construir o cálculo sistêmico do custo/benefício da atividade como um todo.

O PROCESSO DE TRANSFORMAÇÃO PARA UMA PECUÁRIA MAIS EFICIENTE

Mudanças estruturais em qualquer atividade humana passam por uma seqüência de etapas. Para compreender o panorama e o ritmo das melhorias na pecuária a identificação do contexto e do estágio de desenvolvimento é crucial.

O primeiro passo é a conscientização do agente econômico (produtor) para a necessidade de um sistema produtivo (mais) sustentável. Através da relevância que o tema adquiriu na mídia e pela pressão que o consumidor faz através do acerto entre procuradores, cadeias de varejo e frigoríficos, a mensagem chegou de forma muito clara ao pecuarista. O mercado exige um produto que proteja os recursos naturais, que obedeça às regras da sanidade animal e humana e que possa ser rastreado através de sistemas de certificação confiáveis e de amplo uso.
Num segundo passo, o produtor procura capacitação para operar com um sistema produtivo compatível com essas exigências. Para isso ele recorre às informações práticas das empresas de insumos, às pesquisas acadêmicas, aos serviços de consultores técnicos e às associações ou serviços de extensão rural que orientam as mudanças necessárias na propriedade. É natural que o processo de modernização gere tensões não apenas entre os responsáveis pela propriedade, que pode ser familiar ou empresarial, mas também entre os donos e os funcionários, que nem sempre compreendem por que é preciso mudar algo que sempre funcionou bem.
O terceiro passo, após convencimento do tomador de decisão no sentido de incorporar aspectos da sustentabilidade em seu modelo de negócio, é o financiamento dos investimentos necessários para adequar a propriedade às novas normas de produção (Código Florestal, certificação, etc.). Enquanto já é difícil convencer o produtor de mudar suas práticas tradicionais, a vontade de investir na modernização da fazenda normalmente esbarra na baixa rentabilidade da atividade (com fluxo de caixa limitado) e na falta de hábito de trabalhar com crédito na pecuária.
A saída dessa armadilha financeira é mostrar o efeito econômico positivo da aplicação de Boas Práticas Agropecuárias que ao mesmo tempo resultam em maior rentabilidade e sustentabilidade do sistema produtivo.
Enquanto a consciência e as soluções já existem, o foco do setor deve concentrar-se na ampla difusão de técnicas adequadas para cada segmento (empresarial, familiar, assentamentos), sistema de produção (cria, engorda confinamento e extensivo ou tecnificado) e região (clima, raças).
As universidades, associações e indústrias de insumos e de carne, juntamente com as cadeias de varejo e a mídia colocaram os aspectos ambientais no centro da atenção do produtor. Falta aprofundar a avaliação econômica e esclarecer a dimensão social que envolve mais de 5 milhões de brasileiros na atividade da bovinocultura.
A ponderação dos múltiplos aspectos da sustentabilidade aponta de forma muito clara o caminho da solução. Essa passa mais pela atitude do consumidor do que pelo produtor rural. Como nas outras atividades econômicas, o equilíbrio entre o econômico, ambiental e social é resultado de um processo que começa com a viabilidade econômica e tem os outros dois objetivos como conseqüência.

MITO E REALIDADE DA SUSTENTABILIDADE NA PECUÁRIA

Na discussão atual, a pecuária, como um todo, é acusada de ser um dos principais causadores de problemas ambientais e sociais. Para ordenar o diálogo entre o setor produtivo e a sociedade convém esclarecer alguns pontos iniciais.
Existem 1,2 milhões de pecuaristas, dos quais cerca de 1 milhão operam na beira da subsistência. Acrescentando os produtores de leite e calculando 3 pessoas que vivem

na, e da propriedade, chega-se a um número de aproximadamente 5 milhões de pessoas que representam a pecuária bovina no Brasil.

Ao contrário da agricultura, a pecuária não é trabalho intensivo. Ou seja, poucas pessoas cuidam de muitos animais, um dos motivos pelo qual grande parte do pasto está se degradando. Ou seja, a questão social não deve focar no melhor tratamento de funcionários na fazenda (que são poucos), mas sim, num sistema de garantia de preços e de apoio técnico que garanta que os 5 milhões de brasileiros que vivem da atividade não precisem migrar para as zonas urbanas. A faceta social da sustentabilidade da pecuária passa a ser uma política de fomento à pecuária familiar que deve ser reclamada junto ao governo. Nesse contingente de micro-proprietários da pecuária familiar devem ser incluídos milhares de assentados que enfrentam problemas semelhantes de sobrevivência que caracterizam a pecuária tradicional. A maior parte de queimadas é provocada por esses pequenos proprietários que buscam outras fontes de renda na madeira ou na produção de carvão vegetal. Enquanto a sociedade, através de preços mais altos dos produtos, ou o governo, através de garantia de preços mínimos, seguro agrícola, financiamento subsidiado e assistência técnica não melhoram a atividade do pequeno produtor, dificilmente pode se esperar um avanço de grande parte dos produtores nos quesitos ambientais.
A sustentabilidade da pecuária não é um problema que o pecuarista pode resolver sozinho. A sociedade, através de preços mais altos para os produtos rurais, e o governo, através da criação de condições externas (infra-estruturas, ensino básico e técnico, financiamento e assistência) decidirão se haverá uma melhora significativa das condições do pasto e da cria e engorda dos animais. A pecuária empresarial ou de grande porte com cerca de 50.000 unidades (no total de 1,2 milhões de propriedades de gado de corte) produzem menos que a metade dos 40 milhões de animais abatidos anualmente. Mesmo se todos esses sistemas (semi-) profissionalizados adotarem as normas ambientais e as BPAs (boas práticas agropecuárias), o avanço seria importante, porém ainda não resolveria a questão. O País precisa que as centenas de milhares propriedades (familiares, de pecuaristas com outras atividades, ou assentados) que continuam sem capacidade técnica e econômica para melhorar os aspectos ambientais (e sociais) em suas fazendas sejam incluídos num processo amplo de modernização. Talvez exista aqui a perspectiva de criar uma “Bolsa Ecologia”, ao menos para a Amazônia Legal.
Ao ponderar as críticas feitas à produção pecuária e avaliando as soluções que existem e já estão parcialmente em curso, é preciso caracterizar a natureza da ZED (zona de equilíbrio de desenvolvimento), que é resultante das sinergias e dos conflitos do chamado *triple bottom line* entre a Economia, o Ambiente e o Social.
Em linha com a progressão na satisfação das necessidades básicas conforme Abraham Maslow, o ser humano trata primeiro do imediato, nomeadamente daquilo que precisa para sobreviver (alimentação, habitação, segurança). Só depois amplia a visão para o médio e longo prazo e para objetivos mais nobres. Considerando a baixa produtividade e lucratividade da pecuária tradicional, que é praticada por 80% ou mais dos proprietários, o aspecto econômico da atividade ocupa o principal espaço em seu raciocínio existencial. O produtor não consegue se preocupar com o futuro se não vê resolvido seu presente.

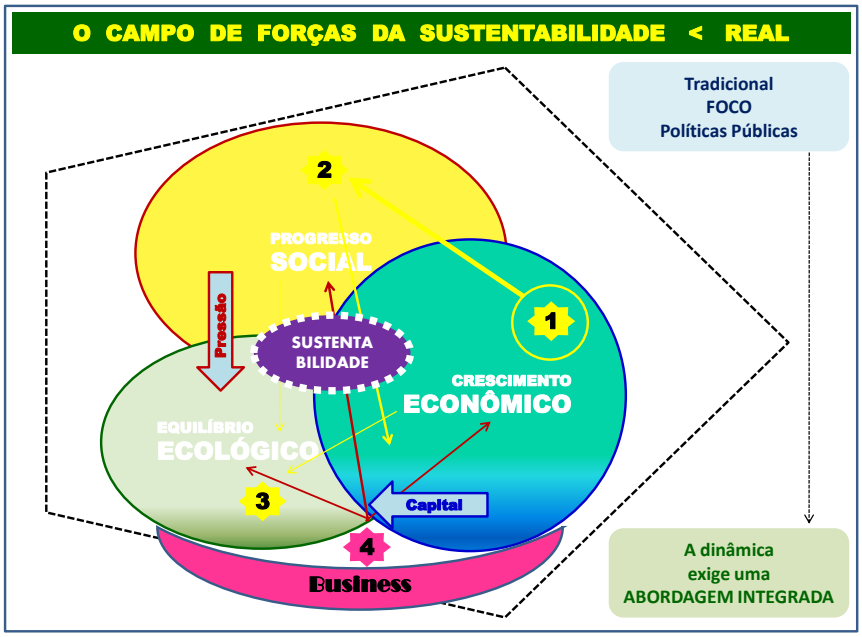


Figura 3: A zona dinâmica de equilíbrio (ZED) da sustentabilidade. **Fonte:** autor

Somente depois de atingido um patamar razoável de resultado econômico da sua atividade o pecuarista canaliza atenção, energia e meios financeiros para melhorar a situação ambiental. Na maioria dos casos, essas medidas não apenas beneficiam o ambiente, mas também melhoram a produtividade de pasto, da criação de animais, ou de ambos. Por este motivo, a preocupação com a preservação dos recursos naturais para a produção deve ser 'vendida' como medida para melhorar os resultados e não para cuidar da natureza.

Outras iniciativas, geralmente ilegais, de desmatamento ou queima, devem ser fiscalizadas e punidas com multas em proporção ao bolso do infrator. Juntamente com a explicação técnica no sentido de que essas práticas ou não resolvem ou trazem apenas benefício de curtíssimo prazo, cria-se uma cultura de maior responsabilidade com o negócio, a natureza e da sociedade como um todo.

Existe um amplo leque de iniciativas que podem aprimorar significativamente a produção bovina em todos seus aspectos:

- Continuação da melhoria da genética do rebanho nacional
- Apoio financeiro para a recuperação do pasto degradado
- Intensificação do pastejo rotacionado e do confinamento estratégico
- Difusão do conhecimento sobre as Boas Práticas Agropecuárias
- Integração de lavoura e pecuária e de sistemas silvipastoris
- Política de renda mínima para o agricultor e seguro agrícola
- Valorização do produtor rural perante a sociedade urbana

Os preços reais dos alimentos baixaram em mais de 50% entre 1960 e 2005. Ao mesmo tempo, a grande maioria de produtos industriais e serviços aumentaram seus preços. Foi a agropecuária que financiou a estabilidade econômica do Real. Enquanto em 1990 a família brasileira gastava 45% de sua renda mensal com alimentos, essa proporção caiu para 15% em 2010.

Fica evidente que houve uma enorme transferência de riqueza do campo para a cidade. Através dos preços do mercado, o pecuarista recebe apenas o equivalente do seu custo direto de produção. O pasto degradou, as infra-estruturas e máquinas estão obsoletas e a perspectiva de renda torna difícil segurar os jovens na atividade. Perante esse panorama, são a sociedade que através de pagamento de preços significativamente mais altos e/ou o governo através da (re-) transferência de renda que podem e devem financiar a sustentabilidade ambiental da agropecuária. O produtor simplesmente não tem nem o capital nem o fluxo de caixa para arcar com essa tarefa.

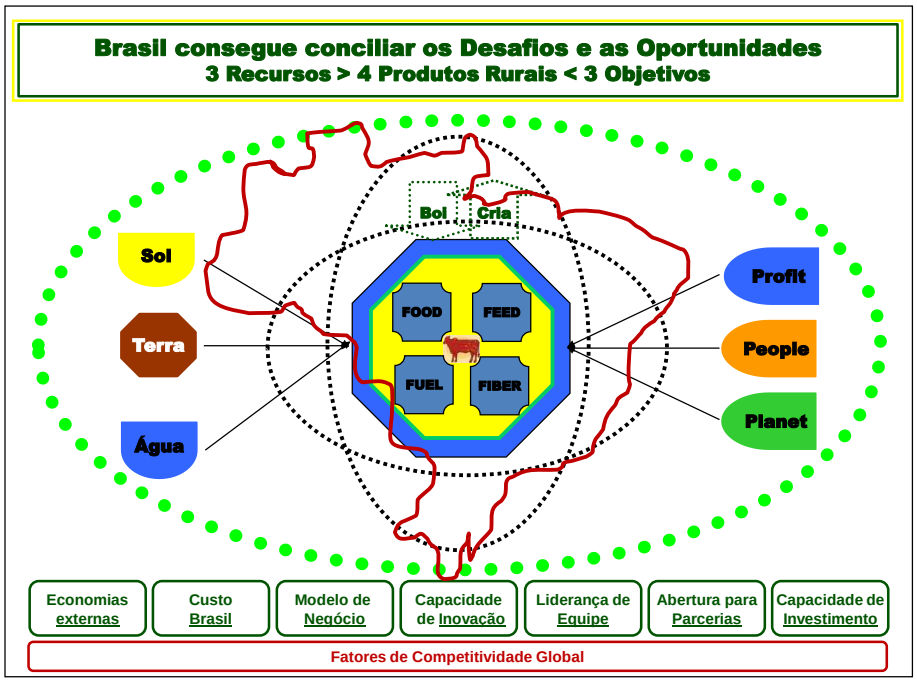


Figura 4. Vantagens competitivas do agronegócio brasileiro. **Fonte:** autor

Colocando a questão na perspectiva do tempo, verifica-se que a produção de um alimento nobre, a fixação de centenas de milhares de produtores familiares no campo e a preservação do ambiente como fonte reprodutiva de alimentos passa pela responsabilização de todos os brasileiros. A migração para a alimentação vegetariana ou a produção e exportação de carne de soja (já em curso em escala crescente) são alternativas interessantes, mas não resolvem o desafio da sustentabilidade de milhões de produtores, nem atendem às expectativas de bilhões de consumidores, nomeadamente nas economias emergentes. Melhores preços e o avanço tecnológico garantirão a subsistência da pecuária e, mais uma vez, a criatividade humana superará as limitações dos recursos naturais.

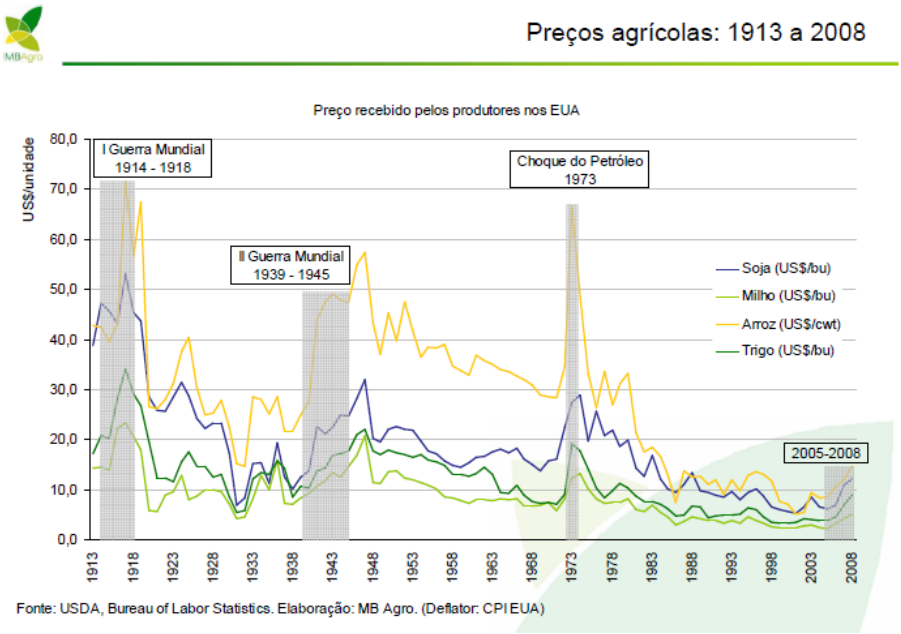


Figura 05. A deroccada dos preços agrículos - espelho do aumento da produtividade.
Fonte: MG-Agro - Alexandre Barros Mendonça.

FONTES PARA O APROFUNDAMENTO DA TEMÁTICA

1. CNPC – www.cnpc.org.br Simpósios de sustentabilidade 2008-2020 com ABCZ e outras entidades científicas, governamentais e associativas

2. ABAG – www.fgv.br/agroanalisis - Congresso Sustentabilidade 2009

3. SRB – www.srb.ogb.br – Debate sobre Sustentabilidade 2009; Workshop sobre Produtividade Legal 2009

4. Agripoint - www.beefpoint.com.br – Workshop Sustentabilidade 2009

5. FAEP – www.faep.org.br – Programa Preservar – Amazonpec 2010

6. TerraViva – www.tvterraviva.band.com.br – Programa diário Terraviva Sustentável

7. EMBRAPA- www.cnpma.embrapa.br – Site Meio ambiente - ILPF

8. ASSOCON – www.assocon.com.br – Certificação

9. ARES – www.institutoares.org.br – Pecuária sustentável

10. WWF Brasil – www.wwf.org.br – Conceitos de sustentabilidade

11. Programas dos principais frigoríficos focada na sustentabilidade

12. FEICORTE – www.feicorte.com.br – Semana da pecuária sustentável durante a feira em junho de 2010

13. Novilho precoce - www.agpnp.com.br – Norma e programa de Boas Práticas

14. Prof. Fernando Penteado Cardoso – www.agrisus.org.br – Projetos

15. Instituto Peabiru – www.peabiru.org.br – Programas de Sustentabilidade

16. Instituto Terra - www.institutoterra.org.br - Exemplo do reflorestamento e recuperação completa de área degradada em MG como iniciativa individual pelo Sebastião Salgado (fotógrafo).

FISIOLOGIA DO CRESCIMENTO FOLICULAR EM BOVINOS

Marcelo Marcondes Seneda; Letícia Schmidt Siloto; Fábio Morotti;
Carine Letícia Schneider

Laboratório de Reprodução Animal, Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina. CEP 86051-990, Londrina/PR, Brasil,
mseneda@uel.br

RESUMO

Importantes pesquisas têm sido conduzidas com o intuito de elucidar os complexos mecanismos envolvidos na fisiologia reprodutiva da fêmea em razão da relevância das descobertas para a comunidade científica e para toda a sociedade em geral. A possível participação de células-tronco na foliculogênese pós-natal representa um campo fértil de perspectivas bastante promissoras. Recentes estudos com estimativas da população folicular em ovários de fêmeas taurinas e zebuínas sugerem uma revisão dos conceitos da reserva folicular durante a fase fetal. As surpreendentes interações entre o DNA e as histonas, no contexto da epigenética, apontam para uma modulação muito mais dinâmica dos mecanismos da fisiologia ovariana. Este texto trata desses aspectos citados, com a proposta de demonstrar a necessidade de uma ampla compreensão da atividade folicular para o sucesso das biotécnicas aplicadas à reprodução.

INTRODUÇÃO

A reprodução animal se encontra em um momento bastante singular no contexto dos avanços da pesquisa molecular e aplicada. A aplicabilidade e a disseminação em larga escala de biotécnicas como a inseminação artificial em tempo fixo, a transferência de embriões e a produção *in vitro* de embriões têm apresentado um exponencial crescimento nos últimos anos.

O desafio da busca contínua por resultados sempre melhores e a perspectiva de aplicabilidade para a medicina humana estimulam ainda mais o interesse em desvendar os mecanismos envolvidos na foliculogênese, na oogênese e no desenvolvimento embrionário (Caixeta, 2010).

O Brasil detém o posto de líder mundial na produção *in vitro* de embriões (Thibier, 2007). O grande mérito deste título é decorrente do predomínio de fêmeas *Bos taurus indicus* (zebuínas), em especial da raça Nelore, no plantel nacional. A produção das vacas da raça Nelore é, em média, de 25 oócitos por sessão de aspiração folicular, cerca de quatro vezes superior à de fêmeas *Bos taurus taurus*, sem qualquer procedimento adicional, como aplicação de FSH, BST ou controle do ciclo estral (Pontes, 2009).

Um aspecto que merece destaque é a alta produção oocitária em algumas fêmeas Zebu. Patamares de centenas de oócitos em um único procedimento de aspiração folicular são comuns em muitos laboratórios de produção de embriões. Estimativas da população folicular em fêmeas zebuínas e taurinas e suas respectivas taxas de atresia folicular têm sido realizadas a fim de explicar diferenças tão significativas na produção de oócitos (Silva, 2009). Aspectos inusitados, como a presença de cordões ovígeros em fêmeas adultas, estão novamente sendo investigados, considerando-se que a presença de tais estruturas seria esperada apenas na fase fetal (Lucci, 2002).

Os mecanismos epigenéticos, responsáveis pela remodulação da cromatina e pelo acesso a genes regulatórios da expressão gênica (Li et al. 2007), se mostram extremamente interessantes como ferramenta para se compreender fatos como os descritos anteriormente. O estudo da epigenética busca explicações sobre a atividade dinâmica do nucleossomo no interior do núcleo celular e de alguns dos intrincados mecanismos de regulação da expressão gênica, com repercussões extraordinárias em todos os campos das ciências da vida (Cosgrove and Wolberger, 2005).
Teorias como a neo-foliculogênese ou foliculogênese pós-natal e estudos relatando um possível envolvimento de células-tronco, capazes de gerar células de outro tecido, na renovação folicular (Johnson et al. 2004 e 2005; Zou et al. 2009) têm se mostrado dignos de interesse, em razão de evidências capazes de propor uma revisão em conceitos amplamente utilizados na fisiologia reprodutiva.

CONCEITOS BÁSICOS DA FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese, evento caracterizado pela formação, pelo crescimento e pela maturação folicular, é controlada por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos (Magalhães, 2009).
O ovário é responsável pela produção cíclica de oócitos capazes de serem fertilizados (gametogênese) e pela produção de hormônios esteroidais requeridos na preparação para a fertilização e prenhes (esteroidogênese) (Hafez & Hafez, 2004). O folículo é a estrutura primordial do ovário e é composto por um oócito envolto por uma ou mais camadas de células somáticas (Seneda, 2008).
Durante o desenvolvimento embrionário, as oogônias originam-se de sucessivas mitoses das células germinativas que migram do saco vitelínico para as cristas gonadais. Posteriormente, as oogônias são circundadas por células somáticas do mesonéfron formando estruturas chamadas cordões corticais, precursores dos folículos primordias (Silva, 2009). As oogônias 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).
Embora o mecanismo de recrutamento folicular não esteja completamente elucidado, acredita-se que o número de folículos primordias recrutado é controlado por fatores intraovarianos (Hafez, 2004), independentemente da ação de gonatodrofinas (Roche, 1996). O crescimento ou ativação do folículo primordial caracteriza a fase de transição para folículo primário. Esta fase é acompanhada pela proliferação e diferenciação de células da granulosa, cuja forma anteriormente pavimentosa adquire conformação cubóide (Aerts, 2008). Há o início da formação da zona pelúcida que permanece por todo o desenvolvimento folicular até a fase inicial de desenvolvimento embrionário.
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).
Seguido o crescimento folicular, há a formação da cavidade antral, constituída pela transudação do líquido folicular, originado principalmente do plasma periférico, através da membrana basal folicular (Hafez, 2004). Este importante evento fisiológico precede os processos de desvio e de dominância folicular.
Conforme descrição de Santos et al. (2008), os folículos antrais compreendem os folículos terciários (subordinados e dominantes) e pré-ovulatórios. Estes folículos são constituídos por um oócito circundado pela corona radiata e células do *cumullus* que

conectam o oócito às células da granulosa, além das células tecais e uma cavidade contendo líquido folicular. A proliferação celular é dependente da ação do FSH. Admite-se que esta gonadotrofina tenha envolvimento na ação parácrina de fatores de crescimento, como relatado para membros do grupo FGF, como o FGF-8 (Buratini et al., 2005).

A ação gonadotrófica intensifica-se durante a fase antral. A presença do líquido folicular torna exequíveis os estudos utrassonográficos, permitindo o acompanhamento *in vivo* do folículo até seu destino final: o processo de atresia ou a ovulação. O curso constante desses eventos 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.

NOVAS PERSPECTIVAS SOBRE A FISIOLOGIA FOLICULAR

Há mais de 150 anos que o conceito básico da fisiologia da reprodução fundamenta-se no estoque finito e não renovável das células germinativas (Byskov et al., 2005). Entretanto, estudos recentes conduzidos por Johnson et al. (2004 e 2005) têm mostrado evidências que propõe a revisão desta teoria, demonstrando indícios da continuidade da oogênese e foliculogênese no período pós-natal, pela atuação de células-tronco.

Na medula óssea existem várias populações de células-tronco, com evidências promissoras no que se refere ao potencial de plasticidade, ou seja, capacidade de gerar células de outros tecidos, independentemente da origem do folheto embrionário. 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 presença 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 contestada 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 à subseqüente fase de diplóteno nos supostos oócitos derivados de células-tronco. Além disso, a eficácia da esterilização química foi questionada pelo curto período de crescimento dos novos folículos.

Um suporte para sustentação da metodologia de Johnson et al. (2004; 2005) ocorreu recentemente, quando Zou et al. (2009) demonstraram a eficácia no método de esterilização de camundongas ao utilizar a ciclofosfamida e busulphan, evidenciado pela ausência de folículos e oócitos no ovário das fêmeas controle dois meses após a esterilização. Concomitantemente, através de cortes histológicos, observaram que o ovário dos animais que receberam o transplante de células-tronco de linhagens germinativas tinha muitos oócitos em todas as fases de desenvolvimento. Esses dados corroboraram as estratégias experimentais de Johnson et al. (2004; 2005), comprovando não só a eficiência do método na esterilidade, mas também ressaltando a capacidade regenerativa ao utilizar o transplante de células-tronco de linhagem germinativa.

Em um experimento especificamente delineado para avaliar a hipótese de neo-foliculogênese, 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 sangüínea compartilhada. 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 seis meses testando diversos ensaios experimentais nas camundongas parabióticas, os autores não obtiveram ovulação de nenhum oócito expressando a proteína fluorescente, contrariando a teoria da formação folicular pós-natal. Mas alguns detalhes comparativos entre os estudos merecem atenção. Enquanto o grupo liderado por Tilly (Johnson et al. 2004; 2005) descreve a "renovação folicular", Eggan et al. (2006) declaram a ausência de "oócitos ovulados". Ou seja, permanece um espaço, referente ao intervalo existente entre a formação e o crescimento de um folículo (aspectos inicial e intermediário, a presença de um oócito maduro no oviduto e o produto final).

Apesar das oposições à teoria de renovação folicular pós-natal, outros grupos, utilizando diferentes estratégias experimentais, realizaram descobertas bastantes 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 produzirem 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 partenogenéticos – a partir de células-tronco, como descrito pela equipe de Guelph (Dyce et al., 2006).

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

Mas em um trabalho mais recente, Zou et al. (2009) demonstraram a viabilidade de nascimento de animais viáveis a partir de oócitos oriundos da reprogramação de células tronco. Tal resultado representa importante avanço na discussão sobre a neo-foliculogênese, pois os autores demonstraram que o transplante de células tronco para fêmeas estéreis proporcionou descendentes em cerca de 80% dos animais submetidos. Posteriormente, a análise da prole revelou que os descendentes eram férteis e com todas as características de normalidade.

ASPECTOS APLICADOS DOS NOVOS CONCEITOS SOBRE POPULAÇÃO FOLICULAR

Um aspecto fundamental no atual contexto refere-se à retomada dos estudos de população folicular em bovinos. Uma possibilidade de encontrar respostas para essa discrepância da produção oocitária entre *taurus* e *indicus* é o estudo da reserva das

células germinativas em fêmeas (Gupta et. al., 2009). A espécie bovina apresenta aspectos interessantes para o estudo de foliculogênese, por se tratar de uma espécie com múltiplas ondas foliculares, crescimento de folículos antrais e atresia durante um ciclo reprodutivo relativamente longo (Ireland et. al.; 2000) parecido com o da mulher (Forabosco et. al., 1991; Gougeon et. al., 1994; Baerwald et. al., 2003) e bastante viável de ser avaliado por ultrassonografia.

Silva et. al. (2009) estimaram o número de folículos pré-antrais em fêmeas da raça Nelore e da raça Angus. Nesse estudo constatou-se que não houve diferença estatística entre a população folicular de *indicus* e *taurus*, tanto na fase fetal quanto em novilhas. Estes resultados tornam ainda mais desafiador o aspecto da produção de oócitos ser tão maior em *indicus* do que em *taurus*.

Um item de relevância é a descrição de estruturas foliculares, até então reportadas somente na fase fetal, agora também descritas em animais adultos. Um exemplo é o relato de estruturas denominadas “folículos poliovulados” (Lucci et al., 2002). Essas estruturas já foram descritas em vacas (Lucci, 2002) e em fetos no primeiro trimestre de gestação, durante a oogênese, como “ninhos de oogônias” (Diniz et al., 2005). No início da vida fetal, tais estruturas também já foram reportadas em humanos (Gondos et al., 1971) e sob a denominação de “cistos” (Pepling et al., 2006). Enquanto as células germinativas estão se dividindo para formar os “cistos” ou “ninhos”, ocorre interação das mesmas com células da pré-granulosa, originando cordões ovarianos, os quais são mantidos até a formação dos folículos primordiais (Odor & Blandau, 1969; Byskov, 1986; Hirshfield, 1991; Guigon & Magre, 2006). Desta forma, é fato intrigante a observação de tais estruturas na fase fetal tardia e, principalmente, em novilhas e vacas (Lucci, 2002). Ainda foi possível constatar que quando da presença dos folículos poliovulados nos ovários de animais com idades similares foi muito maior o número desses em ovários com maior número de folículos do que em folículos com baixo número de células foliculares (Ireland, 2008). A presença de tais estruturas foi relatada tanto em *taurus* quanto em *indicus* (Silva, 2009).

A cada nova constatação ligada à foliculogênese abrem-se novos caminhos para estudos no âmbito de possíveis alterações macroscópicas, microscópicas e moleculares. A alteração na capacidade reprodutiva da fêmea, qualidade dos oócitos, assim como uma possível proliferação das células germinativas ou ainda o envolvimento de células tronco na renovação folicular faz com que esses achados possibilitem um avanço não somente em modos de diagnosticar maneiras ou meios de fertilização, mas também para, finalmente, desvendar causas genéticas e epigenéticas desses mecanismos com impactos sobre a fertilidade (Ireland, 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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.

Mesmo com o empenho da comunidade científica em esclarecer as questões referentes à reserva ovariana, é necessário um acompanhamento mais aprofundado para responder questões que envolvem o desempenho fisiológico, funcional, genético e epigenético da função reprodutiva ovariana e endócrina.

Seria possível ocorrer alguma alteração folicular ou ovariana após um auto-transplante de medula óssea? Seria a esterilização química um fator desencadeante para a

neofoliculogênese? Sabe-se que mulheres jovens que sofreram esterilização química, quando submetidas a um estímulo, voltaram a produzir folículos. Haveria algo possível também em bovinos e outras espécies?

O estoque finito de folículos é considerado um dogma central na reprodução animal. Por este motivo, a teoria da neo-oogênese/foliculogênese é polêmica e várias questões ainda permanecem sem resposta ou pouco esclarecidas, fato este que reforça a necessidade de mais estudos a fim de melhor elucidar os eventos que circundam estes novos conceitos na reprodução.

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

Aerts, J.M.J., Bols, P.E.J. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. Reproduction Domestic Animal (In press) 2008.

Baerwald, A.R., Adams, G.P., Pierson, R.A. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. Fertil Steril 2003; 80: 116–122.

Baerwald A.R., Adams G.P., Pierson R.A.. Characterization of ovarian follicular waves in women. Biol Reprod 2003; 69:1023–1031.

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

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.

Caixeta, E.S., Dode, M.A.N. Veterinária e Zootecnia (UNESP) 2010; 17: 8-18.

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

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

Diniz, E.G., Esper, C.R., Jacomini, J.O., Vieira, R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 2005; 57(1): 70-76.

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.

Forabosco, A., Sforza, C., De Pol, A., Vizzotto, L., Marzona, L., Ferrario, V.F. Morphometric study of the human neonatal ovary. Anatomical Record 1991; 231: 201–208.

Gondos, B., Bhuraleus, P., Habel, C.J. Ultrastructure observations on germ cells in human fetal ovaries. American Journal of Obstetrics and Gynecology 1971; 110:644-652.

Gougeon, A., Ecochard, P., Thalabard, J.C. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increase in the disappearence rate of non-growing and early-growing follicles in aging women. Biology of Reproduction 1994; 50:653–663.

Guigon, C.J., Magre, S. Contribution of germ cells to the differentiation and maturation of the ovary: Insights from models of germ cell depletion. Biology of Reproduction 2006; 74:450–458.

Gupta, S., Sharma, D., Surti, N., Kesavan, S., Khanna, P., Agarwal, A. Ovarian reserve testing: systematic review of the literature. Archives of Medical Science 2009; 5,1A:S143-S150.

Hirshfield, A.N. Development of follicles in the mammalian ovarian. International Review of Cytology 1991; 124:43-101.

Hsieh, Y.Y., Chang, C.C., Tsai, H.D. Antral follicle counting in predicting the retrieved oocyte number after ovarian hyperstimulation. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 2001; 18:320–324.

Ireland, J.L.H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P.N., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Perez, G.I., Evans, A.C.O., Ireland, J.J. Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morfologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle. Biology of Reproduction 2008; 79:1219-1225.

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.

Hafez, E.S.E., Hafez, B. Reprodução Animal. São Paulo: Manole. 7ªed. 2004. p.69-71.

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).

Lucci, C.M., Rumpf, R., Figueiredo, J.R., Bao, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. Theriogenology 2002; 57:1467–1483.

Machado, S.A., Reichenbach, H.D., Weppert, M., Matos, L.F., Wolf, E., Gonçalvez, P.B.D. Variabilidade da punção folicular transvaginal e da produção *in vitro* de embriões em vacas gêmeas monozigóticas. Acta Scientiae Veterinariae 2003; 31:442-443, (Resumo).

Magalhães, D.M.; Fernandes, D.D.; Araujo, V.R.; Almeida, A.P.; Matos, M.H.T.; Figueiredo, J.R. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro.* Revista Brasileira de Reprodução Animal 2009; 33(4):171-182.

Martins, JR., A., Takada, L., Abrahão, R.G., Freitas, C.P., Calegari, R.S. Aspiração folicular de oócitos de bezerras através de videoendoscopia: um procedimento promisssor para maximizar a produção de embriões bovinos *in vitro.* Acta Scientiae Veterinariae 2007; 35:1194-1194, (Resumo).

Nasser, L.F., Rezende, L.F., Bó, G.A., Barth, A. Induction of parturition in Zebu-cross recipients carrying *in vitro*-produced *Bos indicus* embryos. Theriogenology 2008; 69:116–123.

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.

Odor, D.L., Blandau, R.J. Ultrastructural studies on fetal and early postnatal mouse ovaries. I. Histogenesis and organogenesis. American Journal Anatomy 1969; 124:163–186.

Pepling, M.E. From Primordial Germ Cell to Primordial Follicle: Mammalian Female Germ Cell Development Genesis 2006; 44:622–632.

Pontes, J.H.F.; Nonato-Junior, I.; Sanches, B.V.; Ereno-Junior, J.C.; Uvo, S.; Barreiros, T.R.R.; Oliveira, J.A.; Hasler, J.F.; Seneda, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. Theriogenology 2009; 71(4):690-697.

Roche, J.F. Control and regulation of folliculogenesis - a symposium in perspective. Journal of Reproduction and Fertility 1996; l:19-27.

Rubin, K.C.P., Pontes, J.H.F., Nonato JR., Ereno JR, J.C., Pansard, H., Seneda, M.M. Influência do grau de sangue Nelore na produção *in vivo* de oócitos. Acta Scientiae Veterinariae 2005; 33:183.

Rubin, K.C.P., Rigo, A.G., Schroeder, R.V., Silva, R.C.P, Marques, M.O., Seneda, M.M. Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de 38 vácuo para obtenção *in vivo* de oócitos bovinos. Acta Scientiae Veterinariae 2004; 32:121. (Resumo).

Santos, R.G., Soto, M.A.B., Lourenço, R.X., Stranieri, P., Bishop, W., Accorsi, M.F., Watanabe, M.R., Dayan, A., Watanabe, Y.F. Aspiração folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal 2005; 16:79.

Santos, R.R; Celestino, J.J.H.; Lopes, C.A.P.; Melo, M.A.P.; Rodrigues, A.P.R.; Figueiredo, J.R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. Revista Brasileira de Reprodução Animal 2008; 32(1):9-15.

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.

Silva, K.C.F.; Estudo comparativo da recuperação de complexo cumulus oócito e da popu-lação de folículos pré-antrais entre fêmeas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2009.

Soto-Suazo, M., Zorn, T.M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. Animal Reproduction 2005; 3:147-60.

Thibier, M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world: a report from the IETS data retrieval committee. International Embryo Transfer Society Newsletter 2004; 12-19.

Thibier, M. New records in the numbers of both *in vivo*-derived and *in vitro*produced bovine embryos around the world in 2006. International Embryo Transfer Society Newsletter 2007; 25:15-20.

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.

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

Watanabe, M.R., Watanabe, Y.F., Franceschini, P.H., Dayan, A., Lobo, R.B. Variation in ultrasound guided oocyte recovery in Nellore cows per session and *in vitro* embryo production. Theriogenology 1999; 51:438.

Zou, K.; Yuan, Z.; Yang, Z.; Luo, H.; Sun, K.; Zhou, L.; Xiang, J.; Shi, L.; Yu, Q.; Zhang, Y.; Hou, R.; Wu, J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. Nature cell biology 2009; 11(5):631-636.

ESTADO DEL ARTE DE LAS TECNICAS DE CONTROL DE DESARROLLO FOLICULAR Y LA OVULACION PARA EL EMPLEO DE LAS BIOTECNOLOGIAS

Gabriel A. Bó[1] y Reuben J. Mapletoft[3]

[1]Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Zona Rural General Paz, (5145) Córdoba, Argentina;
[2]Instituto de Ciencias Básicas, Medicina Veterinaria, Universidad Nacional de Villa María, Villa del Rosario, Córdoba, Argentina;
[4]Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canadá, gabrielbo@iracbiogen.com.ar

INTRODUCCIÓN

El progreso genético alcanzado en la industria lechera a través del uso de la inseminación artificial (IA) ha sido muy importante. Además, la utilización de la IA se viene incrementando en forma exponencial en los rodeos de carne, sobre todo los de Sudamerica. En los rodeos de carne la información genética ha comenzado a ser cada vez más accesible, y sus beneficios potenciales aparentes. Además, el sexado de semen y la selección genética basado en los marcadores de ADN ha incrementado la necesidad de la IA. La mayoría de los programas de IA requieren la detección del celo, lo cual es un gasto adicional de tiempo y costos, que lo convierte en un método cada vez más ineficiente. La sincronización del celo y la ovulación ofrece alternativas para eliminar la necesidad de la detección del celo. La siguiente revisión mostrara la sincronización de celo desde una perspectiva histórica, concluyendo con los actuales avances de la sincronización de la ovulación por IA a tiempo fijo y especulando sobre los desarrollos futuros.

EL PASADO

Los métodos de control del ciclo estral han incluido varios tratamientos farmacológicos. Como la fase lúteal del ciclo estral ha sido mas modificada hacia el control por intervención externa, dos técnicas básicas han sido aplicadas. Estas son, la prolongación de la fase progestacional, con el uso de progesterona o varios progestágenos, y el acortamiento de la fase progestacional como la inducción de la lúteolisis con prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF). Estos avances han llevado a la inducción del celo y a la ovulación con un rango de predicción entre los 4 a 5 días, lo cual reduce pero no elimina la detección de celo.

Progestágenos

Hace sesenta años, la administración de progesterona fue colocada para alterar la función ovárica e inhibir la ovulación en vacas lecheras (Christian and Casida, 1948). Los resultados de estudios subsecuentes demostraron que los progestágenos, si eran dados de manera lo suficientemente prolongada para permitir la regresión normal del CL (por ejemplo, ≥14 días), conseguirían inducir la sincronización del celo, pero estaban asociados con una baja fertilidad (Trimberger & Hansel, 1955; Hansel et al., 1961; Wiltbank et al., 1965). Se ha descubierto que los niveles de progesterona en la fase lúteal suprimen la frecuencia pulsátil de LH (Savio et al., 1993; Stock & Fortune, 1993), convirtiéndose en la causa de la supresión del crecimiento folicular y la

emergencia de la nueva onda (Adams et al., 1992b; Sirois & Fortune, 1988). Se ha visto que la progesterona suprime la secreción de LH, y aparentemente no suprime la secreción de FSH (Adams et al., 1992a). Por lo tanto, el tratamiento con progesterona disminuirá el crecimiento de folículos receptivos a la LH (folículo dominante) y evitará la ovulación, pero no detendrá o sincronizara los aumentos regulares de FSH y la emergencia de las ondas foliculares.

Se ha demostrado que el crecimiento del folículo dominante es suprimido por la progesterona de manera dosis-dependiente (Adams et al., 1992b); niveles de progesterona por encima de lo normal, normal, y por debajo de lo normal durante la fase lúteal, respectivamente, resultan en perfiles de folículos dominantes de menor, normal y de mayor tamaño. Las dosis de progestágenos comúnmente utilizadas en el control del ciclo estral de vacas lecheras ha tenido relativamente menos efectos supresores en la secreción de LH que los niveles normales de progesterona de la fase lúteal, y son asociados con un exagerado desarrollo en el tamaño de los folículos "persistentes" (Savio et al., 1993; Stock & Fortune, 1993; Custer et al., 1994).El acetato de Melengestrol (MGA) es uno de los progestágenos utilizados en la sincronización de vacas lecheras y carne. Las ventajas del MGA incluyen el bajo costo, su administración oral y su extrema baja toxicidad. Sin embargo, la subsecuente baja fertilidad en tratamientos prolongados con MGA (≥14 días) en estudios iniciales (revisados en Odde, 1990; Larson & Ball, 1992) ha sido atribuida un degeneración del ovocito dentro del folículo persistente (Custer et al., 1994; Mihm et al., 1999). La maduración espontánea (esto es, el quiebre de la vesicular germinal y la expansión del cumulus) fue evidente en 23/23 folículos dominantes "persistentes" comparados con 5/29 en folículos dominantes en crecimiento (Revah & Butler, 1996). El potencial de inducción de folículos "persistentes" de gran tamaño para la sincronización de celo ha sido investigado (Kinder et al., 1996), y esto ha sido especulado que la regresión mas que la ovulación del folículo "persistente" puede ser electivamente inducida teniendo como resultado una nueva onda folicular emergente (Kastelic et al., 1996; McDowell et al., 1998). De hecho, Small et al., (2009) indujo folículos persistentes con el uso de dispositivos con progestágenos y causo su ovulación con GnRH, generando la emergencia de una nueva onda folicular.

El uso del estradiol en combinación con progestagenos fue inicialmente introducido para causar luteolisis uterina inducida (Wiltbank et al., 1961; revisado en Odde, 1990), razón por la cual el estradiol fue incorporado en uno de los primeros tratamientos comerciales disponibles para la sincronización del celo; con Syncro-Mate B (SMB). El tratamiento que involucra el uso del implante auricular subcutáneo contiene 6 mg de norgestomet, que permanece por un periodo de 9 días y una inyección de 5 mg de valerato de estradiol y 3 mg de norgestomet que se proporcionan al momento de la inserción. Un alto porcentaje de vacas (77% a 100%) presentaron celo inmediatamente después de la remoción del implante SMB (revisado en Odde, 1990). Sin embargo, las tasas de preñez fueron variables (33% a 68%), en parte debido a la variabilidad de la proporción de animales que estaban ciclando al momento del tratamiento. La versión mas reciente del implante del norgestomet, Crestar, ha sido usado similarmente, pero debido a las reformas del implante, contiene solamente 3 mg de norgestomet (Kastelic et al., 1999).

Los dispositivos intravaginales liberadores de progesterona, que son colocados dentro de la vagina por 7 o 8 días, se han convertido en dispositivos disponibles para la sincronización del celo (Mapletoft et al., 2003). Inicialmente, la regresión luteal era inducida con un capsula de 10 mg de benzoato de estradiol al mismo tiempo de la introducción del dispositivo, pero más recientemente se ha comprobado que 2 mg de benzoato de estradiol es mas efectivo para sincronizar el desarrollo folicular y el

tratamiento con PGF al momento del retiro del dispositivo es mas efectivo que el estradiol para la inducción de la regresión luteal. La mayoría de las vacas entraran en celo 2 a 3 días después de la remoción del dispositivo, y debido al corto intervalo de tiempo del tratamiento, no presentaran la formación de folículos persistentes y tendrán una fertilidad muy buena.

Prostaglandina $F_{2\alpha}$

La enucleación del cuerpo lúteo es uno de los métodos antiguos usados para la sincronización del celo o en el tratamiento de patologías ováricas (Teige & Jakobsen, 1956). En los inicios de 1970's, PGF fue descubierta como la luteolisina natural (McCracken, 1972; Manns & Hafs, 1976), y desde entonces la PGF ha sido el tratamiento mas comúnmente utilizado para la inducción de la regresión luteal y/o sincronización del celo en vacas lecheras (Odde, 1990; Larson & Ball, 1992). Estudios iniciales demostraron que la madurez del CL al momento del tratamiento con la PGF influencia la respuesta luteolítica (Momont & Seguin, 1984); la PGF no induce efectivamente la lúteolisis durante los primeros 5 a 6 días del celo. En principio se creyó que la ausencia de respuesta producida era debida a la de falta de los receptores de PGF en los CL inmaduros, sin embargo, trabajos recientes han demostrado la presencia de receptores de PGF en los CL tempranos en los 2 días posteriores a la ovulación (Wiltbank et al., 1995). Sin embargo, parece que los CL maduros pueden tener un feedback positivo que resulte en la producción intraluteal de PGF que pueda continuar con el proceso de luteolisis iniciado por el tratamiento individual de PGF exógena (Wiltbank, 1997). Si el CL inmaduro no posee el feedback positivo, las múltiples inyecciones de PGF pueden esperar completar el proceso luteolítico en CL de estados tempranos. Con respecto a esto, la luteolisis y la ovulación fue inducida en 56/60 vaquillonas de carne (93%) al darse PGF en la mañana y en la tarde del cuarto y quinto día posterior al celo en dos estudios que realizaban el inicio de la superestimulación cerca del momento de la ovulación (Nasser et al., 1993; Adams et al., 1994), proporcionando un tratamiento alternativo para los CL que no respondían.
La palpación transrectal y el tratamiento de vacas con aparentes CL receptivos puede aumentar la proporción de respuesta al tratamiento de PGF, pero la determinación errónea del CL y fallas en la detección de celos conlleva a la detección del celo de solo el 75% en las vacas tratadas (Gaines, 1994). Además, en vacas en las cuales la luteolisis es inducida efectivamente por el tratamiento con PGF, el celo se distribuye en un periodo de mas de 6 días (Seguin, 1987). La respuesta mas consistente (por ejemplo, el intervalo de celo menos variable) se presenta en el tratamiento con PGF durante el diestro temprano (7 y 8 días post-estro) o diestro tardío (15 días post-estro) al compararlo con el diestro medio (10 a 13 días post-estro; Seguin, 1987). Otros estudios recientes han documentado que gran parte de esta variación es debido al estatus en el momento del tratamiento. El tratamiento cuando el folículo dominante de la onda tiene un crecimiento tardío (≥ 9 mm) o esta en una fase estática temprana puede resultar en la ovulación de este folículo entre los 2 a 3 días, sin embargo los tratamientos después de la fase media y tardía estática (por ejemplo, cuando no es mas viable) resultaran en la ovulación del folículo dominante de la próxima onda 4 o 5 días posteriores al tratamiento (Kastelic et al., 1990; Kastelic and Ginther, 1991). En el esquema convencional de la sincronización con dos dosis de PGF, el intervalo de 10 a 11 días entre los tratamientos han sido usado debido a que representa un punto medio del ciclo estral y teóricamente todas las vacas podrían tener CL receptivos a la PGF a uno o dos tratamientos. Sin embargo, los intervalos largos (13 a 14 días) de tiempo entre los tratamientos puede resultar en una mejor sincronía. Respecto a esto, un

estudio reporto una mayor tasa de concepción con 14 días que con 11 días de intervalo entre los tratamientos de PGF (Folman et al., 1990). Recientemente, el tratamiento con PGF se ha combinado con tratamientos diseñados para controlar el estatus folicular y la sincronización precisa de la ovulación.

EL PRESENTE

Se ha demostrado que la sincronización de la ovulación depende del crecimiento sincronizado de un folículo dominante y de su ovulación en un tiempo predeterminado. Los tratamientos que eliminan el folículo dominante pueden llevar a la emergencia de una nueva onda folicular y el crecimiento sincronizado de un nuevo folículo dominante. De este modo, la ablación transvaginal del folículo dominante guiado por ultrasonografía consigue sincronizar la emergencia de la siguiente onda folicular al remover los efectos supresores de ese folículo sus productos derivados sobre la liberación de FSH (Bergfelt et al., 1994). La ovulación del folículo dominante de la nueva onda folicular puede ser luego inducida por la inyección de GnRH o por medio de la inyección de LH. Igualmente, la ablación folicular en combinación con PGF y LH es bastante eficaz para la sincronización del celo y la ovulación, pero no es práctico su uso en el campo.

Estradiol y progesterona

A pesar de que los efectos de la sincronización debido a los tratamientos combinados con progestagenos y estradiol han sido demostrados por décadas, los descubrimientos sobre los efectos del estradiol en el desarrollo folicular fueron comprendido recién el los años 90. En una serie de estudios (revisados en Bó et al., 1995b), se descubrió que el tratamiento con estradiol suprimía la fase de crecimiento del folículo dominante y la supresión era más eficaz cuando se combinaba con progesterona. El mecanismo responsable por la supresión del crecimiento folicular inducido por estrógenos ocurre a través de la supresión de FSH (Bó et al., 1994) y LH. La combinación de estradiol y progestágenos fue subsecuentemente utilizada para determinar si la supresión del crecimiento folicular podría inducir una nueva onda folicular con un consistente intervalo post tratamiento, sin importar la fase de desarrollo folicular en el momento en el que el tratamiento fue iniciado (por ejemplo, fase de crecimiento, estática, o de regresión del folículo dominante en la onda). El uso de 17β estradiol en los implantes de progestagenos en vacas llevaba consistentemente a la emergencia de una nueva onda, en promedio entre 4.3±0.2 días después (Bó et al., 1995a; b). Una vez el estradiol fue metabolizado, existe un aumento de FSH, y la emergencia de una nueva onda folicular (Martinez et al., 2005; 2007). La administración de 5 o 2.5 17β estradiol (revisado en Bó et al., 2002), 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Caccia and Bo, 1998) o valerato de estradiol (Colazo et al., 2005b) en implantes con progestagenos en vacas con diferentes estados de ciclicidad presentaron la emergencia de una nueva onda folicular aproximadamente 4 días después, con una pequeña variabilidad.

En los protocolos para la sincronización del celo, el estradiol es normalmente inyectado al momento de la inserción de los dispositivos con progestágenos (Martinez et al., 2000; 2005; Mapletoft et al., 2003) los cuales son retirados 7 o 8 días después, al mismo tiempo de la administración con PGF. Una dosis baja de estradiol es dada normalmente 24 horas después de haber inducido la liberación sincronizada de LH (aproximadamente 16 a 18 horas post-tratamiento) y la ovulación aproximadamente 24 a 32 horas después (Mapletoft et al., 2003; Martinez et al., 2005; 2007). Esto ha permitido la IA a tiempo fijo (IATF) con altas tasas de preñez. Las tasas de preñez se

han visto incrementadas en vacas lactantes, especialmente en vacas *Bos indicus* y ganado de carne cuando se administra 400 UI de eCG al momento del retiro del progestágeno (revisado en Baruselli et al., 2004; Bó et al., 2005). También se ha visto el mismo efecto en vacas lecheras en anestro posparto en los sistemas de parición estacional en Nueva Zelandia (Bryan et al., 2010). Los efectos benéficos de la eCG pueden verse a través de la estimulación del crecimiento del folículo dominante y de la producción de progesterona por el CL del ciclo subsiguiente (Baruselli et al., 2004, Souza et al., 2009).

Las tratamientos con estradiol y progesterona han sido utilizados ampliamente para la sincronización de la onda folicular emergente permitiendo la superestimulación (Bó et al., 1995b; 2002), y la sincronización de la ovulación en los protocolos de transferencia de embriones a tiempo fijo (TETF; Bó et al., 2002; 2005; 2007). En general, los tratamientos para la TETF son similares a los usados en IATF, excepto el tratamiento con PGF puede ser administrado antes o dividido en dos inyecciones, una en el momento de la inserción del dispositivo y la otra en el momento de la remoción. Por lo tanto, en las receptoras se utiliza el dispositivo de progestagenos y una inyección de 2 mg de BE en el día 0, PGF en el día 5 (1 día después de la emergencia de la onda folicular), los dispositivos de progestágenos son removidos en el día 8 y se administra 1 mg de BE en el día 9 (el día 10 es considerado el día del celo) y los embriones son transferidos al día 17 en todas las receptoras con CL. El tratamiento con PGF en el día 5 tiene como resultado folículos dominantes con mayor diámetro, altas concentraciones de progesterona al momento de la TETF y una alta proporción de receptoras seleccionadas para transferencia con altas tasas de preñez (Bó et al., 2005).

Los efectos de 400 UI de eCG en el día 5 en el protocolo de tratamiento para la TETF en las tasas de preñez ha sido igualmente investigado en receptoras cruza *Bos taurus* x *Bos indicus* (Nasser et al., 2004; Bó et al., 2005; 2007). Aunque el tratamiento con eCG no tenga como resultado mayor numero de receptoras para la transferencia, permite el incremento del diámetro de los CL y el aumento de las tasas de concepción. Además, las concentraciones plasmáticas de progesterona en las receptoras tratadas con eCG fueron significativamente mayores que las no tratadas con eCG, a pesar del número de CL al momento de la transferencia de embriones. Una observación interesante en estos estudios fue que la tasa de preñez no difirió entre las receptoras en las cuales se había observado celo o no. Este protocolo resulta en una tasa de aprovechamiento del 85% y una tasa de concepción del 50%, por lo que se aprovecha al máximo el uso de las receptoras de que se disponen en un establecimiento y sin afectar las tasas de preñez.

Como la aplicación del protocolo de TETF necesita de varios tratamientos (Día 0, Día 5, Día 8 y Día 9), se desarrollaron trabajos para simplificar estos protocolos. Se diseño un experimento para simplificar el número de encierres en el tratamiento adelantando la administración de PGF del Día 5 al Día 0 (día de inserción del dispositivo) y atrasando la colocación de la eCG del Día 5 al Día 8 (día de la remoción del dispositivo; Bó et al., 2005). En trabajos preliminares realizados con vacas tratadas con dispositivos con progesterona y EB, la colocación de PGF en el Día 0 resultó en un diámetro mayor del folículo preovulatorio que cuando se colocó la PGF en el Día de la remoción del dispositivo (Día 8, Bó et al., 2004b, Cutaia et al., 2004). En este experimento se utilizaron 918 vacas y fue realizado en 4 réplicas. Al inicio de cada réplica (Día 0), todas las vacas fueron tratadas con un dispositivo DIB y 2 mg de EB y fueron divididas al azar en 6 grupos de tratamiento en un diseño 2 x 3 factorial. Los factores a evaluar fueron el momento de la aplicación de la PGF más la eCG (PGF Día 5 y eCG Día 5, PGF Día 0 y eCG Día 5 ó PGF Día 0 y eCG Día 8) y el momento de la aplicación de la segunda dosis de EB (en el momento de sacar el dispositivo (EB Día 8) o 24 h después

(EB Día 9). Por lo tanto, las vacas de los grupos PGF Día 0 recibieron 75 µg de PGF en el Día 0 y 75 µg de PGF en Día 8 y 400 UI de eCG en el Día 5 (eCG Día 5) u 8 (eCG Día 8). Las vacas del grupo PGF Día 8 recibió 150 µg de PGF en el Día 8 y 400 UI de eCG en el Día 5 (eCG Día 5) u 8 (eCG Día 8). En todos los Grupos se retiraron los dispositivos en el Día 8 y allí cada grupo fue nuevamente subdividido para recibir 1 mg de EB intramuscular en ese momento (EB Día 8) ó 24 h después (EB Día 9). La administración de 1 mg de EB en el momento de la retirada del dispositivo (EB Día 8) obtuvo un menor número de receptoras seleccionadas (transferidas/tratadas) y preñadas que el grupo EB Día 9. El área del CL también fue mayor (P<0,05) en el grupo EB Día 0 que en el grupo EB Día 8. El intervalo desde la remoción del dispositivo al celo fue menor en el grupo EB Día 8. La tasa de receptoras seleccionadas (transferidas/tratadas) fue mayor en el grupo PGF0 + eCG5 que en los grupos PGF5 + eCG5 y PGF0 + eCG8. El área y número de CL también fue mayor (P<0,05) en el Grupo PGF0 + eCG5 que en los grupos PGF5 + eCG5 y PGF0 + eCG8. Los porcentajes de preñez no difirieron entres los grupos (P>0,05).

Tabla 1. Porcentajes de vacas transferidas/tratadas, preñadas/transferidas y preñadas/tratadas en receptoras de embriones tratadas en relación al Día de administración de la PGF (Día 0 y 8 vs Día 5), eCG (Día 5 vs 8).

Grupos	Transferidas/ Tratadas (%)	Preñadas/ Transferidas (%)	Preñadas/ Tratadas (%)	Área CL (mm^2)	Número CL
PGF5 + eCG5	220/312 (70,5)[a]	129/220 (58,6)	129/312 (41,3)	274,6±98,6[b] (n=205)	1,05±0,2[a]
PGF0 + eCG5	208/301 (69,1)[a]	119/208 (57,2)	119/301 (39,5)	304,4±127,1[a] (n=208)	1,11±0,3[b]
PGF0 + eCG8	243/305 (79,6)[b]	123/243 (50,6)	123/305 (40,3)	258,4±90,2[b] (n=243)	1,04±0,2[a]

[ab] Superíndices diferentes en la misma columna difieren (P<0,05).

Estos resultados demuestran que es posible simplificar los tratamientos de receptoras colocando PGF en el momento de la inserción y remoción del dispositivo con progesterona y la eCG en el momento de la remoción. No es posible aplicar EB en el momento de la remoción del dispositivo en lugar de a las 24 h después, por lo tanto se podría utilizar estrógenos de mayor vida media como el cipionato de estradiol (ECP). En ese sentido se realizo un trabajo donde se comparo la utilización cipionato de estradiol (ECP) o benzato de estradiol (EB) como inductores de la ovulación. Para esto se utilizaron 150 vacas cruzas, ciclando y con una condición corporal (CC) promedio de 3,5 (escala de 1 a 5). En el Día 0 se les realizó la determinación de status ovárico por ultrsonografía y los animales que tenían un CL fueron seleccionados para recibir un dispositivo auricular con 3 mg de norgestomet (Crestar, Intervet, Brasil) más la aplicación de 2 mg de valerato de estradiol (EV) y 1,2mg de norgestomet intramuscular (Crestar, Intervet, Brasil). En el Día 8 se realizó el retiro de los Crestar y se aplicó 400 UI de eCG intramuscular (Folligon, Intervet), más 150 µg de D (+) cloprostenol (Preloban, Intervet) y las receptoras fueron divididas al azar en dos grupos de tratamiento, para recibir 1 mg de ECP (Pfizer Sanidad Animal) intramuscular al momento del retiro del dispositivo (Grupo ECP) o 1 mg de EB 24 h después de retirado el dispositivo. En el Día 17 se les realizó ultrasonografía a todas las vacas para determinar la presencia y tamaño del CL y todas aquellas con un CL >14mm de diámetro recibieron un embrión en el cuerno ipsilateral. No se encontraron efectos

significativos del tratamiento en la tasa de aprovechamiento [EB: 59/75 (78,7%) vs ECP 58/75 (77,3%)] ni en la tasa de concepción [EB: 13/29 (44,8%) vs ECP: 14/28 (50,0%)]. Estos resultados demuestran que la utilización de ECP al momento del retiro implante es una alternativa confiable para la simplificación de los tratamientos de sincronización de la ovulación en TETF.

El ECP también se utiliza en forma rutinaria para inducir la ovulación en programas de IATF con resultados similares a los que se obtienen con el uso de EB a las 24 horas de la remoción del dispositivo con progesterona. Se diseñaron dos experimentos con el objetivo de evaluar el efecto del momento de la IATF en relación al retiro de un dispositivo intravaginal con progesterona nuevo o reutilizado (DIB 1 g P4, Syntex Argentina) y con ECP como inductor de la ovulación en las tasas de preñez. En el Experimento 1 se utilizaron 285 vaquillonas cruza cebú x Bonsmara de entre 18 y 24 meses de edad y con una condición corporal (CC) de entre 3,0 y 3,5 (escala 1 al 5). El día de inicio del tratamiento se palparon las vaquillonas y se determinó un porcentaje de ciclicidad del 92 %. Todos los animales recibieron en el Día 0 del tratamiento un DIB nuevo junto con 2 mg de EB (Syntex) y 250 ug de cloprostenol (Ciclase DL, Syntex). En el Día 8 se retiraron los DIB y se aplicó otra dosis de 250 ug de Ciclase junto con 0,5 mg de ECP (Cipiosyn, Syntex). En ese momento las vaquillonas fueron divididas para ser IATF entre las 48 y 49 h; 53 y 54 h o 58 y 59 h pos retiro de los DIB. Las vaquillonas fueron IATF con semen de uno de cuatro toros por dos inseminadores. En el Experimento 2 se utilizaron 260 vaquillonas de las mismas características que las anteriores (87% de ciclicidad). Las mismas fueron tratadas exactamente de la misma manera que en el Experimento 1, salvo que en este caso se aplicaron DIB de segundo uso. El diagnóstico de gestación se realizó a los 30 días pos IATF por ultrasonografía. Los datos fueron analizados por regresión logística, teniendo en cuenta el efecto del horario de IATF, semen e inseminador. En el Experimento 1 se encontró un menor (P=0,04) porcentaje de preñez en las vaquillonas IATF entre las 48 y 49 h pos DIB que en aquellas IATF entre las 53 y 54 o 58 y 60 h (Tabla 2). Sin embargo, en el Experimento 2 no se encontraron diferencias (P=0,72) entre los porcentajes logrados en los tres grupos de tratamiento. No se encontró efecto del semen, ni del inseminador (P>0,2) en ninguno de los 2 experimentos.

Tabla 2. Efecto del momento de la IATF en vaquillonas de carne tratadas con DIB nuevos y usados.

	47 a 48 h pos DIB	53 a 54 h pos DIB	58 a 59 h pos DIB
Experimento 1 (DIB nuevos)	46/95 (48,4%)[a]	61/99 (61,6%)[b]	57/91 (62,6%)[b]
Experimento 2 (DIB reutilizados)	39/91 (42,9%)	45/89 (50,6%)	35/89 (43,8%)

[ab] Superíndices con letras distintas difieren (P=0,04)

Concluimos que realizar la IATF entre las 48 y 49 h pos DIB (nuevos) resulta en menores porcentajes de preñez que la IATF entre las 53 y 54 h. Por otro lado es factible la IATF hasta las 59 h pos retiro del DIB, sin que esto afecte los resultados. Sin embargo, los resultados no se modifican inseminando desde las 48 hasta las 59 h utilizando DIB de segundo uso.

Hormona liberadora de gonadotropina (GnRH)

En vacas con un folículo dominante en crecimiento (de por lo menos 10 mm de diámetro), el tratamiento con GnRH lleva a la ovulación (Macmillan and Thatcher, 1991), con una nueva onda folicular aproximadamente 2 días después (Twagiramungu et al., 1995), pero solo cuando ha ocurrido la ovulación (Martinez et al., 1999). El esquema de la sincronización de la ovulación con la utilización de GnRH para IATF (Ovsynch) en vacas lecheras lactantes fue desarrollado por Pursley et al. (1995). La primera inyección de GnRH se da seguido de 7 días por una inyección de PGF, y 48 horas después por una segunda inyección de GnRH; la IATF se realiza entre las 0 a 24 (siendo optimo entre 16 a 18 horas posteriores). El protocolo de Ovsynch ha sido utilizado con éxito por muchos años (Seguin, 1997), y ha sido mucho mas efectivo en vacas lecheras en lactancia que en ganado de carne (Pursley et al., 1995; Martinez et al., 2002). Aunque la causa para esta discrepancia entre las vacas lecheras y de carne es aún desconocida, la ovulación con la primera inyección de GnRH ocurre en el 85% de las vacas lecheras y solo el 54% en las vacas de carne (Pursley et al., 1995). Además, el 19% de las vacas presenta celo antes de la inyección con PGF reduciendo dramáticamente la fertilidad por IATF (Wiltbank, 1997).

Se ha demostrado que el grado de desarrollo del folículo dominante (Martinez et al., 1999), o el estado del ciclo estral (Vasconcelos et al., 1999) en el momento de la administración de GnRH afecta los resultados. Si la GnRH es administrada cuando el folículo dominante es inmaduro o posterior a la maduración, puede no ocurrir la ovulación ni la emergencia de una nueva onda folicular (Martinez et al., 1999). Una alternativa es garantizar que el folículo dominante viable este presente en el momento del tratamiento con GnRH. Se ha sugerido que las vacas lecheras responderán mas consistentemente a la GnRH cuando se administra entre el día 5 y 8 del ciclo estral; esto puede realizarse utilizando un tratamiento de pre-sincronización con PGF, dando la ultima dosis de PGF al día 12 a 14 antes de la primera inyección de GnRH (Moreira et al., 2001). Nosotros hemos usado igualmente los dispositivos para pre-sincronizar los animales antes de iniciar el protocolo Ovsynch (Colazo et al., 2005a; 2006).

Igualmente se observo que la GnRH causa la ovulación del folículo dominante en solo el 56% de las vaquillonas de carne y no induce consistentemente la emergencia de la nueva onda folicular (Martinez et al., 1999). En las vacas con cría parece ser mas similar a las vacas de carne que a las vacas de leche, obteniendo rara vez mas del 60% de ovulación después de la administración de GnRH (Colazo et al., 2007). Igualmente demostramos que las concentraciones circulantes de progesterona afectan la liberación de LH posterior a la administración de GnRH en vacas de carne (Colazo et al., 2008). La presencia de dispositivos con progesterona entre la primera inyección con GnRH y la inyección con PGF 7 días después, esencialmente duplica las tasas de preñez en vaquillonas de carne (Martinez et al., 2002). Aunque los protocolos a base de GnRH han sido utilizados con éxito en vacas con cria, la adición de dispositivos con progesterona ha sido igualmente benéfico, especialmente si las vacas están en post-parto temprano o con baja condición corporal. La adición de eCG al momento del retiro del dispositivo demostró igualmente aumentar las tasas de preñez en vacas *Bos taurus* primíparas (Colazo et al., 2005a; 2006), en vacas *Bos indicus* (Pincinato et al., 2005), en vacas lecheras en anestro en Nueva Zelandia (Bryan et al, 2010) y en vacas lecheras cíclicas en Australia (Begg et al., 2010).

Los protocolos a base de GnRH han sido utilizados igualmente en la sincronización de la ovulación de receptoras (revisado en Bó et al., 2005; 2007). En dos estudios hechos en ganado cruza *Bos indicus* x *Bos taurus* (Baruselli et al., 2000; Zanenga et al., 2000),

el total de las tasas de preñez fue mayor en receptoras tratadas con protocolos basados con GnRH al ser comparados con las tratadas con PGF, principalmente debido a que un mayor número de receptoras recibieron embriones. La inclusión de los dispositivos con progestágenos en los protocolos a base de GnRH ha demostrado que aumenta la tasa de preñez. En uno de los estudios que involucra la transferencia de embriones congelados, Beal (1999) reporto que la tasa de concepción del control a celo detectado (62%) fue significativamente mayor que en las receptoras sin detección de celo sincronizadas con un protocolo Ovsynch (48%) o numéricamente mayor que las sincronizadas con Ovsynch que incluye el uso de dispositivo con progestágenos entre la primera inyección de GnRH y PGF 7 días después (54%). Sin embargo, fueron producidas mas preñeces con los protocolos a base de GnRH debido a que un mayor número de receptoras recibieron embriones (las receptoras fueron usadas independientemente de haber sido observadas en celo). En una prueba a campo en la que se involucraron 1637 receptoras tratadas con el protocolo con GnRH mas el dispositivo con progestágeno, la transferencias de embriones sin la detección de celo tuvo como resultado un total de 59.9% de tasa de preñez (Beal & Hinshaw, 2000).
Un experimento reciente examino el efecto de la adición de eCG en un protocolo a base de GnRH en receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus* con transferencia de embriones a tiempo fijo (Mayor et al., 2008). Las receptoras recibieron un dispositivo de progestágeno y GnRH al día 0, 400 UI de eCG al día 3 (1 día después al que se esperaba tendría la onda folicular emergente), PGF y retiro del dispositivo al día 7, una segunda dosis de GnRH al día 9 y la TETF al día 16. El numero de receptoras seleccionadas/tratadas, las tasas de concepción y las tasas de preñez fueron mayores que las del grupo control, en el cual eran tratadas con un tratamiento similar pero sin eCG al día 3.
En resumen, los resultados de estos estudios indicaron que las tasas de preñez aceptables pueden conseguirse por medio de IATF o TETF sin la necesidad de la detección de celo en animales que han recibido tratamientos que sincronicen la onda folicular emergente y la ovulación. Además, la administración de eCG en el tiempo esperado para la onda folicular emergente en las receptoras, o al momento del retiro del dispositivo, en cierta clase de animales a ser inseminados, se ha demostrado aumenta las tasas de preñez.

Manipulación de la onda folicular para la Superovulación

Tradicionalmente los protocolos de superovulación eran comenzados en la fase luteal media, aproximadamente entre el día 9 a 11 después del celo (Lindsell et al., 1986; Mapletoft y Pierson, 1993). Esto se debe a que en la mayoría de las vacas la segunda onda folicular comienza en promedio entre el día 9 y 10 del ciclo (Ginther et al., 1989). Sin embargo trabajos posteriores han demostrado que la respuesta superovulatoria es mayor cuando los tratamientos con gonadotropinas son iniciados en el momento exacto de la emergencia de la onda folicular, en vez de 1 o 2 días más tarde (Nasser et al., 1993; Adams et al., 1994). Por lo tanto, el tratamiento convencional tiene dos inconvenientes: 1) requiere tener personal entrenado y dedicado a la detección de los celos y una respuesta 100% efectiva a la pre-sincronización de todas las donantes para tener el llamado “celo Base” y 2) desde el punto de vista práctico, es imposible tener a todas las donantes a ser superestimuladas al inicio de una onda folicular el día que elegimos comenzar con la aplicación de la gonadotrofina.
En la década del 90 se desarrollaron tratamientos con progestágenos y esteres de estradiol, que inducen la atresia de todos los folículos y el comienzo de una nueva onda folicular 4 días después (Bó et al, 1994b; 1995; 1996). Este tratamiento es utilizado por

muchos profesionales alrededor del mundo (Beal, 1999; Mapletoft et al., 2000; Bó et al., 2006; Baruselli et al., 2006), pero su uso ha sido restringido recientemente en países como USA, Nueva Zelandia y los de la Unión Europea, lo cual deja a muchos profesionales que realizan transferencia de embriones en un serio dilema.

Esto creó la necesidad de desarrollar tratamientos que sincronicen el comienzo de una nueva onda folicular que no utilicen esteres de estradiol. Un método alternativo ya descrito hace tiempo consiste en eliminar, por punción guiada por ultrasonografía, todos los folículos ≥5 mm y de esta manera, inducir una nueva onda folicular, aproximadamente 1,5 días después (Bergfelt et al., 1994). De esta manera se puede comenzar la superovulación uno o dos días después de la ablación del folículo dominante (Beal, 1999; Bungarts y Niemann, 1994; Kim et al., 2001) ó de todos los folículos presentes en el ovario (Bergfelt et al., 1997). El inconveniente que tiene este método es que hay que contar con un equipo de ultrasonografía y personal capacitado para realizar dicho trabajo, lo que hace que esta tecnología se adapte más a centros de producción de embriones, donde todas la donantes se encuentran concentradas en un solo lugar, que a la superovulación a campo, en establecimientos de productores.

Otra alternativa es la utilización de GnRH o pLH para inducir la ovulación del folículo dominante (Macmillan y Thatcher, 1991) y así tener el inicio de una nueva onda folicular 1,5 a 2 días después (Pursley et al., 1995); pero el comienzo de la onda es sincronizado solamente cuando el tratamiento resulta en ovulación del folículo dominante (Martinez et al., 1999). En vacas lecheras, los primeros trabajos con esta temática reportaron tasas de ovulación del folículo dominante del 85% después de la administración de GnRH (Pursley et al., 1995), pero otros más recientes (Colazo et al. 2007b) reportaron un promedio de ovulación de 62,4% después de la administración de LH porcina y un 44,3% cuando se trataron con GnRH ($P< 0.01$). Otro estudio mostró un promedio de ovulación de 78% y 56% en vaquillonas tratadas con LH porcina o GnRH, respectivamente (Martinez et al., 1999). La incidencia de ovulación en respuesta a la GnRH o LH en vacas de carne parecen ser similares a las vaquillonas (aproximadamente 60%, Colazo et al., 2007a). Por esta razón, los tratamientos con GnRH antes de la superestimulación han resultado en menores respuestas superovulatorias que los tratamientos iniciados luego de la aspiración folicular (Deyo et al., 2001). No obstante, en un estudio reciente (Wock et al., 2008), vacas lecheras (n=411) fueron superovuladas seguido del uso de GnRH o estradiol para sincronizar la emergencia de la onda folicular. Los animales tratados con GnRH recibieron un CIDR en días aleatorios del ciclo estral (Día 0), la GnRH fue inyectada el Día 3 y la superestimulación fue iniciada 48 h más tarde. Las otras donantes fueron superestimuladas 4 días después de la inserción de un CIDR y la administración 4 mg de estradiol-17β. El análisis de los datos no mostró diferencias significativas ($P>0,05$) entre los grupos tratados con estradiol ó GnRH en el número de ovocitos/embriones recuperados (9,8±0,6 vs. 9,7±0,7), ni en los grado 1 y 2 (4,7±0,4 vs. 4,5±0,4). Finalmente, en otro análisis retrospectivo de superovulaciones comerciales en vacas lecheras (Steel y Hasler, 2009), hubo un grupo de donantes (n=245) que recibieron GnRH 1,5 días después de la inserción de un CIDR y 60 h antes del inicio del tratamiento con FSH que tuvieron una respuesta (5,6±6,0 embriones transferibles) que no difirió de las de donantes tratadas con estradiol-17β (n=691; 6,1±6,2 embriones transferibles). Sin embargo, las donantes con estradiol-17β si tuvieron una respuesta mayor ($P<0,05$) que las de vacas iniciadas entre los Días 7 a 14 del ciclo estral (n=614; 5,3±5,5 embriones transferibles). Por lo tanto, estudios experimentales apropiadamente desarrollados y controlados eran necesarios para confirmar estos resultados.

Los tratamientos superestimulatorios también pueden ser comenzados en el momento de emergencia de la primera onda folicular en vacas (Nasser et al. 1993) y ovejas (Menchaca et al., 2002). Adams et al. (1994) reportaron además similares respuestas superovulatorias entre tratamientos iniciados en el momento de la emergencia de la primera o segunda onda folicular. El punto es determinar el momento de la ovulación con ultrasonografia o iniciar los tratamientos un día después del comienzo del celo.

Para evitar la necesidad de observar la expresión de celo de las donantes, Nasser et al. (2003) indujeron una ovulación sincrónica en vacas Nelore (*Bos indicus*) utilizando un protocolo de CIDR y benzoato de estradiol (EB), con la administración de pLH (Lutropin-V, Bioniche Animal Health, Canadá) 24 h después de retirado el CIDR. Los tratamientos superestimulatorios se iniciaron 24 h después de la pLH (en el momento esperado de la ovulación y consecuentemente la emergencia de la primera onda folicular). No hubo diferencias en el número de embriones transferibles en las vacas tratadas con CIDR cuando los tratamientos superestimulatorios fueron iniciados en el momento de emergencia de la primera onda folicular (8.0 ± 1.8) o 4 días después de la inyección de 2,5 mg de EB y 50 mg de progesterona (Grupo control: 6.6 ± 2.0); pero el número de embriones fue menor cuando las vacas fueron superestimuladas durante la primera onda pero sin la colocación de un CIDR durante el tratamiento (0.2 ± 0.2; $P<0.05$). Los resultados de este último grupo, sugieren que se requiere tener progesterona circulante para que los ovocitos tengan la capacidad de ser fertilizados y los embriones desarrollarse (Nasser, comunicación personal).

Recientemente, realizamos una serie de 5 experimentos con el objetivo general de desarrollar un protocolo de superovulación de la primera onda folicular, utilizando dispositivos con progesterona pero sin el uso de estradiol (Carballo et al., 2008a, 2008b, 2009, 2010). Para desarrollar este protocolo nos basamos en los trabajos que han demostrado que es posible aumentar la respuesta ovulatoria a la GnRH mediante la inducción de un folículo persistente con el uso de un CIDR por 7 a 10 días y $PGF_{2\alpha}$ en el momento de inserción del CIDR (Small et al., 2009). El protocolo resultante de estos trabajos (Figura 1), consiste en la inserción de un dispositivo con progesterona (Cue-Mate, Bioniche Animal Health, Canada) y una dosis de $PGF_{2\alpha}$ (en momentos no conocidos del ciclo estral de la donante), seguidos de una dosis de GnRH a los 7 días de la inserción del Cue-Mate. Esto resultó en una tasa de ovulación del folículo dominante del 89.2% y la ovulación ocurrió a las 37.5 ± 0.7 horas (Carballo Guerrero et al., 2009). Por lo tanto, se inician los tratamientos con Folltropin-V a las 36 horas de la GnRH. Las donantes reciben Folltropin-V en 8 dosis decrecientes cada 12 horas y por 4 días, $PGF_{2\alpha}$ con las dos últimas dosis de Folltropin-V y el dispositivo Cue-Mate es removido con la última aplicación de Folltropin-V. Todas las donantes reciben 12,5 mg de pLH, 24 horas después del retiro del Cue-Mate y son inseminadas 12 y 24 horas más tarde. Los embriones son colectados 7 días después de la aplicación de pLH. La respuesta superovulatoria y la calidad de los embriones no difirió de la obtenida con el tratamiento de superovulación utilizando EB+ P4 para sincronizar el desarrollo folicular (Carballo Guerrero et al., 2010; Tabla 3).

Tabla 3. Respuesta superovulatoria (media ± E.E.) de donantes de embriones Simmental pre-tratadas con Cue-Mates y una inyeccion de $PGF_{2\alpha}$ antes de la inducción de la ovulación (y sincronización de onda) con GnRH y donantes tratadas con Cue-Mates, P4 y EB para sincronizar la onda folicular (Adaptado de Carballo et al., 2010).

Grupos de tratamiento	N	Ovocitos/ Embriones	Ovocitos Fertilizados	Embriones Gr. 1 y 2	Embriones Gr. 1, 2 y 3
GnRH	14	11,5±1,7	9,3±1,5	7,2±1,5	7,7±1,6
EB + P4	14	14,5±2,8	9,4±2,3	5,6±1,5	6,8±1,7
Valor P		0,8033	0,9220	0,5416	0,8547

Estos datos demuestran que la superestimulación de la primera onda folicular puede ser empleada en grupos de donantes, independientemente del momento del ciclo estral en que se encuentren y sin afectar la respuesta superovulatoria, sin la necesidad del uso de estradiol para sincronizar la emergencia de la onda folicular. El tratamiento recomendado esta esquematizado en la Figura 1.

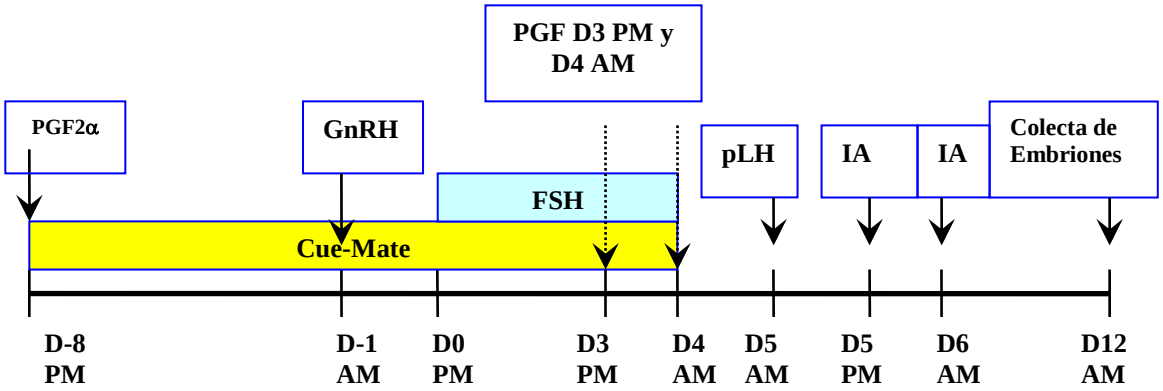


Figura 1. Tratamiento de sincronización de la ovulación para realizar la superestimulación durante la primera onda folicular en bovinos. Las donantes reciben un dispositivo liberador de progesterona (Cue-Mate) junto con una dosis de $PGF_{2\alpha}$ (Día -8) y una dosis de GnRH 7 días después (Día -1). En el Día 0 (36 h después de la GnRH) se comienza con el tratamiento con FSH en 8 dosis decrecientes administradas cada 12 h y por 4 días. Se administra $PGF_{2\alpha}$ con las dos últimas inyecciones de FSH y se retira el Cue-Mate con la última FSH. Luego se induce la ovulación con pLH a las 24 h de la remoción del Cue-Mate y las donantes son inseminadas 12 y 24 h después. Los embriones son colectados a los 7 días de la pLH.

Superovulación de vacas donantes utilizando una única dosis de FSH

Los tratamientos superestimulatorios tradicionales, constan de una aplicación intramuscular de gonadotropina coriónica equina (eCG) o dos aplicaciones diarias cada 12 h durante 4 días de extractos pituitarios que contienen FSH (Mapletoft et al., 1991). La eCG, es una glicoproteína que tiene una prolongada vida media (más de 40 h), lo que representa una ventaja desde el punto de vista práctico, dado que una sola aplicación es suficiente para provocar una apropiada estimulación ovárica (Schams et al., 1977; Murphy y Martinuk, 1991). Sin embargo, una prolongada estimulación con eCG provoca un incremento en la cantidad de folículos anovulatorios en el momento de la colecta de embriones (González et al., 1994a; 1994b). Contrariamente, la vida media de la FSH en la vaca es de 5 h (Laster, 1972; Demoustier et al., 1988) y por eso se

necesitan aplicaciones frecuentes para inducir una adecuada respuesta superovulatoria (Bellows et al., 1969; Monniaux et al., 1983). Tratamientos con dos aplicaciones diarias de FSH han demostrado mayor respuesta superovulatoria que tratamientos con una sola aplicación diaria (Looney et al., 1981; Monniaux et al., 1983; Walsh et al., 1993).
La necesidad de inyectar dos veces por día hace que el tratamiento requiera máxima atención y resulta a veces muy dificultoso de aplicar en algunos establecimientos, dificultando aun más la posibilidad de que esta técnica sea utilizada masivamente. Además, cuando el tratamiento es aplicado incorrectamente las vacas no responden, o si se las trata bruscamente puede causar estrés en algunas donantes, con la consiguiente disminución de la respuesta superovulatoria (Bó et al., 1991). Se ha reportado que el estrés por transporte disminuye la respuesta superovulatoria en vaquillonas (Edwards et al., 1987). Además, el estrés agudo repetido puede alterar el pico preovulatorio de LH (Stoebel y Moberg, 1982) y el uso de inyecciones de ACTH exógena, disminuyó significativamente la pulsatilidad de la LH (Ribadu et al., 2000). Estos informes sugieren que en el ganado bovino, el estrés puede influir en la eficiencia de los tratamientos superovulatorios en animales indóciles o no tan acostumbrados a pasar frecuentemente por la manga. El desarrollo de un tratamiento superovulatorio con una sola aplicación de FSH no sólo ahorra tiempo y mano de obra, sino que también podría disminuir el estrés en las donantes de embriones, además de aumentar la precisión de los tratamientos en las explotaciones que carecen de personal capacitado.
En un estudio realizado hace mas de 10 años, una sola dosis subcutánea de 400 mg NIH-FSH-P1 de Folltropin-V en vacas de carne con una buena condición corporal (>3 en una escala del 1 al 5), resultó en una respuesta superovulatoria equivalente al protocolo de tratamiento tradicional de dos aplicaciones al día durante 4 días (Bó et al., 1994a). Sin embargo, los resultados no se pudieron repetir en vacas Holstein, que tenían menos tejido adiposo subcutáneo (Hockley et al., 1992). En otro estudio realizado en vacas Holstein, la inyección única se dividió en dos, con un 75% de la dosis de Folltropin-V administrada por vía subcutánea en el primer día de tratamiento y el 25% restante fue administrado 48 horas después, cuando normalmente se administra la $PGF_{2\alpha}$ (Lovie et al., 1994). La respuesta superovulatoria a este tratamiento fue intermedia entre la obtenida con el protocolo tradicional (la mayor respuesta) y la obtenida con una sola dosis subcutánea (la menor respuesta). En un estudio realizado por Brogliatti et al. (1996) se confirmaron los resultados del experimento anterior.
Una opción alternativa para inducir una respuesta superovulatoria con una única inyección de FSH, sería combinarla con agentes que resultan en una liberación lenta y sostenible de la hormona durante varios días. Estos agentes, son denominados comúnmente polímeros. Existen polímeros de origen biológico o sintético con diferentes propiedades utilizados en la liberación de drogas. Estos compuestos son biodegradables y no reaccionan en el tejido, lo que facilita su uso en animales (Sutherland, 1991). Nosotros hemos realizado recientemente una serie de experimentos para evaluar la respuesta superovulatoria en donantes de embriones tratadas con una inyección única de Folltropin-V asociado con una formulación de liberación lenta (SRF, Bioniche Animal Health). Estos experimentos fueron realizados en donantes de varias razas de carne (Angus, Brangus, Bonsmara y Braford) para probar la efectividad de este protocolo.
En el Día 0, todas las vacas recibieron 5 mg de estradiol 17β, 50 mg de progesterona y un dispositivo Cue-Mate. El Día 4, las vacas fueron superestimuladas con dos tratamientos: las vacas del Grupo Control recibieron Folltropin-V en dosis decrecientes por vía intramuscular cada 12 h durante 4 días, mientras que las vacas del Grupo Dosis

Simple recibieron una dosis única de Folltropin-V diluida en 10 ml de SRF que fue aplicada por vía intramuscular en la tabla del cuello. En la mañana y la tarde del Día 6, todas las vacas recibieron $PGF_{2\alpha}$ y se retiró el Cue-Mate en la tarde del Día 6. En la mañana del Día 8 las vacas recibieron 12,5 mg de pLH y fueron inseminadas 12 y 24 h más tarde (Día 9). Las vacas que mostraron celo en la tarde del Día 7, fueron inseminadas en el momento de la pLH y 12 h más tarde. Se colectaron los embriones en el Día 15 y fueron clasificados siguiendo las normas de la IETS. En el Día de la colecta, las donantes recibieron $PGF_{2\alpha}$, para ser nuevamente tratadas entre 13 y 20 días después (30 a 40 días de intervalo entre colectas). En la Tabla 4 se muestran resumidos los resultados obtenidos de los 7 experimentos realizados. No se encontraron diferencias significativas en el número y calidad de los embriones obtenidos.

Tabla 4. Respuesta superovulatoria (media ± E.E.) en donantes de embriones tratadas con Folltropin-V administrada en 2 aplicaciones diarias durante 4 días (Control) o diluida en una solución de liberación lenta y administrada en una única aplicación (Dosis simple).

Grupos	N	Ovocitos/ Embriones Totales	Ovocitos Fertilizados	Embriones Gr. 1, 2 y 3
Control	175	12,1 ± 0,6	8,5 ± 0,5	6,4 ± 0,4
Dosis simple	178	11,6 ± 0,7	8,3 ± 0,5	6,5 ± 0,5
Valor P		0,107	0,2346	0,5117

Como se muestra en la tabla, los resultados permiten afirmar que este protocolo es viable y efectivo para superestimular donantes de razas de carne. De las dosis de Folltropin-V evaluadas para cada raza, la que más embriones transferibles produjo en las donantes Angus (n=150) fue 300 mg (versus 200 y 400 mg); en las Brangus (n=41) no hubo diferencias entre 260 y 300 mg (versus 200 mg) y en la raza Bonsmara (n=74), no hubo diferencias entre 200 o 300 mg. En la raza Braford, sólo se utilizo las dosis de 260 mg (n=14).

Superovulación con dos inyecciones de FSH (Tratamiento "Split")

Aunque la dosis simple de Folltropin-V diluido en SRF fue altamente eficaz en la inducción de la superovulación, se considero que la concentración de SRF utilizada es estos experimento era muy viscosa y el protocolo de dilución no tan fácil de utilizar por el personal de campo. Una reducción del 50% en la concentración de SRF fue mucho menos viscosa y más fácil de mezclar con Folltropin-V, pero una sola inyección intramuscular resultó en una menor respuesta superovulatoria, presumiblemente debido a una absorción más rápida. La media de tamaño de los folículos en el grupo 50% SRF fue similar a la de las vacas tratadas con 100% SRF en los días 4 (día de la inyección Folltropin V), 5 y 6, pero menor en los días 7 y 8, y mayor en los días 10 y 11, lo que sugiere que varios folículos no alcanzaron un tamaño ovulatorio y no ovularon después del estro. Especulamos que una inyección adicional de Folltropin-V en la preparación del 50%, 48 horas después de iniciar el tratamiento, podría estimular los folículos para continuar su crecimiento a un tamaño ovulatorio, como ocurrió en el grupo 100% SRF. En tres estudios con 54 superovulaciones en vacas Simmental, Brangus y Angus, dos inyecciones intramusculares de Folltropin-V en 50% SRF con 48

horas de diferencia indujo una respuesta superovulatoria y un número de embriones que no se diferenciaron de los obtenidos con los tratamientos de dos inyecciones por día, durante 4 días. Además, el número de folículos de tamaño ovulatorio en el día de la inseminación, no difirió entre los grupos. La solución al 50% SRF fue mucho más fácil de mezclar con Folltropin-V que el SRF 100% utilizado anteriormente, pero todavía tardó algún tiempo para que se mezcle bien. Especulamos que una preparación aún más diluida de la SRF también podría ser eficaz en un protocolo de dos inyecciones intramusculares (Tratamiento "Split"). Por lo tanto, se diseñó un experimento para comparar el Tratamiento Split de Folltropin-V diluido en 25% o 50% SRF, de dos inyecciones por día durante 4 días. Vacas de carne (17 Angus y 12 Simmental) fueron asignadas aleatoriamente a uno de los tres grupos de tratamiento para ser superstimuladas tres veces en un diseño cross-over. En el Día 0 (momento al azar del ciclo estral), las vacas recibieron un dispositivo intravaginal Cue-Mate y una inyección intramuscular de 5 mg de estradiol-17β y 50 mg de progesterona para sincronizar la emergencia de onda folicular. El Día 4, se iniciaron los tratamientos superstimulatorios. Se realizó la dilución de Folltropin-V con 20 mL de solución salina para las vacas en el grupo control o 10 mL de 25% o 50% SRF para las vacas de los tratamientos Split. Todas las vacas recibieron una dosis total de 300 mg Folltropin-V dividido en inyecciones intramusculares dos veces al día durante 4 días (Control), o como una inyección intramuscular de 200 mg (es decir, el 67% de la dosis total) el Día 4 y 100 mg Folltropin- V (es decir, el 33% de la dosis total) el Día 6 en el 25% o 50%, SRF, respectivamente. Se inyectó $PGF_{2\alpha}$ en el Día 6 AM y PM y los Cue-Mates fueron retirados en el Día 7 AM. Las vacas recibieron 12,5 mg Lutropin-V en el Día 8 AM y fueron inseminadas en el Día 8 PM y 9 AM. Aunque el número total estructuras (ovocitos y embriones) obtenido fue superior ($P < 0,05$) en las vacas tratadas con los Tratamientos Split (25% SRF: 14,3 ± 2,1 y 50% SRF: 14,4 ± 2,0) que en las del Grupo Control (10,2 ± 1,8), no hubo diferencias significativas entre los grupos en el número de óvulos fertilizados y embriones transferibles (Grupo control: 6,7 ± 1,3 y 4,0 ± 0,8), Grupo 25% SRF (9,3 ± 1,9 y 6,1 ± 1,3) y Grupo 50% SRF (8,9 ± 1,4 y 5,0 ± 0,9). Los datos fueron interpretados para sugerir que el tratamiento Split de Folltropin-V diluido en un 25% o 50% SRF resulta en una respuesta superovulatoria comparable a la del protocolo tradicional de dos inyecciones intramusculares por día, durante cuatro días.

EL FUTURO

Aun cuando no hay duda que la técnica más efectiva para la sincronización del crecimiento folicular y la ovulación va a ser desarrollada en el futuro, muchas de las herramientas que son necesarias ya existen. Una vez que se produce el crecimiento sincronizado de un folículo dominante competente, la ovulación puede ser inducida en un tiempo predecible por medio de la aplicación de hormonas que induzcan la liberación de LH, o por la administración de LH exógeno. Sin embargo, estas hormonas pueden ser derivados recombinantes, y ser más puras y con acción más especifica. Las técnicas moleculares pueden ser igualmente utilizadas para la identificación de genes y productos genéticos que controlen la ovulación (Duggavathi et al., 2008), o induzcan la cascada de eventos que generen la ovulación en un tiempo predeterminado. La mayor cuestión es probable que sea la sincronización de la emergencia de la onda folicular y el consistente, crecimiento del folículo ovulatorio.
El estradiol ha sido el tratamiento hormonal usado con mayor éxito en la sincronización de la onda folicular (revisado por Bó et al., 2002). Sin embargo, el uso del estradiol esta siendo prohibido por un gran número de países, de modo que hay que buscar

alternativas. El mecanismo de acción del estradiol pude ser a través de la FSH y tal vez de la LH, causando atresia del folículo seguido de la liberación sincronizada de FSH y la emergencia de la nueva onda folicular. De igual forma, el uso de GnRH o LH para la inducción de la ovulación, o la ablación del folículo para la remoción de los efectos supresores del folículo dominante sobre la FSH, resulta en aumento de la FSH y una nueva onda folicular en el tiempo posterior predictivo. Por lo tanto, la sincronización de la onda folicular emergente es control electivo a la liberación de FSH, la cual puede involucrar la manipulación ovárica (folicular) de vías metabólicas o mecanismos de feedback sobre el eje hipotálamo-hipofisiario.

Aunque el papel del la FSH en la regulación de la onda del desarrollo de los folículos ≥1 mm haya sido claramente definido (Adams et al., 1992a; Jaiswal et al., 2004), el papel de la FSH en el reclutamiento de pequeños folículos, incluyendo antrales pequeños y pre-antrales, permanece desconocido. A nivel celular, ambos folículos antrales pequeños y de tamaño mediano expresan receptores de FSH y tienen niveles similares de expresión en la base de las células de la granulosa (revisado en Bao and Garverick, 1998). La unión de la FSH a los folículos con una sola capa de células de la granulosa ha sido igualmente demostrada (Ginther et al., 2000), y aun cuando Wandji et al. (1992) sugirieron un sistema mensajero no funcional de adenilato ciclasa-secundario durante los estados tempranos de la foliculogenesis, el efecto promotor de crecimiento de la FSH en los folículos pre-antrales y antrales pequeños en vacas ha sido demostrado (Fricke et al., 1997; Tanaka et al., 2001; Itoh et al., 2002). Además, es probable que las dinámicas de desarrollo de los folículos menores mantenga un parámetro similar al de la onda, en respuesta a los aumentos periódicos de FSH endógeno (Adams et al., 2008). Por tanto, la inducción de la onda folicular puede ser simple como la administración exógena de FSH, o una hormona con actividad FSH. De hecho, Bó et al. (2008) demostraron que es posible la inducción de la superestimulación en la etapa del folículo dominante al aumentar el periodo de tratamiento de FSH, refiriéndose a ellos como “superestimulación de folículos subordinados”.

La secreción de inhibina-A ha sido reportada por ser uno de los mas importantes reguladores de la liberación de FSH durante el crecimiento inicial de folículos en vacas (Ginther et al. 2000; 2001; Mihm and Bleach 2003). Cuando el estradiol exógeno es administrado, los niveles de inhibina-A disminuyen rápidamente en asociación con la atresia folicular y resultan en un aumento en las concentraciones de FSH, a pesar de que las concentraciones de estradiol circulantes permanezcan elevadas (Mihm et al. 2001). Además, durante la regresión del folículo dominante de la primera onda, la FSH aumenta solo cuando las concentraciones de inhibina-A alcanzan el nadir, a pesar de que las concentraciones de estradiol hayan disminuido 2 días antes (Bleach et al. 2001). La inhibina-A es aparentemente un potente control de la liberación de FSH, e inhibinas preparadas comercialmente o sus bloqueadores pueden ser herramientas poderosas para el control exógeno de la dinámica folicular.
Recientemente, Van Steelandt et al. (2008) reportaron que el factor inductor de la ovulación aislado del plasma seminal de los camélidos, tiene una habilidad única para inducir atresia del folículo dominante en vacas y como consecuencia, la emergencia de una nueva onda folicular. Aunque el mecanismo de acción sea desconocido, el componente activo puede proveer los factores necesarios para manipular la dinámica folicular en varias especies. No hay un aparente efecto en la secreción de FSH, sugiriendo que tiene un efecto directo sobre la función ovárica. Los productos farmacológicos que afectan los mecanismos metabólicos esteroides dentro del ovario pueden igualmente ser útiles para influenciar el crecimiento o atresia de los folículos;

como son los disruptores endócrinos (Rhind, 2008) o los inhibidores esteroideos (Cohen et al., 2002).
La biología molecular puede direccionarnos a otros factores que influencien la dinámica folicular. Por ejemplo, las comparaciones de los niveles de expresión del ARNm de las células de la granulosa entre dos folículos de gran tamaño dentro de una onda folicular va a permitir la identificación de un número conocido de diferenciación de genes. Genes que no han sido previamente asociados con la función ovárica bovina, se ha igualmente demostrado que se pueden estimular ("regular hacia arriba" o "upregulate") en el momento de la dominancia folicular, y jugar un papel importante en la función de folículos normales (Mihm et al. 2008). La manipulación externa de estos genes o sus productos puede potencialmente ser usado para afectar la atresia de los folículos o la emergencia de la onda.
Se ha demostrado recientemente que otros factores tales como la proteína-4 morfogenéticas ó sea (BMP-4) está involucrada en la transición de folículos del pool primordial al pool de folículos primarios en crecimiento (Tanwar et al., 2008). Reddy et al. (2008) reportaron que la fosfatidil inositol 3-kinasa (PI3K) es una vía de los ovocitos que puede cumplir un papel importante en la activación regular de los folículos primordiales y que la fosfatasa del ovocito y la tesina homologa (PTEN) sirven como supresores en este proceso. Los genes y los productos genéticos asociados con la función ovárica están comenzando a ser identificados; las herramientas para un control preciso de la función ovárica y del crecimiento folicular y selección pueden estar próximamente a nuestro alcance.

REFERENCIAS

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, Bó 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, Bó GA. 2004. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. Anim Reprod Sci, 82/83:479-486.

Baruselli, P.S., Sá Fhilo, M., Matins, C.M., Nasser, L.F., Nogueira, M.F.G., Barros, C.M., and Bó, G.A. 2006. Superovulation and embryo transfer in Bos Indicus cattle. Theriogenology 65,77-88

Beal W.B. 1999. Practical application of ultrasound in bovine embryo transfer. 18th Annual Convention AETA, Colorado Springs, CO, USA, pp. 66-77.

Beal W.B. 1999. Streamlining embryo transfer. Proceedings 18th Annual Convention AETA, Colorado Springs, CO, USA, pp 78-85.

Beal W.E and Hinshaw, R.H. 2000. Synchronization of estrus and ovulation in bovine embryo transfer recipients AABP.

Bellows R.A., Anderson, D.C., and Short, R.E. 1969. Dose-response relationships in synchronized beef heifers treated with follicle stimulating hormone. J. Anim. Sci. 28, 638-644.

Beggs DS, Kelly JK. 2010. The effect of eCG given as part of an ovsynch protocol in a whole herd synchrony program on a seasonal calving herd in Victoria. 8th International Ruminant Reproduction Symposium, Anchorage, Alaska, September 3 to 7, 2010 abstract.

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

Bergfelt D.R., Bó, G.A., Mapletoft, R.J., and Adams, G.P. 1997. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence in cattle. Anim. Reprod. Sci. 49, 1-12.

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.

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

Bó G.A., Hockley, D.K., Nasser, L.F., and Mapletoft, R.J. 1994. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. Theriogenology 42, 963-975.

Bó 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.

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

Bó G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., and Mapletoft, R.J. 1996. Effect of progestogen plus estradiol-17β treatment on superovulatory response in beef cattle. Theriogenology 45, 897-910.

Bó 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 G.A., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R.J., Tríbulo, H. 2004a. Transferencia de embriones a tiempo fijo: tratamientos y factores que afectan los índices de preñez. Taurus, 21:25-40.

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

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 G.A., Baruselli, P.S., Chesta, P., and Martins, C.M. 2006. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. Theriogenology 65,89-101.

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 G.A., Carballo Guerrero, D., and Adams, G.P. 2008. Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. Theriogenology 69, 81-87

Brogliatti G., Bó, G.A., Alísio, L., Martinez, M., Palasz, A., and Mapletoft, R.J. 1996. Efecto de la dosis y la vía de administración de Folltropin en la superestimulación de vacas Holstein. II Simposio Internacional de Reproducción Animal, 31 oct. – 2 nov. Carlos Paz, Córdoba, Argentina. pp. 248 abstract

Bryan AM, Bó GA, Heuer C., Emslie FR. 2010. The use of equine chorionic gonadotrophin in synchronized AI of seasonal breeding, pasture-based, anestrous dairy cattle. Reproduction, Fertility and Development, 22, 126–131.

Caccia M, Bó GA. 1998. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef heifers with estradiol benzoate and progesterone. Theriogenology, 49:341 abstract.

Carballo Guerrero D., Tríbulo, A., Tríbulo R., Tríbulo, H., and Bó G.A. 2009. Superovulatory response in beef cattle treated during the first follicular wave following synchronization of ovulation with a progestin device and GnRH. Reprod. Fertil. Dev. 21, 242-243.

Carballo Guerrero D., Tríbulo, A., Tríbulo R., Tríbulo, H., and Bó G.A. 2010. Superovulatory response in beef donors treated during the first follicular wave or four days after progesterone and estradiol administration. Reprod. Fertil. Dev. 22, 358.

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 M.G., Ambrose, D.J., and Mapletoft, R.J. 2007. Pregnancy rates to timed-AI in dairy cows treated with pLH or GnRH. J Dairy Sci, 90, 328 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 develpment, concentrations of estradiol-17B and progesterone, and LH release during an artificially lengthened bovine estrous cycle. J Anim Sci, 72:1282-1289.

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

Demoustier J.M., Beckers, J.F., Van Der Zwalmen, P., Closset, J., Gillard, J., and Ectors, F.R. 1988. Determination of porcine plasma Folltropin-V levels during superovulation treatment in cows. Theriogenology 30, 379-386

Deyo C.D., Colazo, M.G., Martinez, M.F., and Mapletoft, R.J. 2001. The use of GnRH or LH to synchronize follicular wave emergence for superstimulation in cattle. Theriogenology 55, 513 abstract.

Duggavathi Rajesha, Volle David H, Mataki 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.

Edwards L.M., Rahe, C.H., Griffin, J.L., Wolfe, D.F., Marple, D.N., and Cummins, K.A. 1987. Effect of transportation stress on ovarian function in superovulated Hereford heifers. Theriogenology 28, 291–9.

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.

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.

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 O.J., Kastelic, J.P, and Knopf, L. 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular wave. J. Reprod Fertil. 87, 223-230.

Ginther OJ, Beg MA, Bergfelt DR, Donadeu FX, Kot K. 2001. Follicle Selection in Monovular Species. Biol Reprod, 65:638-647.

Ginther OJ, Bergfelt DR, Kulick LJ, Kot K. 2000. Selection of the dominant follicle in cattle: role of estradiol. Biol Reprod, 63:383-389.

González A., Wang, H., Carruthers, T.D., Murphy, B.D., and Mapletoft, R.J. 1994a. Increased ovulation rates in PMSG-Stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. Theriogenology 41, 1631-1642

González A., Wang, H., Carruthers, T.D., Murphy, B.D., and Mapletoft, R.J. 1994b. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotropin: Effects of dose and antipregnant mare serum gonadotropin serum. Can Vet J, 35: 158-162

Hansel W, Malven PV, Black DL. 1961. Estrous cycle regulation in the bovine. J Anim Sci, 20:621-625.

Hockley D.K., Bó G.A., Palasz A.T., Del Campo M.R., Mapletoft R.J. 1992. Superovulation with a single subcutaneous injection of Folltropin in the cow: Effect of dose and site of injection. Theriogenology 37, 224 abstract.

Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H. 2002. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preanatral 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.

Jaiswal, R.S., Singh, J., and Adams, G.P. 2004 Developmental pattern of small antral follicles in the bovine ovary. Biol. Reprod. 71,1244-1251.

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, 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, 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.

Kim H.I., Son, D.S., Yeon, H., Choi, S.H., Park, S.B., Ryu, I.S., Suh, G.H., Lee, D.W., Lee, C.S., Lee, H.J., and Yoon, J.T. 2001. Effect of dominant follicle removal before superovulation on follicular growth, ovulation and embryo production in Holstein cows. Theriogenology 55, 937-945.

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.

Laster D.B. 1972. Disappearance of and uptake of (125I) FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. J. Reprod. Fertil., 30, 407-415.

Licht P., Bona Gallo, A., Agarwal, B.B., Farmer, S.W., Castellino, J.B., and Papkoff, H. 1979. Biological and binding activities of equine pituitary gonadotrophins and pregnant mare serum gonadotrophin. J. Endocrin., 83, 311-322.

Lindsell C.E., Murphy, B.D., and Mapletoft, R.J. 1986. Superovulatory end endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. Theriogenology 26, 209-219.

Looney C.R., Boutle, B.W., Archibald, L.F., and Godke, R.A. 1981. Comparison of once daily FSH and twice daily FSH injections for superovulatin, 0 beef cattle. Theriogenology 15, 13-22.

Lovie M., García, A., Hackett, A., and Mapletoft, R.J. 1994. The effect of dose schedule and route of administration on superovulatory response to fooltropin in holstein cows. Theriogenology 41, 241.

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, R.J., and Pierson, R.A. 1993. Factors affecting superovulation in the cows: practical considerations. IETS Embryo Transfer Newsletter, 11: 14-24.

Mapletoft R.J., Bo, G.A., and Murphy, B.D. 1991. The effect of biological activity of gonadotropins on superovulation in the cow. Proc IX Congreso Brasileiro de Reproducao Animal 1, pp. 74-92.

Mapletoft R.J., and Pierson, R.A. 1993. Factors affecting superovulation in the cows: practical considerations. IETS Embryo Transfer Newsletter, 11: 14-24.

Mapletoft R.J., Bó, G.A., and Adams, G.P. 2000. Advances in the manipulation of donor cow and recipient estrus cycles in bovine embryo transfer programs. Arq. Fac. Vet. UFRGS, Porto Alegre, 28 pp. 23-48.

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, Bergfelt 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, Bergfelt 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.

Martínez 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.

Martínez 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, Bó 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.

Menchaca A., Pinczak, A., Rubianes, E. 2002 Follicular recruitment and ovulatory response to FSH teratment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. Theriogenology 58, 1713-1721.

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

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., and Evans, A.C.O. 2008. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. Reprod Dom Anim, 43: 48-56.

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 PGF2a products: Implication for AI programs for dairy cattle. Proceedings of X International Congress on Animal Reproduction, 3:336 abstract.

Monniaux, D., Chupin, D., and Saumande, J. 1983. Superovulatory responses of cattle. Theriogenology 19, 55-81.

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.

Murphy B.D., and Martinuk, D. 1991. Equine Chorionic Gonadotropin. Endocrine Reviews 12, 27-44.

Nasser L, Adams GP, Bó GA, Mapletoft RJ. 1993. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. Theriogenology, 40:713-724.

Nasser LF, Reis EL, Oliveira AM, Bó 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.

Nasser L.F., Bó, G.A., Reis, E.L., Menegati, J.A., Marques, M.O., Mapletoft, R.J., and Baruselli, P.S. 2003. Superovulatory response during the first follicular wave in Nelore (Bos indicus) donors. Theriogenology 59, 530 Abstract.

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 PGF2α and GnRH. Theriogenology, 44: 915-923.

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.

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

Rhind SM. 2008. Endocrine disruptors and other food-contaminating environmental pollutants as risk factors in animal reproduction. Reprod Dom Anim, 43:15-22.

Ribadu A.Y., Nakada, K., Moriyoshi, M., Zhang, W.C., Tanaka, Y., and Nakao, T. 2000. The role of LH pulse frequency in ACTH-induced ovarian follicular cysts in heifers. Anim. Reprod. Sci. 64, 21–31.

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.

Schams D., Menzer, D., Schalenberger, E., Hoffman, B., Hahn, J., and Hahn, R. 1977. Some studies of the pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle. In: Control of Reproduction in the Cow. Sreenan JM (ed.), Martinus Nijhoff: The Hague. pp.122-142.

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.

Small, J.A., Colazo, M.G., Kastelic, J.P., and Mapletoft, R.J. 2009. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. Theriogenology 71, 698–706.

Souza AH, Viechnieski S, Lima FA, Silva FF, Araujo R, Bo GA, Wiltbank MS, Baruselli PS. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. 72:10-21.

Steel RG, Hasler JF. 2009. Comparison of three different protocols for superstimulation of dairy cattle. Reprod. Fertil. Dev. 21, 246 abstract.

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.

Stoebel, D.P., and Moberg, G.P. 1982. Repeated acute stress during the follicular phase and luteinizing hormone surge of dairy heifers. J. Dairy Sci., 65:92–6.

Stroud B. and Hasler, J.F. 2006. Dissecting why superovulation and embryo transfer usually work on some farms but not on others. Theriogenology, 65:65-76.

Sutherland W. 1991. Biomaterials – Novel material from biological sources. Ed. By Byrom, D- Published by Stockton Press, pp 307-333.

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.

Walsh J.H., Mantovani, R., Duby, R.T., Overstrom, E.W., Dobrinsky, J.R., Enright, W.J., Roche, J.F., and Boland, M.P. 1993. The effects of once or twice daily injections of p-FSH on superovulatory response in heifers. Theriogenology 40, 313-321.

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 F2α 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.

Wock J.M., Lyle L.M., Hockett, M.E. 2008. Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradiol-17β at the beginning of a superstimulation protocol on superovulatory response and embryo quality. Reprod. Fertil. Dev. 20, 228 abstract.

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

EFFECT OF PROGESTERONE ON EMBRYO DEVELOPMENT AND PREGNANCY MAINTENANCE IN CATTLE

Patrick Lonergan

School of Agriculture, Food Science and Veterinary Medicine, College of Life Sciences, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland, pat.lonergan@ucd.ie

INTRODUCTION

Poor reproductive efficiency is a worldwide problem affecting the dairy industry and has been the subject of numerous excellent recent reviews (e.g., Lucy 2001, Inskeep & Dailey 2005, Leroy *et al.* 2008a,b, Inskeep & Dailey 2010). While in some locations this situation is exacerbated by problems of heat stress in summer (Hansen 2007), even in more moderate climates a steady decline in fertility has been noted. There is substantial evidence for an association between high milk production and the lower conception rate observed in cows (25-40%) compared to heifers (60-75%) (Sreenan & Diskin 1986, Pursley *et al.* 1997, Lucy 2001, Diskin & Morris 2008). However, whether the decline in fertility is due directly to the level of milk production or other factors associated with lactation is unclear (Chebel *et al.* 2008). Infertility in dairy cattle is a multifactorial problem which may be linked to various checkpoints along the developmental axis including suboptimal follicle development associated with poor oestrus exhibition, suboptimal oocyte quality, altered sperm transport and fertilization and/or a suboptimal reproductive tract environment incapable of supporting normal embryo development. One of the obstacles to achieving a better understanding of the causes of poor fertility is the difficulty in separating these various issues from each other. For example, while the proportion of pregnancies after AI declined in past 50 years, there has been little change in the average number of oocytes/embryos and transferable embryos produced in embryo transfer (ET) programmes in USA/Canada; furthermore, there has been little change in the proportion of animals that become pregnant following ET over a period of approximately 30 years (Hasler 2006). However, what seems clear is that the majority of embryo loss occurs quite early during pregnancy, before maternal recognition (Diskin & Morris 2008).

THE ROLE OF PROGESTERONE IN PREGNANCY MAINTENANCE

The steroid hormone progesterone plays a key role in the reproductive events associated with pregnancy establishment and maintenance. High concentrations of circulating progesterone in the immediate post-conception period have been associated with an advancement of conceptus elongation, an associated increase in interferon-tau production and higher pregnancy rates in cattle (Mann & Lamming 1999, Mann & Lamming 2001, Stronge *et al.* 2005, McNeill *et al.* 2006, Carter *et al.* 2008, Forde *et al.* 2009) and sheep (Ashworth *et al.* 1989, Satterfield *et al.* 2006).

The effects of elevated progesterone shortly after conception on the advancement of conceptus elongation have been convincingly demonstrated in cattle and sheep. Garrett *et al*. (1988) administered 100 mg progesterone on Days 1, 2, 3 and 4 of pregnancy which resulted in an increased peripheral plasma progesterone concentration on Days 2 to 5 and significantly larger conceptuses on Day 14. Using a progesterone implant on Day 3 of pregnancy, Carter *et al*. (2008) significantly elevated progesterone

concentrations until Day 8 and this was associated with a larger conceptus recovered at slaughter on Day 16. Similarly, when ewes received daily injections of 25 mg progesterone from 36 h postmating, blastocyst diameter increased by 220% on Day 9 and the time of elongation of blastocysts to a filamentous conceptus on Day 12 was advanced (Satterfield *et al.* 2006); these effects of progesterone treatment on blastocyst development were blocked by administration of RU486, a progesterone receptor antagonist.

From the above, it is clear that the concentration of circulating progesterone has an effect on the developing embryo. This effect is likely as a result of downstream effects of progesterone-induced changes in gene expression in the tissues of the uterus (Bauersachs *et al.* 2006, Satterfield *et al.* 2006, Forde *et al.* 2009) resulting in changes in the composition of histroph to which the developing embryo is exposed. The importance of histotroph for conceptus development was demonstrated in the uterine gland knockout (UGKO) model in sheep in which embryos fail to develop beyond the blastocyst stage in adult UGKO ewes (Spencer *et al.* 2007).

In a series of recent experiments using in vitro and in vivo models we addressed the issue of whether the effects of progesterone on conceptus elongation could be due, at least in part, to a direct effect of progesterone on the embryo (Clemente *et al.* 2009). Progesterone receptor mRNA was present at all stages of embryo development raising the possibility of a direct effect of progesterone on the embryo. Exposure to progesterone in vitro in the absence or presence of oviduct epithelial cells did not affect the proportion of embryos developing to the blastocyst stage, blastocyst cell number or the relative abundance of selected transcripts in the blastocyst. Furthermore, exposure to progesterone in vitro did not affect post-hatching elongation of the embryo following transfer to synchronised recipients and recovery on Day 14. In contrast, transfer of in vitro derived blastocysts to a uterine environment previously primed by elevated progesterone resulted in a 4-fold increase in conceptus length on Day 14. These data provide clear evidence to support the hypothesis that progesterone-induced changes in the uterine environment are responsible for the advancement in conceptus elongation reported previously in cattle and that, interestingly, the embryo does not need to be present during the period of high progesterone in order to exhibit advanced elongation. This is consistent with the fact that administration of progesterone early in the oestrous cycle can advance uterine receptivity for the transfer of older asynchronous embryos (Geisert *et al.* 1991). Furthermore, induction of a low progesterone environment by repeated administration of a PGF2α analogue resulted in retarded embryo development on Day 14 (Beltman *et al.* 2009; Forde *et al.* 2010).

Most of these bovine data on the role of progesterone have been generated in nonlactating beef heifers; there are few if any published reports of endometrial gene expression in the lactating dairy cows despite evidence for suboptimal progesterone concentrations in such animals and evidence for increased progesterone metabolism in the liver (Sangsritavong *et al.* 2002). The critical involvement of oestradiol and progesterone in almost every aspect of reproductive physiology makes changes in steroid metabolism an attractive explanation for the numerous changes in reproduction in lactating dairy cows. Similar data on endometrial function in the dairy cow would aid our understanding of factors associated with embryonic mortality. In a recent study, we hypothesized that part of the difference in fertility between heifers and post partum lactating dairy cows could be explained by differences in the ability of the reproductive tract (oviduct and uterus) to support early embryo development and that this would be related to circulating progesterone concentration. Using endoscopy, we transferred 1800 in vitro produced embryos to the oviducts of nulliparous Holstein-Friesian heifers and post partum lactating Holstein-Friesian cows and assessed their development to

the blastocyst stage following recovery on Day 7 (Rizos *et al.* 2010). Recovery rate was lower from cows (57%) compared to heifers (79%) and of the structures recovered only 18% had developed to the blastocyst stage in cows compared to 34% in heifers, providing evidence for an impairment in the ability of the reproductive tract of the post partum cow to support embryo development. In addition, circulating progesterone concentrations were lower in lactating dairy cows than in heifers.

SUPPLEMENTATION OF ENDOGENOUS PROGESTERONE

A number of treatments can be used to increase peripheral concentrations of progesterone after AI including those that increase endogenous function of the existing CL, induce accessory CL, or supplement progesterone directly (see reviews by Lamb *et al.* 2010, Binelli *et al.* 2001, Inskeep 2004). However, data on outcome in terms of pregnancy rate are often conflicting and may reflect timing of treatment as well as the fact that only a proportion of animals with inherently low progesterone may benefit from such treatment. Stevenson *et al.* (2007) assessed effects of a variety of interventions after AI on fertility including administration of GnRH, hCG or an intravaginal progesterone-releasing device (CIDR). GnRH and hCG effectively induced ovulation and increased CL number but only increased circulating progesterone concentrations in hCG-treated cows. Treatment with a CIDR or Human Chorionic Gonadotrophin (hCG) increased conception rate but only in some herds.
Administration of hCG (Breuel et al 1989; Price and Webb 1989; Walton et al 1990; Howard and Britt 1990; Rajamahendran and Sianangama 1992; Fricke et al., 1993; Schmitt et al., 1996ab; Stevenson *et al.* 2007; Santos *et al.* 2001; Kerbler *et al.* 1997), GnRH (Webb et al 1992; Stevenson *et al.* 2007; Schmitt *et al.* 1996) or a GnRH agonist (Schmitt et al., 1993) between Day 4 and 7 of the estrous cycle induced ovulation of the first wave dominant follicle and formation of a functional CL. Plasma concentrations of P4 of hCG-treated heifers were greatly increased compared to those of GnRH agonist-treated heifers (Schmitt et al 1993). Administration too early (Day 0 or Day 1) failed to induce accessory CL formation or an increase in P4 (Breuel *et al.* 1989; Morris *et al.* 1976). A single injection of hCG on Day 10-12 after AI failed to improve pregnancy rate (63% 64/101 vs 59% 58/99) (Eduvie and Sequin 1982). In another study, treatment on Day 5 with a GnRH agonist (8 ug Buserelin) or hCG (3000 IU) was equally effective in inducing an accessory CL (93%) but subsequent increase in P4 was greater in hCG-treated heifers (Schmitt et al 1996). However, induction of an accessory CL with hCG on Day 5 or 6 after AI did not increase pregnancy rates in heifers (n=243) or lactating dairy cows (n=201) (Schmitt et al., 1996).

CONCLUSION

Many factors are likely to impact on the success or otherwise of pregnancy. It is clear that both maternal factors (e.g., oocyte quality, reproductive tract environment) and the inherent quality of the embryo can have a strong influence on the likelihood of embryo survival. The issue of progesterone supplementation in the period immediately after AI in order to optimize the uterine environment in which the embryo will develop requires further study, especially with regard to the timing of administration as well as the identification of animals which may have inherently low progesterone concentrations and which may therefore benefit from such supplementation.

ACKNOWLEDGEMENTS

The author's work is supported by Science Foundation Ireland (07/SRC/B1156).

REFERENCES

Ashworth CJ, Sales DI & Wilmut I 1989 Evidence of an association between the survival of embryos and the periovulatory plasma progesterone concentration in the ewe. *J Reprod Fertil* **87** 23-32.

Bauersachs S, Ulbrich SE, Gross K, Schmidt SE, Meyer HH, Wenigerkind H, Vermehren M, Sinowatz F, Blum H & Wolf E 2006 Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. *Reproduction* **132** 319-331.

Beltman ME, Roche JF, Lonergan P**, Forde N, Crowe MA 2009** Evaluation of models to induce low progesterone during the early luteal phase in cattle. *Theriogenology* **72** 986-992.

Binelli M, Thatcher WW, Mattos R & Baruselli PS 2001 Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology* **56** 1451-1463.

Breuel KF, Spitzer JC & Henricks DM 1989 Systemic progesterone concentration following human chorionic gonadotropin administration at various times during the estrous cycle in beef heifers. J Anim Sci **67** 1564-1572.

Carter F, Forde N, Duffy P, Wade M, Fair T, Crowe MA, Evans AC, Kenny DA, Roche JF & Lonergan P 2008 Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. *Reprod Fertil Dev* **20** 368-375.

Chebel RC, Demetrio DG & Metzger J 2008 Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology* **69** 98-106.

Clemente M, de La Fuente J, Fair T, Al Naib A, Gutierrez-Adan A, Roche JF, Rizos D & Lonergan P 2009 Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction* **138** 507-517.

Diskin MG & Morris DG 2008 Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod Domest Anim* **43 Suppl 2** 260-267.

Eduvie LQ & Seguin BE 1982 Corpus luteum function and pregnancy rate in lactating dairy cows given human chorionic gonadotropin at middiestrus. Theriogenology **17** 415-22.

Forde N, Carter F, Fair T, Crowe MA, Evans ACO, Spencer TE, Bazer FW, McBride R, Boland MP, O'Gaora P, Lonergan P & Roche JF 2009 Progesterone-regulated changes in endometrial gene expression contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biol Reprod* **81** 784-794.

Forde N, Beltman ME, Duffy G, Duffy P, Roche JF, Lonergan P, Crowe MA 2010 Low circulating progesterone results in a suboptimal endometrial gene expression signature and negatively affects conceptus elongation in cattle. *Biol Reprod* (in press).

Fricke PM, Reynolds LP & Redmer DA 1993 Effect of human chorionic gonadotropin administered early in the estrous cycle on ovulation and subsequent luteal function in cows. J Anim Sci **71** 1242-1246.

Garrett JE, Geisert RD, Zavy MT & Morgan GL 1988 Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. *J Reprod Fertil* **84** 437-446.

Geisert RD, Morgan GL, Zavy MT, Blair RM, Gries LK, Cox A & Yellin T 1991 Effect of asynchronous transfer and oestrogen administration on survival and development of porcine embryos. *J Reprod Fertil* **93** 475-481.

Hansen PJ 2007 Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. *Theriogenology* **68 Suppl 1** S242-249.

Hasler JF 2006 The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. *Theriogenology* **65** 4-16.

Howard HJ & Britt JH 1990 Prostaglandin F-2 alpha causes regression of an hCG-induced corpus luteum before day 5 of its lifespan in cattle. J Reprod Fertil **90** 245-253.

Inskeep EK 2004 Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *J Anim Sci* **82 E-Suppl** E24-39.

Inskeep EK & Dailey RA 2005 Embryonic death in cattle. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **21** 437-461.

Inskeep EK & Dailey RA 2010 Maximizing embryonic and early foetal survival in dairy cattle. *WCDS Advances in Dairy Technology* **22** in press.

Kerbler TL, Buhr MM, Jordan LT, Leslie KE & Walton JS 1997 Relationship between maternal plasma progesterone concentration and interferon-tau synthesis by the conceptus in cattle. Theriogenology **47** 703-714.

Lamb GC, Dahlen CR, Larson JE, Marquezini G & Stevenson JS Control of the estrous cycle to improve fertility for fixed-time artificial insemination in beef cattle: a review. *J Anim Sci* **88** E181-192.

Leroy JL, Opsomer G, Van Soom A, Goovaerts IG & Bols PE 2008a Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part I. The importance of negative energy balance and altered corpus luteum function to

the reduction of oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim* **43** 612-622.

Leroy JL, Van Soom A, Opsomer G, Goovaerts IG & Bols PE 2008b Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. *Reprod Domest Anim* **43** 623-632.

Lucy MC 2001 Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci* **84** 1277-1293.

Mann GE & Lamming GE 1999 The influence of progesterone during early pregnancy in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* **34** 269-274.

Mann GE & Lamming GE 2001 Relationship between maternal endocrine environment, early embryo development and inhibition of the luteolytic mechanism in cows. *Reproduction* **121** 175-180.

McNeill RE, Diskin MG, Sreenan JM & Morris DG 2006 Associations between milk progesterone concentration on different days and with embryo survival during the early luteal phase in dairy cows. *Theriogenology* **65** 1435-1441.

Morris LM, Gonzalez-Padilla E, Niswender GD & Wiltbank JN 1976 Peripheral progesterone levels in pregnant and non-pregnant heifers following use of HCG. Theriogenology **6** 367-78.

Price CA & Webb R 1989 Ovarian response to hCG treatment during the oestrous cycle in heifers. J Reprod Fertil **86** 303-308.

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

Rizos D, Carter F, Besenfelder U, Havlicek V & Lonergan P 2010 Contribution of the female reproductive tract to low fertility in postpartum lactating dairy cows. *J Dairy Sci* **93** 1022-1029.

Sangsritavong S, Combs DK, Sartori R, Armentano LE & Wiltbank MC 2002 High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. *J Dairy Sci* **85** 2831-2842.

Santos JE, Thatcher WW, Pool L & Overton MW 2001 Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. J Anim Sci **79** 2881-2894.

Satterfield MC, Bazer FW & Spencer TE 2006 Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. *Biol Reprod* **75** 289-296.

Schmitt EJ, Diaz T, Barros CM, de la Sota RL, Drost M, Fredriksson EW, Staples CR, Thorner R & Thatcher WW 1996 Differential response of the luteal phase

and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. J Anim Sci **74** 1074-1083.

Schmitt EJ, Diaz T, Drost M & Thatcher WW 1996 Use of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. J Anim Sci **74** 1084-1091.

Sianangama PC & Rajamahendran R 1992 Effect of human chorionic gonadotropin administered at specific times following breeding on milk progesterone and pregnancy in cows. Theriogenology **38** 85-96.

Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC & Palmarini M 2007 Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. *Reprod Fertil Dev* **19** 65-78.

Sreenan JM & Diskin MG 1986. The extent and timing of embryonic mortality in cattle. In *Embryonic mortality in farm animals*, pp. 142-158.

Stevenson JS, Portaluppi MA, Tenhouse DE, Lloyd A, Eborn DR, Kacuba S & DeJarnette JM 2007 Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to gonadotropin-releasing hormone, human chorionic gonadotropin, and progesterone. *J Dairy Sci* **90** 331-340.

Stronge AJ, Sreenan JM, Diskin MG, Mee JF, Kenny DA & Morris DG 2005 Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology* **64** 1212-1224.

Walton JS, Halbert GW, Robinson NA, Leslie KE 1990 Effects of progesterone and human chorionic gonadotrophin administration five days postinsemination on plasma and milk concentrations of progesterone and pregnancy rates of normal and repeat breeder dairy cows. Can J Vet Res **54** 305-308.

FATORES NUTRICIONAIS QUE INFLUENCIAM A QUALIDADE EMBRIONÁRIA EM BOVINOS

Roberto Sartori[1], Monique Mendes Guardieiro[1], Ricardo da Silva Surjus[1], Michele Ricieri Bastos[2]

[1]Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, Brasil - 13418-900.
[2]Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Distrito de Rubião Júnior, s/n°, Botucatu/SP, Brasil - 18618-000.

RESUMO

A nutrição é um dos principais fatores que afetam o desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas, por meio de seu efeito na qualidade ovocitária, embrionária, no número de folículos e corpos lúteos, nas concentrações circulantes de hormônios, bem como na resistência do ovócito e embrião à criopreservação. Há controvérsias na literatura quanto ao efeito dos níveis energéticos ou quantidade de matéria seca ingerida na resposta a protocolos de superovulação. Alguns trabalhos detectaram efeitos positivos da alta ingestão alimentar na população folicular e número de ovulações, outros não detectaram efeito e outros detectaram um efeito contrário. Desta forma, nesta revisão será abordada a influência do consumo de matéria seca e de energia, abrangendo o consumo alimentar e a suplementação com gordura, dando ênfase à ação dos ácidos graxos poli-insaturados, nos ovócitos e embriões bovinos.

INTRODUÇÃO

O estado nutricional está entre os fatores que mais afetam o desempenho reprodutivo da fêmea bovina (Webb et al., 2004). No entanto, os mecanismos fisiológicos específicos através dos quais a dieta influencia a reprodução permanecem pouco entendidos e ainda precisam ser elucidados (Gong, 2002; Diskin et al., 2003), principalmente porque essa relação é complexa e as respostas são muito variáveis e inconsistentes (Boland e Lonergan, 2003).

A ingestão de nutrientes age em vários níveis dentro do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e afeta fatores de crescimento de origem sistêmica ou local que controlam direta ou indiretamente a função ovariana e a produção embrionária (Armstrong et al., 2001; Gong, 2002). Acredita-se que o tipo e/ou quantidade da dieta fornecida aos animais antes de iniciar os programas de superestimulação ovariana tem forte influência sobre a resposta superovulatória e qualidade embrionária (Yaakub et al., 1999).

A energia é o fator que mais afeta a reprodução de fêmeas bovinas. A ingestão insuficiente de energia está correlacionada com baixo desempenho reprodutivo, atraso na idade à puberdade, atraso no intervalo da primeira ovulação e cio pós-parto e redução nas taxas de concepção e de prenhez em vacas de corte e de leite (Santos et al., 2004). Por outro lado, vários estudos mostraram que dietas altamente energéticas diminuem a resposta aos protocolos de superovulação, diminuem a produção embrionária e alteram a expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário. O mecanismo pelo qual isto ocorre ainda não está claro, mas acredita-se que esteja relacionado com a produção de ovócitos com qualidade comprometida (Dunne et al., 1999; Yaakub et al., 1999; Santos et al., 2008).

INFLUÊNCIA DA INGESTÃO DE MATÉRIA SECA NO FOLÍCULO, OVÓCITO E EMBRIÃO BOVINO

A quantidade e o tipo de alimentos que animais superovulados consomem podem afetar a resposta superovulatória, como também, a quantidade e qualidade dos embriões produzidos. A ingestão também pode alterar a fecundação e o estado folicular (Yaakub et al., 1999).

O aumento da ingestão de matéria seca (IMS) seja por "flushing" nutricional (curto período de superalimentação; Gutierrez et al., 1997; Armstrong et al., 2002; Gong et al., 2002) ou longo período (Martins et al., 2006b) e o uso do rbST (somatotropina bovina recombinante) (Gong et al., 1991; Buratini et al., 2000) mostraram ser os principais fatores capazes de influenciar positivamente o número de folículos recrutados e/ou a resposta aos protocolos de superovulação (Gong et al., 1991, 2002). Em um estudo realizado por nossa equipe (Martins et al., 2006b), vacas zebuínas que receberam dieta de alta IMS (170% em relação à dieta de manutenção; 1,7M) durante 56 dias tiveram maior número de folículos aspirados para produção in vitro (PIV) de embriões do que as submetidas à dieta de baixa ingestão (0,66M). Entretanto, alguns autores não encontraram efeito do flushing alimentar no recrutamento folicular e na resposta superovulatória. Em vacas mestiças (Simental X Nelore) não lactantes, as dietas tratamentos (manutenção *versus* alta ingestão = M v*s*. 1,8M) fornecidas entre 7 dias antes do início da superovulação e ao final das aplicações de FSH não afetaram o número de folículos recrutados e ovulados (Bastos et al., 2007a). Da mesma forma, quando um experimento similar foi realizado com novilhas Nelore, não houve diferença entre os tratamentos (Bastos et al., 2007b). Por outro lado, no experimento de Mollo et al. (2007) com novilhas da raça Nelore confinadas e submetidas à restrição alimentar (0,7M) por 7 semanas, estas apresentaram respostas superestimulatórias (48,4±7,2 *vs.* 24,0±7,9) e superovulatórias (33,6±5,8 *vs.* 15,7±6,0) maiores do que novilhas submetidas à alta ingestão alimentar (*ad libitum* = 1,7M), concordando com outros trabalhos que também encontraram efeitos deletérios (Mantovani et al., 1993; Nolan et al., 1998; Yaakub et al., 1999; Wrenzycki et al., 2000; Siddiqui et al., 2002; Lozano et al., 2003).

Em relação à influência da IMS na produção de ovócitos e embriões, Mcevoy et al. (1995) concluíram que ovelhas sob ingestão energética restrita (0,6M) produziram ovócito com maior capacidade de desenvolvimento *in vivo* e *in vitro* do que aquelas alimentadas com 2,3M. No entanto, num estudo com novilhas de corte submetidas à alta e baixa ingestão alimentar, não foi encontrado efeito da dieta sobre a qualidade morfológica dos ovócitos, nem sobre a capacidade de desenvolvimento in vitro desses ovócitos. Porém, quando foi avaliada a taxa de desenvolvimento de embriões colhidos in vivo e cultivados in vitro por 24 horas, foi observado que os embriões colhidos de novilhas submetidas à restrição alimentar se desenvolveram melhor comparados aos do grupo com dieta *ad libitum* (Nolan et al., 1998). Esses resultados levam a sugerir que a dieta não afetou a morfologia ovocitária, mas sim sua capacidade de desenvolvimento pós-fecundação.

Dois estudos (Yaakub et al., 1999; Wrenzycki et al., 2000) avaliaram o efeito do tipo e da quantidade de concentrado sobre a resposta superovulatória e produção de embriões. Os tratamentos consistiam em dois concentrados, um à base de cevada e outro à base de polpa cítrica e de beterraba, com consumo *ad libitum* ou restrito. Os autores observaram que as novilhas que receberam quantidade restrita de concentrado produziram um número maior de embriões e estes foram de qualidade superior em relação às novilhas com dieta *ad libitum*. Da mesma forma, Mantovani et al. (1993)

reportaram que, o aumento na ingestão de concentrado de 3,0 kg para ingestão *ad libitum* em novilhas de corte taurinas reduziu a produção de embriões de qualidade superior (4,8±0,7 *vs.* 2,8±0,4 respectivamente). Ainda, nos estudos de Yaakub et al. (1999) e Wrenzycki et al. (2000), novilhas alimentadas com polpa cítrica e de beterraba produziram mais embriões transferíveis após superovulação em relação às alimentadas com cevada.

Similarmente, encontramos em nossos experimentos que vacas mestiças sob dieta de manutenção apresentaram maior número de estruturas totais e embriões viáveis colhidos (Bastos et al., 2007a) e para novilhas Nelore mantidas sob dieta de restrição alimentar, o número de estrutura colhidas foi maior em relação à alta ingestão (10,5±1,3 *vs*. 6,7±2,7; Mollo et al., 2007). Entretanto, nos estudos de Bastos et al. (2007b) e Martins et al. (2006b) não houve diferença no número e qualidade dos embriões produzidos in vivo ou in vitro, respectivamente. Apesar disso, os ovócitos obtidos de vacas zebuínas alimentadas com dieta de baixa IMS apresentaram tendência de terem melhor qualidade em relação ao grupo que recebeu dieta de alta ingestão (Martins et al., 2006b). Além disso, a expressão do gene BAX e a expressão global gênica (INF-τ, GRB-10, CATALASE, GPX-4, Mn-SOD, e BAX) foram maiores nos embriões do grupo de baixa ingestão alimentar (Martins et al., 2006a).

A redução da eficiência reprodutiva, em animais com alta IMS, pode ser devida às alterações na concentração dos hormônios circulantes. Uma das explicações para estas menores concentrações séricas é que a elevada IMS promove maior metabolismo dos hormônios esteróides, os quais apresentam, consequentemente, menores concentrações circulantes (Sangsritavong et al., 2002; Vasconcelos et al., 2003). Portanto, a diminuição da concentração circulante de progesterona pode aumentar a pulsatilidade de LH e comprometer a maturação do ovócito e o desenvolvimento embrionário inicial (Revah e Butler, 1996).

Outro aspecto que a alta IMS pode influenciar negativamente nos embriões pode ser explicado quando há o fornecimento da dieta por período prolongado. Desta forma, a alta IMS exerce efeito deletério sobre a maturação ovocitária e produção de embriões, possivelmente devido ao excesso de IGF-I (Webb et al., 2004) e à hiperinsulinemia (Adamiak et al., 2005; Santos et al., 2008), pois acredita-se que quando associada ao elevado ECC desenvolva um quadro de resistência à insulina, resultando em comprometimento severo da qualidade dos gametas e embriões produzidos.

Nossos resultados concordam com esta hipótese, uma vez que novilhas Nelore recebendo dieta de alta ingestão produziram menor número de estruturas e apresentaram maiores concentrações circulantes de insulina (Mollo et al., 2007 e Bastos et al., 2007b), bem como, vacas zebuínas sob esta dieta tiveram tendência em comprometer a qualidade ovocitária, fato provavelmente associado às maiores concentrações de insulina circulante (Martins et al., 2008).

Independente do efeito da quantidade da dieta ingerida sobre a resposta superovulatória parece ser consenso que o excesso nutricional tem um efeito deletério na qualidade dos embriões produzidos (Nolan et al., 1998; Yaakub et al., 1999; Lozano et al., 2003), e que a redução da ingestão alimentar por um período de tempo limitado previamente à superovulação pode melhorar a qualidade destes embriões (Santos e Sá Filho, 2006). Essa redução de ingestão, entretanto, quando empregada após a IA pode ocasionar um efeito negativo na taxa de sobrevivência embrionária (Dunne et al., 1999).

INFLUÊNCIA DOS ÁCIDOS GRAXOS NO FOLÍCULO, OVÓCITO E EMBRIÃO BOVINO

A suplementação de gordura é uma prática comum para aumentar a densidade energética da dieta. Além de fornecer calorias, a gordura possui efeito direto na reprodução através do tipo de ácido graxo presente (Funston, 2004; Raes et al., 2004).
Os ácidos graxos poli-insaturados (AGP) que compõem os ovócitos e embriões (Mcevoy et al., 2000; Kim et al., 2001; Ferreira et al., 2010) fornecem energia para os processos relacionados à maturação e competência ovocitária (Kim et al., 2001) e para o desenvolvimento embrionário (Wathes et al., 2007). Além disso, fazem parte da membrana plasmática, alterando sua fluidez que é essencial para o desenvolvimento celular durante e após a fecundação (Mcevoy et al., 2000; Fouladi-Nashta et al., 2007), bem como afetam a resistência celular à técnica de criopreservação (Clandinin et al., 1991; Zeron et al., 2002).

ÁCIDOS GRAXOS E OVÓCITOS

Kim et al. (2001) demonstraram que ovócitos maturados in vitro possuem menores quantidades de ácido linoléico (LA) e aracdônico em relação aos imaturos, provavelmente devido à utilização deste AGP para processo de maturação ovocitária. Além disso, as concentrações de ácido linolênico (LNA) (Wathes et al., 2007) e LA diminuem com o crescimento folicular, sugerindo um potencial papel na regulação da maturação ovocitária por meio da prevenção da quebra da vesícula germinativa (Homa e Brown, 1992). O LA inibiu a expansão das células do cumulus e atrasou o desenvolvimento de ovócitos até o estágio de metáfase II (Marei et al., 2010).
A suplementação com sais de cálcio de óleo de palma aumentou a quantidade de ácidos graxos no complexo cúmulus ovócito, entretanto houve uma captação seletiva de ácidos graxos saturados pelos folículos, o que pode ter comprometido o desenvolvimento após fecundação (Adamiak et al., 2006). O fornecimento por curto período (25 dias) de diferentes tipos de ácidos graxos (predominantemente palmítico e oléico, LA ou LNA) não afetou a composição de ácidos graxos nas células da granulosa em vacas. Apesar disso, vacas que receberam dieta enriquecida com ácido palmítico e oléico apresentaram maior proporção de ovócitos que clivaram após inseminação em relação aos outros grupos (Fouladi-Nashta et al., 2009). Por outro lado, Bilby et al. (2006) não observaram efeito da suplementação com AGP n-3 ou n-6 na qualidade ovocitária, demonstrada pelo subseqüente desenvolvimento embrionário, quando comparado com a alimentação com ácidos graxos monoinsaturados. Entretanto, Zeron et al. (2002) relataram maior número de ovócitos totais e de melhor qualidade ovocitária, bem como, aumento na proporção de AGP no plasma e na fração fosfolipídica das células do cúmulus, o que resultou em maior resistência ovocitária ao resfriamento, para ovelhas suplementadas com sais de cálcio de óleo de peixe por 13 semanas em relação ao grupo controle.

ÁCIDOS GRAXOS E EMBRIÕES

Relativamente, poucos trabalhos avaliaram o efeito dos ácidos graxos na produção e desenvolvimento de embriões produzidos in vivo (Ryan et al., 1992; Kojima et al., 1997; Cerri et al., 2004; Bader et al., 2005; Thangavelu et al., 2007; Childs et al., 2008b; Petit et al., 2008). Além disso, não existe um consenso entre os resultados.

Em estudo recente da nossa equipe (Guardieiro et al., 2008) não se observou efeito da suplementação com Megalac-E quando comparado ao fornecimento de suplemento isoprotéico e isocalórico (por aproximadamente 67 dias) na resposta superestimulatória e produção de embriões em doadoras da raça Nelore. Este resultado associado às taxas de prenhez encontradas em animais suplementados com LA, após IA e inovulação de embriões, podem reforçar a hipótese da sua atuação no útero, auxiliando em mecanismos anti-luteolíticos e contribuindo para manutenção da gestação (Lopes et al. 2008, 2009; Peres et al., 2008). Thangavelu et al. (2007), alimentando vacas holandesas pós parto com gordura saturada, semente de linhaça ou semente de girassol também não observaram diferença na produção de embriões.

Childs et al. (2008b) e Petit et al. (2008) forneceram dietas isocalóricas e isoprotéicas enriquecidas com ácido saturado (controle) ou AGP n-3 a novilhas de corte e vacas lactantes, respectivamente e similarmente, não detectaram efeito da dieta com AGP no número de ovulações, número total de embriões e ovócitos não fecundados. Em um estudo (Ryan et al., 1992) em que o grupo controle não continha gordura, a resposta superestimulatória e superovulatória de novilhas de corte também não foram afetadas pela dieta rica em óleo de soja. Por outro lado, Kojima et al. (1997) reportaram maior número de corpos lúteos para fêmeas suínas que foram suplementadas com uma mistura de ácidos graxos oléico, LA e γ-LNA.

Nossos resultados (Guardieiro et al., 2008) não mostraram efeito da suplementação de lipídio na qualidade e quantidade de embriões de Nelore produzidos in vivo. Entretanto, em outros estudos, o número de embriões degenerados colhidos foi menor em novilhas submetidas à dieta com AGP n-3 (Childs et al., 2008b). Houve também um maior número total de embriões (Kojima et al., 1997) e embriões viáveis (Kojima et al., 1997; Cerri et al., 2004) quando os animais receberam uma mistura de ácidos graxos oléico, LA e γ-LNA (Kojima et al., 1997) ou sais de cálcio de ácidos graxos LA e *trans* (Cerri et al., 2004). Thangavelu et al. (2007) observaram aumento no número de blastômeros em embriões de vacas alimentadas com AGP. Por outro lado, a adição de LA à dieta de vacas em lactação resultou em maior número de embriões degenerados e diminuição do número de embriões viáveis comparado àqueles provenientes de animais que receberam sais de cálcio de óleo de palma (Petit et al., 2008).

O perfil de ácidos graxos e a razão saturado:insaturado influenciam nas propriedades físicas da membrana plasmática, afetando a resistência e a criopreservação dos embriões (Clandinin et al., 1991; Zeron et al., 2002), sendo que estas propriedades são alteradas por fatores externos, tais como temperatura e dieta (Zeron et al., 2001). Assim, os lipídios da membrana celular podem ser manipulados através da nutrição e do meio de cultivo.

A membrana citoplasmática é o principal sítio de crioinjúria. Neste sentido, mudanças no perfil de ácidos graxos ou alterações moleculares de lipídios afetam a fluidez da membrana plasmática e conseqüente resistência a criopreservação, podendo contribuir para aumentar a fluidez da membrana plasmática e obter sucesso no processo de criopreservação (Mcevoy et al., 2000). Miller Junior et al. (2005) observaram que um grau mínimo de fluidez da membrana é requerido para inserção de crioprotetores na membrana plasmática do espermatozóide, o que pode facilitar a desidratação.

O ácido linoléico conjugado (CLA) no meio de cultivo reduziu o acúmulo de lipídio no embrião com conseqüente melhora na taxa de sobrevivência durante a criopreservação. O efeito do CLA pode ser explicado pelo aumento da fluidez da membrana plasmática (nível de insaturação) devido à incorporação do CLA na membrana embrionária durante o cultivo (Pereira et al., 2007). Hochi et al. (1999) também perceberam aumento na taxa de sobrevivência de mórulas pós-descongelação que foram cultivadas em meio adicionado de LA. A viabilidade de embriões biopsiados

ou não, cultivados com CLA foi maior do que aqueles cultivados no meio controle, além de apresentarem menor número de gotas lipídicas citoplasmáticas e aumento na resistência de embriões produzidos in vitro à micromanipulação e criopreservação (Pereira et al., 2008). Taxas de desenvolvimento de embriões de 16 células a blastocisto foram superiores para aqueles cultivados em meio com LA antes do processo de congelação (Tominaga et al., 2000).

Um maior número de embriões suínos com núcleos viáveis pós-descongelação foi relatado para o grupo suplementado com AGP do que os do grupo controle, sugerindo-se o efeito positivo do AGP por meio do aumento da fluidez da membrana plasmática (Kojima et al., 1996). Além disso, LA pode alterar o perfil de ácidos graxos na membrana plasmática, reduzindo o conteúdo de triglicérides ou interferindo nos níveis de ácidos graxos saturados e insaturados e consequente interferência na tolerância embrionária à criopreservação (Tominaga et al., 2000; Zeron et al., 2001, 2002; Pereira et al., 2008).

Por outro lado, outros estudos mostram que os AGP podem comprometer o desenvolvimento embrionário. Adição de CLA no meio de cultivo embrionário diminuiu a produção de blastocisto e a sobrevivência de embriões 7 dias após vitrificação comparados com o grupo controle. Além disso, os AGP diminuíram a expressão de RNAm de proteínas relacionadas ao conteúdo lipídico que pode ter efeito nos níveis de ácidos graxos saturados e insaturados e contribuir para trocas na fluidez da membrana plasmática e crioresistência (Darwich et al., 2010).

Resultados de nossa equipe (Guardieiro et al., 2010) estão de acordo com esta hipótese. Embriões vitrificados ou congelados de novilhas Nelore suplementadas com gordura protegida ruminal apresentaram menor taxa de eclosão em relação àqueles provenientes de novilhas que não foram suplementadas com gordura na dieta ao serem avaliados às 48 horas (33,1±4,0%; n = 148 *vs.* 17,3±3,3%; n = 137; P = 0,009) e às 72 horas (44,3±4,2%; n = 148 *vs.* 30,9±4,0%; n = 137; P = 0,04) de cultivo in vitro. Para vacas de leite, a suplementação com semente de linhaça diminuiu a taxa de fecundação e qualidade embrionária e aumentou a porcentagem de embriões degenerados comparados com a suplementação com sais de cálcio de óleo de palma. Além disso, este experimento não observou aumento na taxa da gestação de embriões congelados-descongelados de vacas alimentadas com AGP (Petit et al., 2008). Alta concentração de LA pode comprometer a criopreservação embrionária pelo aumento nos radicais de peróxidos lipídicos derivados de alguns AGP (Hochi et al., 1999).

AGP são responsáveis pelo aumento no estresse oxidativo e subsequente inibição do desenvolvimento embrionário, visto na exposição de LA e LNA durante o cultivo de zigotos de camundongos, sendo que tal efeito foi controlado com a adição de antioxidantes (Nonogaki et al., 1994). Tratamento de células do cúmulus com LA também bloqueou o desenvolvimento inicial de embriões bovinos (Marei et al., 2010). Da mesma forma, camundongas alimentadas com dieta rica em AGP *n*-3 apresentaram ovócitos com alteração na distribuição de mitocôndria e níveis de cálcio e aumentaram a produção de espécies reativas de oxigênio, bem como, tiveram menor habilidade para desenvolverem até estágio de blastocisto (Wakefield et al., 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adamiak, S.J.; Mackie, K.; Watt, R.G.; Webb, R.; Sinclair, K.D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hiperinsulinemia in cattle. Biology of Reproduction 73: 918-26, 2005.

Adamiak, S.J.; Powell, K.; Rooke, J.A.; Webb, R.; Sinclair, K.D. Body composition, dietary carbohydrates and fatty acids determine post-fertilisation development of bovine oocytes in vitro. Reproduction 131: 247-258, 2006.

Armstrong, D.G.; Gong, J.G.; Gardner, J.O.; Baxter, G.; Hogg, C.O.; Webb, R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. Reproduction 123: 371-378, 2002.

Armstrong, D.G.; Mcevoy, T.G.; Baxter, G.; Robinson, J.J.; Hogg, C.O.; Woad, K.J.; Webb, R.; Sinclair, K.D. Effect of dietary energy and protein on bonine follicular dynamics and embryo production in vitro: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. Biology of Reproduction 64: 1624-1632, 2001.

Bader, J.F.; Kojima, F.N.; Wehrman, M.E.; Lindsey, B.R.; Kerley, M.S.; Patterson, D.J. Effects of prepartum lipid supplementation on FSH superstimulation and transferable embryo recovery in multiparous beef cows. Animal Reproduction Science 85: 61-70, 2005.

Bastos, M.R.; Ramos, A.F.; Driessen, K.; Martins, A.C.; Rumpf, R.; Sartori, R. Efeito do “flushing” nutricional sobre a resposta superovulatória em vacas mestiças. Acta Scientiae Veterinariae 35(supl): 1242 (Resumo), 2007a.

Bastos, M.R.; Martins, A.C.; Melo, L.F.; Carrijo, L.H.D.; Rumpf, R.; Sartori, R. Efeito da condição corporal e da ingestão alimentar sobre a resposta superovulatória e produção embrionária em novilhas Nelore. Acta Scientiae Veterinariae 35(supl): 1243 (Resumo), 2007b.

Bilby, T.R.; Block, J.; Do Amaral, B.C.; Sa Filho, O.; Silvestre, F.T.; Hansen, P.J.; Staples, C.R.; Thatcher, W.W. Effects of dietary unsaturated fatty acids on oocyte quality and follicular development in lactating dairy cows in summer. Journal of Dairy Science 89: 3891-3903, 2006.

Boland, M.P.; Lonergan, M.P. Effects of nutrition on fertility in dairy cows. Advanced Dairy Technology 5: 19-33, 2003.

Buratini Jr, J.; Price, C.A.; Visintin, J.A.; Bo, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and tratament with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (Bos indicus) heifers. Theriogenology 54: 421-431, 2000.

Clandinin, M.T.; Cheema; Field, C.J.; Garg, T.M.L.; Venkatraman, J; Clandinin; T.R.. Dietary fat: exogenous determination of membrane structure and cell function. The FASEB Journal 5: 2761-2769, 1991.

Cerri, R.L.A.; Bruno, R.G.S; Chebel, R.C.; Galvão, K.N.; Rutgliano, H.; Juchem, S.O.; Thatcher, W.W.; Luchini, D.; Santos, J.E.P**.** Effect of fat sources differing in fatty acid profile on fertilisation rate and embryo quality in lactating dairy cows. Journal of Animal Science 82(suppl.1): 586 (Abstract), 2004.

Childs, S.; Carter, F.; Lynch, C.O.; Sreenan, J.M.; Lonergan, P.; Hennessy, A.A.; Kenny, D.A. Embryo yield and quality following dietary supplementation of beef

heifers with n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA). Theriogenology 70: 992-1003, 2008b.

Darwich, A.A.; Perreau, C.; Petit, M.H.; Papillier, P.; Duponta, J.; Guillaume, D.; Mermillod, P.; Guignot, F. Effect of PUFA on embryo cryoresistance, gene expression and Q1 AMPKα phosphorylation in IVF-derived bovine embryos. Prostaglandins other lipid mediat, 2010. doi:10.1016/j.prostaglandins.2010.06.002.

Diskin, M.G.; Mackey, D.R.; Roche, J.F.; Sreenan, J.M. Effects of nutrition and metabolic status on circulatinghormones and ovarian Fo llicle development in cattle. Animal Reproduction Science 78: 345-370, 2003.

Dunne, L.D.; Diskin, M.G.; Boland, M.P.; O'Farrell, K.J.; Sreenan, J.M. The effect of pre- and post-insemination plane of nutrition on embryo survival in beef heifers. Animal Science 69: 411-17, 1999.

Ferreira, C.R.; Saraiva, S.A.; Catharino, R.R.; Garcia, J.S.; Sanvido, G.B.; Gozzo, F.C.; Sartori, R.; Lo Turco, E.G.; Bertolla, R.P.; Guardieiro, M.M.; Eberlin, M.N. Single Embryo and Oocyte Lipid Fingerprinting by Mass Spectrometry. Journal of Lipid Research 51: 1218-1227, 2010.

Fouladi-Nashta, A.A.; Gutierrez, C.G.; Gong, G.J.; Garnsworthy, P.C.; Webb, R. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. Biology of Reproduction 77: 9-17, 2007.

Fouladi-Nashta, A.A.; Wonnacott, K.E.; Gutierrez, C.G.; Gong, J.G.; Sinclair, K.D.; Garnsworthy, P.C.; Webb, R. Oocyte quality in lactating dairy cows fed on high levels of n-3 and n-6 fatty acids. Reproduction 138: 771-781, 2009.

Funston, R.N. Fat supplementation and reproduction in beef females. Journal of Animal Science 82(suppl.): 154-161, 2004.

Gong, J.G.; Bramley, T.A.; Webb, R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. Journal of Reproduction and Fertility 97: 247–254, 1991.

Gong, J.G.; Armstong, D.G.; Baxter, G.; Hogg, C.O.; Garnsworthy, P.C.; Webb, R. The effect of dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. Theriogenology 57: 1591-1602, 2002.

Guardieiro, M. M. ; Machado, G. M. ; Bastos, M. R. ; Mourao, G. B. ; Carrijo, L. H. D.; Dode, M. A. N.; Sartori, R. Postcryopreservation viability of embryos from Nellore heifers supplemented with rumen-protected fat. In: IETS: Córdoba. Reproduction, Fertility and Development 22: 205-206(abstract), 2010.

Guardieiro, M.M., Bastos, M. R., Machado, G. M., Chebel, R. C., Rumpf, R., Sartori, R.. Embryo production in superovulated Nelore heifers supplemented with rumen-protected fat In: II International Symposium on Animal Biology of Reproduction. Animal Reproduction 6: 260-260(abstract), 2008.

Gutierrez, C.G.; Oldham, J.; Bramley, T.A.; Gong, J.G.; Campbell, B.K.; Webb, R. The recruitment of ovarian follicles is enhanced by increased dietary intake in heifers. Journal of Animal Science 75: 1876-1884, 1997.

Hochi, S.; Kimura, K.; Hanada, A. Effect of linoleic acid-albumin in the culture medium on freezing sensivity of in vitro-produced bovine morulae. Theriogenology 52: 497-504, 1999.

Homa, S.T.; Brown, C.A. Changes in linoleic acid during follicular development and inhibition of spontaneous breakdown of germinal vesicles in cumulus-free bovine oocytes. Journal of Reproduction and Fertility 94: 153-160, 1992.

Kim, M.; Kinoshita, J.Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen-thawed immature and in vitro matured bovine oocytes. Reproduction 122: 131-138, 2001.

Kojima, T.; Iwasaki, T.; Zeniya, Y.; Yoshino, J.; Totsukawa, K.. Effect of dietary administration with linoleic acid and α-tocopherol on freezing tolorence in porcine embryos. Journal of Reproduction and Development 42: 67-72, 1996.

Kojima, T.; Zeniya, Y.; Aoyama, T.; Kondo, A.; Yoshino, J. Dietary administration of fatty acods-enriched mold dried cell containing γ-linolenic acid to female pigs improves ovulation rate and embryo quality in summer. Journal of Reproduction and Development 43: 121-127, 1997.

Lopes, C.N.; Zilioti, C.; Araújo, T. et al. Efeito do tratamento do Megalac e Megalac-E na taxa de prenhez em vacas Nelore pós-parto submetidas a IATF. Acta Scientiae Veterinariae 36(suppl.2): 616 (Resumo), 2008.

Lozano, J.M.; Lonergan, P.; Boland, M.P.; O'Callaghan, D. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and post-fertilization development. Reproduction 125: 543-553, 2003.

Mantovani, R.; Enright, W.J.; Keane, M.G.; Roche, J.F.; Boland, M.P. Effect of nutrition on follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. Proc 9th AETE, 234 (Abstract), 1993.

Marei, W.F.; Wathes, D.C.; Fouladi-Nashta, A.A. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. Reproduction 139: 979-988, 2010.

Martins, A.C.; Mollo, M.R.; Bastos, M.R.; Guardieiro, M.M.; Sartori, R. Concentrações séricas hormonais em vacas azebuadas submetidas à baixa e alta ingestão alimentar. Pesquisa Agropecuária Brasileira 43: 243-247, 2008.

Martins, A.C.; Mundim, T.C.D.; Melo, E.O.; Dode, M.A.N.; Rumpf, R.; Franco, M.M.; Sartori, R. Análise de expressão gênica em embriões bovinos produzidos in vitro a partir de ovócitos coletados de vacas submetidas a diferentes níveis de ingestão alimentar. Acta Scientiae Veterinariae 34: 450(resumo), 2006a.

Martins, A.C.; Ramos, A.F.; Mollo, M.R.; Pivato, I.; Camara, J.U.; Carrijo, L.H.D.; Driessen, K.; Rumpf, R.; Sartori, R. Influência da alta ou baixa ingestão alimentar na

produção in vitro de embriões bovinos. Acta Scientiae Veterinariae 34: 290(resumo), 2006b.

Mcevoy, T.G.; Coull, G.D.; Broadbent, P.J.; Hutchinson, J.S.M.; Speake, B.K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. Journal of Reproduction and Fertility 118: 163-170, 2000.

Mcevoy, T.G.; Robinson, J.J.; Aitken, R.P.; Findlay, P.A.; Palmer, R.M.; Robertson, I. Dietary-induced suppression of pre-ovulatory progesterone concentrations in superovulated ewes impairs the subsequent in vivo and in vitro development of their ova. Animal Reproduction Science 39: 89-107, 1995.

Miller Junior, R.R.; Cornett, C.L.; Waterhouse, K.E.; Farstad, W. Comparative aspects of sperm membrane fatty acid composition in silver (Vulpes vulpes) and blue (Alopex lagopus) foxes, and their relationship to cell cryopreservation. Cryobiology 51: 66-75, 2005.

Mollo, M.R.; Rumpf, R.; Martins, A.C.; Mattos, M.C.C.; Lopes Jr., G.; Carrijo, L.H.D.; Sartori, R. Função ovariana em novilhas Nelore submetidas a baixa ou alta ingestão alimentar. Acta Scientiae Veterinariae 35 (Suppl 3): 958 (resumo), 2007.

Nolan, R.; Dufe, P.; Wade, M.; O'Callaghan, D.; Boland, M.P. Effect of quantity and type of diet and frequency of trans-vaginal ovum aspiration on in-vitro embryo development in heifers. Theriogenology 49: 402 (abstract), 1998.

Nonogaki, T.; Noda, Y.; Goto, Y.; Kishi, J.; Mori, T. Developmental blockage of mouse embryos caused by fatty acids. Journal of Assisted Reproduction and Genetics 111: 482-488, 1994.

Pereira, R.M.; Baptista, M.C.; Vasques, M.I.; Horta, A.E.M.; Portugal, P.V.; Bessa, R.J.B.; Chagas e Silva, J.; Silva Pereira, M.; Marques, C. C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). Reproduction Science 98: 293-301, 2007.

Pereira, R.M.; Carvalhais, I.; Pimenta, J.; Baptista, M.C.; Vasques, M.I.; Horta, A.E.M.; Santos, I.C.; Marques, M.R.; Reis, A.; Silva Pereira, M.; Marques, C.C. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. Animal Reproduction Science 106: 322-332, 2008.

Peres, M.S.; Santos, P.G.; Andrighetto, C.; Pereira, F.T.V.; Fonseca, R.; Assis Neto, A.C.; Machado, R.; Madureira, E.H.; Binelli, M.; Bertan, C.M. Efeito da semente de girassol na taxa de concepção de vacas Nelore no período pós-parto. Acta Scientiae Veterinariae, v.36, p.639, suppl.2, 2008. Resumo.

Petit, H.V.; Cavalieri, F.B.; Santos, G.T.D.; Morgan, J.; Sharpe, P. Quality of embryos produced from dairy cows fed whole flaxseed. Journal of Dairy Science 91: 1786-1790, 2008.

Raes, K.; De Smet, S.; Demeyer, D. Effect of dietary fatty acids on incorporation of long chain polyunsaturated fatty acids and conjugated linoleic acid in lamb, beef and pork meat: a review. Animal Feed Science and Technology 113: 199-221, 2004.

Revah, I.; Butler, W.R. Prolonged, dominance of follicles reduced viability of bovine oocytes. Journal of Reproduction and Fertility 106: 39-47, 1996.

Ryan, D.P.; Spoon, R.A.; Williams, G.L. Ovarian follicular characteristics, embryo recovery, and embryo viability in heifers fed high-fat diets and treated with follicle-stimulation hormone. Journal of Animal Science 70: 3505-3513, 1992.

Sangsritavong, S.; Combs, D.K.; Sartori, R.; Armentano, L.E.; Wiltbank, M.C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol 17 beta in dairy cattle. Journal of Dairy Science 285: 2831-2842, 2002.

Santos, J.E.P.; Cerri, R.L.A.; Ballou, M.A.; Higginbotham, G.E.; Kirk, J.H. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of holstein dairy cows. Animal Reproduction Science 80: 31-45, 2004.

Santos, J.E.P.; Sá Filho, M.F. Nutrição e reprodução em bovinos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina 2: 30-54, 2006.

Santos, J.E.; Cerri, R.L.; Sartori, R. Nutritional management of the donor cow. Theriogenology 69: 88-97, 2008.

Siddiqui, M.A.R.; Shamsuddin, M.; Bhuiyan, M.M.U.; Akbar, M.A.; Kamaruddin, K.M. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows. Reproduction Domestic Animals 37: 37-41, 2002.

Thangavelu, G.M.; Colazo, G.; Ambrose, D.J.; Oba, M.; Okine, E.K.; Dyck, M.K. Diets enriched in unsaturated fatty acids enhance early embryonic development in lactating Holstein cows. Theriogenology 68: 949-957, 2007.

Tominaga, K.; Hamada, Y.; Yabuue, T.; Ariyoshi, T. Effect of linoleic acid-albumin on post-thaw survival of in vitro-produced bovine embryos at the 16-cell stage. Journal of Veterinary Medicine Science 62: 465-467, 2000.

Vasconcelos, J.L.M.; Sangsritavong, S.J.; Tsai, S.J.; Wiltbank, M.C. Acute reduction in serum progesterone concentrations after feed intake in dairy cows. Theriogenology 60: 795-807, 2003.

Wakefield, S.L.; Lane, M.; Schulz, S.J.; Hebart, M.L.; Thompson, J.G.; Mitchell, M. Maternal supply of omega 3 polyunsaturated fatty acids alter mechanisms involved in oocyte and early embryo development in the mouse. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism 294: 425-434, 2007.

Wathes, D.C.; Abayasekara, D.R.; Aitken, R.J. Minireview: polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. Biology of Reproduction 77: 190-201, 2007.

Webb, R.; Garnsworthy, P.C.; Gong, J.G.; Arsmstrong, D.G. Control of follicular interactions and nutritional influences. Journal of Animal Science 82 (Supl): E63-E74, 2004.

Wrenzycki, C.; De Souza, P.; Overstrom, E.W.; Duby, R.T.; Herrmann, D.; Watson, A.J.; Niemann, H.; O'Callaghan, D.; Boland, M.P. Effects of superovulated heifer diet type and quantity on relative mRNA abundances and pyruvate metabolism in recovered embryos. Journal of Reproduction Fertility 18: 69-78, 2000.

Yaakub, H.; O´Callaghan, D.; Boland, M.P. Effect of type and quantity of concentrates on superovulation and embryo yield in beef heifers. Theriogenology 51: 1259-1266, 1999.

Zeron, Y.; Ocheretny, A.; Kedar, O.; Borochov, A.; Sklan, D.; Arav, A. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. Reproduction 121: 447-454, 2001.

Zeron, Y.; Sklan, D.; Arav, A. Effect of polyunsaturated fatty acid supplementation on biophysical parameters and chilling sensitivity of ewe oocytes**.** Molecular Reproduction and Development 61: 271-278, 2002.

FISIOLOGIA DA PUBERDADE EM NOVILHAS TAURINAS E ZEBUÍNAS

Maria Carolina Vilani Miguel, Rafael Silva Cipriano, Guilherme de Paula Nogueira

Curso de Medicina Veterinária- Laboratório de Endocrinologia UNESP- Araçatuba/SP, Brasil, gpn@fmva.unesp.br

INTRODUÇÃO

O Brasil possui cerca de 200 milhões de bovinos (IBGE, 2008), e a Nelore é a principal raça de corte criada no país, correspondendo a 70% do rebanho brasileiro (PESSUTI & MEZZADRI, 2004).
O rebanho brasileiro cresceu 24% entre 1998 e 2008 (IBGE, 2008), mas somente 10% das propriedades trabalham com adequado nível tecnológico, os 90% restantes são enquadrados como empresas com baixa ou média tecnologia. Considerando os aspectos mais relevantes do sistema produtivo, como raça, peso e idade dos animais ao abate, capacidade de suporte dos pastos, suplementação alimentar, cobertura, natalidade e taxa de desfrute, a maior parte do plantel está ainda sujeita a níveis de desempenho muito abaixo do recomendado (IPARDES, 2002).
A falha na reprodução é um dos mais importantes fatores que limitam um melhor desempenho da pecuária de corte brasileira (PESSUTI & MEZZADRI, 2004). Segundo NOGUEIRA (2004), as fêmeas de corte do Brasil apresentam a primeira parição aos 40 meses e entre os fatores que podem causar a parição tardia está a genética e a nutrição inadequada.
Manejos para produzir novilhas de reposição precisam dos conhecimentos dos processos fisiológicos que determinam a idade a primeira ovulação. A eficiência reprodutiva pode ser conseguida com melhorias genéticas, nutricionais e sanitárias visando a redução da idade à puberdade que contribuem para o aumento na vida reprodutiva do animal e conseqüentemente a produção de maior número de bezerros, com benefícios para toda a cadeia produtiva (OLIVEIRA et al.,2006; CARDOSO & NOGUEIRA, 2007).

PUBERDADE EM FÊMEAS BOVINAS

Nos mamíferos, o sistema reprodutivo é o último sistema a ser ativado. Apesar do crescimento folicular ovariano começar logo após a formação da gônada e ser acompanhado da produção de esteróides, até a puberdade a ovulação não acontece (PATTERSON et al., 1992). A puberdade pode ser definida como a primeira ovulação acompanhada pelo desenvolvimento de um corpo lúteo que seja mantido por um período correspondente ä fase luteínica de um animal adulto (KINDER et al., 1987).
A puberdade em novilhas de corte pode ser definida como o período de manifestação do primeiro estro, associado à primeira ovulação fértil, a qual pode ocorrer entre o 10º e 24º mês de idade (MORAES et al., 2007; PEREIRA, 2000; SCHILLO et al., 1992; PATTERSON et al., 1992; BALL & PETERS 2006), seguido pelo desenvolvimento de um corpo lúteo funcional (VALE & RIBEIRO, 2005; MORAN et al., 1989), e pode ser confirmado pelas concentrações de progesterona (P4) no plasma acima de 1 ng/ml, em pelo menos dois exames semanais consecutivos (RODRIGUES et al., 2002) ou em três coletas consecutivas, sendo as coletas realizadas duas vezes por semana do desmame à puberdade (ROMANO et al., 2007). O critério utilizado por COOKE et al.

(2008) para novilhas oriundas do cruzamento Brahman x Angus foi determinado pela concentração plasmática de progesterona maior que 1,5 ng/mL durante duas semanas consecutivas.

Próximo à primeira ovulação, ocorre a diminuição da sensibilidade a retro-alimentação negativa do 17-β estradiol sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário, permitindo o aumento da concentração de hormônio luteinizante (LH; MORAN et al., 1989) e consequentemente a maior produção de esteróides pelos ovários que associado ao aumento da retroalimentação positiva, estimula o aumento da freqüência de pulsos, provocando a onda pré-ovulatória de LH e a primeira ovulação (CARDOSO & NOGUEIRA, 2007; PATTERSON et al. 1992; SCHILLO et al., 1992).

O aumento na freqüência de pulsos de LH é o pré-requisito para a puberdade. A primeira ovulação fértil em novilhas de corte pode ocorrer entre cinco e 24 meses de idade dependendo do nível nutricional, do desenvolvimento corporal, da estação do ano, de fatores de manejo e dos tratamentos hormonais (MORAES et al., 2007).

A idade à puberdade varia entre as raças e dentro de linhagens e famílias. Em média, o gado Zebu atinge a puberdade entre 6 e 12 meses mais tarde que os taurinos (WARNICK, 1965; WILTBANK et al., 1969). As novilhas *Bos indicus* não parecem atingir a puberdade com menos de 60% de seu peso quando adulto. Em comparação aos animais *Bos taurus* tanto as de aptidão leiteira quanto as de carne parecem chegar à puberdade com 30 a 50% do peso corporal adulto (MUKASA-MUGERWA, 1989; ABEYGUNAWARDENA et al.,1994).

Segundo RODRIGUES et al. (2002), o mecanismo de contenção da atividade gonadal é o mesmo tanto na novilhas *Bos indicus*, quanto na novilhas *Bos taurus*, a diminuição da retroalimentação negativa do 17-β estradiol sobre a secreção de GnRH e os pulsos de LH coincidiu com a primeira ovulação, mas as novilhas taurinas atingiram a puberdade mais jovens que as novilhas zebuínas.

Estima-se que a idade a primeira ovulação em bovinos *Bos indicus* nos trópicos e subtropicos, ocorra entre 16 e 40 meses com uma média de 25 meses (GALINA & ARTHUR, 1989; MUKASA-MUGERWA, 1989). GUNSKI et al. (2001) em seu estudo mostraram que as fêmeas emprenharam aos 27 meses de idade em média e concluíram que o primeiro parto aos 36 meses refletiu a realidade dos rebanhos Nelore no Brasil, sob condições de criação a pasto consequenca das práticas de manejo, pois nem todas as novilhas têm a mesma oportunidade de ficar expostas ao reprodutor próximo a puberdade, mas quando elas têm mais de 24 meses e entram na estação de monta.

Vários fatores podem influenciar o momento em que a ocorre a primeira ovulação, dentre eles podem ser incluídos: genética, ambiente, interação social, estado nutricional, desenvolvimento corporal, peso, doenças, mudanças no fotoperíodo, temperatura, umidade relativa do ar, estação do ano, fatores de manejo, efeito do touro (bioestimulação), estação do nascimento e uso de protocolos hormonais. Em função da complexidade do processo, é importante que produtores e profissionais ligados ao setor pecuário conheçam como estes fatores interferem no início da puberdade para que possam adotar medidas de manejo que visem reduzir a idade à primeira ovulação nas novilhas (PATTERSON et al., 1992; SCHILLO et al., 1992; HONARAMOOZ et al., 1999; PEREIRA, 2000; GASSER et al., 2006a; MORAES et al., 2007; SILVA FILHO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009;).

O nascimento em época da seca e a exposição ao touro próximo a primeira ovulação (em torno dos 300 kg) podem antecipar a idade à puberdade na novilha (SCHILLO et al., 1992). Associado aos descritos acima os fatores que irão determinar o início da ciclicidade nas novilhas são idade (determinado pela genética) e quantidade de gordura corporal, uma vez que o hipotálamo responde ao aumento da secreção de leptina pelos

adipócitos (NOGUEIRA, 2004; KANE et al., 2004). A leptina secretada parece colaborar para reprogramar o hipotálamo, aumentando o número de picos de secreção de hormônio luteinizante (LH; GARCIA et al., 2002).
A concentração plasmáticas de progesterona indicou que, apesar do primeiro ciclo estral ter sido curto, foi seguido de ciclos estrais regulares, similar ao observado em fêmeas adultas (NOGUEIRA et al., 2003). Importante considerar é que os primeiros 2 ciclos após a primeira ovulação (incluindo o ciclo curto) possuem baixa fertilidade. Para que uma novilha fique prenha aos 16 meses ela tem que apresentar a primeira ovulação pelo menos 2 meses antes. Novilhas da raça Nelore, que foram selecionadas para precocidade e com as exigências nutricionais atendidas, ovularam entre os 12 e os 15 meses de idade mas somente os 30% que ovularam primeiro ficaram prenhes antes dos 16 meses (NOGUEIRA, 2004).

IMPORTÂNCIA DA NUTRIÇÃO NA REPRODUÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS

Dentre os fatores que influenciam a reprodução, a nutrição tem papel importante pois a reserva de energia é um importante aspecto relacionado ao desempenho reprodutivo na fêmea bovina (HAWKINS et al., 1995; MAGGIONI et al., 2008).
Segundo NOGUEIRA (2004), para que a novilha zebuína possa expressar o potencial genético para precocidade sexual é necessário que disponha de alimentação e manejo sanitário adequados. O aumento no fornecimento de energia ou proteína podem aumentar o peso e diminuir a idade à puberdade (PATTERSON et al., 1992; ROMANO et al., 2007).
A restrição nutricional prolongada retardou o início da puberdade e prejudicou a atividade cíclica de novilhas púberes suprimindo a frequencia de pulsos de secreção de LH, necessária ao crescimento dos folículos ovarianos até o estádio pré-ovulatório (YELICH et al.,1996; RAWLINGS et al*.,* 2003). Assim, a habilidade do animal manter elevada a pulsátilidade de liberação do LH depende do seu estado metabólico, principalmente da reserva energética (YELICH et al., 1996).
Entre os fatores nutricionais responsáveis pela variação reprodutiva e início da puberdade estão a porcentagem de proteína bruta, a concentração de gordura e a densidade energética da dieta (O'CALLAGHAN & BOLAND, 1999). A densidade de energia da dieta interfere no crescimento folicular, ovulação e no desenvolvimento embrionário (RIGOLON et al., 2009).
A quantidade de alimento ingerido ou a fonte de energia fornecida para fêmeas de corte e leite afetam as características do ciclo estral, como: duração, padrão de ondas foliculares, dimensão das estruturas ovarianas e concentrações circulantes de hormônios esteróides. A restrição alimentar pode diminuir a ciclicidade por reduzir, entre outros parâmetros, a concentração plasmática de glicose e insulina. Alta ingestão alimentar, por sua vez, aumentar a atividade hepática e aumentar o catabolismo de hormônios esteróides no fígado (SARTORI & MOLLO, 2007) diminuindo sua concentração plasmática, o que compromete a sincronia hormonal que controla o ciclo estral.
A ausência de ciclicidade ovariana em vacas, com aptidão para produção de carne, submetidas a estresse nutricional pode ser conseqüência da diminuição da concentração plasmática de insulina, que diminui a captação da glicose pelo ovário, privando as células da energia necessária para a atividade esteroidogênica durante o próximo ciclo estral. Essa diminuição da insulina também causa a queda no número de receptores para o LH nas células luteínicas, diminuindo ainda mais sua habilidade em sintetizar progesterona. Da mesma forma, atribui-se ao colesterol papel de importância

nesse processo, pois fêmeas submetidas à restrição energética mostraram baixas concentrações de colesterol, associadas às concentrações inferiores de progesterona plasmática (SCHRICK et al., 1990).

O percentual do peso adulto adquirido pela novilha exerce uma importante participação na expressão do potencial de puberdade precoce. Mas mais importante que o peso absoluto, é o fato do animal estar ganhando ou perdendo peso, o que interfere na secreção de gonadotrofinas e no desenvolvimento folicular (NOGUEIRA, 2004; GASSER et al., 2006c).

MOSSMANN & HANLY (1977) consideram que as fêmeas necessitam apresentar aproximadamente 65% do peso da vaca adulta para apresentar cio e obter índices de concepção acima de 85%. Novilhas com diferentes tipos de alimentação chegam à puberdade em diferentes idades, mas com o mesmo estádio relativo de desenvolvimento corporal (PATTERSON et al., 1992).

Segundo RODRIGUES et al. (2002), novilhas *Bos taurus* atingiram a puberdade mais novas e com peso inferior as novilhas *Bos indicus* 507 ± 37 dias vs. 678 ± 7 dias de idade, e com peso de 259 ± 14 kg vs. 312 ± 11 kg, respectivamente.

Segundo BAGLEY (1993), o desmame prematuro associado a uma alimentação de boa qualidade permite que as novilhas de corte a atinjam a puberdade mais cedo. DAY & ANDERSON (1998), observaram que aproximadamente 50% das novilhas taurinas de cruzamento industrial desmamadas entre o 3º e o 4º mês de vida e alimentadas com uma dieta com alto nível de carboidrato atingiram ao 7º mês a puberdade. Importante considerar que a puberdade pode ser antecipada em poucos meses, animais mais tardios dificilmente respondem às alterações de manejo para antecipar a puberdade, a menos que esteja à poucos meses da primeira ovulação.

Inadequada ingestão de energia e escore de condição corporal 2 (escore de 1 a 5) podem afetar negativamente a função reprodutiva. A suplementação lipídica tem sido usada para aumentar a densidade energética da dieta, podendo também afetar positivamente a reprodução em fêmeas de corte (FUNSTON, 2004). Gorduras na dieta podem melhorar a eficiência reprodutiva das fêmeas por melhorar a condição energética e aumentar os precursores das sínteses dos hormônios reprodutivos como os esteróides (SARTORI & MOLLO, 2007).

A suplementação com gordura protegida tem aumentado a taxa de concepção em vacas de leite durante a lactação (BOKEN et al., 2005). O uso de ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, particularmente o Omega-3, pode estar aumentando a fertilidade das fêmeas bovinas (COLAZO et al., 2004).

Em novilhas de corte (½Angus x ½Simental) a combinação do desmame prematuro e a alimentação com uma dieta contendo alto nível de concentrado (60% milho) induziu à primeira ovulação expontânea antes dos 10 meses de idade. Essa ovulação precoce pôde ser realçada pelo aumento da freqüência pulsátil de LH (GASSER et al., 2006b, c). Do mesmo modo, SCHILLO et al. (1992), indicaram que a maior ingestão de energia estimula a secreção de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) que, consequentemente, aumenta a síntese e liberação de LH.

A suplementação com gordura aumentou a porcentagem de novilhas F1 (filhas de vacas mestiças com touros Hereford ou Limousin ou Piemontês) púberes no começo da estação de monta. Essas novilhas foram consideradas púberes quando a concentração plasmática de progesterona ficou acima de 1 ng/mL entre os dias 7 e 10 do ciclo estral (LAMMOGLIA et al., 2000).

Novilhas púberes (½Angus x ½Hereford), entre 18 e 20 meses de idade, com ciclos estrais normais foram divididas em dois grupos que receberam a ração composta dos mesmos alimentos. Entretanto, um grupo experimental recebeu apenas 85% da energia e proteína necessárias para mantença. A subnutrição reduziu a população de

folículos ovarianos no 15º ao 17º dia do ciclo, diminuiu significativamente a concentração plasmática de P4 dentro de cinco dias e aumentou a variação do período do ciclo estral (HILL et al., 1970) mostrando que a nutrição interfere na reprodução.

HORMÔNIOTERAPIA

Durante a maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadas, ocorre um aumento na secreção de gonadotrofinas, conseqüência da redução gradual da sensibilidade do hipotálamo a retroalimentação negativa dos esteróides sobre o hipotálamo são consideradas alterações do início da puberdade em mamíferos. O principal objetivo dos tratamentos para antecipar a primeira ovulação visam reprogramar o hipotálamo diminuindo a retroalimentação negativa do estradiol utilizando outros esteroides (D'OCCHIO et al., 1988).

Vários hormônios são utilizados para antecipar a primeira ovulação em novilhas e melhorar a eficiência reprodutiva destes animais (RASBY et al.,1998; VOGG et al., 2004; BRAGANÇA et al., 2004, COSTA, 2006). O crescimento folicular pode ser induzido com a combinação de progesterona com o estradiol, associando também o GnRH e seus análogos (THATCHER et al., 2001). A principal idéia é simular o que acontece após a primeira ovulação,quando a novilha apresenta um ciclo curto. Considerando a necessidade de uma exposição previa à progesterona é possível apenas com o uso desta induzir a puberdade em novilhas, entretanto, sua eficácia é influenciada pela idade, manejo, peso corporal e grau de desenvolvimento folicular antes do tratamento, em resumo depende da proximidade da idade a primeira ovulação expontânea.

ANDERSON et al. (1996) expuseram novilhas ao progestágeno norgestomet durante 10 dias, induziram a puberdade em 86% das novilhas e concluíram que a progesterona pode induzir a puberdade suprimindo os receptores para estradiol no hipotálamo, e que, com a retirada da progesterona aceleraria a secreção de LH para nivelar a fase folicular conduzindo à primeira ovulação. Como comentado acima a progesterona parece induzir a puberdade somente nas novilhas na quais a retroalimentação negativa do estradiol já tinha começado a declinar.

A associação de progestágenos com o benzoato de estradiol (BE), tem sido alvo de inúmeros estudos, visando associar os possíveis benefícios fisiológicos do estrógeno ao seu baixo custo comercial (VOGG et al., 2004)**.** O BE no início do tratamento com progesterona provoca atresia dos folículos dominantes presentes no ovário e a emergência de uma nova onda folicular aproximadamente 4,3 dias após sua aplicação (BRAGANÇA et al., 2004). Segundo BRIDGES et al. (1999) esta associação é útil para elevar a taxa de cio e de prenhez em novilhas próximas à puberdade.

RASBY et. al. (1998), trabalhando com novilhas mestiças peri-púberes, demonstraram que um tratamento de curto período (7 dias) somente com um dispositivo com progesterona foi capaz de induzir a puberdade. Entretanto, a combinação deste protocolo com BE (1 mg, i.m.) no oitavo dia induziu o estro com o desenvolvimento de um corpo lúteo funcional em um maior número de animais e proporcionou uma sincronia no aparecimento dos sinais de estro, 2 a 4 dias, após o fim do tratamento. Como nas novilhas há pouco estradiol pois os folículos são pequenos a exposição à progesterona associada ao estradiol pode ajudar a reprogramar o hipotálamo.

VOGG et al. (2004) utilizaram um protocolo de sete dias, onde no dia zero, as novilhas receberam esponjas com acetato de medroxiprogesterona (MAP) e uma aplicação de 5 mg de BE por via intramuscular. Este protocolo demonstrou que a utilização de 0,5 mg ao invés de 1 mg de BE, 24 horas após o final do tratamento com progestágeno, deve

ser a dose máxima para que as novilhas respondam sem afetar a fertilização do oócito, cujo folículo está prestes a ovular. Ainda esses autores recomendam a associação de progestágenos com o BE para reduzir a variabilidade da manifestação do cio.
Segundo CLARO et al., 2010, a utilização de um dispositivo de progesterona exógena de 4º uso antecipou a puberdade e melhorou a taxa de prenhez de novilhas Nelore pré-puberes, resultando em maior diâmetro folicular, concepção em 7 dias, e a taxa de prenhez confirmada nos primeiros 45 dias da estação de monta. Assim, o tratamento de novilhas pré-puberes *Bos indicus* com um dispositivo usado é preferível para induzir a puberdade e melhorar o desempenho reprodutivo durante a estação de monta. No estado do Ceará, COSTA (2006) obteve uma taxa de prenhez em novilhas mestiças pré-púberes após tratamento hormonal Ovsynch, e encontrou uma taxa de prenhez de 26 %, a seqüência progesterona-estradiol é importante para a reprogramação do hipotálamo.

CONCLUSÃO

Para que a novilha zebuína possa expressar o potencial genético relacionado ao fenótipo da idade ao primeiro parto, é necessário que disponha de alimentação adequada e bom manejo sanitário. Outras variáveis como o nascimento na época da seca e a exposição ao touro próximo ao período da puberdade (próximo dos 300 kg) podem contribuir para a antecipação da idade à puberdade. Um manejo recomendado é inserir um touro no lote de novilhas e selecionar as que ficaram prenhes até os 16 ou18 meses de idade, estabelecendo um fenótipo de seleção com elevada herdabilidade. Outra possibilidade é utilizar o tratamento hormonal para reprogramar o hipotálamo e antecipar a primeira ovulação, no entanto a eficiência destes protocolos precisa ser melhorada. A antecipação da primeira ovulação depende da possibilidade genética, não se consegue antecipar muito a puberdade, as novilhas que respondem às mudanças no manejo parecem ser as novilhas que estão mais próximas da ovulação.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ABEYGUNAWARDENA H. & DEMATAWEWA, C.M.B. Pre-pubertal and postpartum anestrus in tropical Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**. v.82, n.83, p. 373–387, 2004.

ANDERSON, L.H.; McDOWELL, C.M.; DAY, M.L. Progestin-induced puberty and secretion or luteinizing hormone in heifers. **Biology of Reproduction**, v.54, p. 1025-1031, 1996.

BAGLEY, C.P. Nutritional management of replacement beef heifers: a review. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 3155–3163, 1993.

BALL, P. J.H. & PETERS, A.R. Ciclo ovariano. In:____. **Reprodução em bovinos**, 3. ed. São Paulo: Roca, 2006. p. 38-52.

BRAGANÇA, J.F.M.; GONÇALVES, P.B.D.; BASTOS, G.M.; NEVES J.P.; OLIVEIRA J.F.C.;SIQUEIRA L.C.; BORGES L.F.K.; POMBO R.D. Sincronização de estro e ovulação em novilhas de 12 a 14 meses de idade e inseminadas artificialmente com

observação de estro e horário pré-fixado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, n.2, p.73-77, 2004.

BRIDGES, P.J.; LEWIS, P.E.; WAGNER, W.R.; INSKEEP E.K. Follicular growth, estrus and pregnancy after fixed-time insemination in beef cows treated with intravaginal progesterone inserts and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 52, p. 573-583, 1999.

BOKEN, S.L.; STAPLES, C.R.; SOLLENBERGER, L.E.; JENKINS, T.C.; THATCHER, W.W. Effect of grazing and fat supplementation on production and reproduction of Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.88, n.12, p. 4258-4272, 2005.

CARDOSO, D. & NOGUEIRA, G.P. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Universidade Paranaense**, v. 10, n. 1, p. 59-67, 2007.

CLARO JÚNIOR, I.; SÁ FILHO, O.G.; PERES, R.F.G.; AONO, F.H.S.; DAY, M.L.; VASCONCELOS, J.L.M. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. **Theriogenology**, In Press, Corrected Proof, Available online 21 May 2010.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MARTÍNEZ, M.F.; WHITTAKER, P.R.; WILDE, R.; AMBROSE, J.D.; CORBETT, R.; MAPLETOFT, R.J. Fertility following fixed-time AI in CIDR-treated beef heifers given GnRH or estradiol cypionate and fed diets supplemented with flax seed or sunflower seed. **Theriogenology**, v. 61, p. 1115-1124, 2004.

COOKE, R.F.; ARTHINGTON, J.D.; ARAUJO, D.B.; LAMB, G.C.; EALY, A.D. Effects of supplementation frequency on performance, reproductive, and metabolic responses of Brahman-crossbred females. **Journal of Animal Science**, v. 86, p. 2296–2307, 2008.

COSTA, A.N.L. **Sincronização do estro e da ovulação em novilhas girolandas: comparação entre dois protocolos hormonais "CIDR-B" e "OVSYNCH"** Fortaleza, 2006. 65p. (Dissertação em Zootecnia) Universidade Federal do Ceará, 2006.

DAY, M. L. & ANDERSON, L. H. Current concepts on the control of puberty in cattle. **Journal of Animal Science**, v.76 (S3), p.1–15, 1998.

D'OCCHIO, M. J.,. GIFFORD, D. R.; HOSKINSON, R. M.; WEATHERLY, T.; SETCHELL, B.P. Gonadotrophin secretion and ovarian responses in prepubertal heifers actively immunized against androstenedione and oestradiol-17b. **J. Reprod. Fertil**. 83:159. 1988.

FUNSTON, R.N. Fat supplementation and reproduction in beef females. **Journal of Animal Science**, v. 82 (E. Suppl.), p. E154–E161, 2004.

GALINA, C.S., ARTHUR, G.H. Review of cattle reproduction in the tropics. Part 1. Puberty and age at first calving. **Anim. Breed. Abstr**, v.57, p. 583–590, 1989.

GARCIA, M.R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S.W.; STANKO, R.L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G.L. Serum leptin and its adipose gene

expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p.2158-2167, 2002.

GASSER, C.L.; BRIDGES, G.A. MUSSARD, M.L.; GRUM, D.E.; KINDER, J.E.; DAY, M.L. Induction of precocious puberty in heifers III: Hastened reduction of estradiol negative feedback on secretion of luteinizing hormone. **Journal of Animal Science**, v. 84, p.2050–2056, 2006a.

GASSER, C. L.; BURKE, C. R.; MUSSARD, M. L.; BEHLKE E. J.; GRUM, D. E.; KINDER, J. E.; DAY. M. L. Induction of precocious puberty in heifers II: Advanced ovarian follicular development. **Journal of Animal Science**, v. 84, p.2042–2049, 2006b.

GASSER, C.L.; GRUM, D.E.; MUSSARD, M.L.; FLUHARTY, F.L.; KINDER, J.E.; DAY, M.L. Induction of precocious puberty in heifers I: Enhanced secretion of luteinizing hormone. **Journal of Animal Science**, v. 84, p.2035-2041, 2006c.

GUNSKI, R.J.; GANERO,A.V.;BEZERRA,L.A.F. et al.. **Idade ao Primeiro Parto, Período de Gestação e Peso ao Nascimento na Raça Nelore**. Ciência Agronômica,v.32,n.1/2,p.46-52, 2001.

HAWKINS, D.E.; NISWENDER, K.D.; OSS, G.M.; MOELLER, C.L.; ODDE, K.G.; SAWYER, H.R.;NISWENDER, G.D. An increase in serum lipids increases luteal lipid content and alters the disappearance rate of progesterone in cows. **Journal of Animal Science**, v.73, p. 541-545, 1995.

HILL, J.R.; LAMOND, D.R.; HENRICKS, D.M.; DICKEY, J.F.; NISWENDER, G.D. The effects of undernutrition on ovarian function and fertility in beef heifers. **Biology of Reproduction**, v.2, p. 78-84, 1970.

HONARAMOOZ, A.; CHANDOLIA, R.K.; BEARD, A.P. RAWLINGS N.C. Effects of season of birth on the prepubertal pattern of gonadotropin secretion and age at puberty in beef heifers. **Theriogenology**, v.52, p.67-79, 1999.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2008. www.ibge.gov.br

IPARDES, Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico Social. Grupo de Estudos de Políticas Agroindustriais. GEPAI/UFSCAR. Instituto Brasileiro da Qualidade e Produtividade no Paraná/IBPQ. Análise da competitividade da cadeia agroindustrial da carne bovina no estado do Paraná. Curitiba: IPARDES, 2002. 255p.

KANE, K.K.; HAWKINS, D.E.; PULSIPHER, G.D.; DENNISTON, D.J.; KREHBIEL, C.R.; THOMAS, M.G.; PETERSEN, M.K.; HALLFORD, D.M.; REMMENGA, M.D.; ROBERTS, A.J.; KEISLER, D.H. Effect of increasing levels of undegradable intake protein on metabolic and endocrine factors in estrous cycling beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 283–291. 2004.

KINDER, J.E.; DAY, M.L.; KITTOK, R.J. Endocrine regulation of puberty in cows and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility** Suppl 1987; 34:167–186.

LALMAN, D.L.; PETERSEN, M.K.; ANSOTEGUI, R.P.; TESS, M.W.; CLARK, C.K.; WILEY, J.S. The effects of ruminally undergradable protein, propionic acid, and monensin on puberty and pregnancy in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 71, p. 2843-2852, 1993.

LAMMOGLIA, M.A.; BELLOWS, R.A.; GRINGS, E.E.; BERGMAN, J.W.; BELLOWS, S.E.; SHORT, R.E.; HALLFORD, D.M.; RANDEL, R.D. Effects of dietary fat and sire breed on puberty, weight, and reproductive traits of F1 beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 2244–2252. 2000.

MAGGIONI, D.; ROTTA, P.P.; MARQUES, J.A.; ZAWADZKI, F.; PRADO, R.M.; PRADO, I.N. Influência da proteína sobre a reprodução animal: uma revisão. **Campo Digital**, v.1, n.2, p.105-110, 2008.

Mc NAMARA, S.; BUTLER, T.; RYAN, D.P.; MEE, J.F.; DILLON, P., O´MARA, F.P.; BUTLER, S.T.; ANGLESEY, D.; RATH, M.; MURPHY, J.J. Effect of offering rumen-protected fat supplements on fertility and performance in spring-calving Hostein-Friesian cows. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 45-56, 2003.

MORAES, J.C.F.; JAUME, C.M.; SOUZA, C.J.H. Manejo reprodutivo da vaca de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.160-166, 2007.

MORAN, C.; QUIRKE, S.J.; ROCHE, J.F. Puberty in heifers: a review. **Animal Reproduction Science**, v.18, p.167-182, 1989.

MOSSMAN, D.H. & HANLY, G.J. A theory of beef production *New Zealand Veterinary Journal*., v.25, p.96-100, 1977

MUKASA-MUGERWA, E. **A Review of Reproductive Performance of Female *Bos indicus* (Zebu) Cattle**. ILCA Monograph 6, International Livestock Centre for Africa, Nairobi, Kenya, 1989.

NOGUEIRA, G. P.; de LUCIA, R.F.S.; PEREIRA, F.V.; CIRILO, P.D.R. Precocious fertility in Nelore heifers. **Biology of Reproduction**, v. 68 (S1), p. 382, 2003.

NOGUEIRA, G.P. Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p. 361-372, 2004.

O'CALLAGHAN, D. & BOLAND, M.P. Nutritional effects on ovulation, embryo development and the establishment of pregnancy in ruminants. **Journal of Animal Science**, v.68, p. 299-314, 1999.

OLIVEIRA, R.L., BARBOSA, M. A. A. F., LADEIRA, M. M., DA SILVA, M. M. P., ZIVIANI A. C. Nutrição e manejo de bovinos de corte na fase de cria. In: **II SIMBOI - Simpósio sobre Desafios e Novas Tecnologias na Bovinocultura de Corte**, 29 a 30.04.2006, Brasília-DF, 2006.

OLIVEIRA, C.M.G.; OLIVEIRA FILHO, B.D.; GAMBARINI, M.L.; VIU, M.A.O.; LOPES, D.T.; SOUSA, A.P.F. Effects of biostimulation and nutritional supplementation on pubertal age and pregnancy rates of Nelore heifers (*Bos indicus*) in a tropical environment. **Animal Reproduction Science**, v.113, p. 38–43, 2009.

PATTERSON, D. J.;PERRY, R.C.; KIRACOFE, G.H.; BELLOWS, R.A.; STAIGMILLER, R.B.; CORAH, L.R. Management considerations in heifers development and puberty. **Journal of Animal Science**, v.70, p. 4018-4035, 1992.

PEREIRA, J. C. C. Contribuição genética do Zebu na pecuária bovina do Brasil. **Informe Agropecuário**, v. 21, p. 30-38, 2000.

PESSUTI, O. & MEZZADRI, F. P. Atualidade e perspectivas da pecuária paranaense. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina, 2004. p. 21-27, 2004.

RASBY, R.J.; DAY, M.L.; JOHNSON, S.K.; Kinder J.E.; Lynch J.M.; Short R.E.; Wettemann R.P.; Hafs H.D. Luteal function and estrus in peripubertal beef heifers treated with an intravaginal progesterone releasing device with or without a subsequente injection of estradiol, **Therigenology**, v. 50, p. 55-63, 1998.

RAWLINGS, N. C.; EVANS, A. C. O.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P. M. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 259-270, 2003.

RIGOLON, L.P.; PRADO, I.N.; CAVALIERI, F.L.B.; NASCIMENTO, W.G.; COPOVILA, L.C.; RAMOS, F.S.; MOREIRA, F.B. Effect of the dry matter intake level on the sanguine profile of glucose, insulin, urea, estrogen and progesterone and concentration of IGF-I in the follicular liquid of crossbred heifers. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.1, p. 61-68, 2009.

RODRIGUES, H.D.; KINDER, J.E.; FITZPATRICK, L.A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. **Biology of Reproduction**, v.66, p. 603-609, 2002.

ROMANO, M.A.; BARNABE, V.H.; KASTELIC, J.P.; de OLIVEIRA, C.A.; ROMANO, R.M. Follicular dynamics in heifers during pre-pubertal and pubertal period kept under two levels of dietary energy intake. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 616-622, 2007.

SARTORI, R. & MOLLO, M.R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.197-204, 2007.

SCHILLO, K.K.; HALL, J.B.; HILEMAN, S.M. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3994-4005, 1992.

SCHRICK, F.N., SPITZER, J.C., JENKINS, T.C.; HENRICKS, D.M.; ALTHEN, T.G. Effect of dietary energy restriction on metabolic and endocrine responses during the estrous cycle of the suckled beef cow. **Journal of Animal Science**, v.68, n.10, p.3313-3321, 1990.

SILVA FILHO, A. H. S.; ARAÚJO, A. A.; RODRIGUES, A. P. R. Indução da puberdade em novilhas com o uso da hormonioterapia. **Ciência Animal**, v.17, n.2, p.83-89, 2007.

THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.A.; SANTOS, J.E.P.; MATTOS, R.C.; LOPES, F.L.; PANCARCI, S.M.; RISCO, C.A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production.**Theriogenology**, v.55, p. 75-89, 2001.

VALE, W.G. & RIBEIRO, H.F.L. Características reprodutivas dos bubalinos: puberdade, ciclo estral, involução uterina e atividade ovariana no pós-parto. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 29, n. 2, p. 63-73, 2005.

VOGG, G.; SOUZA, C.J.H.; JAUME, C.M.; MORAES J.C.F. Utilidade do benzoato de estradiol após suplementação com progestágeno na sincronização de cios de novilhas de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p. 41-46, 2004.

VALLE, E.R.; ANDREOTTI, R.; THIAGO, L.R.S. **Estratégias para aumento da eficiência reprodutiva e produtiva em bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa/CNPGC, 1998.

YELICH J.V., WETTEMANN R.P., MARSTON T.T., SPICER L.J. Luteinizing Hormone, Growth Hormone, Insulin-Like Growth Factor-I, Insulin and metabolites before puberty in heifers fed to gain at two rates. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 13, n. 4, p. 325-338, 1996.

WARNICK, A.C. **Reproduction and fertility in beef cattle**. In: Cunha, T.J., Rhodes, C.G. (Eds.), Beef Cattle in Florida. Department of Agriculture, Gainesville, FL, p. 59–68, 1965.

WILTBANK, J.N., KASSON, C.W., INGALLS, J.E. Puberty in cross-bred and straightbred beef heifers on two levels of feed. **Journal of Animal Science**, v.29, p. 602–605, 1969.

INDUÇÃO DE CICLICIDADE E IATF EM NOVILHAS ZEBUINAS

(Induction of cyclicity and FTAI in zebu heifers)

Manoel F. Sá Filho[1], Marcio O. Marques[2], Pietro S. Baruselli[1]

[1] Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, São Paulo-SP. [2] Geraembryo, Cornélio Procópio/PR, Brasil, manoelsa@usp.br

INTRODUÇÃO

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 apresenta grande importância, principalmente no ponto de vista da concentração da ocorrência das gestações em momentos mais adequados durante a estação reprodutiva bem como o de promover o melhoramento genético do rebanho.

A manipulação estratégica das gestações, e conseqüentemente dos partos, deve ser considerada como importante ferramenta do manejo reprodutivo. A ocorrência dos partos em momentos mais favoráveis do ano determina maiores chances de re-concepção, principalmente em primíparas. Além disso, a concentração dos partos possibilita a utilização de técnicas de manejo estratégico, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), além de viabilizar a suplementação alimentar para determinados lotes. Estas estratégias nutricionais e de manejo podem aumentar a taxa de prenhez ao final da estação de monta, sobretudo em fêmeas primíparas que normalmente apresentam comprometimentos na eficiência reprodutiva.

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, por viabilizar o cruzamento industrial em regiões tropicais e aumentar a produção de carne por hectare. Embora apresente essas vantagens, apenas 8% 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 EM NOVILHAS

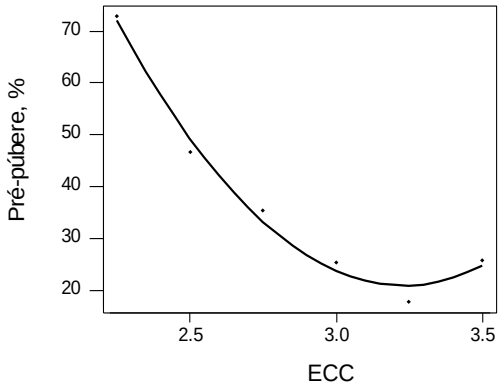
Em fêmeas bovinas, a puberdade pode ser definida como momento em que ocorre a primeira ovulação. A partir desse momento, a novilha adquire capacidade de reproduzir. Entretanto, a puberdade não deve ser interpretada como um evento isolado, sendo caracterizada como a etapa final de inúmeras alterações fisiológicas e morfológicas que culminam com a capacidade de conceber e manter a gestação. Sendo assim, a maturidade sexual da novilha é adquira após a ovulação acompanhada de uma fase luteínica de duração normal e do desenvolvimento adequado do sistema genital.

Após o nascimento, diversos mecanismos endócrinos bloqueiam o funcionamento do sistema reprodutivo até que a fêmea atinja o desenvolvimento corporal compatível com a reprodução. Quando a novilha inicia a atividade reprodutiva, os gastos energéticos utilizados para o crescimento e desenvolvimento diminuem, permitindo as ocorrências normais da gestação, parto e lactação (NOGUEIRA, 2006).

A idade à puberdade é uma característica de produção fundamental em bovinos. Em raças zebuínas 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, as novilhas devem apresentar o primeiro parto 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 criadas a pasto varia entre 22 e 36 meses, projetando a idade ao primeiro parto para 44 a 48 meses (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 ocasiona perdas econômicas para o produtor e para a indústria pecuária. Podem-se ressaltar algumas das importantes causas para o aparecimento tardio da puberdade nos rebanhos zebuínos criados a pasto em países tropicais: 1) a sazonalidade da produção de forragens, 2) o manejo deficiente de pastagens, 3) a inexistência de suplementação alimentar durante o período de crescimento e 4) a pouca de seleção genética para precocidade sexual.

No entanto, existem trabalhos que são indicativos de que um manejo nutricional adequado, associado à terapia hormonal, pode reduzir a idade à puberdade de fêmeas zebuínas criadas a pasto para 18 a 20 meses (SANTOS e SÁ FILHO, 2006).

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. Verificou-se que o aumento da condição corporal ou do peso vivo reduziu a proporção de novilhas em anestro no início da estação de monta (Figura 1).



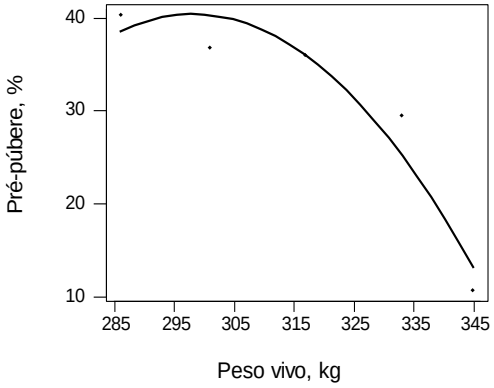


Figura 1. Relação entre o escore de condição corporal (ECC) e o peso vivo com a porcentagem de novilhas Nelore classificadas como pré-púbere entre dois a três anos de idade (SANTOS e SÁ FILHO, 2006).

Em outro levantamento realizado em fazendas comerciais localizadas nos estados do Paraná e do Mato Grosso do Sul, avaliou-se o efeito da condição corporal na freqüência de novilhas Nelore (n=1803) que apresentaram corpo lúteo no primeiro dia da estação reprodutiva (SÁ FILHO et al., 2008). 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.
No início da estação reprodutiva, as novilhas devem atingir um peso equivalente a 55-60% do peso adulto da vaca da raça correspondente. Para atingir esse peso precocemente é necessário que essas novilhas sejam submetidas a manejo nutricional adequado. No caso de novilhas de corte de raças zebuínas, o peso ao início da estação reprodutiva deve estar em torno de 300 a 350 kg. Os dados são indicativos de que novilhas que não atingem peso adequado no início da estação apresentam redução no desempenho reprodutivo. No caso de novilhas zebuínas, a suplementação alimentar para obtenção de um peso vivo de 300 a 350 kg aos 18 meses pode se justificar economicamente conforme o manejo da propriedade (SANTOS e SÁ FILHO, 2006).

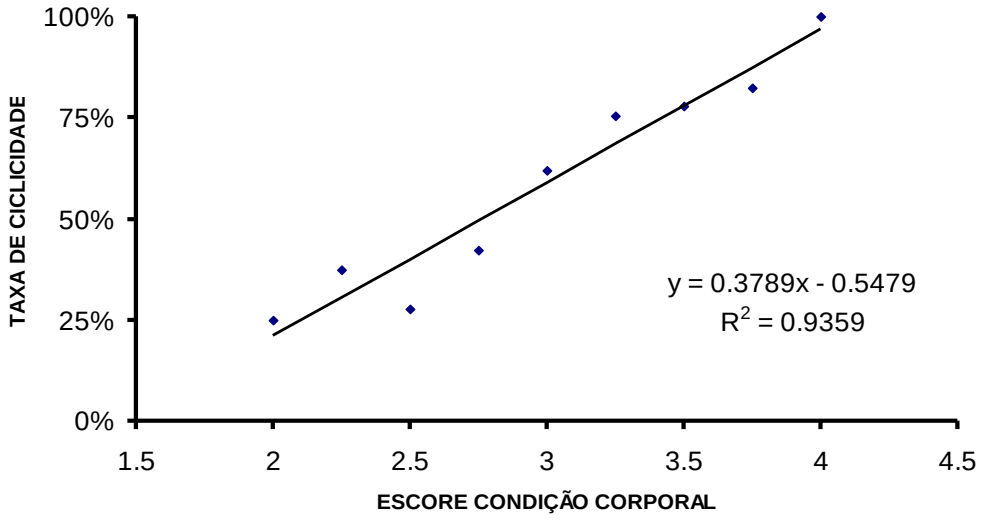


Figura 2. Relação entre o escore de condição corporal e a porcentagem de novilhas Nelore (n=1803) com presença de corpo lúteo no primeiro dia da estação de monta (SÁ FILHO et al., 2008).

MANEJO REPRODUTIVO DE NOVILHAS

O principal objetivo do manejo reprodutivo de novilhas em fazendas comerciais de cria e recria é a obtenção da quantidade necessária de fêmeas gestantes para realização da reposição do rebanho. Dentre as categorias que podem ser utilizadas para esta reposição, a novilha é a mais comum entre os pecuaristas. Normalmente, a quantidade de novilhas que é introduzida no início da estação reprodutiva é de 10 a 35% do

número total de matrizes do rebanho. Entretanto, esta proporção é dependente do grau estabilidade ou crescimento do rebanho, bem como dos índices zootécnicos obtidos.

Como previamente discutido, diversos são os fatores associados à taxa de ciclicidade ao início da estação reprodutiva em novilhas zebuínas criadas a pasto. Dentre estes, a condição e o peso corporal têm efeito determinante na proporção de fêmeas ciclando ao início da estação. No Brasil, a estação reprodutiva na maioria das fazendas tem seu início durante a primavera ou verão, desta forma as novilhas passam por um período de menor disponibilidade de alimento, em termos de quantidade e qualidade, no período que antecede a estação de monta. Pastagens de *Brachiaria ssp.* apresentam redução na disponibilidade de matéria seca, proteína e NDT durante o período do inverno e início da primavera. Geralmente, este menor suporte nutricional leva à redução da taxa de desenvolvimento corporal ou mesmo queda das reservas corporais e perda peso. Portanto, novilhas criadas a pasto, podem apresentar menor desempenho e baixa taxa de ciclicidade ao início da estação reprodutiva devido à menor disponibilidade, consumo e qualidade de forragem durante o período pré-estação (inverno).

Em termos gerais, a maioria das fazendas alcança satisfatórias taxas de prenhez ao final da estação reprodutiva em novilhas, ao redor de 70 a 95%. Entretanto, um ponto importante e muitas vezes esquecido pelos pecuaristas ou técnicos é distribuição da ocorrência das gestações durante este período de cobertura, ou seja, em que momento as novilhas estão sendo cobertas e se tornando gestantes durante a estação reprodutiva.

Atualmente, a eficiência reprodutiva em novilhas aproxima-se do ideal à medida que maior proporção de novilhas é coberta e se torna gestante logo no início da estação reprodutiva. A taxa de prenhez aos primeiros 60 dias de estação de monta esta diretamente relacionada à condição e peso corporal bem como à taxa de ciclidade ao início da estação reprodutiva. Desta forma, aumentar o peso e a condição corporal ao início da estação pode ser uma estratégia para aumentar a concentração da ocorrência das gestações durante a estação de monta. Para isto é necessário realizar um adequado planejamento de disponibilidade de forragem, principalmente durante o período de inverno que antecede a estação de reprodutiva. Outra possibilidade seria a utilização de suplementação estratégica durante este período, principalmente com misturas minerais protéicas ou mesmo suplementos energéticos e protéicos, garantindo o adequado desenvolvimento corporal e o ganho de peso das fêmeas durante o período pré-estação de monta. Desta forma, seria possível aumentar o número o número de fêmeas ciclando ao início da estação de monta, concentrar a ocorrência das gestações nos momentos mais oportunos do ano, bem como viabilizar a formação de lotes de vacas de primeira cria no ano subseqüente.

A manipulação estratégica das gestações, e conseqüentemente dos partos, é uma das principais ferramentas do manejo reprodutivo em bovinos. A ocorrência dos partos em momentos mais favoráveis do ano determina maiores chances de re-concepção, principalmente em vacas de primeira cria. Além disso, a concentração dos partos possibilita a utilização de técnicas de manejo estratégico, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), além de viabilizar a suplementação alimentar para determinados lotes. Estas estratégias nutricionais de manejo podem aumentar a taxa de prenhez ao final da estação de monta, sobretudo em fêmeas primíparas que normalmente apresentam comprometimentos na eficiência reprodutiva.

TERAPIAS HORMONAIS PARA A INDUÇÃO DE CICLICIDADE EM NOVILHAS ZEBUINAS

Diversos estudos foram conduzidos para induzir puberdade de novilhas taurinas (GASSER et al., 2006). A indução da puberdade pode ser obtida por estratégias de manejo nutricional, que visam o incremento do peso ao desmame e do ganho de peso entre o nascimento e o desmame (ARIJE e WILTBANK, 1971) ou durante a fase de recria. Além disso, existe a possibilidade de induzir a puberdade por suplementação hormonal com tratamentos à base de progesterona ou progestágenos (ANDERSON et al., 1996; SALES et al., 2008; SÁ FILHO et al., 2006, 2009).

Nosso grupo de pesquisa tem realizado estudos para avaliar a resposta à diferentes protocolos hormonais de indução de puberdade em novilhas zebuínas, principalmente da raça Nelore. Em um primeiro estudo, Sá Filho et al. (2006) utilizaram 389 novilhas Nelore peri-púberes (ausência de corpo lúteo e presença de folículo > 8mm) para avaliar o uso de um dispositivo intravaginal de progesterona previamente utilizado por 24 dias (CIDR) na indução de ciclicidade. No D0, os animais foram divididos em 3 grupos: Grupo Controle (n=129), nenhum tratamento; Grupo P4 (n=132), utilizou-se um CIDR por 10 dias seguido da administração de 1mg de BE no momento da retirada; e Grupo P4BE (n=127) que recebeu o mesmo tratamento do Grupo P4 associado a 2 mg de BE no momento da inserção do dispositivo. Após 20 dias da retirada (D30), os animais foram sincronizados para IATF. Observou-se aumento na taxa de ciclicidade das novilhas tratadas com CIDR (presença de CL no D30). Os resultados para taxa de ciclicidade no D30 foram: 85,6% para o Grupo P4, 81,1% para o Grupo P4BE e 63,6% para o Grupo Controle (P<0,0001). Contudo, não houve aumento na taxa de prenhez à IATF [57,5% para o Grupo P4, 55,1% para o Grupo P4BE e 49,6% para o Grupo controle (P>0,05)]. Alem disso, observou-se que o protocolo para indução de ciclicidade foi mais eficiente em novilhas com maior ECC [61,3% para ECC ≤ 2,5; 76,7% para ECC = 2,75; e 85,5% para ECC > 3,0).

Em outro estudo realizado por nosso grupo, Sales et al (2008) avaliaram o efeito do tratamento com progesterona (P4), associado à administração de Cipionato de estradiol no dia da retirada do dispositivo de P4, na indução de ciclicidade em novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) pré-púberes. Nesse estudo, 226 novilhas (ausência de CL à ultra-sonografia) foram divididas em 3 grupos: Grupo Controle - não houve qualquer tratamento, Grupo P4 - as novilhas receberam por 8 dias um dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®, Pfizer Saúde Animal, Brasil) previamente usado por 24 dias, e Grupo P4CE - além do dispositivo de progesterona, as novilhas receberam 0,5mg de Cipionato de estradiol (ECP®, Pfizer Saúde Animal, Brasil) no dia da retirada do dispositivo (Dia 8). Avaliações ultra-sonográficas foram realizadas no dia 0 e no dia 18 para mensurar também o diâmetro uterino. Verificou-se aumento na taxa de ciclicidade nos grupos que receberam o tratamento de progesterona (Controle=18,7^{b} (14/75), P4=44,0^{a} (33/75) e P4CE=48,0^{a} (36/75). Além disso, o tratamento com progesterona aumentou o diâmetro uterino das novilhas dos grupos P4 (D0=13,0±0,3^{b} e D18=14,1±0,3^{a}, P=0,003) e P4+CE (D0=13,3±0,2^{b} e D18=14,4±0,3^{a}, P=0,003), o que não foi observado nas novilhas do grupo controle (D0=13,4±0,7 e D18=13,9±0,3, P=0,53).

Esses resultados estão de acordo com os apresentados por Wheaton & Lamb (2007), que demonstraram que o tratamento com progesterona induziu ciclicidade em vacas de corte primíparas e pluríparas. Os resultados apresentados são indicativos de que o tratamento prévio com dispositivo intravaginal de P4 foi capaz de induzir ciclicidade em novilhas cruzadas pré-púberes, além de aumentar o diâmetro uterino.

Dando seqüência aos estudos, Sá Filho et al. (2009) avaliaram diferentes tipos de indutores da ovulação em protocolos de indução de puberdade em novilhas *Bos indicus*. Foram utilizadas 480 novilhas Nelore acíclicas [útero atônico e ausência de corpo lúteo (CL) na ultra-sonografia] 40 dias antes da estação de monta. O Grupo Controle (n=95) não recebeu nenhum tratamento. O Grupo CIDR (n=130) recebeu um CIDR previamente utilizado por 24 dias durante 10 dias. Os Grupos CIDR-BE (n=127) e CIDR-ECP (n=128) receberam o mesmo tratamento do Grupo CIDR, adicionando-se 1mg de benzoato ou 0,5mg de cipionato de estradiol no momento da retirada do dispositivo, respectivamente. As fêmeas foram reavaliadas no início da estação de monta para diagnosticar a presença de CL e o ECC (ECC40). A resposta aos tratamentos foi analisada de acordo com a idade, o ECC0, bem como a mudança do ECC entre o ECC0 e o ECC40. Os resultados dos tratamentos e da mudança do ECC entre o ECC0 e o ECC40 na indução de ciclicidade estão apresentados nas figuras 3, 4 e 5. Verificou-se que as novilhas que apresentavam ECC0 ≤2.75 obtiveram menor taxa de ciclicidade (presença de CL) no início da estação de monta (55,5%; 141/254 - P<0.0001) que as novilhas com ECC0 ≥3.00 (77,9% 102/131). Também, foi observado que novilhas que apresentavam mais que 24 meses de idade demonstraram maior resposta ao tratamento (72,6% 119/164) do que novilhas com ≤ 24 meses (56,1% 124/221; p=0.03; Figura 5).

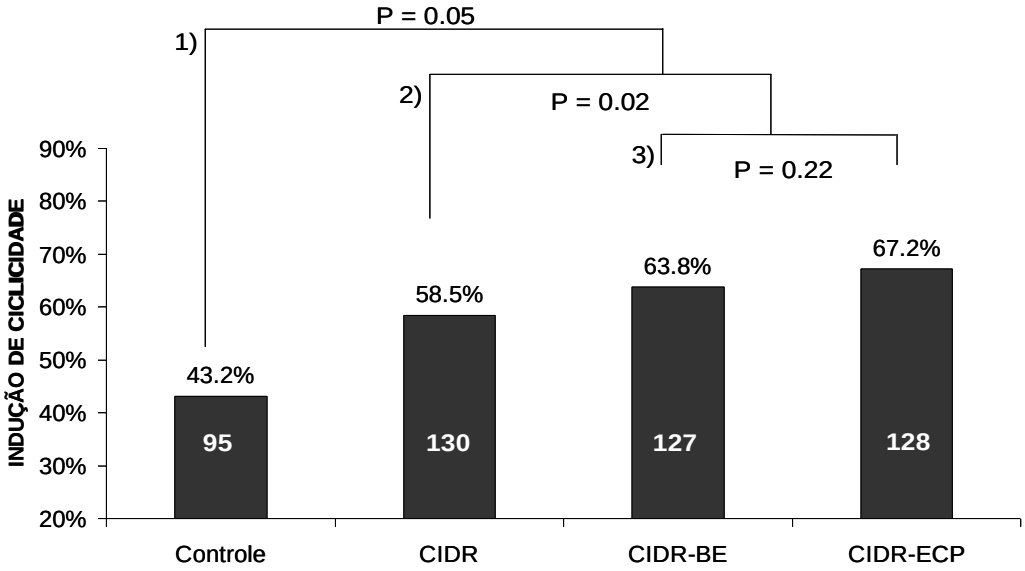


Figura 3. Efeito dos diferentes estímulos ovulatórios (cipionato ou benzoato de estradiol) no protocolo de indução de ciclicidade em novilhas zebuínas (Sá Filho et al., 2009).

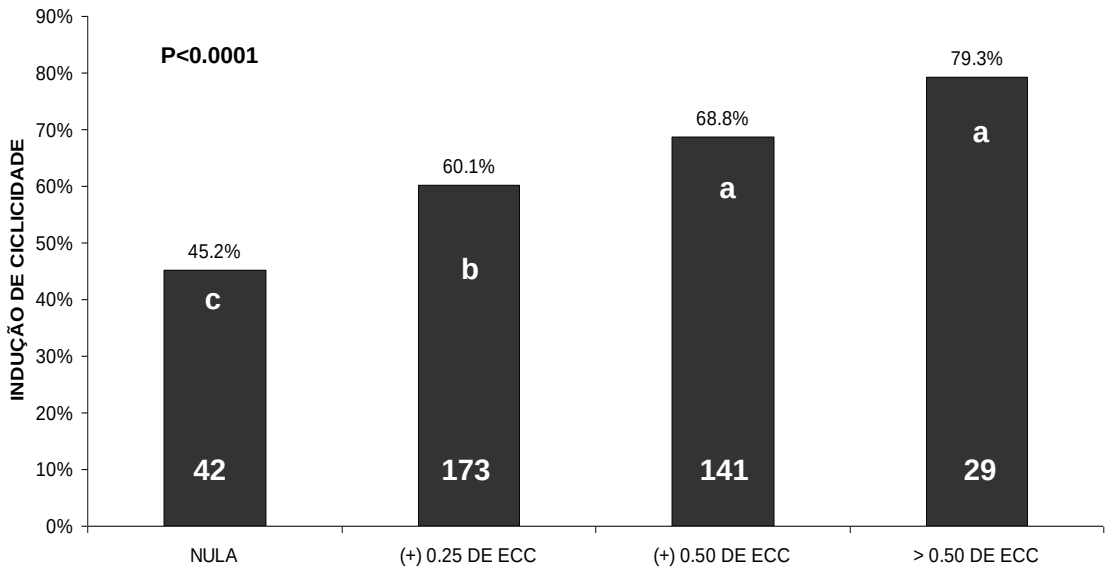


Figura 4. Efeito da mudança do ECC entre o início do protocolo de indução de ciclicidade e o início da estação reprodutiva (40 dias após) em novilhas zebuínas (Sá Filho et al., 2009).

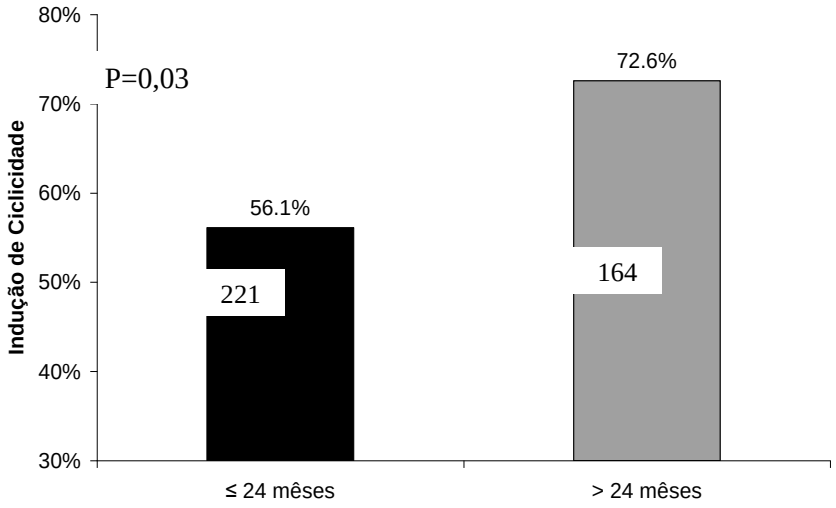


Figura 5. Efeito da idade em meses na resposta ao protocolo de indução de ciclicidade em novilhas zebuínas (Sá Filho et al., 2009).

Os resultados são indicativos de que o protocolo com CIDR induz ciclicidade, sendo essa resposta potencializada pela adição de estrógeno no momento da retirada do dispositivo de progesterona. Além disso, tanto o ECC no momento do tratamento, o aumento de ECC durante o período entre o tratamento e o inicio da estação reprodutiva quanto à idade das novilhas tratadas influenciam a resposta ao tratamento de indução de ciclicidade.

Em outro experimento, Marques, et al (2009, dados ainda não publicados) compararam o efeito do tratamento com CIDR usado previamente por 24 dias na indução de ciclicidade em novilhas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à monta natural. Nesse estudo foram utilizadas 189 novilhas Nelore acíclicas (ausência de CL por ultra-sonografia 14 dias antes da estação estação reprodutiva). Esses animais foram distribuídos em dois

grupos: Grupo Controle (n=95) - não receberam qualquer tratamento: Grupo CIDR (n=94) - receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) previamente utilizado por 24 dias durante 14 dias. Além disso, administrou-se 0,5mg de cipionato de estradiol no momento da retirada dos dispositivos intravaginais. Após a remoção dos dispositivos iniciou-se a estação reprodutiva por exposição das novilhas de ambos os grupos aos touros por 90 dias. Durante esse período foram realizados exames ultra-sonográficos aos 30, 75 e 120 dias do início da estação de monta, para avaliar as taxas de indução de ciclicidade e de prenhez, e para estimar a idade gestacional. Os resultados estão apresentados na Tabela 1 e Figura 6.

Tabela 1. Efeito do tratamento com CIDR na indução de ciclicidade e na taxa de prenhez durante a estação de monta natural (EM) de 90 dias.

Grupos	Controle	CIDR	P
Ciclicidade no primeiro mês da EM (%)	19,0 (18/95)	34,0 (32/94)	0,06
Prenhez aos 30 dias de EM(%)	15,8 (15/95)	31,9 (30/94)	0,03
Prenhez aos 90 dias de EM (%)	56,8 (54/95)	56,4 (53/94)	0,72
Intervalo início da EM / concepção (dias)	52,8±26,3	40,3±31,7	<0,001

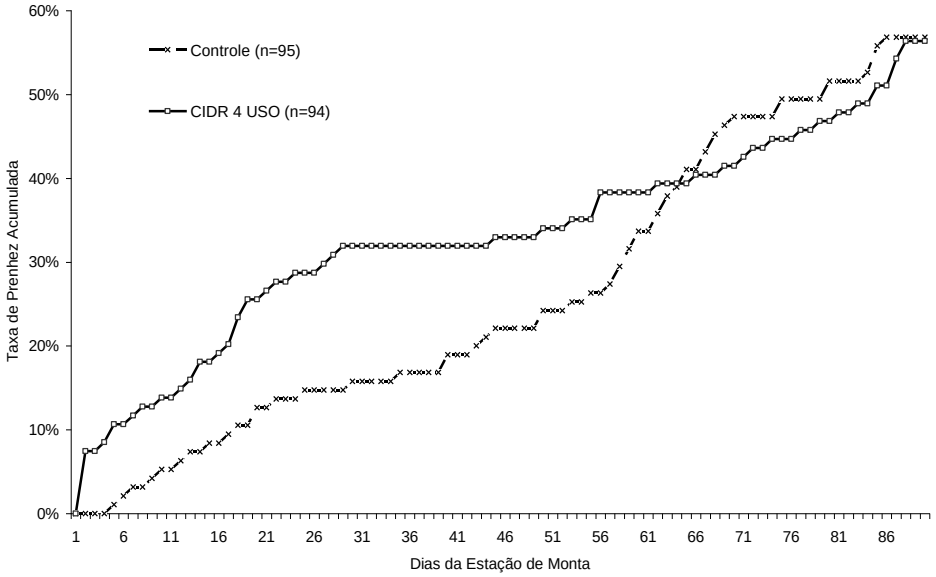


Figura 6. Efeito do tratamento com dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de prenhez acumulativa de novilhas zebuínas submetidas à monta natural (Marques et al., 2009, dados não publicados).

Verificou-se que o tratamento com CIDR aumentou a quantidade de novilhas ciclando e a taxa de prenhez nos primeiros 30 dias de estação de monta. Observou-se, também, que o tratamento reduziu o intervalo entre o início da estação de monta e a concepção, antecipando a prenhez. No entanto, a taxa de prenhez ao final da estação de monta não foi influenciada pelo tratamento.

Os resultados corroboram com os apresentados anteriormente e são indicativos de que é possível induzir a ciclicidade e antecipar a concepção com tratamentos hormonais.

IATF EM NOVILHAS ZEBUINAS

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®) em novilhas *Bos indicus, Bos indicus x Bos taurus e Bos taurus* (CARVALHO et al., 2008). 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 2), indicando baixa resposta ao tratamento de sincronização.

Tabela 2. 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.

Grupo Genético	N	Início da onda (dia)	Nº de folículos recrutados (>2mm)	∅ máximo do FD (mm)	Taxa de cresc. (mm/dia)	Taxa de ovulação (%)
B. indicus	23	3,1±0,1	33,4±3,2[a]	9,5±0,5[b]	0,9±0,1[b]	39,1 [b]
B.indicus taurus	25	3,3±0,1	29,6±2,5[ab]	12,3±0,4[a]	1,2±0,1[a]	84,0[a]
B. taurus	22	3,2±0,1	25,4±2,5[b]	11,6±0,5[a]	1,1±0,1[a]	72,7[a]

Em resumo, novilhas *Bos indicus* apresentaram menor taxa de crescimento (mm/dia), menor diâmetro máximo do folículo dominante e menor taxa de ovulação que as novilhas *Bos taurus.* Assim, os níveis circulantes de P4 derivados da somatória entre a fonte endógena (corpo lúteo) e a fonte exógena (dispositivo de progesterona) em

novilhas *Bos indicus* podem diminuir a freqüência da liberação de LH o que compromete o crescimento folicular e a ovulação, inviabilizando o emprego deste tratamento para a IATF em novilhas zebuinas.

ESTRATÉGIA PARA UTILIZAÇÃO DE DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS EM NOVILHAS

Diversas possibilidades foram testadas na tentativa de diminuir a concentração de progesterona durante os tratamentos de sincronização da ovulação utilizando dispositivos intravaginais. Dentre estas estratégias podem ser citadas a antecipação do momento da administração da PGF (ao início do tratamento ou dois dias antes da remoção do dispositivo), bem como, a utilização de dispositivos intravaginais previamente utilizados.

No estudo citado anteriormente, Carvalho et al., (2008), também se avaliou 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 $F_{2\alpha}$ (PGF) no dia da inserção do dispositivo (D0). O objetivo do estudo foi antecipar a luteólise e diminuir as concentrações sangüíneas 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. O tratamento com prostaglandina no momento da inserção do dispositivo intravaginal aumentou a taxa de crescimento folicular (Com PGF=1,2±0,1^{a} e Sem PGF=0,9±0,1^{b}), o diâmetro máximo do folículo dominante (Com PGF=11,9±0,4^{a} e Sem PGF=10,5±0,4^{b}) e a taxa de ovulação (Com PGF=78,8^{a} % e Sem PGF=54,0^{b}%). Esses resultados demonstram 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.

Para avaliar esta estratégia da manipulação do momento da administração da PGF em novilhas tratadas com dispositivos intravaginais, 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). O objetivo deste experimento foi de aumentar a eficiência do tratamento de sincronização da ovulação para IATF em novilhas Nelore (*Bos indicus*) através da redução dos níveis de P4 durante o tratamento de sincronização ou promover o aporte gonadotrófico para o crescimento folicular final através da adminstração de eCG no final do tratamento. No experimento foram utilizadas 392 novilhas Nelore com peso corporal acima de 300Kg. Considerando os efeitos principais, não houve efeito da administração de PGF ao início do tratamento sobre a taxa de prenhez [Com PGF=25,8 (50/194) e Sem PGF=24,7 (49/198)]. Entretanto, efeito significativo do tratamento com eCG foi observado [Com eCG=34,9 ^{b} (68/195) e Sem eCG=34,9 ^{b} (68/195). Contudo, 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.

Ainda outros estudos foram realizados avaliando diversas estratégias para melhorar a eficiência dos protocolos de IATF utilizando dispositivo intravaginal de progesterona em novilhas Nelore (Dias et al., 2009, Peres et al., 2009). Dentre estas estratégias os autores testaram utilização de dispositivos intravaginais reutilizados bem como a suplementação com eCG ao final do protocolo. Resultados interessantes foram obtidos e coletivamente, os mesmos demonstram que é possível obter taxas de prenhez satisfatórias pela associação do uso de dispositivos intravaginais reutilizados e eCG em programas de IATF em novilhas Nelore.

IMPLANTES AURICULARES CONTENDO NORGESTOMET NA IATF EM NOVILHAS ZEBUÍNAS

Como discutido anteriormente, elevadas concentrações de P4 (endógena e/ou exógena) estão associadas à 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 freqüência 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. Emergência 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	10	10	9	
	Média	2,5±0,2[a]	4,2±0,3[b]	6,1±0,6[c]	<0,001
	Variação	2-3[x]	3-6[xy]	3-8[y]	<0,05
Vacas	Número	10	10	10	
	Média	2,5±0,2[a]	3,1±0,4[ab]	4,0±0,5[b]	<0,05
	Variação	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-puberes 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-puberes, 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). Ambos os tratamentos apresentaram satisfatórios resultados no que se refere à taxa de ovulação

[BE=100,0% (8/8) e BE+P4=77,7% (7/9)] e ao intervalo entre retirada do implante a ovulação [BE´=73,7±1,7 e BE+P4=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 4.

Tabela 4. 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. Para confirmar a necessidade da utilização de PGF no início do protocolo com implante auricular em novilhas, utilizou-se 258 novilhas Nelore ciclando (Marques et al., 2010). Metade dos animais recebeu PGF no Dia 0 e 8 e a outra metade somente no Dia 8 do protocolo (retirada do implante). Não se verificou efeito do tratamento com PGF no Dia 0 [PGF no Dia 0 e 8 = 52,3% (69/132) vs PGF no Dia 8 = 58,7% (74/126)].
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 $PGF_{2\alpha}$ (Dia-24 e Dia-12). Os resultados estão apresentados na tabela 5 e Figura 7.

Tabela 5. 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 D0	Crestar®	Crestar® +PGF D0	Valor de P		
					Impl.	**PGF**	**Impl x PGF**
N.	10	11	12	12			
Emergência Folicular	3,2±0,2	3,0±0,2	3,0±0,2	2,8±0,2	0,38	0,38	0,97
FD Dia 8	0,8±0,1[b]	0,9±0,0[a]	1,0±0,0[a]	1,0±0,1[a]	<0,01	0,21	0,17
FD na IATF	0,8±0,1[b]	1,0±0,1[ab]	1,1±0,1[a]	1,2±0,1[a]	<0,01	0,08	0,27
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±6,9[xb]	77,1±2,4[xab]	74,4±1,6[ay]	72,0±0,0[ay]	0,01 (*<0,01)	0,24 (*0,02)	0,19

*Teste de Bartlett (x≠y), a≠b na mesma coluna indica diferença estatísca (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*.

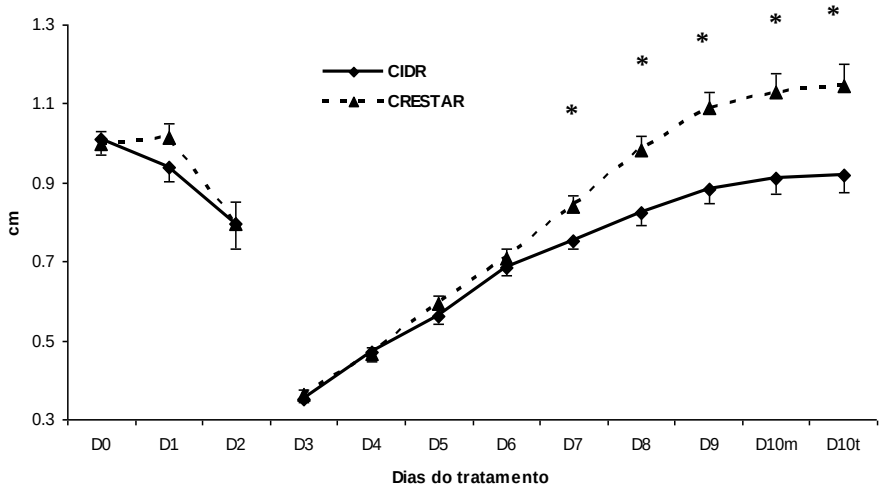


Figura 7. Dinâmica folicular de novilhas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante auricular contendo Norgestomet (Crestar®) ou dispositivo intravaginal de P4 (CIDR®) *(p<0,05).

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-puberes 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. (2010) avaliaram o efeito

da administração de 400 UI de eCG no momento da retirada do implante auricular contendo Norgestomet em novilhas Nelore. Os resultados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6. Efeito da administração de eCG (400UI) na dinâmica folicular de novilhas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante auricular contendo Norgestomet associado ao benzoato de estadiol.

	sem eCG (n=87)	**com eCG (n=90)**	**Valor P**
∅ FD D8 (cm)	0,82±0,02	0,86±0,02	0,28
∅ FD na IATF (cm)	0,95±0,02	1,06±0,02	0,0009
Taxa ovulação %(n)	73,6 (64/87)	94,4 (85/90)	0,0001
∅ do CL cinco dias após a IATF (cm)	1,39±0,03	1,55±0,03	0,0001
Taxa prenhez %(n)	36,8 (32/87)	50,0 (45/90)	0,04
Taxa prenhez nas ovuladas %(n)	50,0 (32/64)	52,9 (45/85)	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. Com isto, pode-se concluir que é possível obter taxas de prenhez satisfatórias em novilhas Nelore tratadas com eCG 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 distribuidos 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 homogeneamente 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 7.

Tabela 7. 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 folícular 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 estatísca (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 (≤2.75=8,21±0,03[b], 3=8,29± 0,03[b] e ≥3.25=9,31± 0,03[a]; P=0,03) e na taxa de prenhez à IATF(≤2.75=41,5[b] (105/253), 3=43,1[b] (84/195)e ≥3.25=54,1[a](93/172); P=0,03). As novilhas com ECC ≥3,25 apresentaram maior diâmetro folicular e maior taxa de prenhez (P=0,03). O diâmetro folicular no momento da IATF influenciou a taxa de prenhez, no qual novilhas que apresentam maiores folículos no momento da IATF promovem maiores taxas de gestação após a IATF (P=0,001, Figura 8).

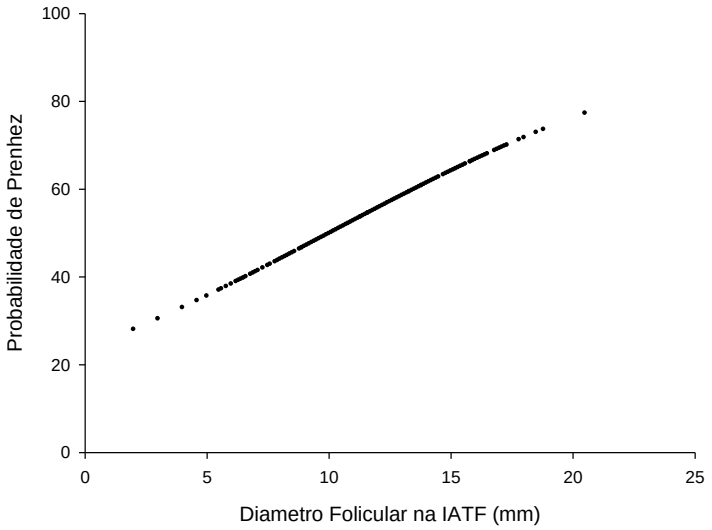


Figura 8. Probabilidade de prenhez aos 30 dias após IATF em novilhas *Bos indicus* (n = 617) de acordo com o diametro follicular na inseminação [Prenhez = exp (-1.1788 + 0.1171*Diametro folicular / 1+exp (-1.1788 + 0.1171*diâmetro folicular); P < 0.0001)].

Outro resultado observado foi o efeito signicativo 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.

MOMENTO DA IATF DE ACORDO COM O NÚMERO DE USOS DOS IMPLANTES AURICULARES

A utilização de dispositivos previamente usados tem sido uma alternativa para viabilizar economicamente a IATF em larga escala para rebanhos comerciais. Diferentes respostas das fêmeas tratadas com implantes auriculares ou dispositivos intravaginais previamente utilizados têm sido descrito na literatura (Castro Junior et al. 2008, Crepaldi 2009). O momento de ovulação e a taxa de concepção destas fêmeas parecem estar associados ao tipo de implante ou dispositivo utilizado (novos ou usados) e ao momento em que as fêmeas são inseminadas em tempo fixo.

Estudos prévios relatam a existência de momentos mais adequados para se realizar a IA em relação ocorrência da ovulação da fêmea. Este momento é depende da viabilidade do oócito e da sobrevivência dos espermatozóides no trato genital feminino (Hunter, 1994). Dransfield et al. (1998) demonstraram que a probabilidade de ocorrer concepção diminui à medida que a IA se aproxima muito ao momento da ovulação. Além disso, relataram diminuição da concepção quando a IA é realizada em animais já ovulados. Entretanto, para maximizar disponibilidade de espermatozóides para fecundação do ovócito, a inseminação artificial deve ocorrer próximo ao momento da ovulação, porém não tão tardiamente de modo que o ovócito envelheça (Dalton e Saacke, 2007). Roelofs et al., (2006) relataram que a ovulação ocorre aproximadamente 30 horas após o início do cio. Dessa maneira, o melhor momento para se realizar a IATF seria entre 12 a 26 horas antes a ovulação (Crepaldi, 2009).

Em vacas paridas, a ocorrência das ovulações após os tratamentos a base de progesterona ou progestágeno associado a estradiol parece ser influenciada pelo número de usos das fontes de progesterona. Em um estudo recente, Crepaldi (2009) descreve que vacas *Bos indicus* paridas tratadas com dispositivos intravaginais previamente utilizados por oito (72,0±0,0h^{ab}) ou por 16 (68,0±2,0h^{b}) dias apresentam menor intervalo entre a retirada do dispositivo e a ovulação em relação às fêmeas tratadas com dispositivos novos (74,4+1,6h^{a}). Resultados semelhantes foram descritos por Sales et al., (2009; dados não publicados), que verificaram antecipação das ovulações conforme o número de usos do dispositivo (novo = 77,1 horas; previamente usado 8 dias = 73,3 horas e previamente usado por 16 dias = 71,8 horas). Esse efeito do número de reutilizações dos dispositivos intravaginais sobre momento da ovulação sincronizada poderia influenciar a fertilidade das fêmeas após IATF.

Para testar esta hipótese em novilhas *Bos indicus* foi conduzido um estudo a fim de verificar a fertilidade após a utilização de implantes auriculares novos ou previamente utilizados com diferentes momentos de inseminação. Sá Filho et al., (2010, dados ainda não publicados) avaliaram o efeito do momento da realização da IATF (48 vs. 54 horas após a remoção do implante auricular) de acordo com o tipo do implante auricular (novo ou previamente utilizado). Foi observada interação entre o número de usos do implante e o momento da IATF (P=0.02), ou seja, o efeito do momento da inseminação sobre a taxa de prenhez depende do número de utilizações do implante. As novilhas inseminadas 54 horas após tratamento com implante auricular reutilizado apresentaram menor taxa de concepção (40.0%, 42/105) do que novilhas tratadas com implante usado e inseminadas 48 horas (56.6%, 56/99) ou aquelas tratadas com implantes novos e inseminadas 48 horas (47.6%, 50/105) ou 54 horas (53.3%, 57/107) após a retirada da fonte de progesterona.

IMPORTÂNCIA DA MATURIDADE SEXUAL DAS NOVILHAS EM PROGRAMAS DE IATF

Durante a puberdade o trato reprodutivo de novilhas passa por diversas alterações fisiológicas e morfológicas para que ocorra o estabelecimento da gestação. Alguns 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). As novilhas pré-púberes apresentaram útero de diâmetro inferior comparado às novilhas que tinham atingido a puberdade. O efeito da puberdade no desenvolvimento do trato reprodutivo parece estar relacionado à estimulação exercida pelo aumento das concentrações de estradiol e progesterona durante o período pós-púbere.

A maturidade 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 luteínicas normais (40 a 60 dias após a ocorrência da puberdade) para que a fêmea bovina adquira capacidade plena 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 que receberam monta de touros no primeiro estro apresentaram menor taxa de concepção quando comparadas às novilhas que receberam monta no terceiro estro após a puberdade. Assim, fica evidente a importância da elevada porcentagem de novilhas ciclando no início da estação de monta.

O efeito da maturidade sexual em novilhas zebuínas durante programas de IATF foi recentemente avaliado por nosso grupo de pesquisa. Em uma análise retrospectiva de dados de dois experimentos de pesquisa (Sá Filho, Marques e Baruselli, dados não publicados) no qual as novilhas (n=512) foram avaliadas por ultrassom em três diferentes momentos antes do protocolo de sincronização (90, 45 e 0 dias antes do início da estação reprodutiva). Somente participou da análise novilhas que estivessem não ciclando no primeiro exame ultrassonográfico (90 dias antes da sincronização). Nossa hipótese foi de que novilhas que alcançam a antecipadamente a puberdade (entre 90 a 45 dias antes do início do protocolo se sincronização) apresentam maior fertilidade à IATF. Desta forma, as novilhas que iniciaram a ciclicidade entre 90 e 45 dias antes da sincronização poderiam apresentar maior maturidade sexual. Os resultados demonstram que novilhas ciclando por mais que 45 dias antes do protocolo de sincronização apresentaram melhor taxa de concepção (P=0.006) após a IATF (59.5%, 97/163) do que novilhas que alcançaram a puberdade somente nos últimos 45 dias antes do tratamento (47.7%, 166/349). Alem disso, novilhas que estavam ciclando antecipadamente apresentaram tendência em apresentar maior taxa de prenhez aos 60 da EM (Grupo 1 = 86.5% vs. Grupo 2 = 76.8%; P = 0.07). .

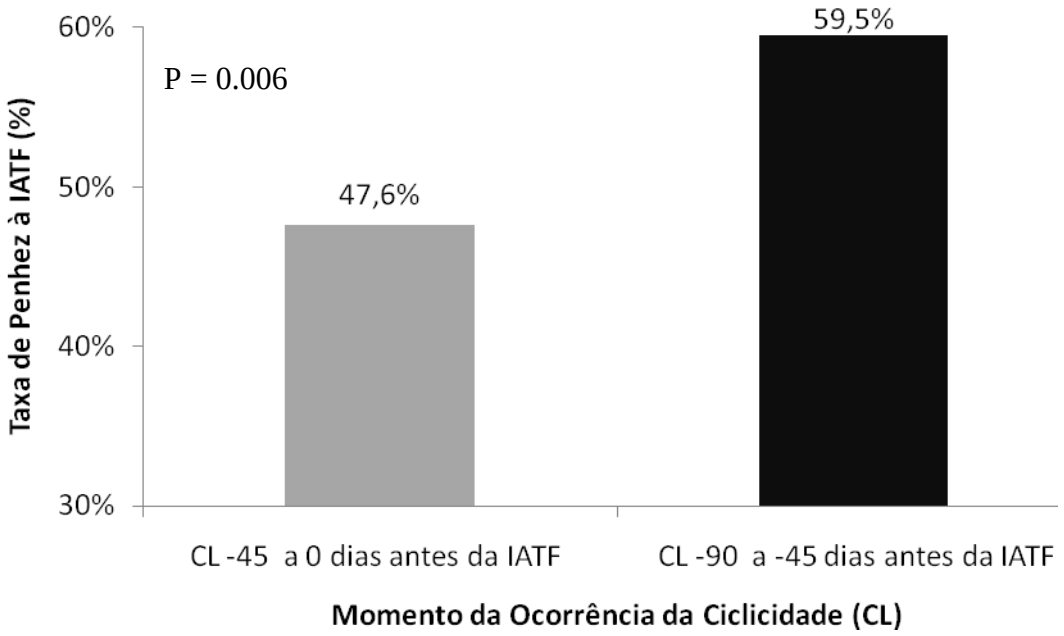


Figura 8. Efeito do momento da ocorrência da ciclicidade na taxa de prenhez à IATF de novilhas Nelore.

Os resultados demonstram que novilhas que foram submetidas à IATF e estava ciclando ao menos 45 dias antes da estação de monta apresentaram maior taxa de concepção quando comparadas às novilhas que alcançaram a puberdade somente nos últimos 45 dias antes da estação reprodutiva. Assim, fica evidente a importância da maturidade sexual para a obtenção de resultados satisfatórios em programas de IATF em novilhas zebuínas.

CONCLUSÕES

Estratégias que aumentem a proporção de novilhas ciclando e sexualmente maduras no início da estação reprodutiva devem ser interpretadas como importantes ferramentas de manejo reprodutivo a serem implantadas em fazendas de gado de corte. A elevação da porcentagem de novilhas ciclando no inicio da estação de monta aumenta a eficiência reprodutiva e permite concentrar os partos e programar os nascimentos em épocas mais adequadas do ano. Pelos dados apresentados, nota-se que é possível obter resultados satisfatórios após indução de ciclicidade por protocolos hormonais em novilhas. No entanto, estes resultados são dependentes da idade, condição corporal e ganho de peso entre o tratamento e o início da estação de reprodutiva. Nesse sentido, a adoção de manejo nutricional adequado, associado à terapias hormonais em períodos que antecedem a estação reprodutiva, podem reduzir a idade à puberdade e aumentar a eficiência reprodutiva de novilhas de corte. Alem disso, 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 ciclidade, 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BO, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. Animal Reproduction Science, v. 82-83, p. 479-486, 2004a.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; CARVALHO, N.A.T.; CARVALHO, J.B.P. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION-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.; KITTOK, 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 potenciates a prolonged progesterone-induced supression 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.

CASTRO JÚNIOR, J. D.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; BARUSELLI, P. S. Efeito do tratamento com diferentes indutores da ovulação (cipionato e benzoato de estradiol) e do momento da inseminação artificial (48 e 54h após a retirada do implante de norgestomet) na taxa de prenhez de vacas nelore (Bos indicus) inseminadas em tempo fixo. In: XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2008, Guarujá. **Acta Scientiae Veterinariae...** 2008. v. 36 supl. p. 617.

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 indices 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.

CREPALDI GA,Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF. Dissertação de Mestrado, Departamento de Reprodução Animal- FMVZ-USP, 2009.

DIAS, C.C., WECHSLER, F.S., DAY , M.L., VASCONCELOS, J.L.M., Progesterone concentrations, exogenous eCG and timing of prostaglandin $F_{2\alpha}$ treatment affect fertility in *post*puberal Nelore heifers**. Theriogenology** 72, 378–385, 2009.

DALTON, J. C.; SAACKE, R. G. Parâmetros da Qualidade do Sêmen para Programas de Sincronização. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 11., 2007, Uberlândia. **Anais…** p. 154 – 161, 2007.

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

DRANSFIELD MB, NEBEL RL, PEARSON RE, WARNICK LD. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. **J Dairy Sci** 1998;81:1874-1882.

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.

HUNTER, R. H. F. Causes for failure of fertilization in domestic species. In**: Embryonic Mortality in Domestic Species**. CRC Press, Boca Raton, FL, VS, p. 1–22. 1994.

KOJIMA, N.; STUMPF, T.T.; CUPP, A.S.; WERTH, L.A.; ROBERSON, M.S.; WOLFE, M.W.; KITTOK, 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-estratadiol 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 $PGF_{2\alpha}$ 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*. **Biotecnologias da Reprodução em Bovinos** (2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada), Londrina, p. 101-112, 2006.

PERES RF, CLARO IJR, SÁ FILHO OG, NOGUEIRA, GP, VASCONCELOS JL. Strategies to improve fertility in Bos indicus postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-timed artificial insemination. **Theriogenology**;72:681-9, 2009.

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.

ROELOFS JB, GRAAT EAM, MULLAART E, SOEDE NM, VOSKAMP-HARKEMA W, KEMP B,. Effects of inseminationovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. Theriogenology 66, 2173–2181, 2006.

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. TORRES-JÚNIOR, J.R.S., PENTEADO, L., GIMENES, L.U., FERREIRA, R.M., AYRES, H., CASTRO E PAULA, L.A., SALES, J.N.S., BARUSELLI, P.S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (Bos indicus) heifers. **Animal Reproduction Science** 118, 182–187, 2010.

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.

SANTOS, J.E.P; SA FILHO, M.F. Nutrição e reprodução em bovinos. **Biotecnologias 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 4° 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 PGF2α 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.

SEMEN EVALUATION AND FERTILITY IN THE FIELD

Joseph C. Dalton, Ph.D.

University of Idaho, Caldwell, Idaho, USA.

ABSTRACT

Studies investigating the relationship of semen evaluation and fertility in the field have produced inconsistent results, as evidenced by a wide range in correlations (r values = 0.06 to 0.86). There are likely many reasons for the inconsistencies, including the accuracy of fertility data, the multifaceted nature of sperm function, and the inaccuracy of in vitro seminal quality measurements. Historically, the assessment of male fertility has focused on the quantity and quality of sperm delivered to the female. Sperm numbers, however, elucidate only a portion of the story of male fertility. Seminal deficiencies, seen as reduced fertility when numbers of sperm are below threshold, which can be overcome or minimized by increasing sperm dosage, are considered compensable. Compensable traits of semen quality relate to the ability of inseminated sperm to not only reach the ovum, but also bind to and penetrate the zona pellucida, and initiate the block to polyspermy. Compensable seminal traits are thought to be closely associated with measures of sperm viability, including motility, and acrosomal and cell membrane integrity. In contrast, seminal deficiencies resulting in suppressed fertility regardless of sperm dosage are considered uncompensable. Uncompensable traits of semen quality relate to the competence of fertilizing sperm to complete fertilization and sustain early embryonic development. Bulls with semen exhibiting unacceptable levels of abnormal sperm are usually the main source of uncompensable traits. Unfortunately, compensable seminal traits cannot be explained completely by morphology and present-day in vitro viability measurements. Although the recognition of both compensable and uncompensable seminal traits is important, the focus should be on uncompensable traits, as these result in depressed fertility regardless of sperm numbers in the inseminate. It is evident that no one test will likely evolve as being “predictive” of male fertility. Consequently, multiple tests should be used to ensure the production, cryopreservation, distribution, and use of highly fertile semen.

INTRODUCTION

Studies investigating the relationship of seminal quality evaluations and fertility have produced inconsistent results. For example, although studies have reported a positive correlation of seminal quality characteristics (e.g., viability and morphology) with fertility, the range in correlations is very large (r values = 0.06 to 0.86; reviewed by Graham et al., 1980). Furthermore, none of the assays have consistently provided desirable correlations with fertility (Graham et al., 1980; Saacke et al., 1980). There are likely many reasons for the inconsistencies, a few of which are outlined below:

1. **The accuracy of fertility data** (Saacke et al., 1980; Amann, 1989) which is compromised by the factors listed in Table 1.

2. **The multifaceted nature of sperm function** (Amann and Hammerstedt, 1993). Currently, ***some*** attributes of sperm necessary for fertilization are known (Table 2),

while others remain unknown. Unfortunately, the multifaceted nature of sperm function is the foundation for the realization that "the malfunction of any one of many essential and independent sperm attributes (known and unknown) can render a given spermatozoon incapable of fertilizing an oocyte" (Amann and Katz, 2004).

3. **The inaccuracy of in vitro seminal quality measurements** (Graham and Crabo, 1978; Graham et al., 1980; Mocé and Graham, 2008) within and between laboratories.

Table 1. Potential factors affecting fertility data.

Factor	Reference
Definition of fertility used (nonreturn rate or pregnancy diagnosis)	Saacke et al., 1980 Mocé and Graham, 2008
Non-sperm effects (management and environment on fertility of the cow)	Saacke et al., 1980 Mocé and Graham, 2008
AI of too few females to accurately estimate fertility	Mocé and Graham, 2008
Confounding due to the use of high sperm numbers	Saacke et al., 1980 DeJarnette, 2005 Mocé and Graham, 2008
Sample of bulls used in one study may not be representative of the population of bulls in other studies	Saacke et al., 1980

Table 2. Sperm attributes necessary for fertilization.[1]

"Acceptable" morphology
Metabolism for production of energy
Progressive motility
Capacity for hyperactive motility
Stabilization of plasma and acrosomal membrane lipids
Acrosomal enzymes
Chromatin integrity

[1]Partial list adapted from Amann and Hammerstedt (1993).

Throughout the world, researchers, clinicians, and cattle producers are interested in identifying the most fertile bulls for use in AI. Unfortunately, in vitro seminal quality evaluations used to estimate the fertility potential of a semen sample rarely explain more than 50 to 65% of the variation among males (Saacke and White, 1972; Graham et al. 1980; DeJarnette, 2005). Consequently, it is not a surprise that although researchers and clinicians have tried for "nearly a century to develop techniques to accurately predict the fertility of a semen sample from an individual male, the goal has not been achieved (Amann and Hammerstedt, 1993)."

This does not imply, however, that we should stop investigating the relationship of semen quality and fertility. In fact, the development and refinement of techniques to evaluate seminal quality have actually led to enhanced "accuracy in positive fertility diagnosis by default, through identification and measurement of greater numbers of semen quality attributes that are associated with sub-fertile semen" (DeJarnette, 2005).

Nevertheless, investigation of seminal quality evaluations and the relationship to fertility remains a daunting task, as DeJarnette (2005) states that “semen samples that possess sufficient levels of all known traits must still (at least initially) be considered of questionable fertility, because the sample could be deficient in other traits unknown or unmeasured.” Consequently, DeJarnette (2005) argues that “the accuracy of below average fertility diagnosis will likely always be more accurate than the acceptable diagnosis.”

REVIEW

QUANTITY AND QUALITY OF SPERM IN THE INSEMINATE

Historically, the assessment of male fertility has focused on the quantity and quality of sperm delivered to the female. Salisbury and VanDemark (1961) first suggested the relationship between sperm quantity and quality, when they proposed that fertility increases with increasing numbers of viable sperm inseminated up to a threshold level. After this threshold level has been attained, the female population becomes the limiting factor and increases in numbers of sperm do not result in further increases in fertility (Figure 1). Sullivan and Elliot (1968) reported the minimum number of motile sperm required for maximum fertility differed among bulls, while den Daas et al. (1998) reported that bulls differed in their maximal nonreturn rate, and in the rate at which they approached this maximum as sperm numbers per dose were increased. Nonreturn rate, defined by Rycroft (1992) “as the percentage of cows that are not rebred within a specified period of time after an insemination, typically 60 to 90 days,” has been historically used by the dairy industry as an indirect measure of fertility. Regarding semen quality, Pace et al. (1981) reported that fertility increases with increasing numbers of structurally intact and motile sperm.

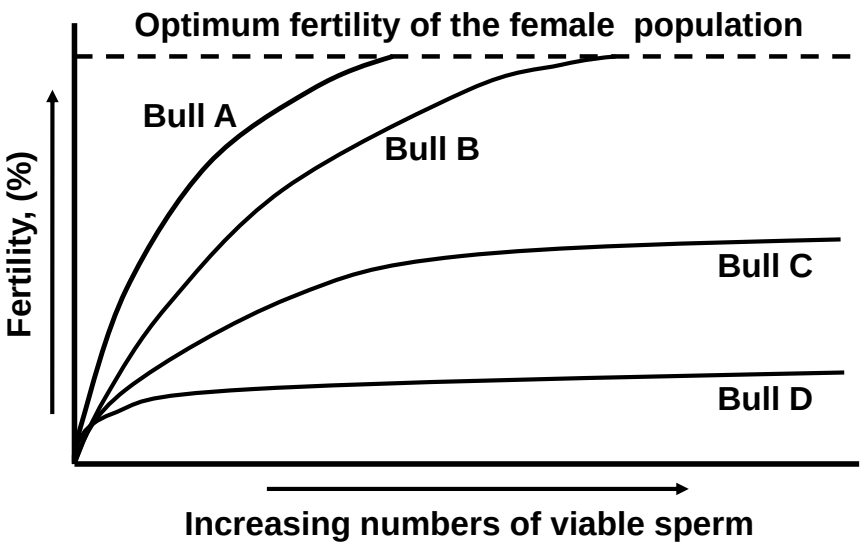


Figure 1. Relationship between number of viable sperm inseminated and fertility. The minimum number of viable sperm required for maximum fertility differs among bulls, as does the rate at which the maximum fertility is achieved with increasing sperm dosage (Adapted from Salisbury and VanDemark, 1961, Sullivan and Elliot, 1968, and den Daas et al. 1998).

Sullivan and Elliot (1968) also observed that low fertility bulls required more sperm in the inseminate than high fertility bulls in order to reach maximum fertility. Sullivan and Elliot (1968) postulated that more sperm were necessary due to the presence of abnormal sperm unable to gain access to the site of fertilization. As measured by accessory sperm trapped in the zona pellucida of embryos recovered 6 d after AI, the apparent inability of some abnormal sperm to gain access to the site of insemination was later shown to be true by Saacke et al. (1998).

COMPENSABLE AND UNCOMPENSABLE SEMINAL TRAITS

Collectively, the work of Salisbury and VanDemark (1961), Sullivan and Elliot (1968), and den Daas et al. (1998) provides evidence that there are seminal parameters which are “compensable” and others which are “uncompensable,” as originally described by Saacke et al. (1994). Specifically, compensable traits of semen quality relate to the ability of inseminated sperm to not only reach the ovum, but also bind to and penetrate the zona pellucida, and initiate the block to polyspermy. Seminal deficiencies, seen as reduced fertility when numbers of sperm are below threshold, which can be overcome or minimized by increasing sperm dosage, are considered compensable. Compensable seminal traits are thought to be closely associated with measures of sperm viability, including motility, and acrosomal and cell membrane integrity (DeJarnette, 2005).
Uncompensable traits of semen quality relate to the competence of fertilizing sperm to complete fertilization and sustain early embryonic development. Seminal deficiencies resulting in suppressed fertility regardless of sperm dosage are considered uncompensable. Bulls with semen exhibiting unacceptable levels of abnormal sperm are usually the main source of uncompensable traits. Consequently, bulls with high levels of abnormal sperm should not have semen collected, cryopreserved, and used for AI.

SEMEN QUALITY AND BARRIERS TO SPERM TRANSPORT

The population of sperm reaching the site of fertilization (oviductal ampullary-isthmus junction) is enriched in both viability and normal morphology over that inseminated (Overstreet et al., 1978). Although morphologically abnormal sperm have been associated with subfertility and sterility for many years (Williams and Savage, 1925, 1927; Lagerlof, 1934), it is now known that sperm with classically misshapen heads do not traverse the barriers of the female reproductive tract or participate in fertilization based upon accessory sperm data from ova and embryos (Saacke et al., 1998). Consequently, severely misshapen sperm within an otherwise normal semen sample are considered a compensable seminal trait. Impaired progressive sperm motility may be one of the reasons for the exclusion of these sperm, as Dresdner and Katz (1981) reported that even small geometrical differences in sperm head morphology can cause large differences in sperm motility.
Known barriers to sperm transport in the cow include the cervix-mucus complex (Mullins and Saacke, 1989) and the uterus (Mitchell et al., 1985), while the utero-tubal junction and lower isthmus of the oviduct (Krzanowska, 1974) are a formidable barrier in the mouse. The relationship between barriers to sperm transport and specific morphological abnormalities has been elucidated by numerous investigators. In the cow, the cervix-mucus complex is a barrier to abnormal tails and heads (Koeford-Johnsen, 1972), while

the utero-tubal junction and lower isthmus impair traverse by sperm with abnormal head morphology (Krzanowska, 1974; Nestor and Handel, 1984) and tails with droplets (Nestor and Handel, 1984) in the mouse. The zona pellucida of the ovum, however, may be the most formidable barrier to participation in fertilization of morphologically abnormal, viable sperm (Howard et al., 1993). Further, sperm with abnormal acrosomes have been reported to: a) be impaired in their ability to attach to the ovum in vitro, and b) fail to penetrate the zona pellucida (Thundathil et al., 2000). Lastly, apparently normal sperm in the inseminate of bulls with a high percentage of abnormal acrosomes were also found to be deficient, as embryonic development following fertilization with apparently normal sperm was also impaired (Thundathil et al., 2000).
Evidence of a relationship between reduced embryonic development and sperm with apparently normal morphology in an otherwise abnormal ejaculate was initially reported by Setchell et al. (1988) in mice. The impaired reproductive performance by apparently normal sperm in an abnormal ejaculate of bulls and mice (Thundathil et al., 2000; Setchell et al., 1988) provides alarming evidence that sperm abnormalities may only be the visible portion of an iceberg impairing reproduction.

EVALUATION OF COMPENSABLE TRAITS OF SEMINAL QUALITY

As previously mentioned, compensable traits of seminal quality relate to the ability of inseminated sperm to not only reach the ovum, but also bind to and penetrate the zona pellucida, and initiate the block to polyspermy. Seminal deficiencies, seen as reduced fertility when numbers of sperm are below threshold, which can be overcome or minimized by increasing sperm dosage, are considered compensable. Compensable seminal traits are thought to be closely associated with measures of sperm viability, including motility, and acrosomal and cell membrane integrity (DeJarnette, 2005).

Sperm motility

Microscopic evaluation of sperm motility is a simple, rapid, and inexpensive measure of seminal quality. Unfortunately, the procedure is also highly subjective (Graham et al., 1980) and can lead to overestimation and underestimation errors due to sperm concentration within the sample. Furthermore, the results are not repeatable between or within laboratories (Graham et al., 1980; Saacke et al., 1980). As reviewed by Graham et al. (1980), the highest correlation reported for progressive motility of fresh semen (r = 0.84; Ludwick et al., 1948) accounts for only 70.6% of the variation. In contrast, the highest correlation reported for frozen-thawed semen (r = 0.78; Dimitropoulus, 1967) accounts for only 60.8% of the variation. Consequently, Graham et al. (1980) concluded “that motility estimations alone are not reliable for predicting fertility of a semen sample.”

Computer assisted sperm analysis (CASA)

More objective than microscopic evaluation of sperm motility, CASA provides information on sperm motility, and patterns of sperm motion, including linearity, velocity, and frequency and amplitude of head displacement (DeJarnette, 2005). Evidence of increased precision and repeatability in motility estimation following the use of CASA has been reported (Farrell et al., 1998); however, it is uncertain whether this translates into increased correlations with fertility (Table 3).

Table 3. Correlations of percentage motility and fertility as determined by CASA or visual estimation.

Reference	Type of sample	r value	
		CASA	Visual
Ludwick et al. (1948)	Fresh	*	0.84
Saacke and White (1972)	0-h post-thaw	*	0.48
O'Connor et al. (1981)	3-h post-thaw	0.19	0.09
O'Connor et al. (1981)	Extended pre freeze	0.26	0.35
Farrell et al. (1998)	Fresh	0.58	*
Zhang et al. (1998)	Post-thaw	0.45	*
Januskauskas et al. (2001)	Post-thaw	0.57	0.67
Januskauskas et al. (2003)	Post-thaw	0.61	0.59

*Evaluation not performed.

The majority of CASA systems are in human andrology laboratories (Amann and Katz, 2004), while application in commercial AI Centers has likely been hindered by purchasing costs (DeJarnette, 2005) and the inability to distinguish between particulate matter and nonmotile sperm in the extender (Verstegen et al., 2002), which according to DeJarnette (2005), may bias estimates of both concentration and motility.

Sperm viability (membrane integrity)

Numerous staining procedures are available to allow for the estimation of viable sperm (Barth and Oko, 1989; Garner, 1997); however, according to DeJarnette (2005) and Barth and Oko (1989), staining and fixation can be a source of variation in semen analysis. Saacke and Marshall (1968), using differential interference contrast microscopy, pioneered the use of wet-smears of unfixed bull sperm to determine percentage intact acrosomes based on the presence (or absence) of the acrosomal (apical) ridge.

Flow cytometric analysis of sperm viability (membrane integrity)

Methods are available to evaluate sperm viability (plasma membrane integrity) using stains and flow cytometry (Graham, 2001; Gillian et al., 2005; Christensen et al., 2005). A commonly used viability stain combination includes two flourochromes, SYBR-14, a membrane-permeable nuclear stain, and PI (propidium iodide), a membrane-impermeable stain. Both flourochromes label DNA, thus avoiding potential ambiguity of stains that target separate cellular components (Garner et al., 1994). The nuclei of viable sperm fluoresce green (SYBR-14) (Garner et al., 1994; Gillian et al., 2005) as an intact plasma membrane prevents PI from entering the sperm. In contrast, the nuclei of non-viable sperm fluoresce red, as PI is able to penetrate sperm with damaged plasma membranes (Garner et al., 1994; Gillian et al., 2005). Correlations of sperm viability as assessed by flow cytometry using SYBR-14 and PI with 56-d nonreturn rate are shown in Table 4.

Table 4. Correlation of sperm viability and sperm motility with 56-day nonreturn rate (r values) †

	Type of sample	
	Fresh	Post-thaw
Sperm viability‡	0.32	0.41
Sperm motility§	0.47	0.55

†Adapted from Christensen et al. (2005)
‡Assessed by flow cytometry using SYBR-14 and PI
§Assessed by microscopy

In 2007, Celeghini et al. described a technique for simultaneously evaluating plasma and acrosomal membrane integrity, together with mitochondrial function, using the flow cytometer and a combination of propidium iodide (PI), fluorescein isothiocyanate–*Pisum sativum* agglutinin (FITC-PSA), and JC-1. *Pisum sativum* agglutinin (PSA), a lectin from the pea plant, binds to α-mannose and α-galactose moieties of the acrosomal matrix (Gillian et al., 2005). *Pisum sativum* agglutinin is commonly conjugated to fluorescein isothiocyanate (FITC-PSA), and FITC-PSA stains the acrosome of damaged sperm yellow-green (Graham et al., 1990). The fluorescent probe JC-1 detects variations in mitochondrial membrane potential, with green fluorescence occurring at low membrane potential and red-orange fluorescence occurring at high membrane potential (Celeghini et al., 2007).

Post-thaw incubation

Saacke and White (1972) described a study in which incubation of frozen-thawed semen at 37°C for 2 to 4 h before evaluation improved the correlation of acrosome integrity with fertility, as compared to evaluation immediately post-thaw (Table 5). Furthermore, as can be seen in Table 5, acrosomal integrity is more highly related to fertility than motility. Incubation for 2 to 4 h is thought to mimic the stress upon sperm following deposition in the female reproductive tract, and subsequently, facilitates the discovery of latent sperm damage that would be undetectable immediately after thawing.

Table 5. Correlation of percentage intact acrosomes and percentage motility with 90-day nonreturn rate (r values)†

	Incubation at 37°C, h		
	0	2	4
Intact acrosomes, %	.42	.60	.58
Motility, %	.46	.41	.21

†Adapted from Saacke and White (1972)

The use of post-thaw incubation of frozen-thawed semen is not without controversy as Vianna et al. (2009) reported no association (r = 0.14) between motility and fertility following incubation at 38°C for 5 h (percentage intact acrosomes was not evaluated). Vianna et al. (2009) concluded that “the results indicate that thermoresistance (post-thaw incubation) tests do not mimic uterine conditions as suggested.” Furthermore, Vianna et al. (2009) also concluded that post-thaw incubation tests “cannot be used alone to

predict fertility of cryopreserved semen." Taken together with the realization that total motility was the only sperm parameter evaluated by Vianna et al. (2009), the implication is that multiple tests may be necessary to increase the association of in vitro semen evaluation and field fertility. Saacke and White (1972) suggested that evaluation of acrosomal cap retention, percentage motility, and morphology should provide the "best quality control program," but cautioned that fertility trials must be conducted prior to the adoption of any "new semen evaluation technique." Following a commercial fertility trial, Marshall and Frey (1976) reported results similar to Saacke and White (1972) (Table 6).

Table 6. Correlation of percentage intact acrosomes and percentage motility with 60-90 day nonreturn rate (r values)[†‡]

	Saacke and White (1972)	**Marshall and Frey (1976)**
Intact acrosomes at 4 h, %	.58	.70
Motility at 4 h, %	.21	.35

[†]Incubation for 4 h at 37°C
[‡]Adapted from Saacke and White (1972) and Marshall and Frey (1976)

Collectively, the correlations shown in Tables 5 and 6 provide evidence that, after 4 h of incubation at 37°C, acrosomal integrity is more highly related to fertility (nonreturn rate) than motility.

EVALUATION OF UNCOMPENSABLE TRAITS OF SEMINAL QUALITY

As previously mentioned, uncompensable traits of semen quality relate to the competence of fertilizing sperm to complete fertilization and sustain early embryonic development. Seminal deficiencies resulting in suppressed fertility regardless of sperm dosage are considered uncompensable. Bulls with semen exhibiting unacceptable levels of abnormal sperm are usually the main source of uncompensable traits.

Normal sperm morphology

There are numerous methods for assessment of normal sperm morphology. According to Barth and Oko (1989) "a good quality microscope is essential for the study of sperm morphology," with phase contrast microscopy "a minimum requirement for the evaluation of frozen-thawed semen." It is generally accepted that semen samples should exhibit ≥ 70% morphologically normal sperm (Hopkins and Spitzer, 1997; Barth and Oko, 1989; DeJarnette, 2005). Further, sperm head abnormalities should not exceed 20% of sperm evaluated (Barth and Oko, 1989; DeJarnette, 2005). Although normal sperm morphology is known to be related to embryo quality (DeJarnette et al., 1992) and fertility (Saacke et al., 1980), unfortunately, normal sperm morphology does not necessarily guarantee a decreased incidence of uncompensable seminal traits.

Sperm with microscopically normal morphology, but with defective chromatin, have been implicated in cases of male subfertility for 40 years (Gledhill, 1970), and are likely an uncompensable seminal trait (Ostermeier et al., 2001). The chromatin structure assay developed by Evenson et al. (1980) revealed a strong negative correlation between DNA fragmentation and heterospermic fertility in bulls (in which parentage of calves was determined by blood typing and visual appraisal of phenotypic

characteristics at birth) (r = -0.94, Ballachey et al., 1988; r = - 0.87, Kasimanickam et al., 2006). In contrast, Januskauskas et al. (2003) reported a moderate negative correlation (r = -0.53) between stability of sperm to acid denaturation and homospermic fertility in bulls. Using the same assay (Evenson et al., 1980) and cryopreserved semen from a study in which bulls received a thermal insult (48-h scrotal insulation; Vogler et al., 1993), Karabinus et al. (1997) reported that sperm ejaculated before scrotal insulation have more stable DNA than those ejaculated after scrotal insulation (where abnormal sperm are also evident). Acevedo et al. (2002) applied a thermal insult (48-h scrotal insulation) to Holstein bulls and modified the chromatin structure assay so that sperm DNA stability to acid denaturation could be evaluated on the same sperm as judged morphologically. Acevedo et al. (2002) reported that vulnerability of sperm DNA to acid denaturation was: a) positively associated with abnormal shaped sperm, and b) also extended to normal shaped sperm in abnormal samples. Beletti et al. (2005a) used computational image analysis of sperm smears stained with toluidine blue and reported that sperm with chromatin abnormalities did not necessarily have abnormal sperm head morphology. Collectively, these results provide evidence that damage to chromatin integrity extends beyond morphologically abnormal sperm to apparently morphologically normal sperm.

How might chromatin stability affect fertility? Flaws in DNA packaging, condensation of sperm chromatin during spermiogenesis, and decondensation of the sperm nucleus following fertilization have been implicated in reduced fertility (Sakkas et al., 1995, 1996; Walters et al., 2006). Walters et al. (2006) compared pronuclear development following IVF for semen collected before and after scrotal insulation in *Bos taurus* bulls, and concluded that normal sperm maturation is disrupted during scrotal insulation, as evidenced by a lack of timely decondensation after penetration of the ovum. The results of Walters et al. (2006) confirm the previous results of Eid et al. (1994) in which early cleavage rates were reduced due to delayed pronuclear formation following the use of semen from low fertility bulls in vitro. Although female sperm selection appears strong based upon sperm shape and motility, it is apparent that total exclusion of incompetent sperm from accessing the ovum does not occur. Consequently, altered chromatin stability is considered an uncompensable seminal trait, and certainly worthy of future research.

Evaluation of sperm morphology by CASA holds promise, yet problems remain as Graves et al. (2005) reported that different staining procedures produce different mean head sizes. Another concern listed by Graves et al. (2005) was the amount of time required to perform the morphological analysis (~ 1 h for analysis of one slide). Lastly, evaluation of sperm head morphology by Fourier harmonic analysis has been shown to provide a sensitive measure of sperm head shape independent of sperm orientation, while simultaneously being able to differentiate between live and dead sperm (Parrish et al., 1998).

CONCLUSIONS

All attributes of sperm necessary for fertilization and maintenance of embryonic development are not known. Unfortunately, compensable seminal traits cannot be explained completely by morphology and present-day in vitro viability measurements. Bulls whose sperm are able to access the ovum in vivo at low insemination dose based on fertility data (den Daas et al., 1998) or accessory sperm numbers per embryo (ova) (Nadir et al., 1993) may differ from sperm of other bulls in motility patterns or sperm surface modifications important to ova recognition, binding, and penetration.

Although the recognition of both compensable and uncompensable seminal traits is important, the focus should be on uncompensable traits, as these result in depressed fertility regardless of sperm numbers in the inseminate. The risk associated with uncompensable seminal deficiencies can be minimized when sperm morphology is a routine part of the evaluation process, thus allowing for problem bulls to be identified. Furthermore, in morphology-based characterization of sperm through computational image analysis, spermatozoal morphological differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls should be considered in order to avoid the scenario where such variations between subspecies may be mistaken as abnormalities (Beletti et al., 2005b).

As originally stated by Saacke and White (1972), "If we choose as our ultimate goal the accurate prediction of semen fertility based upon laboratory evaluation, we must realize that no one test will likely evolve as being all inclusive." Clearly this is evident in the modest correlations of in vitro evaluations of semen and field fertility presented here and in the literature. Consequently, multiple tests should be used to ensure the production, cryopreservation, distribution, and use of highly fertile semen.

In 2001, Januskauskas et al. reported a strong correlation (r = 0.83) between predicted and observed nonreturn rates following the combination of motility assessments and other parameters of sperm function. In 2008, Mocé and Graham conducted an experiment to determine which laboratory assays consistently appeared in "best fit" multiparametric models for estimating bull fertility (as determined by multivariate regression analysis). Laboratory tests consistently included in the "best fit" model included: 1) visual motility at 0 minutes post-thaw, 2) mitochondrial function, 3) progressive motility post-thaw (after 90 minutes of incubation), and 4) linear motility post-thaw (after 90 minutes of incubation). **Nevertheless, caution must be used when interpreting the results of Mocé and Graham (2008) as:** 1) the objective of the research was not "to determine a set of laboratory assays that could be used to evaluate fertility," but rather "to determine if one or two (or more) laboratory assays consistently appeared in the models for bull sperm" (Mocé and Graham, 2008), and 2) many sperm variables are known to be highly correlated with each other (DeJarnette, 2005) e.g., percentage live sperm and percentage live acrosome intact sperm are highly correlated with percentage motile sperm (Mocé and Graham, 2008). Mocé and Graham (2008) summarized the "best fit" models as "intuitive, as we know that sperm must be alive, capable of swimming (at least to penetrate the ZP), and be able to remain alive and motile for some period of time to be able to fertilize an oocyte."

FUTURE PERSPECTIVE

Caution must be applied when considering the adoption of a specific test of seminal quality. The potential benefits in the use of any assay must be weighed against the cost, accuracy, and repeatability of the use of a competing assay. As described by DeJarnette (2005) the following questions should be asked:

1. What information does the new procedure provide over and above what we already know?
2. Is the new procedure more predictive, or just another method to measure the same trait?
3. Is the new procedure simply a more tedious and expensive method to measure what we already measure in a simpler manner?

The cost of implementation of a new procedure must be investigated thoroughly, in light of the changing dynamic of the cattle industry worldwide. Realistically, will the cost and anticipated added benefit of implementing a new procedure provide a reasonable return on investment to the AI center? In many countries, semen for use in AI is currently treated as a commodity with producers bargaining for (and AI centers agreeing to sell) semen at dangerously low retail prices. This is a disturbing trend that will likely lead to further consolidation of the AI industry, as AI centers struggle to achieve a reasonable revenue stream to stay in business.

As mentioned previously, although researchers and clinicians have tried for "nearly a century to develop techniques to accurately predict the fertility of a semen sample from an individual male, the goal has not been achieved (Amann and Hammerstedt,1993)." Nevertheless, the quest to further identify techniques for semen evaluation with greater association to field fertility will continue. We must continue to recognize the complexity of male fertility, and we should attempt to magnify minute differences in fertility through research focused on: 1) low sperm numbers for AI, 2) early fixed-timed AI insemination models, and 3) heterospermic inseminations.

Lastly, we should recognize the wisdom of Amann and Hammerstedt (1993) in their summation of the importance of semen evaluation:

> "The most important biologic and economic motivations for evaluation of sperm quality are to identify males with a high probability of reduced fertility or to ascertain if fertility of a male is likely to increase or decrease. For these purposes, in vitro evaluations of sperm quality have been and will continue to be important for andrology."

REFERENCES

Acevedo, N., J. Bame, L.A. Kuehn, W.D. Hohenboken, D.P. Evenson, and R.G. Saacke. 2002. In: Proc. Nat'l. Assoc. Anim. Breeders 19th Tech. Conf. on Artif. Insem. and Reprod., Columbia, MO, pp.84-90.

Amann, R.P. 1989. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately? J. Androl. 10:89–98.

Amann, R.P., and R.H. Hammerstedt. 1993. In vitro evaluation of sperm quality: An opinion. J. Androl. 14:6:397-406.

Amann, R.P., and D.F. Katz. 2004. Reflections on CASA after 25 years. J. Androl. 25:3:317-325.

Ballachey, B.E., D.P. Evenson, and R.G. Saacke. 1988. The sperm chromatin structure assay: relationship with alternate tests of semen quality and heterospermic performance of bulls. J. Androl. 9:109-115.

Barth, A.D., and R.J. Oko. 1989. Preparation of semen for morphological examination. In: Abnormal morphology of bovine spermatozoa, Iowa State University Press, Ames, pp. 8-18.

Beletti, M.E., L.F. Costa, and M.M. Guardieiro. 2005a. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. Braz. J. Morphol. Sci. 22(2):85-90.

Beletti, M.E., L.F. Costa, and M.P. Viana. 2005b. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. An. Repro. Sci. 85:105-116.

Celeghini, E.C.C., R.P. de Arruda, A.F.C. de Andrade, J. Nascimento, and C.F. Raphael. 2007.
Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. Reprod. Dom. Anim. 42:479–488.

Christensen, P., D. Boelling, K.M. Pedersen, I.R. Korsgaard, and J. Jensen. 2005. Relationship between sperm viability as determined by flow cytometry and nonreturn rate of dairy bulls. J. Androl. 26:1:98-106.

DeJarnette, J.M., R.G. Saacke, J. Bame, and C.J. Vogler. 1992. Accessory sperm: Their importance to fertility and embryo quality, and attempts to alter their numbers in artificially inseminated cattle. J. Anim. Sci. 70:484-491.

DeJarnette, J.M. 2005. The effect of semen quality on reproductive efficiency. Vet. Clin. Food Anim. 21:409-418.

den Daas, J.H.G., G. DeJong, L.M.T.E. Lansbergen, and A.M. van Wagtendonk-de Leeuw. 1998. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. J. Dairy Sci. 81:1714-1723.

Dimitropoulos, E. 1967. The significance of the test of thermoresistance with the estimation of fertility value of frozen sperm. Ann. Med. Vet. 3:215:-224.

Dresdner, R.D., and D.F. Katz. 1981. Relationship of mammalian sperm motility and morphology to hydrodynamic aspects of cell function. Biol. Reprod. 25:920-930.

Eid, L.N., S.P. Lorton, and J.J. Parrish. 1994. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. Biol. Reprod. 51:1232-1237.

Evenson, D.P., Z. Darznikiewicz, and M.R. Melamed. 1980. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. Science 240:1131-1134.

Farrell, P.B., G.A. Presicce, C.C. Brockett, and R.H. Foote. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. Theriogenology. 49:871-879.

Garner, D.L., L.A. Johnson, S.T. Yue, B.L. Roth, and R.P. Haugland. 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. J. Androl. 15:6:620-629.

Garner, D.L. 1997. Ancillary test of bull semen quality. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Prac. 13:313-330.

Gillian, L., G. Evans, and W.M.C. Maxwell. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. Theriogenology. 63: 445–457.

Gledhill, B.L. 1970. Enigma of spermatozoal DNA and male infertility: A review. Am. J. Vet. Res. 31:539-549.

Graham, E.F., and B.G. Crabo. 1978. Some methods of freezing and evaluating human spermatozoa. In: The Integrity of Frozen Spermatozoa, Nat'l Acad. Sciences, Washington, D.C.

Graham, E.F., M.K.L. Schmehl, and D.S. Nelson. 1980. Problems with laboratory assays. In: Proc. Nat'l. Assoc. Anim. Breeders 8th Tech. Conf. on Artif. Insem. and Reprod., Columbia, MO, pp. 59-66.

Graham, J.K., E. Kunze, and R.H. Hammerstedt. 1990. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. Biol Reprod 43: 55–64.

Graham, J.K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. Anim. Reprod. Sci. 68: 239–247.

Graves, J. E., H.L. Higdon, W.R. Boone, and D.W. Blackhurst. 2005. Developing techniques for determining sperm morphology in today's andrology laboratory. J. Assist. Reprod. Genet. 22:5:219-225.

Hopkins, F.M., and J.C. Spitzer. 1997. The new Society for Theriogenology breeding soundness evaluation system. Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract. 2:13:283-293.

Howard, J.G., A.M. Donoghue, L.A. Johnston, and D.E. Wildt. 1993. Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats. Biol. Reprod. 49:131-139.

Januskauskas, A., A. Johannisson, and H. Rodriguez-Martinez. 2001. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. Theriogenology. 55:947-961.

Januskauskas, A., A. Johannisson, and H. Rodriguez-Martinez. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility Theriogenology 60:743–758.

Karabinus, D., C.J. Vogler, R.G. Saacke, and D.P. Evenson. 1997. Chromatin structural changes in bovine sperm after scrotal insulation of Holstein bulls. J. Androl. 18:549-555.

Kasimanickam, R., R.L. Nebel, I.D. Peeler, W.L. Silvia, K.T. Wolfe, A.J. McAllister, and B.G. Cassell. 2006. Breed differences in competitive indices of Holstein and Jersey bulls and their association with sperm DNA fragmentation index and plasma membrane integrity. Theriogenology. 66:1307-1315.

Koeford-Johnsen, H. H. 1972. Cervical secretions as a selective filter for abnormal types of spermatozoa. Arsberetnig Inst. For Sterilitetsforskning, Konelige Veterinaer-og Landbohojskole 15:171-176.

Krzanowska, H. 1974. The passage of abnormal spermatozoa through the uterotubal junction of the mouse. J. Reprod. Fertil. 38:81-90.

Lagerlof, N. 1934. Morphological studies on the changes in the sperm structure and in the testes of bulls with decreased or abolished fertility. Acta Path. Microbiol. Scand. 19:254-267.

Ludwick, T.M., D. Olds, and M. Carpenter. 1948. As referenced in Kelly, J.W., and V. Hurst. 1963. Relationship between certain laboratory criteria and fertility of frozen bovine semen. Am. J. Vet. Res. 24:136-138.

Marshall, C.E., and L. Frey. 1976. Semen evaluation at Select Sires. In: Proc. Nat'l. Assoc. Anim. Breeders 6th Tech. Conf. on Artif. Insem. and Reprod., Columbia, MO, pp. 91-93.

Mitchell, J.R., P.L. Senger, and J.L. Rosenberger. 1985. Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract. J. Anim. Sci. 61:956-963.

Mocé, E., and J.K. Graham. 2008. *In vitro* evaluation of sperm quality. Anim. Reprod.Sci. 105: 104–118.

Mullins, J., and R G. Saacke. 1989. Study of the functional anatomy of the bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. Anat. Rec. 225:106-117.

Nadir, S., R.G. Saacke, J. Bame, J. Mullins, and S. Degelos. 1993. Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility, and embryo quality in artificially inseminated cattle. J. Anim. Sci. 71:199-204.

Nestor, A., and M.A. Handel. 1984. The transport of morphologically abnormal sperm in the female reproductive tract. Gamete Res. 10:119-126.

O'Connor, M.T., R.P. Amann and R.G. Saacke. 1981. Comparisons of computer evaluations of spermatozoal motility with standard laboratory tests and their use for predicting fertility. J. Anim. Sci. 53:5:1368-1376.

Ostermeier, G.C., G.A. Sargeant, B.S. Yandell, D.P. Evenson, and J.J. Parrish. 2001. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. J. Androl. 22:4:595-603.

Overstreet, J.W., G.W. Cooper, and D.F. Katz. 1978. Sperm transport in the reproductive tract of the female rabbit. II. The sustained phase of transport. Biol. Reprod. 19:115.

Pace, M.M., J.J. Sullivan, F.I. Elliott, E.F. Graham and G.H. Coulter. 1981. Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoal quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in .5-ml french straws. J. Anim. Sci. 53:3:693-701.

Parrish, J.J., G.C. Ostermeier, and M.M. Pace. 1998. Fourier harmonic analysis of sperm morphology. In: Proc. Nat'l Assoc. Anim. Breeders 17th Tech. Conf. on Artif. Insem. and Reprod., Columbia, MO, pp. 25-31.

Rycroft, H. 1992. Factors influencing nonreturn data. In: Proc. Nat'l Assoc. Anim. Breeders 14th Tech. Conf. on Artif. Insem. and Reprod., Columbia, MO, pp.43-46.

Saacke, R.G., and C. E. Marshall. 1968. Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. J. Reprod. Fertil. 16:511-514.

Saacke, R.G., and J.M. White. 1972. Semen Quality tests and their relationship to fertility. In: Proc. Nat'l Assoc. Anim. Breeders 4th Tech. Conf. on Artif. Insem. and Reprod., Columbia, MO, pp. 22-27.

Saacke, R.G., W.E. Vinson, M.L. O'Connor, J.E. Chandler, J. Mullins, and R.P. Amann. 1980. The relationship of semen quality and fertility: A heterospermic study. In: Proc. Nat'l Assoc. Anim. Breeders 8th Tech. Conf. on Artif. Insem. and Reprod., Columbia, MO, pp. 71–78.

Saacke, R.G., S. Nadir, and R.L. Nebel. 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. Theriogenology. 41:45-50.

Saacke R.G., J.M. DeJarnette, J.H. Bame, D.S. Karabinus, and S.S. Whitman. 1998. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? Theriogenology. 50:117-128.

Sakkas, D., G. Manicardi, P.G. Bianchi, D. Bizzaro, and U. Bianchi. 1995. Relationship between the presence of endogenous nicks and sperm chromatin packaging in maturing and fertilizing mouse spermatozoa. Biol. Reprod. 52:1140-1155.

Sakkas, D., F. Urner, P.G. Bianchi, D. Bizzaro, I Wagner, N. Jaquenoud, G. Manicardi, and A. Campana. 1996. Sperm chromatin anomalies can influence decondensation after intracytoplasmic sperm injection. Human Reprod. 11:837-843.

Salisbury, G.W., and N.L. VanDemark. 1961. In: Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle, p. 361. W.H. Freeman and Company, San Francisco, CA.

Setchell, B.P., M.J. Occhio, M.S. Hall, M.S. Lourie, M.J. Tucker, and J.L. Zupp. 1988. Is embryonic mortality increased in normal female rats mated to subfertile males? J. Reprod. Fertil. 83:567-574.

Sullivan, J.J., and F.I. Elliott. 1968. Bull fertility as affected by an interaction between motile spermatozoa concentration and fertility level in artificial insemination. VI Int'l. Cong. Anim. Reprod. Artif. Insem. 2:1307.

Thundathil, J.R. Meyer, A.T. Palasz, A.D. Barth, and R.J. Mapletoft. 2000. Effect of the knobbed acrosome defect in bovine sperm on IVF and embryo production. Theriogenology. 54:921-934.

Verstegen, J., M. Iguer-Ouada, and K. Onclin. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology. 57:149-179.

Vianna, F.P., F.O. Papa, F.S. Zahn, C.M. Melo, and J.A. Dell'Aqua, Jr. 2009. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. Anim. Reprod. Sci. 113:279-282.

Vogler, C.J., J.H. Bame, J.M. DeJarnette, M.L. McGilliard, and R.G. Saacke. 1993. Effects of elevated testicular temperature on morphology characteristics of ejaculated spermatozoa in the bovine. Theriogenology. 40:1207-1219.

Walters, A.H., R.G. Saacke, R.E. Pearson, and F.C. Gwazdauskas. 2006. Assessment of pronuclear formation following in vitro fertilization with bovine spermatozoa obtained after thermal insulation of the testis. Theriogenology. 65:1016-1028.

Williams, W.W., and A. Savage. 1925. Observations on the seminal micropathology of bulls. Cornell Vet. 15:353-375.

Williams, W.W., and A. Savage. 1927. Methods of determining the reproductive health and fertility of bulls. A review with additional notes. Cornell Vet. 17:374-376.

Zhang B.R., B. Larsson, N. Lundeheim, and H. Rodriguez-Martinez. 1998. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen–thawed semen from dairy AI bulls. Int. J. Androl. 21:207-216.

HISTORY, EVOLUTION AND PRACTICAL RESULTS OF THE USE OF SEXED SEMEN

Joseph C. Dalton, Ph.D.

University of Idaho, Caldwell, Idaho, USA.

ABSTRACT

The mammalian ejaculate consists of two populations of sperm, the X-chromosome-bearing and Y-chromosome-bearing sperm. The separation of X- and Y-chromosome-bearing sperm by flow cytometry/cell sorting is based on the fact that the X chromosome is larger and contains approximately 3.8% more DNA than the smaller Y chromosome. To achieve 90% purity of a specific sex, typical sorting rates for bull sperm are slow. Consequently, research and commercial production of sexed semen has focused on maximizing fertility of low numbers of frozen-thawed, sex-separated sperm (2.1×10^6 sperm per dose) in heifers. Research and commercial data in dairy heifers supports the expectation of an average conception rate to sexed semen of approximately 70 to 80% of the conception rate to conventional semen used at first service. Calves born as a result of the use of sexed semen are normal, as no differences in birth weights, weaning weights, gestation length, or incidence of abnormalities have been reported. Nevertheless, there appears to be an increased incidence of stillbirth among male calves born from sexed semen; however, there is no effect on the stillbirth incidence among female calves born from sexed semen. Furthermore, the total incidence of stillbirth is not influenced by the use of sexed semen. Factors that may influence the return on investment in sexed semen include: 1) the reduction in conception rate following the use of sexed semen, 2) the differential value of heifers and bulls, 3) the differential cost of sexed semen and conventional semen, 4) the genetic merit of the heifer or cow being inseminated, and 5) the value of a replacement heifer relative to the cost of raising a heifer. Current recommendations are to use sexed semen in heifers only, as the inherent reduced fertility of multiparous cows makes a return on investment following the use of sexed semen in cows questionable.

INTRODUCTION

Sex selection is one of the most sought after and misunderstood reproductive technologies in history. Democratis (470-402 BC), a Greek philosopher, suggested that the right testis produced males, and the left testis produced females (Garner and Seidel, 2008). Of course, this is not the truth, as there are two populations of sperm in the mammalian ejaculate. These two populations of sperm are called X-chromosome-bearing and Y-chromosome-bearing sperm. Many differences between X- and Y-chromosome-bearing sperm have been reported, including those related to size, weight, swimming speed, electrical surface charges and surface macromolecular proteins (Garner, 1984; Garner and Seidel, 2008). Nevertheless, the differences are so small that it is not possible to accurately measure them in individual sperm (Garner and Seidel, 2008).

Garner et al. (1983) reported on the use of a flow cytometer to determine the difference in DNA content between X- and Y-chromosome-bearing sperm from cattle, sheep, pigs, and rabbits. Unfortunately, the procedure initially used by Garner et al. (1983) killed

sperm. It was not until the late 1980's that researchers at the United States Department of Agriculture (USDA) refined the procedures to sex-separate live sperm via flow cytometry (Johnson et al., 1987a; Johnson et al., 1987b; Johnson et al., 1989). The USDA patented the sperm sorting technology in 1991.

In 1996, XY, Inc., a company based in the USA, became the exclusive worldwide licensee of sperm sorting in non-human mammals using technologies developed by the USDA. Also in 1996, Cytomation, Inc., began commercial production of a high speed flow cytometer/cell sorter named "Mo-Flo." Over the years, XY, Inc., working with the Mo-Flo cell sorter and researchers at Colorado State University, further developed technology and procedures that improved upon the work initially done by the USDA. In 2003 a license to separate sperm was granted to Sexing Technologies (Navasota, TX, USA). In 2007, Sexing Technologies acquired XY. Sexing Technologies currently has laboratories at each major AI Stud in the U.S. and Canada, with additional locations in Brazil and the Netherlands.

REVIEW

HOW ARE X AND Y SPERM SEPARATED?

The separation of X- and Y-chromosome-bearing sperm by flow cytometry/cell sorting is based on the fact that the X chromosome is larger and contains approximately 3.8% more DNA than the smaller Y chromosome (Garner et al., 1983). After sperm are treated with a fluorescent dye, the X-chromosome-bearing sperm glow brighter (when exposed to a laser) than Y-chromosome-bearing sperm because of the increased DNA content. Next, as sperm flow through the sorter single-file, a positive or negative electrical charge is attached based on the sperm's florescence intensity. Sperm then pass an electrical field and the X- and Y-chromosome-bearing sperm are sorted into different collection tubes. According to Schenk and Seidel (1999) and Johnson and Welch (1999), the higher the accuracy of sexing, the fewer sperm sorted per unit of time. To achieve 90% purity of a specific sex, typical sorting rates for bull sperm are between 3,000 and 8,000 sperm per second (Johnson and Welch, 1999; Seidel and Garner, 2002; Garner and Seidel, 2008; Sharpe and Evans, 2009). Consequently, the process is considered very slow as it would take approximately 1 to 2 hours to sort the number of sperm in a typical AI dose (20 to 25 million sperm, i.e., 20-25 × 10^6 sperm).

RESEARCH RESULTS IN HEIFERS

As it is not economically feasible to produce only 1 straw of sexed semen (with 20-25 × 10^6 sperm) per hour, research has focused on maximizing fertility of low numbers of frozen-thawed, sex-separated sperm (1.5 × 10^6 to 3 × 10^6; Tables 1 and 2). Furthermore, sex-separation research has traditionally focused on heifers because well-managed heifers tend to have conception rates (resulting from AI with frozen-thawed, conventional semen) of up to 70%, compared to less than 40% in lactating dairy cows.

Nearly all of the early research trials provide evidence of decreased conception rates following AI with sexed semen as compared to conventional semen in dairy heifers. As shown in Tables 1 and 2, the range in conception rate following AI with sexed semen, expressed as a percentage of the conception rate achieved using conventional semen, is 44 to 100%. (Incidentally, the value of 100% is an anomaly, as there has never been another documented study in which the conception rate following AI with sexed semen

was equal to conventional semen). The average conception rate of sexed semen, expressed as a percentage of the conception rate achieved using conventional semen, is approximately 69% across all the studies shown in Tables 1 and 2. Lastly, there is no evidence that semen deposition into the uterine horns enhances conception rate as compared to deposition into the uterine body (Tables 1 and 2).

Table 1. Summary of three field trials using frozen-thawed sexed semen in Holstein heifers in Colorado, USA†.

Sperm type	Dosage	Site of deposition	Conception rate, %	Sexed conception rate relative to unsexed, %
Sexed	1.5×10^6	Uterine body	65	79
Sexed	3.0×10^6	Uterine body	52	63
Conventional	20×10^6	Uterine body	82	
Sexed	1.5×10^6	Uterine body	52	78
Sexed	3.0×10^6	Uterine body	60	90
Sexed	1.5×10^6	Uterine horns	60	90
Sexed	3.0×10^6	Uterine horns	68	100
Conventional	20×10^6	Uterine body	67	
Sexed	1.5×10^6	Uterine body	41	55
Sexed	3.0×10^6	Uterine body	40	53
Sexed	1.5×10^6	Uterine horns	33	44
Sexed	3.0×10^6	Uterine horns	42	56
Conventional	20×10^6	Uterine body	75	

†Seidel et al. (1999)

Table 2. Summary of three field trials using frozen-thawed sexed semen in dairy heifers†.

Sperm type	Dosage	Technician type	Conception rate, %	Sexed conception rate relative to unsexed, %
Sexed‡	1.5×10^6	Herdsman	43	69
Sexed‡	6.0×10^6	Herdsman	41	66
Conventional‡	20×10^6	Herdsman	62	
Sexed§	2.0×10^6	Professional	31	51
Conventional§	20×10^6	Professional	61	
Sexed‡	2.0×10^6	Herdsman	31	72
Conventional‡	20×10^6	Herdsman	43	

†Seidel and Schenk (2002)
‡Holstein heifers
§Jersey heifers

COMMERCIAL SUCCESS IN U.S. DAIRY HERDS

DeJarnette et al. (2009) evaluated farm records from U.S. Holstein dairy herds and reported that the overall conception rate to sexed semen (for all services, in herds with ≥ 50 services) averaged 45% (range 27 to 70%), compared to 56% (range 34 to 83%) for conventional semen (Table 3). Further, the conception rate achieved following AI with sexed semen averaged 80% of that achieved with conventional semen at first

service (DeJarnette et al., 2009). The dosage used for sexed semen was 2.1 × 10^6 sperm.

Table 3. Conception rates of Holstein heifers following AI with sexed and conventional semen†.

Sperm type	Conception rate, % (n)	Sexed conception rate relative to unsexed, %
Sexed	45 (39,763)	80
Conventional	56 (53,718)	

† All services included; Adapted from DeJarnette et al. (2009).

There is ample research and commercial data in dairy heifers to support the expectation of an average conception rate to sexed semen of approximately 70 to 80% of the conception rate to conventional semen used at first service (Seidel et al., 1999; Seidel and Schenk, 2002; DeJarnette et al., 2009). Consequently, if you currently achieve a 65% conception rate at first service in dairy heifers with frozen-thawed, conventional semen, you can expect to achieve (with good management) a conception rate between 46 to 52% with frozen-thawed, sexed semen. As can be seen from the data in the preceding paragraph, there is large variation in conception rates following AI with sexed semen. This is not surprising as the level of management of each herd must be considered, as well as the bias introduced by the owner or AI technician when choosing animals to receive AI with sexed semen (first service only as compared to multiple services, for example).

Most reports describe an accuracy of 85-90% in the predetermination of the sex of calves born (Tubman et al., 2004; Seidel and Schenk, 2006; Cerchiaro et al., 2006; DeJarnette et al., 2009). Furthermore, calves born as a result of the use of sex-separated sperm are normal, as no differences in birth weights, weaning weights, gestation length, or incidence of abnormalities have been reported (Tubman et al., 2004).

According to DeJarnette et al. (2009), the mean incidence of stillbirths among Holstein heifers delivering female calves as a result of sexed semen was 9.2%, which was similar to the incidence following the use of conventional semen in U.S. dairy herds (~10%; Cole et al., 2007). Among male calves born from conventional semen, the incidence of stillbirths (12.9%; DeJarnette et al. 2009) was identical to the U.S. average (Cole et al., 2007); however, the incidence among males born from sexed semen (19.9%) was greater (DeJarnette et al., 2009). At this time, the reason for the increased incidence of stillbirth among male calves born from sexed semen in conjunction with no apparent effect on the stillbirth incidence among female calves is not known. Even though the mean incidence of stillbirths among male calves from sexed semen appears to be high (19.9%), males represent only 10% of total births following the use of sexed semen. Consequently, the total incidence of stillbirth is not influenced by the use of sexed semen (DeJarnette et al., 2009).

RESEARCH RESULTS IN LACTATING COWS

Although the current recommended use for sexed semen is in virgin heifers only, recent research has focused on the use of sexed semen in lactating dairy cows. In one of the first reports, researchers from Finland reported an average

conception rate of 21% with sexed semen (2 × 10^6 sperm per dose) and 46% with conventional, unsexed semen (15 × 10^6 sperm per dose) following first-service in Holstein cows (Andersson et al., 2006). No estrous or ovulation synchronization was used in this study. The conception rate achieved with sexed semen was 45.6% of conventional, unsexed semen (Andersson et al., 2006).

In another study, Holstein cows (lactation 1 to 4 and between 20 to 140 days in milk) were artificially inseminated with sexed semen or conventional, unsexed semen after synchronization (with prostaglandin or Ovsynch) or natural estrus (Schenk et al., 2009). The overall conception rates were 25% for cows in the sexed semen group and 37.7% for cows in the conventional, unsexed group. The conception rate achieved with sexed semen was 66% of conventional, unsexed semen. Cows receiving AI with sexed semen following a natural estrus had a greater conception rate than cows that were synchronized (either with prostaglandin or Ovsynch). Furthermore, conception rates following AI with sexed semen after 84-98 days in milk (or more) were approximately 8 percentage points higher than earlier in lactation, and greater than 6 percentage points lower in older cows (third and fourth lactations) than younger cows. Consequently, Schenk et al. (2009) concluded that the highest conception rates following AI with sexed semen may be achieved in first and second lactation cows exhibiting natural estrus and greater than 100 days in milk.

Another study focused on the efficacy of selecting only “reproductively normal” lactating dairy cows for timed AI (Ovsynch) with sexed semen (Schenk et al., 2009). All cows (lactation 1 to 9) were initially enrolled in Presynch (two injections of prostaglandin 14 days apart). Ultrasonography was performed approximately 14 days after the second prostaglandin injection, and only those cows with normal ovarian and uterine status (55% of the total evaluated) were enrolled in Ovsynch. Timed AI was performed 16-19 hours after the second GnRH injection of Ovsynch. The overall conception rates were 40.5% for cows receiving sexed semen, and 55.6% for cows inseminated with conventional, unsexed semen. The conception rate achieved with sexed semen was 72.6% of conventional, unsexed semen. Although Schenk et al. (2009) concluded that conception rates of presynchronized, reproductively normal lactating cows following timed AI were acceptable, the authors cautioned that the study was very small (~115 animals) and the results should be viewed cautiously.
Despite the strong recommendation by virtually all AI centers, veterinarians, and university faculty that sexed semen be used in virgin heifers only, many producers have experimented with the use of sexed semen in lactating cows. As reported by DeJarnette et al. (2009), conception rates at first service averaged 26% (1,173 services) to sexed semen (2.1 × 10^6 sperm per dose) in Holstein cows and 37% (929 services) in Jersey cows.

WHY IS THERE A LOWERED CONCEPTION RATE FOLLOWING USE OF SEXED SEMEN?

The specific reasons contributing to lower fertility following AI with sexed semen, as compared to conventional semen, are currently unknown. According to Seidel and Schenk (2006), the decreased conception rate following the use of sexed semen may be due to: 1) sperm injury during the process of staining prior to flow cytometry, 2) exposure of sperm to a powerful laser beam during sorting, and 3) centrifugation

required to concentrate the sperm prior to filling straws. Further, Mocé et al. (2006) argues that the reduction in fertility observed following AI with sexed semen may be due to: 1) changes in the quality of sex-separated sperm resulting in reduced fertilization rates, and 2) problems with embryonic development after fertilization. Data from Sartori et al. (2004) provides evidence to support the assertion that use of sexed semen may lead to problems with embryonic development, as an increased percentage of degenerate embryos were observed in superovulated Holstein heifers following AI with sexed semen as compared to conventional semen (53% vs. 24%, respectively). In contrast, DeJarnette et al. (2009) reported that heifers that failed to conceive to sexed semen "had a greater probability of returning to estrus in a normal 18-24 d interval than heifers that failed to conceive to conventional semen." Considering the data of Sartori et al. (2004), DeJarnette et al. (2009) argued that any increase in embryonic mortality following the use of sexed semen likely occurs prior to the period of maternal recognition, therefore, the majority of heifers return to estrus at normal intervals.

Other factors that may contribute to decreased fertility following the use of sexed semen may be: 1) the current inability to determine before separation if a semen sample from a bull will be able to withstand sex separation, freezing and thawing, *and* retain acceptable fertility, 2) low numbers deposited in the female, and 3) changes in sperm membranes resulting in an accelerated capacitation and acrosome reaction of sex-separated sperm after freezing and thawing (Mocé et al., 2006).

In 2006, Mocé et al. argued that changes in the sorting process or in the freezing protocol may minimize the problems of accelerated capacitation and acrosome reaction, thereby leading to increased fertility of sexed semen. Indeed, Rath et al. (2009) reported a new sperm sexing protocol that includes processing and freezing modifications. Initial field data provides evidence that fertility (as measured by calving rates) is similar between AI in heifers with sexed semen (73.6%) and conventional semen (76.7%) using split ejaculates (Rath et al., 2009). The main effect of the modified protocol appears to be the prolongation of the lifespan of sex-separated sperm after thawing. Specifically, as measured by incubation for 6 h, Rath et al. (2009) were able to demonstrate the maintenance of motility and acrosome integrity at a similar level to conventional semen. Although these results are promising, further research is necessary before the modified procedures can be recommended for commercial use.

WHY NOT USE A GREATER NUMBER OF SPERM IN EACH DOSE OF SEXED SEMEN?

To fully understand the results of recent research focused on the effect of sexed semen dosage on conception rates (DeJarnette et al., 2008), it's important to understand the underlying principles of semen dilution and fertility. Salisbury and VanDemark (1961) first suggested the relationship between sperm quantity and quality, when they proposed that fertility increases with increasing numbers of viable sperm inseminated up to a threshold level. After this threshold level has been attained, the female population becomes the limiting factor and increases in sperm numbers do not result in further increases in fertility. This can be seen in Figure 1, where bull B reaches a threshold value for optimal results at 15×10^6 sperm per dose. According to Salisbury and VanDemark (1961), further increases in sperm numbers for bull B will not result in further increases in fertility, because the limiting factor is now the fertility level of the female population. In contrast, bulls A and C do not reach a threshold value for optimal results even when 20×10^6 sperm per dose are used (Figure 1).

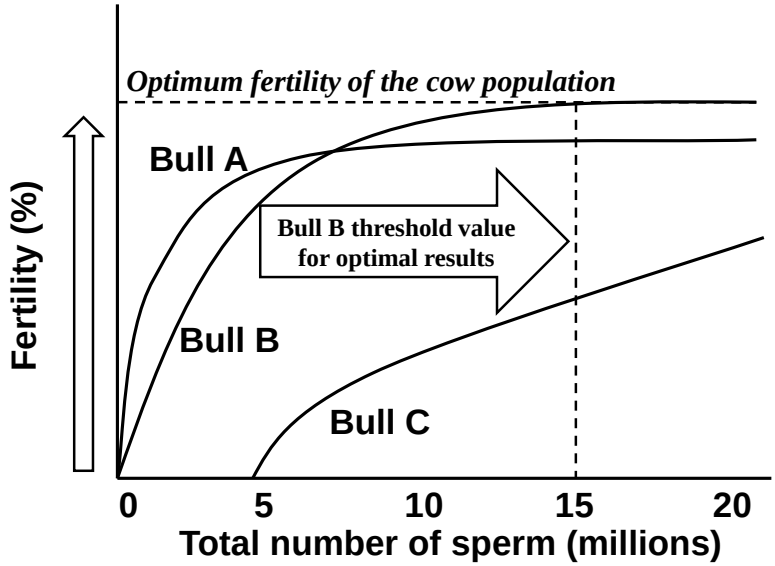


Figure 1. The relationship between increasing total number of sperm and increased fertility as originally proposed by Salisbury and VanDemark (1961).

Figure 1 provides graphic evidence that there are seminal traits which are "compensable" and others which are "uncompensable," as originally described by Saacke et al. (1994). Seminal deficiencies, seen as reduced fertility when sperm numbers are below threshold, which can be overcome or minimized by increasing the sperm dosage would be considered "compensable." Compensable traits of semen quality are believed to be related to sperm viability, specifically to the ability of inseminated sperm to not only reach the ovum, but also bind to and penetrate the zona pellucida, and initiate the block to polyspermy (Saacke et al., 1994). Therefore, if a semen sample contains a low percentage of viable sperm, this may be compensated for by increasing the number of sperm per dose. In contrast, seminal deficiencies resulting in suppressed fertility regardless of sperm dosage would be considered "uncompensable." As illustrated in Figure 1, the maximal fertility of bulls A and C is a function of uncompensable traits and the optimum fertility of the cow population. Uncompensable traits of semen quality are associated with abnormal sperm morphology and DNA integrity, and are manifested by the incompetence of fertilizing sperm to complete the fertilization process and sustain early embryonic development (Saacke et al., 1994).

DeJarnette et al. (2008) studied the effect of sexed semen dosage on conception rates in virgin dairy heifers and lactating cows. Three bulls were used in the study, with sexed semen dosages of 2.1, 3.5, and 5.0 × 10^6 sperm. Following 2,125 services in heifers, a significant response in conception rate to increasing sperm dosage was seen in only one sire (Figure 2; bull A). From the nearly linear response to increasing sperm dosage, it is apparent that bull A possessed few uncompensable traits (Figure 2). In contrast, sperm dosage had no effect on conception rates within bulls B and C. Although the numerical increase in conception rate achieved by bull B when sperm dosage was increased from 2.1 to 3.5 × 10^6 provides evidence of compensable traits, both bulls B and C appear to possess a similar level of uncompensable traits, as seen by the comparable fertility at 3.5 and 5.0 × 10^6 sperm dosages. Overall, there was no effect of sperm dosage on conception rate (46.7, 51.2, and 52.5% for the 2.1, 3.5, and 5.0 × 10^6

sperm dosages, respectively). Lastly, among herds that used greater than 50 doses of sex-separated sperm, conception rates averaged 47% (range 33 to 68%) (DeJarnette et al., 2008).

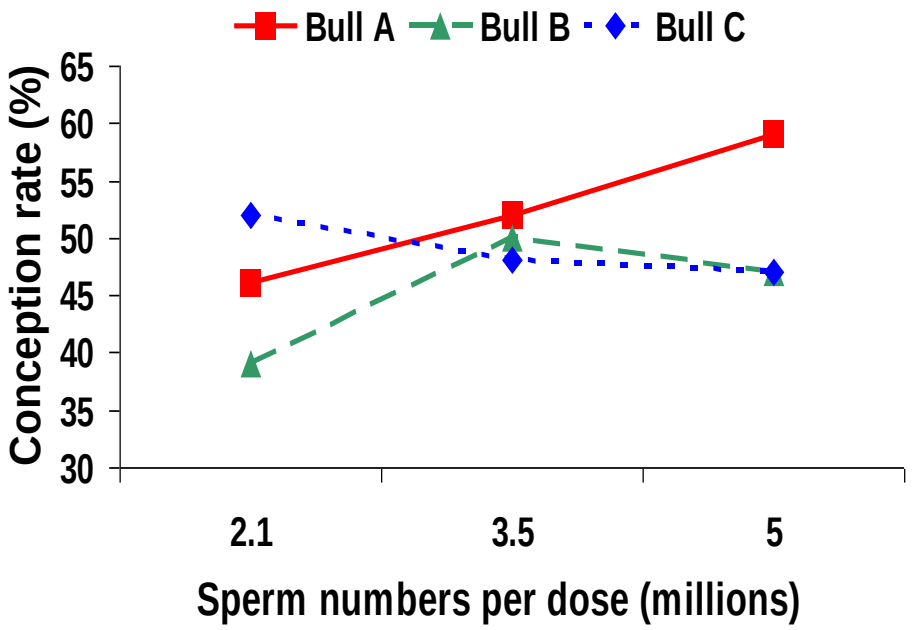


Figure 2. The effect of bull and sex-separated sperm dosage on conception rates in virgin dairy heifers (Adapted from DeJarnette et al., 2008).

In contrast to the results in heifers, DeJarnette et al. (2008) reported that there was no effect of sexed semen dosage on conception rates achieved following 2,369 services in lactating cows, even though the same ejaculates from the same sires were used in cows and heifers. Does this mean that lactating cows respond differently to increasing sperm dosage as compared to heifers? No, argues DeJarnette et al. (2008), as this data provides evidence that the fertility potential of the female population (as described by Salisbury and VanDemark, 1961) places biological limits on the ability of seminal traits to affect an observable fertility response. Furthermore, DeJarnette et al. (2008) asserted that it is possible that other factors may be more limiting to conception than semen quality and sperm numbers which may decrease the ability to detect conception rate differences associated with the inseminates used in the study. Among herds that used ≥ 50 doses of sexed semen, conception rates averaged 30% (range 15 to 41%). Lactation number tended to affect conception rates, as first and second lactation cows achieved numerically greater conception rates (30.4% and 31.1%, respectively) than third and higher lactation cows (25.6%; DeJarnette et al., 2008).

Considering the current limitations in processing efficiency (specifically related to the number of doses per hour) and published data regarding conception rates following AI with different sex-separated sperm numbers per dose (Seidel et al., 1999; Seidel and Schenk, 2002; DeJarnette et al., 2008), there is not enough compelling evidence to suggest that increased sperm numbers per dose (for all bulls) are warranted. In fact, DeJarnette et al. (2008) argues that the wide variation in conception rates achieved following AI with sexed semen in cows (15 to 41%) and heifers (33 to 68%), despite using the same sires and experimental pool of semen, indicates that many opportunities exist to develop and refine on-farm management techniques to enhance the fertility potential of cows and heifers.

ECONOMICS OF SEXED SEMEN

Fetrow et al. (2007) states that "the key to the value of sexed semen lies not in the opportunity to simply have more heifers; it lies in the opportunity to have better heifers." Consequently, Fetrow et al. (2007) provides evidence that two of the most important factors affecting the most profitable use of sexed semen are: 1) how many genetically superior heifers are inseminated, and 2) the reduction in conception rate following the use of sexed semen. Other factors that may influence the opportunity for a return on investment include: 1) the differential value of heifers and bulls, 2) the differential cost of sexed semen and conventional semen, 3) the genetic merit of the heifer or cow being inseminated, and 4) the value of a replacement heifer relative to the cost of raising a heifer (Seidel, 2003; Olynk and Wolf, 2006; Fetrow et al., 2007). To further investigate the economics of using sexed semen, a free calculator, developed by Dr. Victor Cabrera at the University of Wisconsin, is available on the internet at:

http://dairymgt.uwex.edu/tools/sexedsemen/EV_SexedSemen.swf

CONCLUSIONS

There are many opportunities and challenges associated with the use of sexed semen. To achieve 90% purity of a specific sex, typical sorting rates for bull sperm are very slow. Therefore, research has focused on maximizing fertility of low numbers of frozen-thawed, sex-separated sperm in heifers. There is ample data to support the expectation of an average conception rate to sexed semen of approximately 70 to 80% of the conception rate to conventional, unsexed semen used at first service in dairy heifers.
Currently, the most obvious practical use of sexed semen is to breed virgin heifers to have heifer calves. The following list includes the current recommendations regarding the use of sexed semen:

- Use in well-grown, well-managed heifers.
- Administer AI approximately 12 h after observation of estrus.
- Thaw straws using warm water (35 degrees C) for a minimum of 45 seconds.
- Do not use sexed semen in timed AI programs.

Accurate estrous detection and well-trained inseminators will be mandatory to maximize fertility with sexed semen. Success will be achieved by those with intense management skills.
Over time, the use of sexed semen in heifers will allow for: 1) the opportunity to generate genetically superior heifers from the best heifers in the herd, and 2) closed herd expansion (without the biosecurity risks normally present due to the introduction of purchased animais).
The inherent reduced fertility of multiparous cows makes the use of sexed semen in cows more problematic than in heifers. Reproductive success and profitability with sexed semen in lactating cows is likely to be elusive. Consequently, usage of sexed semen in lactating dairy cows is still not recommended.

FUTURE PERSPECTIVE

The availability of sexed semen is primarily limited by the number of sorting machines at an AI Stud and the time required to process each straw. The number of sorting machines at an AI Stud is limited by the high initial investment cost (> US$500,000/machine). Furthermore, it is unrealistic to believe that sexed semen from the most elite bulls will be available soon because ≥ 75% of sperm in an ejaculate is discarded (or lost) in the process of sex-separation (Seidel and Garner, 2002). Consequently, because of the high fixed costs and inefficiency associated with processing sexed semen, the cost of a single straw of sexed semen in North America has been in the range of US$20.00 to US$50.00 for the past few years.
What is the impact of sexed semen use on the U.S. national dairy herd? DeVries and Nebel (2009) estimated that less than 1% of all heifers entering milking herds by the end of 2008 were conceived with sexed semen. By the end of 2009, the figure will increase to 2% of all entering heifers, and is estimated to reach 6% by the end of 2010 (DeVries and Nebel, 2009). In 2011, approximately 10% of all heifers entering milking herds will have been conceived with sexed semen. This translates into approximately 8,100 extra heifers entering milking herds in 2008 as a result of the use of sexed semen (DeVries and Nebel, 2009). In 2009, this number is expected to increase to 63,000 extra heifers, and 161,000 extra heifers are expected to enter the milking herd in 2010 (DeVries and Nebel, 2009).

REFERENCES

Andersson, M., J. Taponen, M. Kommeri, and M. Dahlbom. 2006. Pregnancy rates in lactating Holstein–Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. Reprod. Dom. Anim. 41: 95–97.

Cerchiaro, I., M. Cassandro, R. Dal Zotto, P. Carnier, and L. Gallo. 2006. A field study on fertility and purity of sex-sorted cattle sperm. J. Dairy Sci. 90:2538–2542.

Cole, J.B., G.R. Wiggans, and P.M. VanRaden. 2007. Genetic evaluation of stillbirth in United States Holsteins using a sire-maternal grandsire threshold model. J. Dairy Sci. 90:2480–2488.

DeJarnette, J.M., R.L. Nebel, and C.E. Marshall. 2009. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. Theriogenology. 71:49-58.

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. 91:1778-1785.

DeVries, A., and R. Nebel. 2009. National heifer supply and the effects of sexed semen. In: Proc. 9th West. Dairy Mgt. Conf., Reno, NV, USA, pp.131-140.

Fetrow, J., M. Overton, and S. Eicher. 2007. Sexed semen: Economics of a new technology. In: Bovine Pract. 41: 88-99.

Garner, D.L., L.A. Johnson, S. Lake, N. Chaney, D. Stephenson, D. Pinkel, and B.L. Gledhill. 1983. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing sperm of domestic animals by flow cytometry. Biol. Reprod. 28:312–21.

Garner, D.L. 1984. An overview of separation of X- and Y- spermatozoa. In: Proc. 10th Tech. Conf. AI and Reprod., Nat'l Assoc. Anim. Breeders, Columbia, MO, pp. 87-92.

Garner, D.L. and G.E. Seidel, Jr. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. Theriogenology. 69:886–895.

Johnson, L.A., J.P. Flook, M.V. Look, and D. Pinkel. 1987a. Flow sorting X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations. Gamete Res. 16:1–9.

Johnson, L.A., J.P. Flook, and M.V. Look. 1987b. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. Gamete Res. 17:203–12.

Johnson, L.A., J.P. Flook, and H.W. Hawk. 1989. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. Biol. Reprod. 41:199–203.

Johnson, L.A., and G.R. Welch. 1999. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X- and Y-sperm for maximum efficiency. Theriogenology. 52:1134–323.

Mocé, E., J.K. Graham, and J. Schenk. 2006. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. Theriogenology. 66:929–936.

Olynk, N.J., and C.A. Wolf. 2006. Expected net present value of pure and mixed sexed semen artificial insemination strategies in dairy heifers. J. Dairy Sci. 90:2569–2576.

Rath, D., G. Moench-Tegeder, U. Taylor, and L.A. Johnson. 2009. Improved quality of sex-sorted sperm: A prerequisite for wider commercial application. Theriogenology. 71:22–29.

Saacke, R.G., S. Nadir, and R.L. Nebel. 1994. Relationship of semen quality to sperm transport, fertilization, and embryo quality in ruminants. Theriogenology. 41:45-50.

Salisbury, G.W., and N.L. VanDemark. 1961. In: Physiology of Reproduction and Artificial Insemination of Cattle, p. 361. W.H. Freeman and Company, San Francisco, CA.

Sartori, R., A.H. Souza, J.N. Guenther, D.Z. Caraviello, L.N. Geiger, J.L. Schenk, and M.C. Wiltbank. 2004. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. Anim. Reprod. 1:1:86-90.

Schenk, J.L., and G.E. Seidel, Jr. 1999. Imminent commercialization of sexed bovine sperm. In: Proc. XVI Range Beef Cow Symposium, pp. 89-96.

Schenk, J.L., D.G. Cran, R.W. Everett, and G.E. Seidel. 2009. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per

inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. Theriogenology. 71:717–728.

Seidel, G.E., Jr. 2003. Economics of selecting for sex: The most important genetic trait. Theriogenology. 59:585-598.

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 spermatozoa. Reproduction. 124:733–743.

Seidel, G.E., Jr., and J.L. Schenk. 2002. Field trials with sexed, frozen bovine semen. In: Proc. 19th Tech. Conf. AI and Reprod., Nat'l Assoc. Anim. Breeders, Columbia, MO, pp. 64-69.

Seidel, G.E., Jr., and J.L. Schenk. 2006. Sex-selected semen. In: Proc. Applied Repro. Strategies in Beef Cattle, Rapid City, SD, pp. 261-267.

Sharpe, J.C., and K.M. Evans. 2009. Advances in flow cytometry for sperm sexing. Theriogenology. 71: 4–10.

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.

SÊMEN SEXADO EM PROGRAMAS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

José Nélio S. Sales, Gabriel A. Crepaldi, Manoel F. Sá Filho, Alexandre H. Souza, Claudiney M. Martins, Kedson A.L. Neves, Pietro S. Baruselli

Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, CEP 05508-000, São Paulo/SP, Brasil, barusell@usp.br

Durante anos, os pesquisadores vêm buscando manipular o sexo da prole antes da concepção (Garner e Seidel, 2008). Essa determinação do sexo em bovinocultura de corte e de leite pode ser um dos fatores determinantes para melhorar o desempenho produtivo e econômico da atividade. Por exemplo, em fazendas produtoras de leite, o bezerro macho tem pouco ou nenhum valor zootécnico. Porém, em fazendas de corte comerciais, o bezerro macho é o sexo de interesse devido maior potencial de produção. Levando em consideração essas particularidades, muitas pesquisas vêem sendo desenvolvidas com o objetivo de se predizer e/ou manipular a proporção do sexo dos bezerros. Uma biotecnologia já disponível em escala comercial é a utilização do sêmen sexado. A separação dos espermatozóides Y dos espermatozóides X é possível devido às diferenças no conteúdo do DNA dessas células espermáticas (espermatozóide X possui cerca de 4% mais material genético que espermatozóide Y), sendo realizada por citômetria de fluxo. Essa biotécnica associa a emissão de raios laser, a coloração diferencial dos espermatozóides viáveis e não viáveis e as forças hidrodinâmicas que direcionam o espermatozóide no momento da leitura durante o processo de separação dos espermatozóides X e Y. Além disso, existem diferenças entre as raças de bovinos quanto quantidade DNA presente no cromossomo Y. (Figura 1, Garner *et al*., 2006). Essas diferenças devem ser levadas em consideração quando do emprego dessa tecnologia. Recentes avanços na forma da ponteira do citômetro de fluxo, no posicionamento das células espermáticas no momento da passagem pelo laser, assim como modificações na pressão e no tipo de coloração das células, melhoraram significativamente o processo de separação dos gametas X e Y (Revisado em Garner *et al*., 2006).

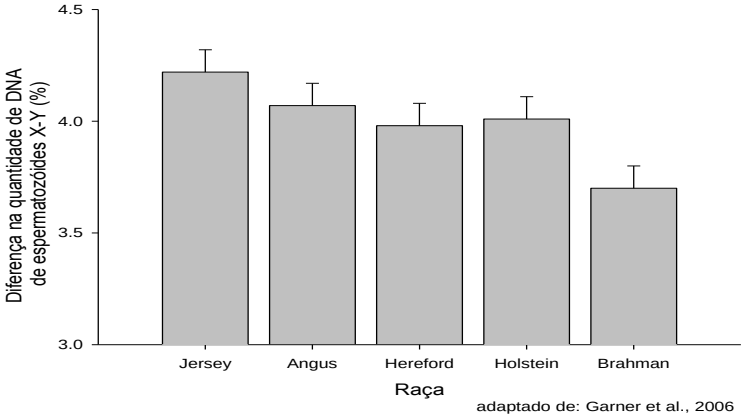


Figura 1. Diferença na quantidade de material genético (DNA) entre o cromossomo X e Y conforme a raça de bovinos

A velocidade de separação dos espermatozóides X e Y é relativamente lenta – aproximadamente 300.000 a 400.000 células por minuto para cada sexo. Desta forma, para a maior eficiência do processo, a dose de sêmen normalmente utilizada é de aproximadamente de $2x10^6$ sptz/palheta. Existem relatos na literatura que relacionam certos comprometimentos na fertilidade com o menor número de espermatozóides por dose nos grupos inseminados com sêmen sexado ($1,5\text{-}2.0x10^6$ sptz/dose) em comparação com a quantidade de espermatozóides utilizado com sêmen convencional ($\sim 10x10^6$ sptz/dose). Porém, trabalhos recentes indicam a mesma taxa de concepção quando inseminados com sêmen sexado ou convencional (Borchersen and Peacock, 2009).

Apesar dos resultados apresentados da literatura com vacas serem inconsistentes, a maioria das pesquisas realizadas com novilhas indica que a taxa de concepção após observação de cio e IA com sêmen sexado é de cerca de 70 a 90% da taxa atingida após o uso de sêmen convencional (revisado em: Seidel *et al*., 1999), dependendo das condições de manejo das fazendas. Seidel *et al*. (1999) relataram, em uma combinação de vários experimentos, que as taxas de concepção de novilhas holandesas inseminadas com sêmen sexado variaram de 40% a 68% e com sêmen convencional de 67% a 82%. Porém, Seidel e Schenk (2002) observaram apesar da taxa de prenhez ser menor no sêmen sexado, a variação dessa taxa foi maior no sêmen convencional (43 a 62%) do que no sêmen sexado (31 a 42%). Assim, essa revisão tem como objetivo apresentar informações de pesquisas que avaliaram a utilização de sêmen sexado em fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus* inseminadas após a detecção de cio ou tempo fixo (sem detecção de cio) ou após tratamentos superovulatórios.

IA COM SÊMEN SEXADO APÓS A DETECÇÃO DE CIO

Atualmente, a taxa de concepção após o uso de sêmen sexado determina cerca 80% da taxa de concepção em inseminações com sêmen convencional (DeJarnette et al., 2008), sendo encontrado em outro estudo, 70% em novilhas e 83% em vacas (Norman *et al.*, 2010). Apesar dos menores índices de prenhez, a utilização do sêmen sexado foi efetiva em aumentar a quantidade de bezerras fêmeas nascidas (sexado = 90%; convencional = 49%). Além disso, o uso de sêmen sexado tem reduzido o número de partos distócios e natimortos tanto em vacas quanto em novilhas, principalmente nessa ultima categoria devido a maior incidência de nascimentos de fêmeas (Norman *et al.*, 2010).

A reduzida quantidade espermatozóides por dose de sêmen sexado poderia ser outro fator envolvido com a redução nos índices de fertilidade. Um primeiro estudo, Bodmer *et al*., (2005), utilizando a mesma concentração de espermatozóides por inseminação em vacas em lactação, obteve taxas de concepção semelhantes entre as fêmeas inseminadas com sêmen sexado (27.6%, n=105) ou convencional (28.1%, n=64). Seguindo ests linha de pesquisa, nosso grupo (Sá Filho et al., 2010a) avaliou a utilização de dupla inseminação em novilhas Jersey recebendo o primeiro, segundo ou terceiro serviço. As novilhas (n=576) foram distribuídas em três tratamentos (1Dose12h, 2Dose12h ou 2Dose12/24h). Nos grupos 1Dose12h (n=193) ou 2Dose12h (n=193) as novilhas foram inseminadas com uma ou duas palhetas contendo 2.1 milhões de espermatozóides 12 horas após a detecção de cio, respectivamente. O grupo 2Dose12/24h (n=190) as novilhas receberam duas doses com 12 horas de intervalo entre as inseminações (primeira 12 horas e a segunda 24 horas após a detecção do cio). Não foram observadas diferenças entre os grupos na taxa de concepção [1Dose12h= 45.1% (87/193); 2Dose12h= 44.0% (85/193); 2Dose12/24h=

49.5% (94/190); P=0.51]. Entretanto, verificou-se efeito significativo do número de serviços (P=0.004) na taxa de concepção [Primeiro= 55.3%[a] (115/208); Segundo= 46.1%[a] (94/204); Terceiro= 34.8%[b] (57/165); P=0.004]. Resultados semelhantes foram observados por DeJarnette et al. (2009), em que as taxas de prenhez reduziram em novilhas com o aumento do número de serviços (47% para o primeiro, 39 % para o segundo e 32% para o terceiro serviço). Portanto, em novilhas Jersey, o aumento da quantidade de espermatozóides por inseminação após observação de cio de 2,1 para 4,2 milhões e a realização da IA em dois momentos com intervalo de 12 horas não alteram a taxa de concepção.

Outra possibilidade para tentar aumentar a taxa de concepção de novilhas inseminadas com sêmen sexado seria a utilização de GnRH no dia da inseminação artificial. Em estudo recente, Sá Filho *et al.* (2010a) observaram que o tratamento com GnRH no dia da inseminação artificial com sincronização prévia com duas prostaglandinas não melhora a taxa de concepção em novilhas Jersey inseminadas com sêmen sexado [GnRH= 47.2% (100/212) vs. Não GnRH= 51.7 % (104/201); P=0.38].

Outro possível fator que poderia influenciar a taxa de prenhez com utilizando sêmen sexado seria o local de deposição no útero. Em novilhas de leite, Kurykin *et al*. (2007) compararam a taxa de prenhez em diferentes locais de deposição do sêmen sexado no trato uterino Nesse experimento, as novilhas foram inseminadas 80-82h após a segunda dose de PGF2α (primeira dose de PGF2α 14 dias antes da segunda dose) com sêmen sexado (2.2 x 10^6 sptz/palheta). O lado da ovulação foi determinado por exame ultra-sonográfico. As taxas de prenhez foram similares entre os diferentes locais de deposição do sêmen sexado no trato uterino de novilhas de leite.

USO DA RADIOTELEMETRIA (HEAT WATCH) PARA A DETECÇÃO DO CIO

Em estudo recente, Sá Filho et al. (2010a) avaliaram a utilização do sêmen sexado em novilhas Jersey inseminadas em diferentes momentos em relação ao início do cio identificado por radiotelemetria (Heat Watch®). Nesse estudo 638 novilhas Jersey foram inseminadas em diferentes momentos após o início do cio (12 a 16h; 16 a 20h; 20 a 24h e 24 a 30h). A taxa de concepção foi maior (*P*=0,03) nas novilhas inseminadas entre 16 e 24 horas em relação às inseminadas entre 12 e 16 horas. Valores intermediários foram obtidos em inseminações realizadas entre 24 e 30 horas após o início do cio (Figura 2).

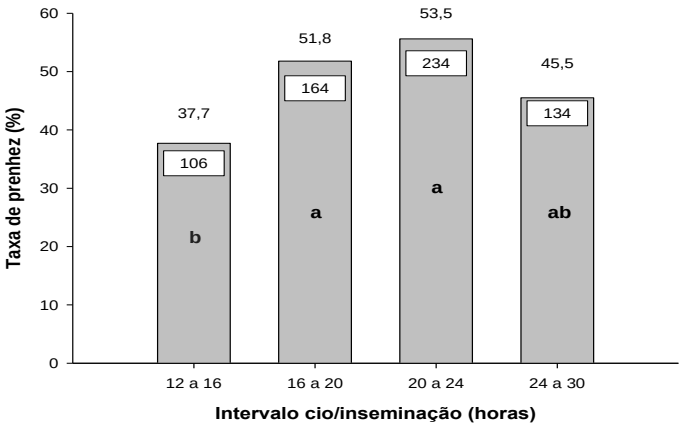


Figura 2. Taxa de concepção de novilhas Jersey de acordo com o intervalo entre início do cio e inseminação utilizando sêmen sexado (a ≠ b; P < 0,05).

Em outro estudo recente realizado, Sales et al. (2010b) avaliaram a utilização do sêmen sexado ou convencional de três diferentes touros em novilhas Jersey inseminadas após o início do cio identificado por radiotelemetria (Heat Watch®). Verificou-se que o sêmen convencional [64,2% (238/371)] apresentou maior taxa de concepção do que o sêmen sexado [49,5% (189/382); P = 0,001]. Além disso, houve efeito de touro na taxa de concepção [Touro A =, 50,0% (108/216)[b]; Touro B = 63,4% (211/333)[a] e Touro C = 53,5% (107/200)[b]; *P*=0,008]. Nota-se que alguns touros apresentaram menores diferenças na taxa de concepção quando a inseminação artificial foi realizada com sêmen sexado ou convencional (Figura 3).

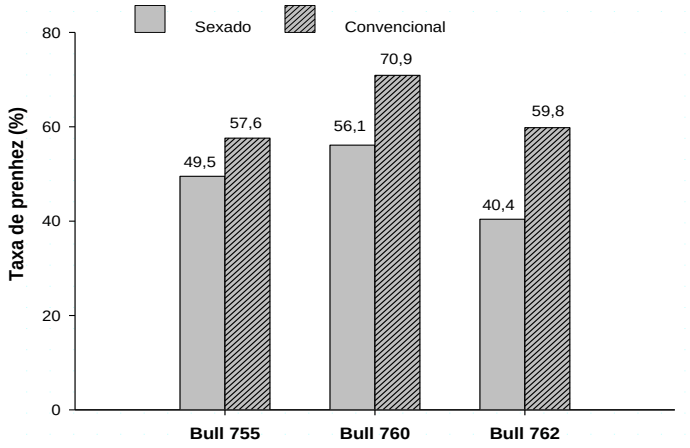


Figura 3. Taxa de concepção de novilhas Jersey submetidas à inseminação artificial de acordo com o touro (775, n=216; 760, n= 333 e 762, n=200) e o tipo de sêmen (sexado ou não sexado). Verificou-se efeito de touro (P = 0,008) e de sêmen (P = 0,001).

Os resultados são indicativos de que a adequação do momento das inseminações em relação ao início do cio melhora a taxa de concepção, apesar do processo de sexagem estar reduzindo a eficiência da técnica em novilhas. Vale ressaltar a diferença individual de fertilidade entre touros. Essa informação tem relevante aplicação prática, pois possibilita a seleção de touros de maior desempenho após a sexagem. O efeito individual da fertilidade de touros após a sexagem também tem sido foco de outros grupos de pesquisa (Borchersen and Peacock, 2009).

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) COM SÊMEN SEXADO

Atualmente, são raras as publicações que tentam relacionar taxas de concepção após o uso de sêmen sexado em vacas de corte e de leite inseminadas em tempo fixo. Uma das possíveis razões da diminuição dos índices de fertilidade após o uso de sêmen sexado é o menor tempo de viabilidade, associado com diferentes padrões de motilidade espermática (Schenk *et al*., 2006). Alguns autores relataram que o sêmen sexado necessita de menos tempo para a capacitação devido ao processo de separação por citometria de fluxo (Lu *et al*., 2004). Uma das possibilidades de diminuir a variação do momento da ovulação é o emprego de técnicas de sincronização, o que poderia colaborar na eficiência de programas de inseminação artificial com sêmen sexado. Vacas de corte e de leite sincronizadas com progestágenos e estradiol ovulam

cerca de 70-72h após a retirada dos implantes (Souza *et al*., 2006, Baruselli *et al*., 2006, Sales *et al.*, 2008).

Baseado nesses princípios, nosso grupo de pesquisa em parceria com a Sexing, Lagoa da Serra e Intervet realizou um primeiro estudo em vacas Nelore (*Bos indicus*, n=389) paridas entre 30 e 60 dias, no qual a inseminação foi realizada em tempo fixo com o sêmen convencional ($40x10^6$ esptz/dose) ou com sêmen sexado ($2.1x10^6$ esptz/dose) em dois diferentes momentos relativos à retirada do implante auricular contendo Norgestomet (Crestar), 54h (16-18 horas antes da ovulação) ou 60h (10-12 horas antes da ovulação). Nossa hipótese foi que a IATF próxima à ovulação aumentaria a taxa de concepção utilizando sêmen sexado por apresentar menor período de viabilidade e tempo para capacitação no trato reprodutivo. Nesse experimento, o sêmen foi preparado levando em consideração cada ejaculado. No laboratório, os ejaculados foram divididos, sendo metade submetida ao congelamento tradicional e a outra metade, ao processo de sexagem seguida de congelamento. Não foi observada diferença na taxa de concepção quando a IATF com sêmen sexado foi realizada 60 horas após a retirada do implante de norgestomet (Figura 4). Além disso, constatou-se que não houve diferença na taxa de concepção entre o uso do sêmen convencional (58,9%), sexado-X (52,0%) e sexado-Y (49,0%), indicando eficiência semelhante para o sêmen sexado em ambos os sexos. Os resultados da sexagem fetal realizados por ultrassonografia 60 dias após IATF demonstraram 93,9% de eficiência de obtenção do sexo desejado. Apesar de não ter sido verificada diferença estatisticamente significativa, o atraso na IATF aumentou 9,0% a taxa de concepção no grupo de animais inseminados com o sêmen sexado.

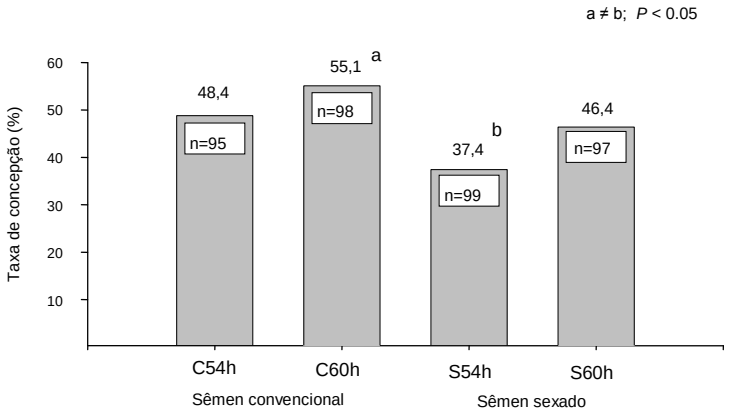


Figura 4. Efeito do momento da IA (54h ou 60h após a retirada do implante auricular contendo Norgestomet) e do tipo de sêmen (convencional ou sexado) na taxa de concepção após IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) pós-parto.

Com base nos efeitos numericamente positivos do experimento anterior, outro estudo foi realizado para verificar o efeito de maior atraso para a realização da IATF (60 vs 64 horas após a retirada; Souza *et al.,* 2008). Foram utilizadas 383 vacas Nelore com período pós-parto de 50 dias. O sêmen foi preparado seguindo o mesmo delineamento dos experimentos anteriores. Os resultados demonstram que ocorre redução na taxa de concepção quando a IATF é realizada 64 horas após a retirada do implante (figura 5). Assim, os resultados sugerem que o momento mais adequado para realização da IATF com sêmen sexado possa ser 60h da retirada da fonte de progesterona /progestágeno (10 a 12 horas antes da ovulação).

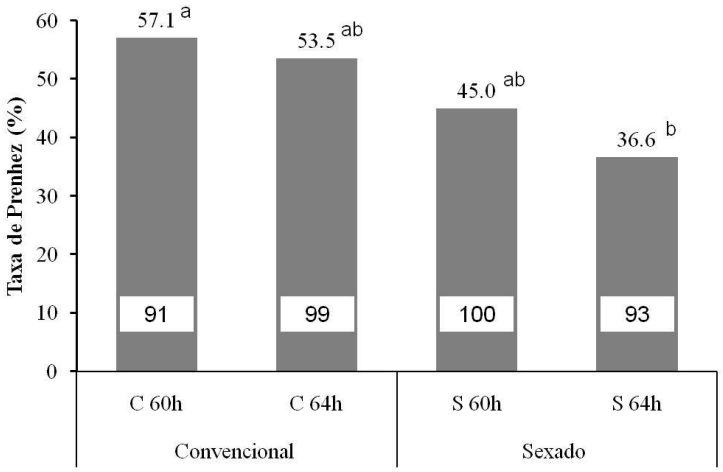


Figura 5. Efeito do momento da IA (60h ou 64h após a retirada do implante de progestágeno) e do tipo de sêmen (convencional ou sexado) na taxa de concepção após IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) no pós-parto.

Em função dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, Neves *et al*. (2010; enviado para publicação) avaliaram qual seria o melhor momento para realizar a IATF com sêmen sexado em relação ao momento da ovulação. Nesse estudo, 339 vacas de cortes lactantes foram distribuídas aleatoriamente para receber a IATF com sêmen sexado 36, 48 ou 60 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. Exames ultrassonograficos foram realizados de 12/12 horas em todos os animais para determinar o momento da ovulação. As ovulações ocorreram em média 71,8 ± 7,8 horas após a retirada do dispositivo. Observou-se maior taxa de prenhez nas vacas inseminadas próximas à ovulação. Os resultados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Risco de prenhez de acordo com o intervalo entre a IATF e a ovulação em vacas de corte lactantes inseminadas com sêmen sexado.

Intervalo IATF /ovulação	Taxa de prenhez (%) No./No.	Risco de prenhez (95% IC)[1]	P
> 24	5,8 5/87[c]	0,24 (0,08-0,70)	<0,01
> 12 a 24	19,4 21/108[b]	Grupo de referência Valor 1,00	
> 0 a 12	37,9 36/95[a]	2,34 (1,22-4,51)	0,01
Após a ovulação	36,4 8/22[ab]	1,80 (0,64-5,03)	0,27

[a,b] Letras diferentes na coluna, difere estatisticamente (P < 0.05).
[1] IC = Intervalo de confiança.

Após a determinação do melhor momento para a realização da IATF com sêmen sexado, outro estudo foi realizado com o objetivo de verificar o efeito do diâmetro folicular no momento da IATF na taxa de concepção. Estudos anteriores demonstraram

que fêmeas com folículo de maior diâmetro no momento da IATF apresentam melhores índices de concepção com sêmen convencional (Sá Filho et al., 2010b). Verificou-se que as fêmeas com folículo >11 mm (58.9%; 818/1388) obtiveram maior taxa de concepção do que fêmeas com folículo <11 mm (40.9% (409/1000).

Quando essa metodologia foi empregada utilizando sêmen sexado (Sá Filho et al., 2010c), foi observado tendência de interação (P=0,08) entre o tipo do sêmen e o tamanho do folículo dominante [Convencional ≥11mm = 59,1% (101/171); Convencional <11mm = 51,0% (131/257); Sexado ≥11mm = 56,8% (104/183) e Sexado <11mm = 36,8% (89/242); Figura 6]. Além disso, observou-se efeito de tipo de sêmen [Convencional 54,2% (232/428) vs. Sexado=45,4% (193/425); P=0,02] e de tamanho do folículo dominante na IATF [≥11mm=57,9% (205/354) vs. <11mm=44,1% (220/499); P>0,00001].

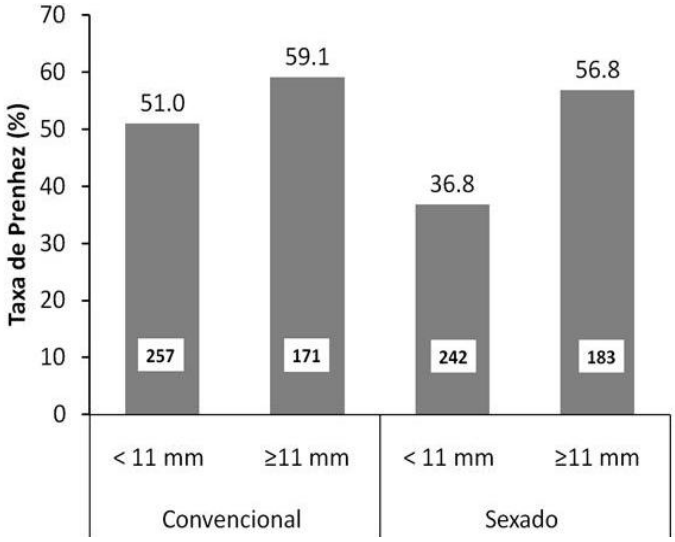


Figura 6. Efeito do diâmetro folicular no momento da IATF e do tipo de sêmen (convencional ou sexado) na taxa de concepção após IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) no pós-parto.

Em outro estudo realizado no Texas – EUA, avaliou-se o efeito do atraso de 6 horas no momento da IATF com sêmen sexado em novilhas Jersey cíclicas sincronizadas e inseminadas em tempo fixo (Sales *et al*., 2010a). Os animais foram sincronizados com CIDR + 2mg de BE + PGF no dia 0; retirada do CIDR + PGF no dia 8; BE (1mg) no dia 9 e IATF no dia 10 (54 ou 60 horas da retirada do CIDR). Houve interação entre o tipo de sêmen e o momento da IATF na taxa de concepção (p=0,06), sendo observado aumento na taxa de concepção quando a IATF foi realizada com sêmen sexado 60 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. No entanto, esse efeito não foi verificado para o sêmen convencional (Figura 7).

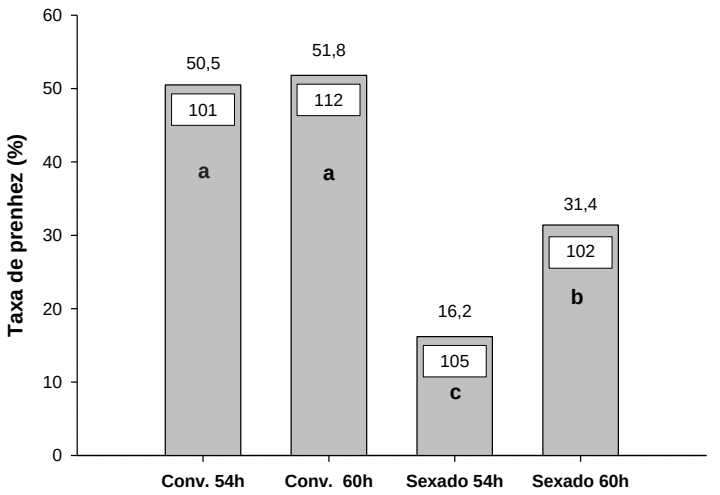


Figura 7. Efeito do momento da IA (54h ou 60h após a retirada do dispositivo de progesterona; 16 a 18 h ou 10 a 12 h antes da ovulação) e do tipo de sêmen (sexado e convencional) na taxa de concepção após IATF em novilhas Jersey.

Nesse experimento foram empregados 3 touros. Verificou-se diferença na taxa de concepção entre os touros utilizados no experimento, indicando mais uma vez que pode haver diferenças entre reprodutores quando da utilização de sêmen convencional e sexado (Figura 8).

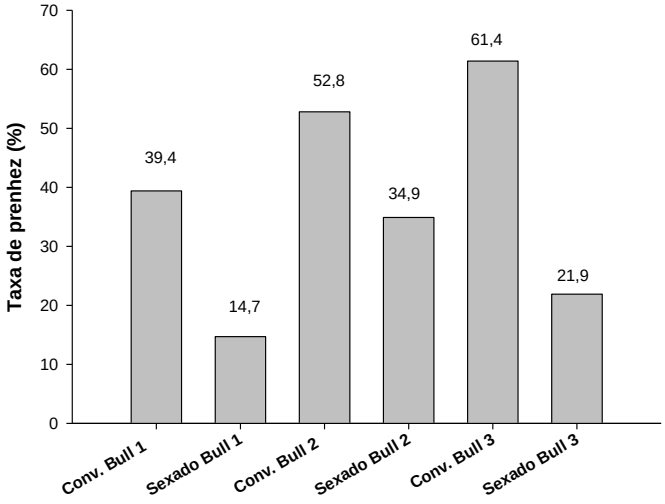


Figura 8. Taxa de concepção de Novilhas Jersey inseminadas em tempo fixo de acordo com o touro e o tipo de sêmen (sexado ou convencional). Verificou-se efeito de touro (P = 0,001) e de sêmen (P = 0,001).

Com o intuito de reduzir o número de manejos nos protocolos de IATF com sêmen sexado, vacas Nelore lactantes foram submetidas a dois diferentes protocolos de sincronização da ovulação (BED9 e RBE9; n=593, Sá Filho *et al.* 2010d). No BED9, os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona associado à administração i.m. de 2 mg de benzoato de estradiol (D0). No D8, o dispositivo de

progesterona foi removido, administrou-se i.m 0,25 mg de cloprostenol sódico e 300UI de eCG. Vinte e quatro horas após a retirada do dispositivo, administrou-se i.m. 1 mg de benzoato de estradiol (BE). A IATF foi realizada entre 60 e 63 horas após a remoção do dispositivo. No grupo RBE9, as fêmeas foram sincronizadas utilizando o mesmo protocolo descrito para o grupo BED9, porém permaneceram com o dispositivo intravaginal durante nove dias, administrou-se 1 mg de BE no momento da retirada do dispositivo e a IATF com sêmen sexado foi realizada entre 50-53 horas após a remoção do dispositivo. Não foi verificado efeito do protocolo de sincronização sobre a taxa de prenhez (BED9 = 47,1%; 140/297 vs. RBE9 = 41,0 %; 121/295; P = 0,25). Conclui-se é possível reduzir o número de manejos sem afetar a eficiência do protocolo de sincronização da ovulação em vacas inseminadas com sêmen sexado.

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

A viabilidade e a concentração de sêmen utilizados em procedimentos de transferência de embriões são importantes, pois animais submetidos a tratamentos superovulatórios apresentam, em geral, menores taxas de fertilização de oócitos que animais não superovulados (Saacke et al., 1998). Portanto, existem muitas dúvidas quanto ao uso do sêmen sexado em animais superovulados, principalmente devido aos distúrbios relacionados ao transporte espermático no trato uterino.

Com o intuito de avaliar a produção de embriões em vaca Nelore (*Bos inducus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo realizamos um experimento para comparar a eficiência do sêmen sexado e do sêmen convencional (Baruselli et al., 2007 e 2008). As doadoras foram sincronizadas e inseminadas em tempo fixo. A IATF com sêmen sexado ($4,2x10^6$ esptz/IA) e convencional ($40x10^6$ esptz/IA) foram realizadas 12 e 24 horas após a administração do indutor da ovulação (GnRH). O sêmen foi produzido de um reprodutor levando em consideração cada ejaculado e todas as vacas passaram por todos os tratamentos (*cross-over*). Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Produção de embriões de vacas Nelore (*Bos indicus)* superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado ou convencional, Cassilândia, MS, 2007.

	Sêmen Convencional	Sêmen Sexado	Valor de P		
			Trat	Rep	Trat vs Rep
Número de animais	10	10			
Total de estruturas	9,90 ± 0,78	8,40 ± 1,40	0,28	0,81	0,71
Emb. transferíveis (Grau 1, 2 e 3)	6,80 ± 0,66	4,20 ± 0,74	0,03	0,88	0,88
Emb. congeláveis (Grau 1 e 2)	5,90 ± 0,71	3,50 ± 0,65	0,03	0,43	0,99
Oócitos não fertilizados	1,50 ± 0,48	3,70 ± 0,88	0,01	0,82	0,46
Degenerados	1,60 ± 0,37	0,50 ± 0,16	0,04	0,54	0,78
Taxa de emb. transferíveis (%)	68,7 ± 6,3	50,0 ± 5,1	0,01	0,68	0,54
Taxa de emb. congeláveis (%)	59,6 ± 5,1	41,7 ± 5,2	0,02	0,32	0,73

Doadoras inseminadas com sêmen sexado apresentaram menor número de embriões transferíveis e congeláveis, aumento do número de embriões não fertilizados e redução na taxa de embriões transferíveis e congeláveis. Apesar da menor produção de embriões com o emprego do sêmen sexado é possível produzir mais embriões do sexo de interesse quando a acurácia dessa biotecnologia atinge 90% de determinação do sexo (Figura 9).

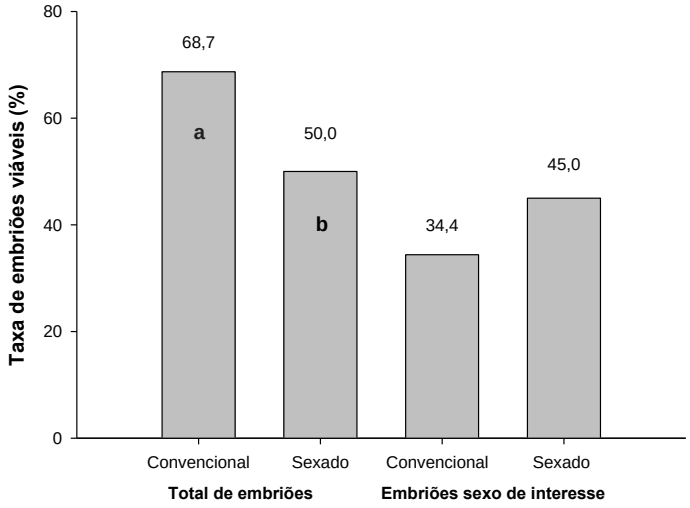


Figura 9. Estimativa de produção de embriões transferíveis (macho ou fêmea) com o emprego de sêmen convencional e sexado em doadoras Nelore superovuladas e inseminadas em tempo fixo (estimativa de 90% de acurácia na sexagem).

Nesse experimento parte dos embriões produzidos foi transferida à fresco em receptoras sincronizadas para receber um embrião em tempo fixo (Tabela 3). Taxas de prenhez semelhantes foram verificadas tanto aos 30 quanto aos 60 dias de gestação para embriões produzidos com sêmen sexado ou convencional. Após a sexagem por ultra-sonografia confirmou-se 90,0% de fêmeas para o sêmen sexado e 52,7% para o sêmen convencional.

Tabela 3. Taxa de prenhez aos 30 e 60 dias após a transferência de embriões provenientes de inseminação com sêmen convencional e sexado e porcentagem de fêmeas na sexagem fetal.

Embriões produzidos	n	Taxa de prenhez 30 dias (%)	Taxa de prenhez 60 dias (%)	Sexagem fetal (% de fêmeas)
Sêmen convencional	68	57,3 (39/68)	52,9 (36/68)	52,7 (19/36)
Sêmen sexado	42	57,1 (24/42)	47,6 (20/42)	90,0 (18/20)

Outro experimento foi estabelecido para avaliar o efeito do atraso de 6 horas na IATF com sêmen sexado em doadoras Nelore superovuladas (Baruselli et al., 2008). As doadoras foram sincronizadas e inseminadas em tempo fixo. No grupo controle, a IATF com sêmen sexado ($4,2x10^6$ esptz/IA, Sexado12-24h) e convencional ($40x10^6$ esptz/IA) foram realizadas 12 e 24 horas após a administração do indutor da ovulação (LH).

Outro grupo (Sexado18-30h) foi inseminado com sêmen sexado ($4,2x10^6$ esptz/IA) 18 e 30 horas após o LH. O sêmen foi produzido de um reprodutor levando em consideração cada ejaculado, semelhante aos experimentos anteriores. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Produção de embriões de vacas Nelore (*Bos indicus)* superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado e convencional de acordo com o momento da IATF, 2008.

	Sêmen Convencional IATF 12/24h	Sêmen Sexado IATF 12/24h	Sêmen Sexado IATF 18/30h	P
Número de animais	12	12	12	
Total de estruturas	8,75±0,87	8,17±0,58	10,42±0,71	0,19
Emb. transferíveis (Grau 1, 2 e 3)	7,25±0,59a	3,25±0,42c	5,17±0,64b	0,001
Emb. congeláveis (Grau 1 e 2)	6,17±0,53a	2,58±0,31b	4,00±0,54b	0,001
Oócitos não fertilizados	0,75±0,22b	3,92±0,70a	4,25±0,68a	0,001
Emb. degenerados	0,75±0,22	1,00±0,35	1,00±0,25	0,74

Apesar de não diferir estatisticamente, o atraso da IATF de 12/24 horas para 18/30 horas após a administração de LH aumentou numericamente o número de embriões produzidos em vacas Nelore superovuladas. Esses dados são indicativos de que existe a possibilidade de aumentar a eficiência da produção de embriões com o emprego de sêmen sexado atrasando em 6 horas o momento da IATF após o tratamento para indução da ovulação com LH.

Experimento semelhante ao de vacas *Bos indicus* (Nelore) de produção *in vivo* de embriões com sêmen sexado foi conduzido em novilhas *Bos taurus* (Holandesas). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Produção de embriões de novilhas holandesas (*Bos taurus)* superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado e convencional de acordo com o momento da IATF, 2008 (Baruselli et al., 2008).

	Sêmen Convencional IATF 12/24h	Sêmen Sexado IATF 12/24h	Sêmen Sexado IATF 18/30h	P
Número de animais	05	05	05	
Total de estruturas	$9,1±1,2^{b}$	$11,1±2,1^{ab}$	$14,3±0,9^{a}$	0,02
Emb. transferíveis (Grau 1, 2 e 3)	7,3±0,8	5,4±1,1	8,1±1,0	0,14
Emb. congeláveis (Grau 1 e 2)	$5,9±0,5^{ab}$	$3,7±0,6^{b}$	$7,0±1,2^{a}$	0,05
Oócitos não fertilizados	$1,4±0,6^{b}$	$4,1±0,9^{a}$	$5,0±0,9^{a}$	0,001
Emb. Degenerados	0,4±0,3	1,6±0,8	1,1±0,7	0,30

Os resultados são indicativos de que o atraso em 6 horas nas inseminações artificiais com sêmen sexado em programas de transferência de embriões pode ser uma medida para aumentar a eficiência dessa biotecnologia em protocolos de superovulação com o emprego de inseminação artificial em tempo fixo, tanto em *Bos indicus* como em *Bos taurus*.

CONCLUSÃO

Os dados apresentados demonstram que as taxas de concepção após detecção de cio em novilhas inseminadas com sêmen sexado são aceitáveis. Ainda, com a adequação do momento da inseminação em relação ao início do estro está melhorando a taxa de concepção. Melhores resultados são obtidos quando as inseminações são realizadas entre 16 a 24 horas após o início do estro (ou seja, 6 a 14 horas antes da ovulação). A taxa de concepção após o uso da sincronização da ovulação para IATF com sêmen sexado foi satisfatória, desde que o momento da IATF seja ajustado para 60 horas após a retirada do implante (10 horas antes da ovulação). O uso do sêmen sexado em programas de superovulação está diminuindo a produção de embriões viáveis. No entanto, existem indícios de melhora com um atraso de 6 horas nas inseminações (IATF 18 e 30 horas após o indutor de ovulações), uma vez que a utilização de sêmen sexado em doadoras de embriões é uma alternativa para aumentar o número e embriões viáveis do sexo desejado. É importante salientar que existe grande variação individual na fertilidade de touros submetidos ao processo de sexagem. Essas diferenças devem ser levadas em consideração no momento da escolha do reprodutor para programas de inseminação artificial e de transferência de embriões. Mais experimentos são necessários para melhor compreender os fatores que afetam a fertilidade do sêmen sexado em fêmeas bovinas.

AGRADECIMENTOS

À Sexing Techonologies, à Lagoa da Serra, à Intervet e ao Dalhart Jersey Ranch pela parceria que possibilitou o desenvolvimento dos experimentos realizados no Brasil e EUA.

REFERÊNCIAS

Baruselli PS, Ayres H, Souza AH, Martins CM, Gimenes LU, Torres-Júnior JRS. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. *In*: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. *Anais do 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2006a. v.1, p.113-132.

Baruselli, P.S.; Martins, C.M.; Reis, P.O.; Ayres, H.; Ferreira, R.M.; Sales, J.N.S.; Crepaldi, G.A. Produção de embriões de vacas Nelore (Bos indicus) inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado, **Acta. Sci. Vet.** v. 36SUP, p. s443-s448, 2008.

Baruselli, P.S.; Souza, A.H.; Martins, C.M.; Gimenes, L.U.; Sales, J.N.S.; Ayres, H.A; Arruda, R.P. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. **Rev Bras Reprod Anim,** v.31, p.374-381, 2007.

Bodmer M, Janett F, Hassig M, den Daas N, Reichert P, Thun R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology*, v.64, p.1647-1655, 2005.

Borchersen, S., Peacock, M. Danish A.I. field data with sexed semen. Theriogenology, v. 71, p. 59–63, 2009.

Crepaldi GA, Sales JNS, Fosado M, Campos Filho EP, Baruselli, PS. Momento da ovulação e taxa de prenhez de novilhas Jersey submetidas a inseminação artificial em tempo fixo com semen sexado em diferentes momentos. Em vias de publicação.

DeJarnette JM, Nebel RL, Marshall CE, Moreno JF, McCleary CR, Lenz RW. Effect of Sex-Sorted Sperm Dosage on Conception Rates in Holstein Heifers and Lactating Cows. J Dairy Sci;91:1778-1785, 2008.

Garner DL. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, v.65, p.943-957, 2006.

Garner DL, GE Seidel Jr. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 69:886–895, 2008.

Hare, E., H. D. Norman, and J. R. Wright. 2004. Duration

Kurykin J, Jaakma U, Jalakas M, Aidnik M, Waldmann A, Majas L. Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. *Theriogenology*, v.67, p.754-759, 2007.

Lu KH, Seidel Jr GE. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage rates of bovine oocytes inseminate with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, v.62, p.819-830, 2004.

Neves KAL, Sales JNS, Souza AH, Crepaldi GA, Sala RV, Fosado M, Campos Filho EP, de Faria M, Sá Filho MF, Baruselli PS. Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado. *Theriogenology*, 2010, submetido para publicação.

Norman HD, Hutchison JL, Miller RH. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. J Dairy Sci. 93:3880–3890, 2010.

Sá Filho M.F., Ayres H., Ferreira R.M., Nichi M., Fosado M., Campos Filho EP, Baruselli OS. Strategies to improve pregnancy per insemination using sexed semen in dairy heifers detected in estrus Theriogenology 2010a, *in press*.

Sá Filho M.F., Crespilho A.M., Santos J.E.P., Perry G.A., Baruselli P.S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. Anim Reprod. Sci. 2010b (in press).

Sá Filho, M.F., Baldrighi, J.M., Penteado L., Campos Filho E.P., Baruselli, P.S. Follicle diameter at timed insemination influences the pregnancy in suckled *Bos indicus* cows inseminated with sexed semen. 8th International Ruminant Reproduction Symposium, Alaska, 2010c (submitted).

Sá Filho MF, Sales JNS, Girotto R, Penteado L, Campos Filho EP, Baruselli PS. Otimização do uso de sêmen sexado e redução de manejos em programas de IATF em vacas Nelore lactantes. *Acta Sci Vet*, 2010d, *in press.*

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*, v.50, p.117-128, 1998.

Sales JNS, Neves KAL, Souza AH, Crepaldi GA, Sala RV, Fosado M, Campos Filho EP, de Faria M, Sá Filho MF, Baruselli PS. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex sorted semen. *Theriogenology*, 2010a, submetido para publicação.

Sales JNS, Crepaldi GA, Fosado M, Campos Filho EP, Baruselli PS. Timing of insemination with sexed or nonsexed semen on pregnancy rates of Jersey heifers detected in heat by radiotelemetry. In: Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 2010, Córdoba. Reprod Fertil Develop, v. 22, p. 178-178, 2010b.

Sales JNS, Carvalho JBP, Crepaldi GA, Maio JRG, Carvalho CAB, Baruselli PS. Rate and timing of ovulation in Nelore cows treated with estradiol Cypionate or Benzoate to induce ovulation on FTAI protocols. Reprod Dom Anim, v. 43, p. 181, 2008 [Abstract].

Schenk JL, Suh TK, Seidel Jr. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology*, v.65, p.299-307, 2006.

Seidel GE, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, **Green RD**, **Cran DG**. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*, v.52, p.1407-1420, 1999.

Souza AH, Martins CM, Torres-Jr JR, Ayres H, 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 Sci Vet*, v.34, p.404, 2006 [Resumo].

Souza AH, Sales JNS, Crepaldi GA, Teixeira AA, Baruselli PS. Effect of type of semen (sexed vs non-sexed) and time of AI (60h vs 64h) on pregnancy rates of postpartum Nelore cows inseminated in a fixed time. *Anim. Reprod.* V.6, n.1, p224, Jan/Mar 2008 [Resumo].

Weigel KA. Exploring the Role of Sexed Semen in Dairy Production Systems. *J Dairy Sci*, v.87, p.E120–E130, 2004.

APLICAÇÃO PRÁTICA DAS TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO EM VACAS DE LEITE

C.A. Rodrigues[1]; A.L. Ranieri[2]; L.M. Vieira[3]; P.R.L. Silva[1]; P.S. Baruselli[3]

[1]SAMVET, São Carlos/SP, Brasil.
[2]UNESP/FCAV, Jaboticabal/SP, Brasil.
[3]Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, São Paulo, Brasil.

INTRODUÇÃO

O declínio na fertilidade de vacas leiteiras nas últimas décadas tem sido associado ao aumento da produção de leite e a mudanças na fisiologia reprodutiva desses animais. Algumas das causas da menor eficiência reprodutiva em rebanhos de alta produção são: diminuição da expressão e da detecção de estros (Dransfield et al., 1998; Lopez et al., 2004), anestro, baixa taxa de concepção e aumento da mortalidade embrionária (Al-Katanani et al., 1999). Além disso, todos esses fatores responsáveis pela redução da eficiência reprodutiva são exacerbados quando esses animais são submetidos a estresses ambientais, como o estresse calórico, principalmente vacas de alta produção (Al-Katanani et al., 1999).

Sendo assim, as razões do declínio do desempenho reprodutivo são multifatoriais e não inteiramente associadas ao aumento da produtividade leiteira (Lucy, M.C., 2001). Estudos epidemiológicos indicam que outros fatores como afecções reprodutivas (retenção de placenta, metrites e cistos ovarianos) e época de parição foram relativamente mais importantes para o desempenho reprodutivo do que a produção de leite (Al-Katanani et al., 1999; Gröhn et al., 2000).

Além desses fatores, De La Sota et. al (1993) observaram baixas concentrações de estradiol (proestro) e progesterona (fase luteal) em vacas em lactação quando comparadas com vacas secas. Portanto, alterações endócrinas também podem estar dificultando o aumento da eficiência reprodutiva desses animais.

TÉCNICAS REPRODUTIVAS DESENVOLVIDAS NA FAZENDA SANTA RITA (AGRINDUS S/A), MUNICÍPIO DE DESCALVADO/SP

- <u>Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)</u>

Com o intuito de aumentar as taxas de serviço (TS), foram desenvolvidos programas hormonais de sincronização que utilizam prostaglandina F2α (PGF2α; revisado por ODDE, 1990). Posteriormente, Pursley et al. (1995) desenvolveram o protocolo Ovsynch que permite a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com a combinação de PGF2α e GnRH. Atualmente, os protocolos de IATF empregam dispositivos ou implantes contendo progesterona ou progestágenos associados a tratamentos com estradiol (E2) para sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular e posterior ovulação para realização da IATF (Bó et al., 1995a). Porém, mesmo com o uso desses protocolos hormonais, as taxas de concepção (TC) de vacas de leite continuam baixas, principalmente no verão. López-Gatius et al. (2003) verificaram declínio na taxa de concepção de vacas de leite durante o período de estresse térmico. No inverno, a fertilidade foi preservada, bem como as chances de desordens reprodutivas. No Brasil, Rodrigues et al. (2007) analisaram as taxas de concepção de vacas Holandesas em lactação ao longo dos meses do ano. Esses pesquisadores

verificaram que vacas submetidas à inseminação artificial (IA) nos períodos de estresse térmico (Janeiro a Abril) apresentaram menor eficiência reprodutiva.

Frente à rápida evolução das técnicas, a fazenda Santa Rita desenvolve vários experimentos em parceria com pesquisadores e empresas, buscando constantes melhorias produtiva, reprodutiva, sanitária e genética do seu rebanho.

Objetivando avaliar o efeito da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) na eficiência reprodutiva de vacas de leite de alta produção, nosso grupo conduziu um experimento para avaliar o efeito da IATF sobre a taxa de concepção, intervalo parto/1ªIA, parto/concepção e porcentagem de animais prenhes até 150 dias pós parto. Foram utilizadas 985 vacas Holandesas em lactação distribuídas em dois grupos experimentais de acordo com escore de condição corporal (ECC), presença de corpo lúteo (CL) e média de produção. As vacas do grupo controle (G-Controle; n=490) que apresentaram CL à palpação retal no D0, receberam PGF2α (150 µg) i.m. e foram mantidas no manejo da fazenda [observação de cio duas vezes por dia por 1h e inseminadas 12h após juntamente com a administração GnRH (100 µg)]. Os animais do G-Controle foram liberados para IA a partir de 57 DEL (Dias em lactação), e aqueles não detectados em cio foram palpados novamente 14 dias mais tarde e na presença de CL ou folículo com aproximadamente 10 mm receberam uma dose de PGF2α ou GnRH, respectivamente. As fêmeas do grupo IATF (G-IATF; n=495) receberam no D0, um implante auricular de Norgestomet e benzoato de estradiol (BE; 2,0 mg) i.m. No D8, o implante foi removido e administrado eCG (400 UI) i.m, PGF2α (150 µg) i.m. e cipionato de estradiol (1 mg) i.m. A IATF foi realizada juntamente com a administração de GnRH 54 horas após a retirada do implante. Todas as vacas do G-IATF foram inseminadas entre 57 e 63 DEL. Após a IATF as vacas observadas em cio foram inseminadas com base na detecção visual até a terceira inseminação pós-parto ou 150 DEL, nas mesmas condições do G-Controle. O diagnóstico de prenhez foi efetuado por ultrassonografia 30 e 60 dias após a IA.

Não houve diferença nas taxas de concepção à primeira [G-Controle=21,2% (99/467); G-IATF=17,8% (88/495)], segunda [G-Controle=21,6% (61/283); G-IATF=20,9% (72/344)] e terceira IA [G-Controle=30,2% (41/136); G-IATF=21,4% (40/187)]. Entretanto, a perda gestacional foi maior no G-IATF após a 1ª IA [G-Controle=20,8% (26/125); G-IATF=30,2% (38/126); P=0,04]. Não houve diferença na taxa de prenhez aos 150 dias pós-parto [G-Controle=41,8% (205/490); G-IATF=41,8% (207/495); P=0,70]. O intervalo parto/1ªIA foi maior no G-Controle (78,4±1,3 dias) comparado ao G-IATF (60,6±0,1 dias; P=0,0001), assim como o intervalo parto/concepção (G-Controle: 94,6 ± 1,8 dias; G-IATF: 87,4 ± 1,8 dias; P=0,02).

Em áreas tropicais e subtropicais, o estresse térmico é uma das principais causas de subfertilidade de vacas de leite, com taxas de concepção de 40 a 60% no inverno e de 10 a 20% no verão (WOLFENSON et al., 2006; DE RENSIS et al., 2003; RODRIGUES et al., 2007). Contudo, no presente estudo não houve efeito de estação (verão e inverno) na taxa de concepção e na perda gestacional de vacas Holandesas de alta produção (Tabela 1). Resultados semelhantes foram apresentados por Lopes et al. (2007), os quais não verificaram menores taxas de concepção em vacas Holandesas em lactação durante o verão.

Os resultados sugerem que o emprego da IATF 60 dias pós-parto foi eficiente em diminuir o intervalo parto/concepção. Contudo, a porcentagem de vacas prenhes aos 150 dias em lactação foi semelhante nos dois grupos.

Tabela 1. Taxa de concepção aos 30 e 60 dias e perda gestacional na primeira, segunda e terceira IA, e intervalos entre o parto e as inseminações de vacas Holandesas IATF ou após a observação de estro (Controle) durante o inverno e o verão (Adaptado de Teixeira A.A., 2010).

	Inverno		Verão		P		
	Controle	IATF	Controle	IATF	Trat	Est	Trat x Est
1ª IA							
Taxa de concepção aos 30 dias (%)	27,1 (65/240)	27,8 (69/248)	26,4 (60/227)	23,1 (57/247)	0,55	0,29	0,52
Taxa de concepção aos 60 dias (%)	20,8 (50/240)	18,2 (45/248)	21,6 (49/227)	17,4 (43/247)	0,13	0,71	0,89
Perda gestacional (%)	23,1 (15/65)	34,8 (24/69)	18,3 (11/60)	24,6 (14/57)	0,09	0,19	0,73
Intervalo parto/1ª IA (dias)	77,3 ± 1,3	60,5 ± 0,1	79,5 ± 1,4	60,8 ± 0,2	0,0001	0,19	0,28
2ª IA							
Taxa de concepção aos 30 dias (%)	29,9 (43/144)	27,3 (45/165)	22,3 (31/139)	25,1 (45/179)	0,92	0,07	0,39
Taxa de concepção aos 60 dias (%)	25,0 (36/144)	21,2 (35/165)	18,0 (25/139)	20,7 (37/179)	0,89	0,24	0,32
Perda gestacional (%)	16,3 (7/43)	22,2 (10/45)	19,4 (6/31)	17,8 (8/45)	0,73	0,93	0,55
Intervalo parto/2ª IA (dias)	103,1 ± 1,7	97,0 ± 1,4	107,1 ± 1,6	95,4 ± 1,4	0,001	0,46	0,04
3ª IA							
Taxa de concepção aos 30 dias (%)	36,8 (25/68)	26,4 (24/91)	32,4 (22/68)	27,1 (26/96)	0,23	0,70	0,50
Taxa de concepção aos 60 dias (%)	29,4 (20/68)	22,0 (20/91)	30,9 (21/68)	20,8 (20/96)	0,17	0,97	0,95
Perda gestacional (%)	20,0 (5/25)	16,7 (4/24)	4,6 (1/22)	23,1 (6/26)	0,43	0,90	0,77
Intervalo parto/3ª IA (dias)	121,1 ± 1,9	121,0 ± 1,6	126,4 ± 1,7	118,7 ± 1,6	0,10	0,58	0,02

Trat – efeito de tratamento; Est – efeito de estação; Trat x Est – interação entre tratamento e estação.

- Superovulação (SOV)

Quanto maior for a produção de leite, maior a necessidade de melhora reprodutiva através da utilização de biotecnologias como inseminação artificial, sincronização estral, transferência de embriões e fecundação *in vitro*. (NEVES et al., 2000). Em função do interesse nacional e internacional na aquisição e multiplicação de animais de elevado valor genético, o mercado de embriões ampliou-se bastante nos anos noventa (FONSECA et al., 2001).

O melhor aproveitamento dos folículos que se tornariam atrésicos pode ser obtido por meio da SOV. Portanto, a SOV pode ser definida como um método de estimular diversos folículos terciários a se desenvolverem até o estágio de pré-ovulação, com subseqüente ovulação (REICHENBACH et al., 2002).

Para o melhoramento zootécnico a técnica de TE é um importante instrumento, pois acelera e confere maior precisão no processo de seleção animal (REICHENBACH et al., 2002). Entretanto, a grande variação individual à resposta aos tratamentos superovulatórios continua sendo um fator limitante da SOV. Sendo assim, nosso grupo vem testando diversos protocolos em busca de minimizar essa variação de respostas e melhorar a eficiência da técnica.

Com o objetivo de avaliar a resposta superovulatória (número de CL, de embriões recuperados e qualidade embrionária) de novilhas holandesas tratadas com eCG no final do protocolo de superovulação com FSH, nosso grupo conduziu um experimento realizado em duas fases (intervalo de 30 a 40 dias). Foram utilizadas 36 doadoras em delineamento *cross over*. As novilhas foram alocadas em dois grupos experimentais de acordo com o recebimento ou não de eCG. As novilhas do grupo FSH (n=35) receberam pela manhã um implante auricular de norgestomet (Crestar®, Intervet, Brasil) em dia aleatório do ciclo estral (D0) + 2mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®, Intervet, Brasil) + 50 mg de progesterona (Index, Brasil) i.m.. A partir do D4 cada animal recebeu 250 UI de FSH (Pluset®, Hertape Calier, Brasil) diluídas em 20 ml e fracionadas em oito aplicações em doses decrescentes (4 ml, 4 ml, 3 ml, 3 ml, 2 ml, 2 ml, 1 ml e 1 ml), com intervalo de 12h. No D6, foi administrado 0,150 mg de D-cloprostenol sódico (Preloban®, Intervet, Brasil) pela manhã e pela tarde, e no D7 a tarde o implante foi retirado. No D8, pela manhã, 200µg de Gonadorelina (Fertagyl®, Intervet, Brasil) i.m. foram administrados. As inseminações artificiais foram realizadas em tempo fixo nos D8 a tarde e D9 de manhã. A colheita de embriões ocorreu no D15. As novilhas do grupo eCG (n=37) receberam o mesmo tratamento com substituição das duas últimas aplicações de FSH por duas aplicações de 200 UI de eCG (Folligon®, Intervet, Brasil) com intervalo de 12h. Previamente às colheitas, o número de CL formados foi registrado. O tratamento com eCG não influenciou o número de CL formados (7,76 ± 0,76 vs 6,59 ± 0,72; P = 0,10), o número total de embriões recuperados (5,54 ± 0,79 vs 5,60 ± 1,21; P = 0,92), o número de oócitos não fertilizados (0,78 ± 0,21 vs 0,51 ± 0,17 (P = 0,16), o número de embriões viáveis (5,00 ± 0,74 vs 4,94 ± 1,13. P = 0,91), a qualidade embrionária [Grau I: 1,43 ± 0,36 vs 1,23 ± 0,40 (P = 0,46); Grau II: 2,68 ± 0,46 vs 2,51 ± 0,59 (P = 0,67); Grau III: 0,89 ± 0,21 vs 1,20 ± 0,31 (P = 0,21)] e o número de embriões congeláveis (3,19 ± 0,75 vs 3,74 ± 1,11; P = 0,21) por doadora (média ± EP); tratamentos com e sem eCG, respectivamente. Pode-se concluir que a substituição das duas últimas doses de FSH por duas doses de 200UI de eCG para SOV de novilhas Holandesas não alterou a resposta ao protocolo.

Além desse experimento nosso grupo avaliou a resposta superovulatória (número de CL, de estruturas recuperados e embriões transferíveis e congeláveis) de vacas Holandesas em lactação submetidas ao protocolo de SOV. Foram utilizadas 40

doadoras, alocadas em quatro grupos experimentais de acordo com o recebimento de 1 ou 2 crestar e atraso (24h) ou não (12h) do indutor de ovulação. As vacas do grupo 1 (n=10) receberam pela manhã um implante auricular de norgestomet (Crestar®, Intervet, Brasil) em dia aleatório do ciclo estral (D0) + 2mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®, Intervet, Brasil) + 50 mg de progesterona (Index, Brasil) i.m.. A partir do D4 cada animal recebeu 500 UI de FSH (Pluset®, Hertape Calier, Brasil) diluídas em 20 ml e fracionadas em 8 aplicações em doses decrescentes (4 ml, 4 ml, 3 ml, 3 ml, 2 ml, 2 ml, 1 ml e 1 ml), com intervalo de 12h. No D6, foi administrado 0,150 mg de D-cloprostenol sódico (Preloban®, Intervet, Brasil) de manhã e de tarde e no D7 de tarde o implante foi retirado. No D8 pela manhã 200µg de Gonadorelina (Fertagyl®, Intervet, Brasil) i.m. foram administrados. As inseminações artificiais foram realizadas em tempo fixo nos D8 de tarde e D9 de manhã e coleta de embriões no D15. As vacas do grupo 2 (n=10) receberam o mesmo tratamento até o momento da retirada do implante. A Gonadorelina foi administrada 24h após a retirada do implante, as inseminações artificiais realizadas no D9 pela manhã e tarde e coleta de embriões no D15. Os animais do grupo 3 (n=10) e 4 (n=10) receberam os mesmos tratamentos do grupo 1 e 2, respectivamente, excetuando que os grupos 3 e 4 receberam 2 implantes de norgestomet. Previamente às coletas, o número de CLs e folículos formados foi registrado. Não houve diferença entre os quatro grupos experimentais com relação à número de CL, total de estruturas coletas, embriões transferíveis e congeláveis. Entretanto, o número de folículos observados no D15 variou estatísticamente entre os tratamentos [grupo1 ($2,8\pm0,55^{bc}$); grupo2 ($2,3\pm0,47^{b}$); grupo3 ($4,2\pm0,76^{c}$); grupo4 ($1,1\pm0,31^{a}$)]. Observou-se diferença estatística no número de embriões congeláveis (1,5±0,52 vs 2,95±1,04; P<0,05) e transferíveis (3,05±0,89 vs 3,8±1,22; P<0,05) entre os grupos com 1 (grupo 1 e 2) e 2 (grupo 3 e 4) implantes, respectivamente. Entre os animais dos grupos com (24h) e sem (12h) atraso do indutor, verificou-se diferença estatística entre o número de folículos (3,5±0,48 vs 1,7±0,31; P<0,05), de embriões congeláveis (1,6±0,55 vs 2,85±1,03; P<0,05) e transferíveis (2,7±0,78 vs 4,15±1,27; P<0,05). Pode-se concluir que a substituição de um implante de norgestomet por dois e atraso no indutor de ovulação para 24h após a retirada do implante aumentou o número de embriões transferíveis e congeláveis em vacas holandesas em lactação submetidas ao protocolo de SOV.

- Ovum pick up / fecundação *in vitro* (OPU-FIV)

Além da produção de leite, hoje a Fazenda Santa Rita possui um novo foco. Iniciado em 2010, a fazenda desenvolve o Leilão Anual de bezerras (até um ano de idade) produzidas através de FIV e uma pequena parcela através da TE convencional com sêmen sexado. Frente a esse novo projeto, as técnicas de produção de embriões (FIV e SOV) estão sendo cada vez mais intensificadas no rebanho. São ferramentas que aumentam significativamente o número de bezerras produzidas durante um mesmo período, fruto do acasalamento entre indivíduos superiores.

Visto a importância da técnica, nosso grupo de pesquisa avaliou a resposta à OPU e à PIV de diferentes categorias de vacas Holandesas [novilhas (N), vacas de alta produção em pico de lactação (PL) e repetidoras de serviço (RS)] submetidas ou não ao estresse térmico decorrente do verão. A emergência de onda folicular de todos os animais foi sincronizada e as sessões de OPU foram realizadas pelo mesmo veterinário. A freqüência respiratória e a temperatura retal e cutânea foram aferidas no momento do início da sincronização (cinco dias antes da OPU). Parte dos oócitos recuperados na OPU foi enviada para a PIV e o restante foi desnudado e mantido a -80ºC. Sêmen de uma única partida do mesmo touro Holandês previamente testado foi

utilizado em todas as rotinas de PIV. No oitavo dia de cultivo embrionário, embriões com zona pelúcida intacta passaram por quantificação do total de células e avaliação de fragmentação nuclear pela técnica de TUNEL.

Novilhas e vacas apresentaram freqüência respiratória semelhante durante o período mais ameno, porém, a freqüência respiratória das vacas aumentou durante o estresse térmico. Com relação à temperatura retal, novilhas mantiveram-se constantes durante o verão e o inverno, porém, vacas PL e RS apresentaram aumento desta temperatura durante o estresse térmico do verão. Novilhas e vacas apresentaram semelhante número de oócitos totais e viáveis recuperados na OPU durante o inverno (Tabela 2). Contudo, durante o estresse térmico estes números apresentaram-se reduzidos apenas em vacas. À PIV, a taxa de clivagem foi similar entre as categorias (N = 51%, PL = 37,5%, RS = 41,6%; P = 0,18) e períodos (inverno = 42,3%, verão = 45,8%; P = 0,45). Porém, a taxa de blastocisto foi afetada tanto pela categoria quanto pelo período. A taxa de blastocistos eclodidos e número de células do blastocisto (Dia 8) foram maiores durante o inverno (23%, 60/261 e 231 ± 7) do que no verão (6,5%, 7/107; P = 0,03 e 253 ± 12; P < 0,01). Além disso, o número total de células dos blastocistos foi maior em novilhas (253 ± 12) do que em PL (203 ± 10) e vacas RS (207 ± 8; P < 0,01). A taxa de fragmentação nuclear do blastocisto foi maior e o número de cópias de DNA mitocondrial (mtDNA) foi menor em vacas RS durante o verão, evidenciando uma diminuição da qualidade oocitária (Chiaratti et al., 2010).

Tabela 2. Número total de oócitos e oócitos viáveis recuperados por OPU de fêmeas Holandesas de diferentes categorias (novilhas, vacas de alta produção em pico de lactação e repetidoras de serviço) durante o inverno e o verão (adaptado de Ferreira et al., 2010).

	Categoria					
	Novilha		Pico de lactação		*Repeat breeder*	
	Total	Viáveis	Total	Viáveis	Total	Viáveis
Inverno	12,51 ± 1,17 (n=34)	8,43 ± 0,93 (n=34)	10,86 ± 0,75^{a} (n=32)	8,00 ± 0,63^{x} (n=32)	15,14 ± 1,29^{a} (n=31)	12,87 ± 1,22^{x} (n=31)
Verão	11,82 ± 0.91^{A} (n=36)	9,36 ± 0,81^{X} (n=36)	6,30 ± 0,51^{bB} (n=37)	4,32 ± 0,41^{yY} (n=37)	6,51 ± 0,56^{bB} (n=36)	5,15 ± 0,50^{yY} (n=36)

Categoria*Estação: P<0,0001

Para TOTAL DE OÓCITOS
Na mesma coluna - a ≠ b, P<0.000
Na mesma linha - A ≠ B, P<0.0001

Para OÓCITOS VIÁVEIS
Na mesma coluna - x ≠ y, P<0.0001
Na mesma linha - X ≠ Y, P<0.0001

- Transferência de embriões em tempo fixo (TETF)

O sucesso dos programas de transferência de embriões depende da disponibilidade de receptoras aptas à inovulação, além do aprimoramento e da associação de técnicas de produção de embriões (Bousquet et al., 1999).
A detecção de estro tem sido um fator limitante para o sucesso dos programas de TE em virtude de sua curta duração (Bó *et al.*, 2003; Baruselli *et al.*, 2006). Dessa maneira, os programas de TETF minimizam os efeitos do estresse térmico na observação de cio e aumentam a utilização das receptoras (Reichenbach et al., 2002).
Nosso grupo de pesquisa conduziu um estudo visando avaliar a taxa de aproveitamento (TA), taxa de prenhez (TP) e perda gestacional (PG) em vacas holandesas de alta produção sincronizadas para TETF utilizando protocolos com diferentes indutores de ovulação (Estradiol ou GnRH), associados ou não a eCG no verão e no inverno. Foram utilizadas 784 vacas alocadas em um de quatro grupos experimentais em cada estação do ano de acordo com o recebimento ou não de E2 e eCG. Vacas do grupo E2 receberam um implante auricular de norgestomet (Crestar®, Intervet, Brasil) em dia aleatório do ciclo estral (D0) e 2mg de benzoato de E2 (Gonadiol®, Intervet, Brasil) i.m.; No D8 o implante foi retirado e administrou-se 0,150mg de D-Cloprostenol Sódico (Preloban®, Intervet, Brasil) e 1,0mg de cipionato de E2 (E.C.P®, Pfizer, Brasil); a TETF ocorreu no D17. Vacas do grupo E2+eCG receberam o mesmo tratamento do grupo anterior, porém com a adição de 400UI de eCG (Folligon®, Intervet, Brasil) no dia da retirada do implante (D8). Nos grupos GnRH e GnRH+eCG o E2 do D0 foi substituído por 100µg de Gonadorelina (Fertagyl®, Intervet, Brasil) i.m., o implante foi removido no D7 e o E.C.P®, substituído por 100µg de Gonadorelina i.m. administrada no D9. A TETF foi realizada no D16.

Tabela 3. Taxas de aproveitamento e prenhez aos 25 e 42 dias de gestação e perda gestacional de vacas Holandesas de alta produção submetidas a protocolos de TETF com diferentes indutores de emergência de onda folicular e ovulação (estradiol ou GnRH). Adaptado de Rodrigues et al., 2010b.

	Verão		Inverno		Valor de P				
	Estradiol	GnRH	Estradiol	GnRH	Ind.	eCG	Est.	Ind. x Est.	Ind. x eCG
TA	53,0% (105/198)	69,7% (138/198)	59,9% (115/192)	66,3% (130/196)	<0,01	0,41	0,28	0,09	0,70
TC 25d	30,5% (32/105)[b]	36,2% (50/138)	42,7% (49/115)[ax]	30,8% (40/130)[y]	0,15	0,93	0,01	0,06	0,55
TP 25d	16,2% (32/198)[by]	25,6% (50/198)[x]	25,5% (49/192)[a]	20,4% (40/196)	0,01	0,74	<0,01	<0,01	0,35
TP42d	12,6% (25/198)[b]	16,7% (33/198)	19,8% (38/192)[a]	13,3% (26/196)	0,09	0,84	0,01	0,01	0,30
PG	21,9% (7/32)	20,7% (17/50)	22,5% (11/49)	35,0% (14/40)	0,06	0,43	0,55	0,91	0,21
P4 D7 (ng/mL)	3,53 ± 0,58	3,83 ± 0,41	2,39 ± 0,25	2,99 ± 0,16	0,06	0,40	<0,01	0,56	0,98

Tabela 4. Taxas de aproveitamento, concepção e prenhez aos 25 e 42 dias de gestação e perda gestacional de vacas Holandesas de alta produção submetidas a protocolos de TETF com ou sem a adição de eCG (400 UI). Adaptado de Rodrigues et al., 2010b.

	eCG		Valor de P			
	Sem eCG	Com eCG	indutor	eCG	Estação	Ind x eCG
Taxa de aproveitamento	65,5 % (256/391)	59,0 % (232/393)	>0,01	0,05	0,09	0,81
Taxa de concepção 25 dias	36,3 % (93/256)	33,6 % (78/232)	0,18	0,45	<0,01	0,55
Taxa de prenhez 25 dias	23,8 % (93/391)	19,9 % (78/393)	0,01	0,15	<0,01	0,35
Taxa de prenhez 42 dias	16,6 % (65/391)	14,5 % (57/393)	0,22	0,47	0,04	0,52
Perda gestacional	30,1 % (28/93)	26,9 % (21/78)	0,06	0,43	0,55	0,21

De acordo com a análise dos dados, não houve interação entre eCG e tratamento com E2 ou GnRH para nenhuma das variáveis analisadas, nem entre E2/GnRH e estação do ano para TA, PG e P4 no D7. O uso de eCG não influenciou a taxa de aproveitamento, taxa de concepção aos 25d, taxa de prenhez aos 25d e aos 42d, perda gestacional e P4 (Tabela 4). No entanto, houve interação entre E2/GnRH e estação para TC25, TP25, TP42 (Tabela 3). A TA foi maior no grupo GnRH (68,0%; 268/394) do que no E2 (56,4%; 220/390; P<0,01), assim como a PG [GnRH=34,4% (31/90) e E2=22,2% (18/81); P=0,06)]. Com base nos resultados podemos concluir que a adição de 400UI de eCG ao protocolo de TETF de vacas Holandesas de alta produção não influenciou as taxas reprodutivas avaliadas. Os tratamentos com E2 e GnRH se assemelharam em TP25 durante o inverno, mas no verão essa taxa foi reduzida (P< 0,01) quando o E2 foi usado como indutor (E2=16,2%; 32/198 vs GnRH= 25,6% ; 50/198).

- Mortalidade embrionária

A mortalidade embrionária é uma causa reconhecida de falha reprodutiva em bovinos e é responsável por grandes perdas econômicas. A mortalidade embrionária precoce ocorre no período de manutenção do corpo lúteo, entre 15 e 17 dias após a ovulação, e a tardia se estende até a fase de diferenciação, aos 42 dias de prenhez (Santos et al., 2004). Segundo Grunert (2005) os fatores maternos, externos e ligados ao próprio embrião são responsáveis por essas perdas.
Analisamos, em estudo retrospectivo, a perda gestacional (entre 30 e 60 dias) de 5040 vacas holandesas submetidas à IA e 2109 submetidas à TE no período de 2004 a 2008 em diferentes épocas do ano. Os animais foram inseminados artificialmente 12h após a observação de estro (OE) ou inovulados seis a oito dias após OE. Os embriões utilizados foram produzidos *in vivo* pela técnica de SOV e transferidos a fresco ou pós congelação-descongelação em receptoras com presença de CL. Todas as doadoras de embriões eram vacas holandesas de alta produção do próprio rebanho. O diagnóstico de prenhez foi realizado por exames ultrassonográficos aos 30 e 60 dias de gestação.

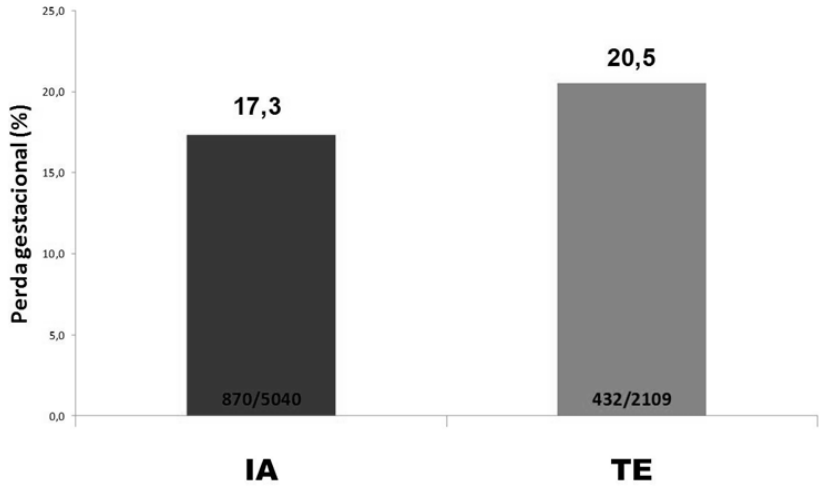


Figura 1. Perda embrionária de acordo com a biotecnologia empregada (Adaptado de Freitas et al. 2010).

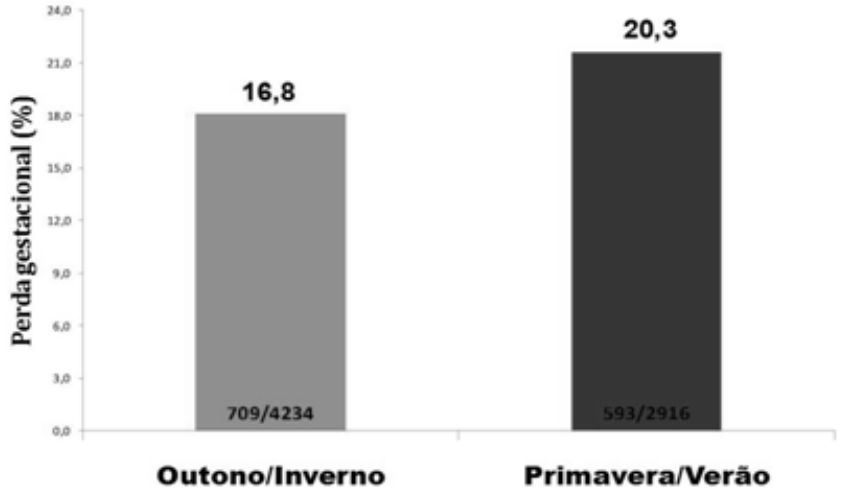


Figura 2. Perda embrionária com relação à estação do ano (Adaptado de Freitas et al. 2010).

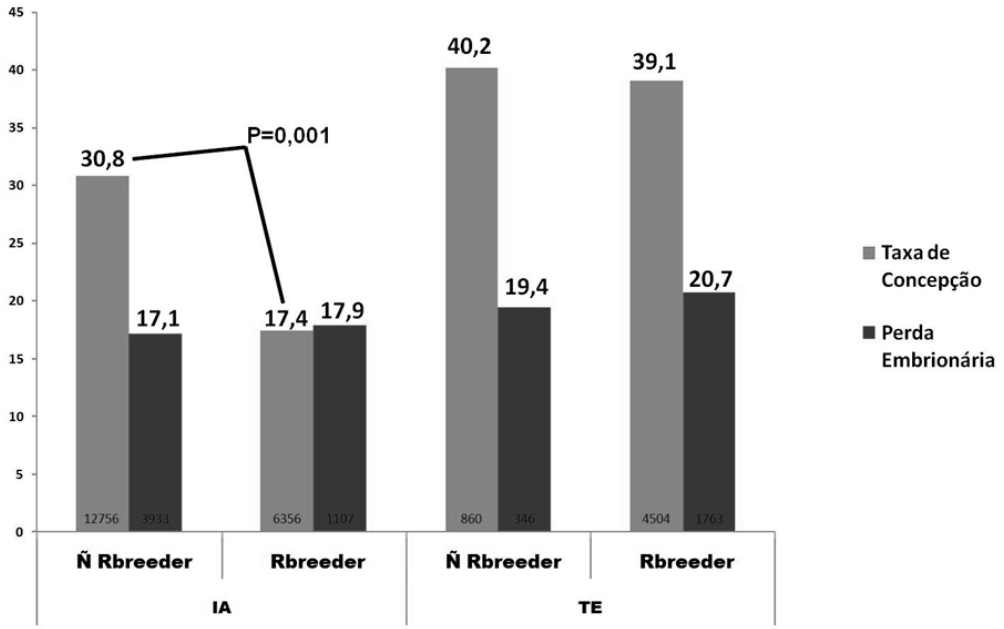


Figura 3. Taxa de concepção e perda embrionária em vacas de leite de alta produção com < 4 (não repeat breeders) ou ≥ 4 serviços (repeat breeders), submetidas à IA ou TE (Adaptado de Freitas et al. 2010).

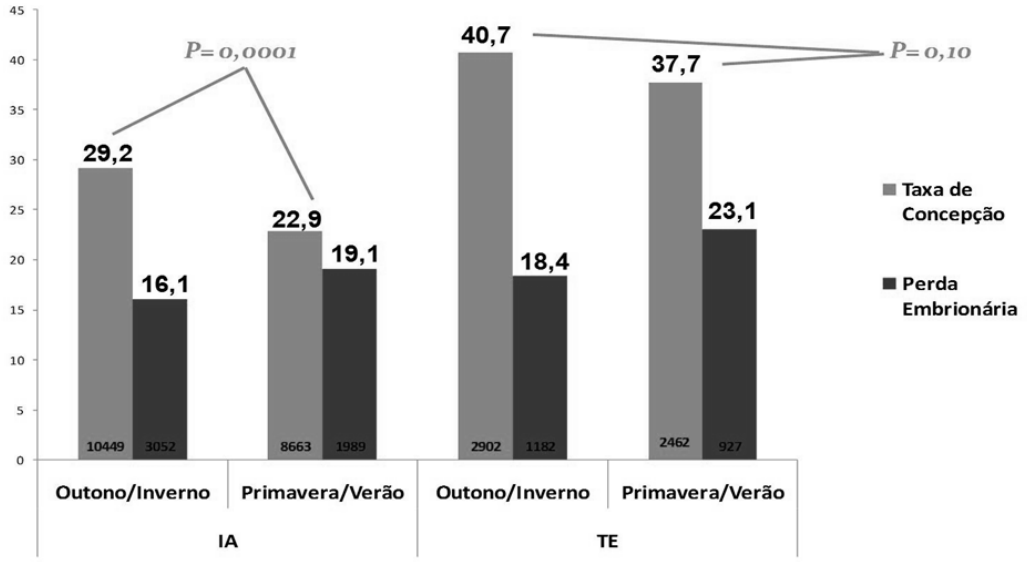


Figura 4. Taxa de concepção e mortalidade embrionária em vacas de leite de alta produção submetidas à IA ou TE na primavera/verão ou no outono/inverno (Adaptado de Freitas et al. 2010).

Não houve interação (P= 0,55) entre o tipo de biotecnologia utilizada (IA e TE) e estação do ano (verão e inverno). Porém, verificou-se que as vacas holandesas submetidas a TE (20,5%; 432/2109) apresentam maior perda embrionária (P = 0,001) que aquelas submetidas a IA (17,3%; 870/5040) (Figura 1). Além disso, os animais submetidos a IA ou TE nas estações primavera/verão apresentaram maior perda embrionária que outono/inverno [20,3% (593/2916) vs 16,8% (709/4234); P= 0,002] (Figura 2). Não houve diferença estatística (P=0,62 para IA e P=0,55 para TE) entre

vacas repeat breeder (≥ 4 serviços) e vacas com menos de 4 serviços, quanto à perda embrionária [IA - 17,9% (198/1107) para repeat breeders e 17,1% (671/3933) para menos de 4 serviços; TE - 20,7% (365/1763) para repeat breeders e 19,4% (67/346) para menos de 4 serviços].

Concluindo, a perda embrionária tardia é maior em vacas que foram inovuladas seis a oito dias após a detecção de estro. Além disso, observou-se maior perda embrionária nos meses mais quentes e úmidos do ano (verão). Entretanto, vacas repeat breeder apresentam perdas embrionárias semelhantes às vacas não repeat breeder após a IA ou TE.

Nosso grupo de pesquisa avaliou em outro estudo retrospectivo os dados de 2096 TE no período de 2004 a 2008. Os embriões foram transferidos, frescos ou congelados, em receptoras holandesas repeat breeders no período de seis a oito dias após o estro, em sincronia com as doadoras (D-1, Do ou D1). Foram avaliadas as seguintes variáveis: sincronia entre a doadora e a receptora, embriões frescos ou congelados, estágio de desenvolvimento embrionário, e qualidade do embrião. O diagnóstico de prenhez foi realizado por ultrassonografia aos 23 e 53 dias após a inovulação, ou seja, 30 e 60 dias de gestação.

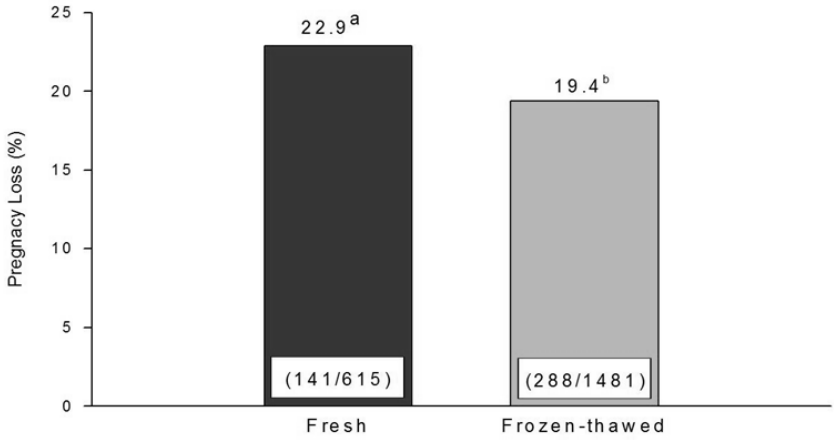


Figura 5. Perdas embrionárias de embriões transferidos a fresco ou congelados em receptoras da raça Holandesa (Adaptado de Rodrigues et al. 2010a).

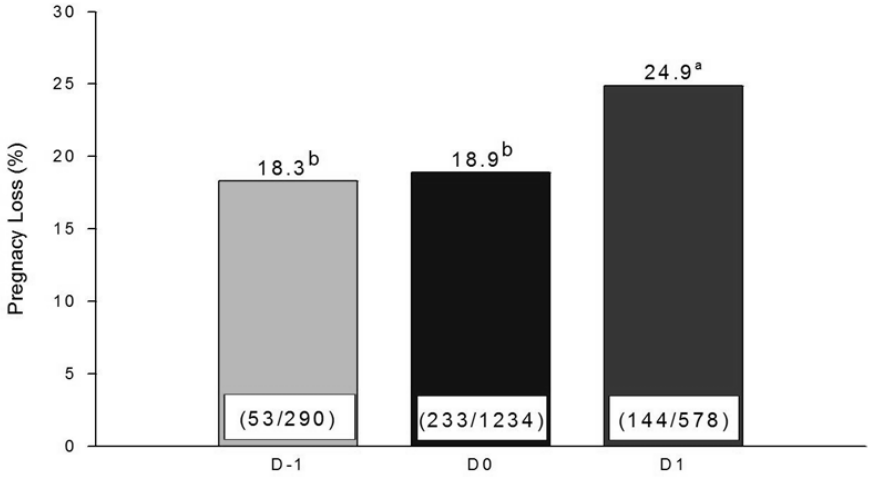


Figura 6. Perda embrionária de acordo com a sincronia doadora-receptora da raça Holandesa (Adaptado de Rodrigues et al. 2010a).

De acordo com as análises feitas, não houve efeito de ano. A perda gestacional foi maior (P=0,005) em embriões frescos (22,9%[a]; 141/615) que em congelados (19,4%[b]; 288/1481) (Figura 5). A perda gestacional também foi influenciada (P=0,002) pela sincronia entre receptora e doadora [D-1: 18,3%[b] (53/290); D0: 18,9%[b] (233/1234); D1: 24,9%[a] (144/578)] (Figura 6). No entanto, não houve diferença quando foram comparados os estágios de desenvolvimento embrionário [Mórula: 20,7 % (295/1428); Blastocisto inicial: 18,9 % (67/355); Blastocisto: 23,0 % (59/256); Blastocisto expandido: 14.0 % (8/57; P=0.31)] e qualidade do embrião [grau 1: 17,6 % (78/443); grau 2: 20,1% (216/1073); grau 3: 23,3% (135/580); P=0,31].
Pudemos concluir, portanto, que as perdas gestacionais em receptoras holandesas de alta produção repeat breeders foram maiores com embriões transferidos frescos e em receptoras em sincronia D1 com as doadoras.

REFERÊNCIAS

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;82:2611–6.

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.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestagen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science,** v. 39, p. 193–204, 1995a.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of fillicula development in Bos inducus cattle. **Animal Reproduction Science**. 2003; 307-26.

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,** Stoneham, v.51, n.1, p.59-70, jan. 1999.

CHIARATTI M.R. & MEIRELLES F.V. 2010. Mitochondrial DNA copy number, a marker of viability for oocytes. **Biology of Reproduction**. In press.

CHIARATTI M.R., BRESSAN F.F., FERREIRA C.R., CAETANO A.R., SMITH L.C., VERCESI A.E. & MEIRELLES F.V. 2010. Embryo mitochondrial DNA depletion is reversed during early embryogenesis in cattle. **Biology of Reproduction**. 82(1): 76-85.

DE LA SOTA RL, LUCY MC, STAPLES CR, THATCHER WW. Effects of recombinant bovine somatotrophin (sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. **J Dairy Sci** 1993;76:1002–13.

DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - a review. **Theriogenology**, v. 60, p. 1139-1151, 2003.

DRANSFIELD, M. G. B.; NEBEL, R. L.; PEARSON, R. E.; WARNICK, L. D. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. **Journal of Dairy Science,** v. 81, p. 1874–1882, 1998.

FERREIRA R.M., AYRES H., FERRAZ M.L., ARAÚJO A.B., CHIARATTI M.R., SÁ FILHO M.F., RODRIGUES C.A., WATANABE Y.F., VIREQUE A.A., JOAQUIM D.C., MEIRELLES F.V. & BARUSELLI P.S. 2010. Reduced oocyte mitochondrial DNA may compromise in vitro embryo production of repeat-breeder Holstein cows during summer heat stress. In: **Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society** (Porto de Galinhas, Brazil). In press.

FONSECA, J.F.; SILVA FILHO, J.M.; PINTO NETO, A.; PALHARES, M.S.Superovulated zebu cows embryonic developmental stages. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Dec. 2001, vol. 53, nº 6, p. 671-676. ISSN 0102- 0935

FREITAS, B.G.; RODRIGUES, C.A.; TEIXEIRA, A.A.; FERREIRA, R.M.; RANIERI, A.L.; AYRES, H.; SALES, J.N.S.; BARUSELLI, P.S. Perda gestacional (entre 30 e 60 dias) à inseminação artificial e à transferência de embriões em vacas holandesas de alta produção. In: **XXIV Reunião anual da sociedade brasileira de tecnologia de embriões**, Porto de Galinhas, PE. 2010

GRÖHN YT, RAJALA-SCHULTZ PJ. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. **Anim Reprod Sci** 2000;60/61:605–14.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H.; VALE, W. G.; JUNIOR, H.B. **Patologia e clínica da reprodução dos animais domésticos** – ginecologia. 1. Ed. São Paulo: Varela, 2005. P. 468-470.

LOPEZ-GATIUS, F. Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study northeastern Spain. **Theriogenology,** v. 60, p. 89-99, 2003**.**

LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science,** v. 81, p. 209-223, 2004.

LUCY MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **J Dairy Sci** 2001;84:1277–93.

NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, J.F.C.; MACIEL, M.N.. EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM GADO LETEIRO. IN: GALINA, C.; PIMENTEL, C.A.; NEVES, J.P.; MORAES, J.C.F.; HENKES, L.E.; GONÇALVES, P.B.; WEINER, T. **Avanços na reprodução bovina,** 2000**,** 1ªed. Pelotas, Ed. Universitária, 2000 p.35-37.

ODDE, K. G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, n. 3, p. 817-830, 1990.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915–923, 1995.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: Gonsalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal,** 1ªed. São Paulo, Ed. Varela, 2002 p.153-160.

RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TEIXEIRA, A. A.; MANCILHA, R. F.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P.S. Taxa de concepção à inseminação artificial e à transferência de embriões em vacas holandesas de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae,** v. 35, p. 1254, 2007.

RODRIGUES, C.A.; TEIXEIRA, A.A.; FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; RANIERI, A.L.; FREITAS, B.G.; BARUSELLI, P.S.Pregnancy loss (between 30 and 60 days) in high producing repeat breeder holstein cows submitted to embryo transfer. In: **36th Annual Conference of the International Embryo Transfer Society / 23rd Annual Meeting Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões,** Cordoba, Argentina. 2010a.

RODRIGUES, C.A.; RANIERI, A.L.; TEIXEIRA, A.A.; VIEIRA, L.M.; FERREIRA, R.M.;' AYRES, H.; BARUSELLI, P.S. Eficiência Reprodutiva de receptoras Holandesas de alta produção sincronizadas para TETF com protocolos com ou sem estradiol e/ou eCG. In: **XXIV Reunião anual da sociedade brasileira de tecnologia de embriões**, Porto de Galinhas, PE. 2010b.

SANTOS, J. E. P.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C.; CERRI, R. L. A.; GALVÃO, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science,** v. 82-83 (special issue), p. 513-535, 2004

TEIXEIRA, A.A. Impacto da inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de leite de alta produção. 2010. 69 f. **Dissertação** (Mestrado em reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2010.

WOLFENSON, D.; ROTH, Z.; MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 535-547, 2006.

NUEVOS TRATAMIENTOS PARA DISMINUIR LA MORTALIDAD EMBRIONARIA EN VACAS DE CARNE Y LECHE

Lucas E. Cutaia

Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC) Córdoba, Argentina,
lcutaia@iracbiogen.com.ar

INTRODUCCIÓN

La alta mortalidad embrionaria es la principal causa del intervalo entre los nacimientos, en el ganado bovino. La mayoría de las muertes ocurren durante el período embrionario de la gestación (<45 d) (Thatcher et al., 1994; Vanroose et al., 2000; Sreenan et al., 2001), y Según Wathes (1992), la mayoría de estas pérdidas embrionarias se producen en los primeros días después de la fecundación y durante la implantación del embrión.

La mortalidad embrionaria se refiere a las pérdidas que ocurren durante los primeros 45 días de gestación que coinciden con la finalización del periodo de implantación del embrión (Ayalon, 1978). Las pérdidas embrionarias a la vez pueden ser clasificadas en, mortalidad embrionaria, cuando ocurre dentro de los 25 días y mortalidad embrionaria tardía, entre los 25 y 45 días (Humbolt, 2002). Los términos muerte fetal o abortos se refieren a las pérdidas que ocurren entre los 45 y 260 días de gestación (Forar et al., 1996).

En los rodeos lecheros, la mortalidad embrionaria tardía en vacas en lactanción, se estimó en un 9.5 – 12.2% (Santos et al., 2004, Stevenson et al., 2003, Vasconcelos et al., 1997 Vasconcelos et al., 2006) en diferentes estudios donde se donde se evaluaron las pérdidas entre los 27 - 31 y los días 38 – 50 de gestación. Por otra parte, otros autores estimaron que en los mismo períodos las pérdidas fueron del 18.6 a 23.4% (Chebel et al., 2003, Fricke et al. 2003, Sartori, 2006). Las pérdidas fetales fueron estimadas en 10.7% entre los 38 y 90 días (López Gatius et al., 2002).

TRATAMIENTOS FARMACOLÓGICOS PARA DISMINUÍR LA MORTALIDAD EMBRIONARIA

Diversas estrategias terapéuticas han sido experimentadas en vacas lecheras con el fin de inducir cuerpos luteos accesorios, aumentar los niveles de progesterona y reducir el crecimiento folicular y los niveles de estrógeno durante los períodos embrionarios temprano y tardío. La inducción de la ovulación con un implante de un agonista de GnRH (Deslorelin, Peptech Animal Health, Australia) podría estimular la formación de un cuerpo luteo con mayor producción de progesterona. Un experimento realizado en Florida utilizó 450 y 750 ug de deslorelin para inducir la ovulación en vacas lecheras y lo comparó con protocolos de IATF que utilizaron GnRH natural (100 ug). Se evaluó la tasa de preñez a los 27 y a los 41 días post servicio y el implante de 750 ug redujo la tasa de preñez en comparación con el implante de 450 ug. Las tasa de preñez fueron de 40% a los 41 días tanto para el control como para el implante de 450 ug pero las pérdidas de preñez entre el día 27 y 41 tendieron a ser menores para el implante de 450 ug que para el control (5% vs. 12.7%; Thatcher et al., 2003).

Uno de los tratamientos mas comunes en investigación fue la aplicación de GnRH tanto a los 5,7, 11 o 15 días post servicio o una combinación de dos de estos días. En Florida

sobre vacas lecheras de alta producción se administró una dosis de GnRH (100 ug de gonadorelina) los días 5 y 15 post inseminación en un diseño 2x2 (Bartolome et al., 2005). Se utilizaron aproximadamente 800 animales y no se encontró un efecto beneficioso (un 4% de aumento en la preñez a los 55 días para el día 15 y un 3% para el día 5 que no fue significativo) pero la administración de ambos (día 5 y 15) redujo la tasa de preñez a los 55 días.

La administración de hCG debería tener mejor resultados debido a una más potente acción LH con una mayor efectividad en formar cuerpos lúteos accesorios y mayor estimulación de los mismos.

De hecho, la administración de hCG en día 5 post servicio incremento el numero de cuerpos luteos y la progesterona plasmática y las tasas de concepción al día 28, 45 y 90 y este aumento fue aun mas marcado en vacas que perdían condición corporal (Santos et al., 2001).

Un trabajo realizado recientemente en Florida (Bartolome et al., 2006) incluyó la administración de un implante de deslorelin (2.1 mg) en vacas detectadas preñadas el día 27 post inseminación con el fin de inducir la formación de cuerpos luteos accesorios y disminuir el crecimiento folicular. Si bien solo el 50% de las vacas formaron cuerpos luteos accesorios, las que lo hicieron, tuvieron una menor

pérdida fetal entre los días 45 y 90 (0%) comparado con vacas que no formaron cuerpos luteos accesorios (16%). Este hallazgo concuerda con un trabajo donde 49 vacas que gestaban un solo feto pero tenían dos cuerpos luteos no experimentaron pérdidas de gestación entre los días 38 y 90 (Lopez-Gatius et al., 2002) y el hecho de que la presencia de un cuerpo luteo adicional redujo las posibilidades de perdidas de gestación especialmente en los meses de verano (Bech-Sabat et al., 2008). Además, la suplementación con progesterona por 28 días comenzando entre los días 36 y 42 de gestación redujo las pérdidas al día 90 (Lopez-Gatius et al., 2004).

En un trabajo reciente (Bech-Sabat et al., 2009) se administró un dispositivo PRID con 1,55 g de progesterona o una dosis de GnRH (100 ug, cystorelina) en vacas entre los 28-34 días de gestación y se midió el incremento de progesterona en un primer experimento (n=88) y pérdidas de gestación en otro (n=585). Las vacas tratadas con PRID y con dos cuerpos luteos incrementaron progesterona al Día 56-62 de gestación. Solo el 17,7% de las vacas tratadas con GnRH formaron un nuevo cuerpo luteo y vacas con preñez simple se beneficiaron con el PRID (13.7 vs. 7.5% de pérdidas) y las vacas con mellizos se beneficiaron con la aplicación de GnRH (16,3 vs. 6,1% de pérdidas).

La administración de somatotrofina bovina (bST) en vacas lecheras de alta producción tendría un efecto negativo en la reproducción debido a que disminuye la expresión de celo, si embargo estimularía el desarrollo del embrión y aumentaría las tasas de concepción (Thatcher et al., 2003). La bST incrementa la expresión de proteínas tales como IGF-II y IGFBP-3 y del RNA mensajero para la

hormona de crecimiento en el endometrio, como así también disminuye la estimulación sobre la liberación de prostaglandina y esto podría beneficiar la implantación del embrión. Este efecto se ha observado en vacas lecheras en lactación las cuales serian deficientes en hormona de crecimiento pero no así en vacas secas donde la administración de bST tuvo un efecto negativo sobre la concepción (Bilby, Thatcher et al., 2005).

Otra de las estrategias para aumentar la sobrevida del embrión y disminuir la mortalidad embrionaria podría ser las administración de grasas by-pass conteniendo ácidos grasos no saturados (Thatcher et al., 2006). La administración de grasas enriquecidas con ácidos grasos no saturados específicos (ácidos grasos omega-3 tales como EPA, DHA y acido linolenico) durante el período pre y postparto mejoró la salud

posparto, la producción de leche, la calidad de los embriones y el porcentaje de preñez (Thatcher et al., 2006).

eCG COMO ESTRATEGIA PARA MINIMIZAR LAS PÉRDIDAS EMBRIONARIAS

La Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) es una glicoporteína compleja con actividad FSH y LH. Tiene una vida media aproximadamente de 40 horas en la vaca y persiste por más de 10 días en la circulación sanguínea (Murphy y Martinuk, 1991). La eCG estimula el crecimiento folicular a través de su acción de FSH y LH, aumenta el tamaño del folículo, también incrementan las concentraciones plasmáticas de progesterona, mejorando así el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la preñez (Barucelli et al, 2004). También la eCG puede mejorar las tasas de preñez en vacas de carne con cría al pie y con mala condición corporal (Roche et al,. 1992). Por su parte Kastelic, 1999, dice que no podrá ser eficaz la eCG en las vacas con buena condición corporal.
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 con cría al pie tratadas durante el anestro posparto (Baruselli et al., 2004; Bó et al., 2007).
Un experimento realizado 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 cuerpo lúteo (CL) más competente. Esto, a su vez, puede producir un incremento en la tasa de preñez (Souza et al., 2006). La eCG, hace un CL accesorio (Thatcher, 2002). La progesterona circulante se aumentó en la fase luteal posterior al tratamiento con eCG, cuando se inyectó antes de la ovulación (Murphy, 1991).
En consecuencia, generar alternativas que permitan perfeccionar las estrategias para aumentar la progesterona circulante a través de la inyección de eCG, después de la ovulación podrían mejorar la supervivencia de embriones en protocolos de Inseminación a Tiempo Fijo (IATF).
Recientemente fueron publicados una seria de estudios (Bartolomé 2009) en los cuales se evaluó el efecto de la colocación una dosis de 400 UI de eCG (Novormón) 22 días luego de realizada la IA en vacas lecheras. Se realizó el experimento en 4 réplicas en establecimientos diferentes y se evaluó el porcentaje de preñez logrado a los 29 por medio de US. En la Tabla 1 puede observarse que se encontró una interacción réplica x tratamiento. En algunos establecimientos el uso de eCG posterior a la IA mejoró significativamente los porcentajes de preñez.

Tabla 1. Efecto del tratameinto con 400 UI de eCG 22 pos IA sobre los porcentajes de preñez y mortalidad embrionaria.

Réplica x Tratamiento

		US Día 29	**US Día 45**
1	Control	26,5 % (17/64)	20,3% (13/64)
	eCG	50% (31/62)	48,4% (30/62)
2	Control	55% (11/20)	45,0% (9/20)
	eCG	50% (9/18)	38,9% (7/18)
3	Control	40,3% (29/72)	27,8% (20/72)
	eCG	39,0% (25/64)	34,4$ (22/64)
4	Control	39,1% (18/46)	34,8% (16/46)
	eCG	47,7% (21/44)	43,2% (19/44)

eCG*Rep (P<0,05)

También puede observarse en estos resultados un efecto de la disminución de la mortalidad embrionaria luego del día 29, ya que en algunas de las réplicas el porcentaje de preñez disminuyó mas en el grupo control que en el eCG a los 45 días.
En otro Experimento (Vilches, comunicación personal) se evaluó el uso de 400 UI de eCG pero en este caso aplicadas a los 14 dias pos IATF. Todas las vacas fueron tratadas con un protocolo convencional de IATF y fueron divididas para recibir o no eCG en el día 14 pos IATF.
En la tabla 2 puede observarse que se obtuvo un mayor porcentaje de preñez en el diagnostico del día 33 como así también que los porcentajes de muerte embrionaria fueron mayores en las vacas del grupo control que en el grupo eCG al día 75.

Tabla 2. Porcentaje de preñez en vacas de leche tratadas con 400 UI de eGC 14 días pos IATF.

	TP Día 33		TP Día 75		Pérdidas 33-75	
	%	N	%	N	%	N
Control	28.7	29/101	23.8	24/101	17.2	5/29
eCG	38.7	36/93	37.6	35/93	2.7	1/36

USO DE eCG POS IATF EN VACAS DE CARNE.

Se diseñó un experimento con el objetivo de evaluar el efecto de la aplicación de una dosis de 400 UI de eCG (Novormon, Syntex SA, Argentina) 14 días después de la IATF sobre los porcentajes de preñez en vacas Cebú x Bonsmara con cría al pie, inseminadas a tiempo fijo (IATF). Un objetivo secundario fue evaluar el efecto de la utilización de benzoato de estradiol (EB) o de GnRH como inductor de ovulación. Se utilizaron 260 vacas de segundo servicio, entre 60 y 120 días pos parto (DPP) y con una condición corporal de entre 2,0 y 2,5. El día de inicio del tratamiento (Día 0), se palparon las vacas y se determinó un porcentaje de ciclicidad del 11%.
Todos los animales recibieron en el Día 0 un dispositivo intravaginal con progesterona (DIB 0,5; 0,5g de progesterona, Syntex SA). En ese momento las vacas fueron divididas para recibir uno de tres tratamientos. Las vacas del Grupo E_2 recibieron 2 mg de EB y las vacas de los Grupos GnRH y ½ GnRH recibieron una dosis de 100 µg de Gonadorrelina (Gonasyn GDR, Syntex). En el Día 7 se retiraron los DIB a todas las vacas y se aplicó una dosis de 500 µg de cloprostenol (Ciclase DL, Syntex) junto con 400 UI de eCG (Novormon, Syntex) y las vacas del Grupo E_2 recibieron 0,5 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn, Syntex). Todas las vacas fueron IATF utilizando semen de uno de dos toros entre las 52 y 56 h pos retiro de los DIB.
Además, las vacas del Grupo GnRH recibieron una dosis de 100 µg de Gonadorrelina y las del Grupo ½ GnRH 50 µg de Gonadorrelina en el momento de la IATF. En el Día 14 pos IATF las vacas de los tres grupos fueron subdivididas en dos (3 x 2 factorial) para recibir o no una dosis de 400 UI de eCG. El diagnóstico de gestación se realizó a los 30 días pos IATF por ultrasonografía. Los datos fueron analizados por regresión logística, teniendo en cuenta el efecto de los grupos de tratamiento y semen utilizado. No se encontraron diferencias (P=0,16) entre los porcentajes de preñez de los Grupos E_2 (39/87; 43,7%), GnRH (38/92; 41,3%) y ½ GnRH (25/81; 30,9%).
Sin embargo se obtuvo un mayor porcentaje (P=0,02) de preñez en las vacas tratadas con eCG en el Día 14 pos IATF (60/127; 47,2%) versus el Grupo Control (41/133; 30,8%). Por otro lado, el Toro A (77/155; 47,1%) resultó en mayor preñez (P=0,009) que el Toro B (28/107; 26,2%). No se encontraron interacciones entre las variables analizadas (P>0,1).

Tabla 3. Efecto del tipo de inductor de ovulación utilizado y del tratamiento con eCG 14 días pos IATF en vacas de segundo servicio con cría al pie.

	eCG Día 14	**Control**	***TOTAL***
E_2	21/45 (46,7%)	17/42 (40,5%)	***39/87 (43,7%)***
GnRH	25/45 (55,6%)	13/47 (27,7%)	***38/92 (41,3%)***
1/2 GnRH	14/37 (37,8%)	11/44 (25,0%)	***25/81 (30,9%)***
TOTAL	***60/127 (47,2%)[a]***	***41/133 (30,8%)[b]***	

[ab]Superíndices con distinta letra difieren (P=0,02)

CONCLUSIONES

El uso de eCG posterior al servicio en vacas de carne y leche IA puede ser una alternativa interesante para disminuir la mortalidad embrionaria. Queda por determinar aún si el efecto positivo de eCG posterior al servicio se debe a un aumento de en los niveles de P4. En estos momentos se encuentran en marcha una seria de experimentos diseñados con ese objetivo. Asimismo se encuentran ejecución experimentos orientados a determinar el efecto del tratamiento en novillas y receptoras de embriones.

BIBLIOGRAFÍA

Ayelon N. 1978. A review o embryonic mortality in cattle. J Reprod Fert; 54:483-493.
Baruselli, P.S., Reis, E.L., Marques, M.O., Nasser, L.F., Bó, G.A. 2004.The use of treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. Anim Reprod Sci; 82-83, 479-486.

Bartolome JA, Melendez P, Kelbert D, Swift K, McHale J, Hernandez J, Silvestre F, Risco CA, Arteche ACM, Thatcher WW, Archbald LF. Strategic use of gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) to increase pregnancy rate and reduce pregnancy loss in lactating dairy cows subjected to synchronization of ovulation and timed insemination. Theriogenology 2005, 63: 1026-1037.

Bartolome JA, Kamimura S, Silvestre F, Arteche AC, Trigg T, Thatcher WW. The use of a deslorelin implant (GnRH agonist) during the late embryonic period to reduce pregnancy loss. Theriogenology 2006, 65:1443-1453

NM, Beckers JF. Factors affecting plasma progesterone in the early fetal period in high producing dairycows. Theriogenology 2008, 69: 426–432.

Bech-Sabat G, Lopez-Gatius F, , Garcıa-Ispierto I, Santolaria JP, Serrano B, Nogareda C, de Sousa.

NM, Beckers JF, Yaniz J. Pregnancy patterns during the early fetal period in high producing dairy cows treated with GnRH or progesterona. Theriogenology 2009, 71:920–929.
.
Bó, G.A., Cutaia, L., Peres, L.C., Pincinato, D., Maraña, D., Baruselli, P.S. 2007.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.

Bridges, P.J., Wright, D.J., Buford, W.I., Ahmad, N., Hernandez – Fonseca, H., McCormick, M.L., Schrick, F.N., Dailey, R.A., Lewis, P.E., Inskeep, E.K. 2000. Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows, J Anim Sci; 78:2942 – 2949.

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

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

Forar, A.L., Gay, J.M., Hancock, D.D., Gay, C.C. 1996. Fetal loss frequency in ten Holstein dairy herds. Theriogenology;45:1502-1513.

Garrett, G.E., Geisert, R.D., Zavy, M.T., Morgan, G.L. 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. J Reprod Fertil;84:437–446.

Geisert, R.D., Short, E.C., Morgan, G.L. 1994. Establishment of pregnancy in domestic species. In: Geisert, R.D., Zavy, M.T. (eds.) Embryonic mortality in domestic species. Florida: CRC Press; 23-53.

Humbolt, P. 2002. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. Theriogenology; 56:1417:1433.

Inskeep, E.K. 1995. Factors that affect fertility during oestrous cycles with short or normal luteal phases in postpartum cows. J Reprod Fertil Suppl; 49:493 - 503.

Kastelic, J.P., Olson, W,O., Martinez, M.A., Cook, R.B., Mapletoft, R.J. 1999.

Synchronization of estrous in beef cattle with norgestomet and estradiol valerate. J Can Vet; 40:173–178.

Lopez – Gatius, F., Santolaria, P., Yaniz, J.L., Rutllant, J., Lopez- Bejar, M. 2002. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90in lactating dairy cows from a single herd. Theriogenology; 57:1251-1261.

Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz JL, Hunter RHF. Progesterone supplementation during early fetal period reduces pregnancy loss in high-yielding dairy cattle. Theriogenology 2004;62:1529-1535.

Mann, G.E., Lamming, G.E., Robinson, R.S., Wathes, D.C. 1999. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. J Reprod Fertil; 317-328.

Mann, G.E., Fray, M.D., Lamming, G.E. 2006. Effects of time of progesterone supplementation on embryo development and interferon-τ production in the cow. Vet J;171:500–503.

Murphy, B.D., Martinuk, S.D. 1991. Equine chorionic gonadotropin. Endocr Rev;12:27–44.

Okuda, K., Miyamoto, Y., Skarzynski, D.J. 2002. Regulation of endometrial prostaglandin F(2alpha) synthesis during luteolysis and early pregnancy in cattle. Domest Anim Endocrinol; 23: 255-264.

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. Relationship between follicle size at insemination and

pregnancy success. Proceedings of the National Academy of Science USA; 102:5268-5273.

Pitchard, J.Y., Schrick, F.N., Inskeep, E.K. 1994. Relationship of pregnancy rate to peripheral concentration of progesterone and estradiol in beef cows. Theriogenology; 42:247 – 259.

Roche, J.F., Crowe, M.A., Boland, M.P. 1992. Postpartum anestrous in dairy and beef cows. Anim Reprod Sci;28:371–378.

Sangsritavong, 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 beta in dairy cattle. J Dairy Sci; 85:2831 – 2842.

Santos, J.E., Thatcher, W.W., Chebel, R.C., Cerri, R.L., Galvao, K.N. 2004. The effect of embryonic death rates in cattle n the efficacy of estrus synchronization programs. Anim Reprod Sci; 82 – 83:513 – 535.

Santos JEP, Thatcher WW, Pool L, Overton MW. Effect of human chorionic gonadotropin on luteal function and reproductive performance of high-producing lactating Holstein dairy cows. J Anim Sci. 2001;79: 2881-2894.

Sartori, R., Gumen, A., Guenther, J.N., Souza, A.H., Caraviello, D.Z., Wiltbank, M.C. 2006. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. Theriogenology; 65:1311-1321.

Souza, A.H., Wosniacki, A.M., Torres-Junior, J.R.S., Martins, C.M., Ayres, H., Baruselli, P.S. 2006. 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.

Sreenan, J.M., Diskin, M.G., Morris, D.G. 2001. 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; 93-104.

Stevenson, J.S., Johnson, S.K., Medina-Britos, M.A., Richardson-Adams, A.M., Lamb, G.C. 2003. Resynchronization of estrus in cattle of unknown pregnancy status using estrogen, progesterone, or both. J Anim Sci; 81: 1681-1692.

Thatcher, W.W., Staples, C.R., Danet-Desnoyers, G., Oldick, B., Schmitt, E.P. 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. J Anim Sci; 72 (Suppl. 3): 16-30.

Thatcher, W.W., Binelli, M., Arnold, D., Mattos, R., Badinga, L., Moreira, F., Staples, C.R., Guzeloglu, A. 2001. 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; 81-91.

Thatcher WW, Guzeloglu A, Meikle A, Kamimura S, Bilby T, Kowalski AA, Badinga L, Pershing R, Bartolome J, Santos JEP. Regulation of embryo survival in cattle. Reproduction 2003, Suppl 61:253-266.

Thatcher, W.W., Bilby, T.R., Bartolome, J.A,, Santos, J.E. 2002. Strategies for improving fertility in modern dairy cow. Theriogenology; 65:30-44.

Vanroose, G., de Kruif, A., Van Soom, A. 2000. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. Anim Reprod Sci; 60: 131-143.

Vasconcelos, J.L., Demetrio, D.G., Santos, R.M., Chiari, J.R., Rodrigues, C.A., Sa Filho, O.G. 2006. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. Theriogenology; 65:192-200.

Vasconcelos, J.L.M., Silcox, R.W., Lacerda, J.A., Pursley, J.R., Wiltbank, M.C. 1997. Pregnancy rate, regnancy loss, response to head stress after AI at 2 different times from ovulationin dairy cows. Biol Reprod; 56: 140.

Wathes, D.C. 1992. Embryonic mortality and the uterine environment. J Endocrinol; 134: 321-325.

ATUALIZAÇÃO DOS PROTOCOLOS DE IATF E TETF

Pietro Sampaio Baruselli[1], José Nelio S. Sales,[1]Manoel F. Sá Filho[1]

[1]Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, Rua Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brasil, barusell@usp.br

INTRODUÇÃO

A eficiente multiplicação de animais superiores por biotecnologias da reprodução pode proporcionar maior retorno econômico à agropecuária nacional. Da mesma forma que elevados índices reprodutivos, associados ao melhoramento genético, devem ser metas que norteiam os técnicos e criadores a alcançarem maior produtividade e lucratividade na pecuária. Programas de inseminação artificial (IA) ou transferência de embriões (TE) após detecção de cio geram resultados satisfatórios em termos de taxa de concepção, ou seja, no número de animais gestantes por inseminação artificial ou por transferência de embriões. No entanto, geralmente apresentam baixa taxa de prenhez (número de animais gestantes por números de animais submetidos à detecção de cio) devido à baixa taxa de serviço (número de animais detectados em cio que receberam IA ou TE por números de animais em reprodução), associada freqüentemente a dificuldades na detecção de cio. Além disso, estes programas apresentam diversos problemas operacionais que, muitas vezes, compromete sua aplicação em fazendas comerciais.

As dificuldades operacionais freqüentemente encontradas em programas reprodutivos tradicionais são: 1) necessidade de rodeios diários para detecção de cio nas primeiras horas da manhã e no final da tarde; 2) baixa taxa de serviço; 3) baixa taxa de ciclicidade de vacas no período pós-parto; 4) limitada escala de aplicação das técnicas devido à restrição no número de lotes a serem observados em cio todos os dias; 5) degradação das pastagens nos piquetes de observação de cio próximo aos centros de manejo; 6) baixa previsibilidade de resultados e 7) escassez da mão de obra capacitada.

Durante os últimos anos, com o intuito de facilitar o emprego da IA e da TE nas fazendas comerciais, novas técnicas de sincronização da ovulação foram desenvolvidos visando aumentar a aplicação dessas biotecnologias, favorecendo o melhoramento genético dos rebanhos. Dentre elas, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a transferência de embriões em tempo fixo (TETF), tanto em bovinos de corte como de leite, merecem destaque.

O objetivo dessa revisão é apresentar as mais recentes atualizações dos protocolos de sincronização da ovulação para IATF e TETF aplicados em bovinos de corte.

CONTROLE DA DINÂMICA FOLICULAR EM PROGRAMAS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

Existem três premissas para a manipulação hormonal da dinâmica folicular e luteínica em programas de sincronização da ovulação para IATF e TETF: 1) **Sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular**, seja por indução da ovulação (GnRH, LH ou hCG) ou por indução de atresia folicular (associação entre progesterona e estradiol); 2) **Controlar a duração da fase progesterônica,** através do uso de agentes luteolíticos (prostaglandina F2α e estrógenos), ou pela administração

exógena de progesterona (P4) por meio de dispositivos/implantes de liberação lenta; 3) **Induzir a ovulação sincronizada** do folículo dominante ao final do tratamento com GnRH, LH, hCG ou estrógenos (benzoato ou cipionato de estradiol).
Levando em consideração esses princípios os programas de sincronização da ovulação para IATF e TETF procuram induzir a emergência de uma onda de crescimento folicular sincronizada, controlar a duração do crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório, sincronizar a retirada da progesterona exógena (dispositivo) e endógena (prostaglandina $F_{2\alpha}$) e induzir a ovulação sincronizada em todos os animais.

Sincronização da emergência da nova onda de crescimento folicular

Para a eficiente sincronização da emergência folicular é necessário promover a atresia folicular através da inibição da secreção de FSH e de LH (os folículos são dependentes de FSH no início e de LH no final da onda de crescimento folicular). Após essa fase inicial de inibição da liberação de gonadotrofinas, ocorre um pico de FSH com indução sincrônica de uma nova onda de crescimento folicular. Diversos métodos foram propostos para a indução da emergência sincronizada de uma nova onda. Dentre esses, podem ser citados a sincronização por métodos mecânicos (ablação folicular) ou farmacológicos.
A ablação do folículo dominante guiada por ultrassonografia (Bo et al., 1995a) promove rápida redução das concentrações circulantes de E2 e inibina com conseqüente descarga de FSH, induzindo a emergência de uma nova onda de crescimento folicular em aproximadamente 1,5 dias (Martinez et al., 2000). No entanto, apesar de sua satisfatória eficiência, estes métodos apresentam alto grau de dificuldade para aplicação em larga escala.
Os estrógenos quando administrados na presença de P4 endógena (produzido pelo CL) ou exógena (liberado pelos dispositivos/implantes de P4), causam a diminuição dos níveis circulantes de FSH e LH provocando regressão dos folículos gonadotróficos dependentes. Após a metabolização e a diminuição das concentrações plasmáticas de estradiol (E2), verificam-se elevações nas concentrações de FSH e subseqüente emergência de uma nova onda de crescimento folicular. Existem diferentes ésteres de E2 (estradiol-17β, benzoato, valerato ou cipionato de estradiol). O valerato de estradiol (VE; Bo et al., 1995b) e o cipionato de estradiol (CE; Colazzo et al., 2003), na presença de progesterona, causam a regressão dos folículos antrais presentes no ovário. No entanto, a meia vida longa desses ésteres de estradiol, devido a baixa solubilidade em água, promove atraso e dispersão no dia da emergência da onda de crescimento folicular. O benzoato de estradiol (Sá Filho et al., 2004) e o estradiol 17β (Bo et al., 1994) apresentam meia vida curta, induzindo com mais eficiência a emergência sincronizada de uma nova onda de crescimento folicular (entre 3 a 4 dias após o tratamento tanto em *Bos taurus* quanto em *Bos indicus*; Bo et al., 1995 e Sá Filho et al. 2005).
Sá Filho et al. (2010b) avaliaram o efeito da administração de 2mg de benzoato de estradiol (BE) na inserção do implante auricular contendo norgestomet (D0) ou duas diferentes doses de valerato de estradiol (VE) para sincronização da emergência da nova onda de crescimento folicular em vacas e novilhas *Bos indicus*. Foi observado interação entre categoria animal (vaca ou novilha) e ester de estradiol utilizado (VE ou BE). O BE promoveu efeito semelhante em vacas e em novilhas na indução da emergência da nova onda de crescimento folicular. No entanto, novilhas tratadas com VE apresentaram atraso e maior dispersão da ocorrência de uma nova onda de crescimento folicular quando comparadas com vacas (Tabela 1).

Outra possibilidade para a sincronização da emergência seria através da indução da ovulação. A ovulação do folículo dominante e a emergência de uma nova onda de crescimento folicular estão estreitamente relacionadas (revisado por Wiltbank e Haughian, 2003). Esta ovulação pode ser induzida diretamente, administrando fármacos que se ligam aos receptores de LH do folículo dominante (LH e hCG) ou pela indução da secreção pulsátil do hormônio luteinizante com a administração de GnRH. Durante o processo de indução da ovulação, verifica-se uma queda da secreção de estradiol e inibina, responsáveis pelo bloqueio da secreção de FSH na hipófise. Como conseqüência, ocorrerá uma subseqüente descarga de FSH (Bergfelt et al., 1997), responsável pela emergência e pelo desenvolvimento de uma nova onda de crescimento folicular após 1 e 2 dias (Ginther et al., 1996). É importante ressaltar que para a efetiva indução de uma nova onda de crescimento folicular é necessário que a ovulação ocorra (Martines et al., 1999). No entanto, o uso do GnRH para a indução de ovulação com finalidade de sincronizar a emergência da nova onda de crescimento folicular apresenta baixa eficiência em fêmeas *Bos indicus*, principalmente em anestro (Baruselli et al., 2004, Barros et al., 2000).

Controle da fase progesterônica do ciclo estral

Estrógenos

Os estrógenos, principalmente os de longa duração na corrente sanguínea (valerato de estradiol), são capazes de induzir a luteólise pela sua capacidade de estimular a secreção endógena de $PGF_{2\propto}$ pelo endométrio uterino. Martinez et al. (2004) trataram novilhas de corte durante o diestro com 2 mg de BE com intuito de sincronizar a emergência folicular e obtiveram 27,6% de luteólise (manifestação de cio e ovulação). Esse efeito luteolítico é superior quanto o E2 de meia vida longa é incorporado no início dos protocolos de sincronização da ovulação para IATF, com o objetivo de induzir a emergencia de uma nova onda de crescimento folicular e de eliminar a administração de PGF2∝. A administração de 5mg de VE no início do protocolo Crestar induz a luteólise em mais de 90% dos animais (Peterson et al., 2000).

Prostaglandina F2∝ no protocolo de sincronização da ovulação

É preconizada a aplicação de PGF2∝ juntamente aos tratamentos à base de progesterona/progestágenos para indução da luteólise e queda abrupta dos níveis endógenos de progesterona, simulando as condições fisiologias encontradas no final do diestro. Recomenda-se a administração de prostaglandina no momento da retirada dos dispositivos de progesterona para evitar que os níveis de progesterona permaneçam elevados e bloqueiem a ovulação.

Progesterona/progestágenos

O tratamento com P4 exógena bloqueia o pico de LH (Stock e Fortune, 1993; Kinder et al., 1996), evitando a maturação folicular final, estro e a ovulação do folículo dominante. A P4 e os progestágenos são substâncias que podem ser administradas por via oral, por implantes subcutâneos ou por dispositivos intravaginais. Esses compostos quando associado ao tratamento com E2 para sincronização da nova onda de crescimento folicular e à $PGF_{2\propto}$ como agente luteolítico proporcionam adequadas taxas de sincronização do cio e da ovulação possibilitando a IATF e TETF.

Indução sincronizada da ovulação

Os fármacos utilizados para a indução da ovulação agem por retroalimentação positiva na liberação pulsátil de LH (estrógenos e GnRH) ou agem diretamente nos receptores de LH do folículo (hCG e LH). Cada um dos fármacos apresenta um intervalo específico entre sua administração e a ocorrência das ovulações. No caso do GnRH, o intervalo entre administração e ovulação é de 26 a 30 horas (Wiltbank and Haughian 2003). Entretanto, quando o hCG ou o LH é administrado este intervalo é de 24 a 26 horas. Já, a administração de BE induz a ovulação entre 44 a 45 horas após o tratamento, decorrente do fato de que o intervalo entre a administração de BE e o pico de LH é de 22 horas (Maio et al., 2007). O cipionato de estradiol, quando administrado no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4, induz o pico de LH entre 45 a 49 horas (Sales et al., 2007) e a ovulação entre 67 a 70 horas após o tratamento (Sales et al., 2008). Dessa forma, o intervalo entre a retirada da fonte de P4 e a ovulação é semelhante entre o protocolo que administra CE no momento ou BE 24 horas após a retirada do dispositivo de P4.

PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO COM PROGESTERONA E PROGESTÁGENO PARA IATF

Existem atualmente no mercado brasileiro produtos eficientes que liberam P4 (dispositivos intravaginais) e progestágenos (implantes auriculares) para sincronização do estro e da ovulação.

O Crestar® é um implante auricular subcutâneo, utilizado para sincronização do crescimento folicular e da ovulação por um período de aproximadamente nove dias. Os implantes auriculares de progestágenos contêm Norgestomet (17α-acetoxi-11β-metil-19-norpreg-4-en-3,30-diona), que apresenta potência cerca de 200 vezes superior à da P4 natural. Assim, este implante auricular silástico possui três miligramas de norgestomet. O implante de silicone provoca a liberação do progestágeno de forma homogênea e linear (Kesler *et al*., 1995). A utilização de implantes auriculares associado ao VE apresentou satisfatória taxa de prenhez à IATF em vacas de corte *Bos indicus* lactante, principalmente quando se adiciona a este tratamento a administração de eCG no momento da retirada do implante auricular (Sá Filho et al., 2010a, Ayres et al., 2006a,b).

No mercado, existem diversas marcas de dispositivos intravaginais que liberam eficientemente P4 com finalidade de sincronização do estro e da ovulação. A eficiência da utilização da associação entre dispositivos intravaginais de P4 associados a adminstração de BE no início do protocolo tem sido comprovada por diversos estudos, tanto em vacas *Bos indicus* (Baruselli et al., 2004, Sá Filho et al., 2009;) quanto em *Bos taurus* (Cutaia *et al.*, 2001; Colazo *et al.*, 1999; Macmillan *et al.*, 1993). Em uma análise retrospectiva de dados coletados em diversas fazendas comerciais do Brasil, nas quais as fêmeas foram sincronizadas utilizando a associação entre benzoato de estradiol e progesterona, Sá Filho et al., (2009) descreveram taxa média de prenhez após IATF de 49.6% (31786/64033). Esta taxa de prenhez foi influenciada pela fazenda (variação entre 26.8% a 68.0%) e pela categoria animal (novilhas, 39.6% [2095/5290]; primíparas, 45.2% [3924/8677]; multíparas, 51.8% [24.245/46.767]; solteiras, 46.1% [1522/3299]). Também foi descrito efeito significativo de condição corporal (2.5, 43.0% [3409/7923]; 3.0, 49.6% [18.958/38.229]; e 3.5, 52.7% [9419/17.881]) e do touro utilizado (variação entre 7.2% a 77.3%).

REDUÇÃO DO NÚMERO DE TRATAMENTOS NECESSÁRIOS PARA IATF

O sistema de cria no Brasil é caracterizado principalmente por fazendas com grandes extensões territoriais nas quais as fêmeas são geralmente criadas em condições extensivas. Do mesmo modo que, para que uma biotecnologia da reprodução seja incorporada na rotina destas fazendas, é necessário que estas técnicas apresentem facilidades de logística, de organização e de manejo dos animais nos currais. Os protocolos de sincronização que necessitam um grande número de manejos geram dificuldades em termos de deslocamento dos animais dentro da fazenda e do manejo rotineiro dos currais, podendo comprometer sua aplicação em larga escala. Neste sentido, nosso grupo de pesquisa tem realizado diversos experimentos com objetivo principal de diminuir o número de manejos em protocolos de sincronização da ovulação para IATF em vacas de corte criadas em condições extensivas (Baruselli et al., 2003; Marques et al., 2003; Martins et al., 2005b; Penteado et al., 2006; Martins et al., 2007). Em um primeiro estudo, avaliou-se a possibilidade de substituir o tratamento com BE realizado 24 horas após a remoção do dispositivo de progesterona (4 manejos) pelo tratamento com GnRH ou com hCG no momento da IATF (54 horas após a retirada do dispositivo; 3 manejos) em vacas Nelore (*Bos indicus*) e em vacas Brangus (*Bos indicus* x *Bos taurus*). Um grupo recebeu BE (1mg) no D9 e os outros GnRH (25µg) ou hCG (1500 UI) no momento da IATF (D10). Não foram observadas diferenças na taxa de prenhez entre os tratamentos, tanto em Nelore [59,9% (109/182) para o Grupo BE; 61,6% (125/203) para o Grupo GnRH e 58,5% (117/200) para o Grupo hCG] quanto em Brangus [60,1% (113/188) para o Grupo BE; 59,0% (131/222) para o Grupo GnRH e 62,8% (147/234) para o Grupo hCG]. Esse resultado é indicativo de que é possível obter taxas semelhantes de prenhez tanto com o tratamento com BE (4 manejos) quanto com o tratamento com GnRH ou hCG (3 manejos). Entretanto o inconveniente da utilização de GnRH ou de hCG como indutores de ovulação está relacionado ao maior custo desses fármacos quando comparados com os estrógenos.

Dando continuidade aos estudos que visam facilitar o manejo dos programas de IATF, outros experimentos foram conduzidos com o objetivo de aumentar o período para a realização das inseminações. Em um primeiro estudo, Martins et al. (2005b) avaliaram a dinâmica folicular de vacas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante intravaginal de P4 associado à administração de BE ou CE no momento da retirada (dia 8) ou 24 horas após (dia 9), respectivamente. Para isto, no momento da retirada dos dispositivos as fêmeas foram distribuídas em quatro grupos: Grupos BE8 e CE8, tratados com 1mg de BE ou 0,5mg de CE no momento da retirada do dispositivo intravaginal, respectivamente; Grupos BE9 e CE9, tratados com 1 mg de BE ou 0,5mg de CE, 24 horas após a remoção do dispositivo intravaginal, respectivamente. Avaliou-se por ultrassonografia a dinâmica folicular de 12/12 horas do Dia 8 até o momento da ovulação. Verificou-se que o intervalo entre a retirada do dispositivo e a ovulação foi semelhante entre o grupo tratado com BE 24 horas após a retirada do dispositivo (4 manejos; 70,0±1,48 h) e o grupo tratado com CE (3 manejos; 70,7±2,40 h) no momento da retirada do dispositivo.

Na seqüência, Penteado et al. (2006a) realizaram um estudo para certificar se a substituição do BE administrado no dia 9 pelo CE administrado no dia 8 (momento da retirada do dispositivo) apresentava semelhante taxa de prenhez a IATF. Procurou-se, também, verificar a dose mais apropriada de CE no momento da retirada do dispositivo (0,5 ou 1,0mg). As fêmeas *Bos indicus* lactantes foram divididas em três grupos: Grupo 1mg BE, 24 horas após a remoção do dispositivo de P4 (4 manejos); Grupo 0,5 mgCE e Grupo 1mg CE, no momento da retirada do dispositivo de P4 (3 manejos). As fêmeas receberam uma IATF entre 54 a 58 horas após a remoção do dispositivo de P4. As

taxas de prenhez foram de 49,4% (82/166)[b] para o Grupo 1mg CE, 39,2% (65/166)[a] para o Grupo 0,5mg CE e de 41,4% (70/169)[ab] para o Grupo 1mg BE. Não foram verificadas diferenças significativas entre os animais tratados com BE (4 manejos) e CE (3 manejos).

Em outros estudos realizado (Martins et al., 2007; Ayres et al., 2008), foi avaliado o efeito de diferentes momentos de aplicação do BE (0 ou 24 horas após a retirada do implante) na resposta ao protocolo de sincronização da ovulação, com o intuito de diminuir o número de manejos para a IATF com o emprego do BE como indutor de ovulação. Primeiramente, foi estudada a resposta folicular aos tratamentos. Verificou-se que os animais tratados com BE na retirada do dispositivo intravaginal de P4 apresentaram redução do intervalo retirada/ovulação (59,4 ± 2,0h), comparado com os tratados com BE 24 horas depois (69,3 ± 1,6h). Na seqüência, foram sincronizadas 504 vacas Nelore lactantes, divididas em quatro tratamentos. No Grupo BED9-IA48H (n=126), os animais receberam 1mg de BE no dia 9 e foram inseminados em tempo fixo 48 a 52 horas após a retirada do implante. No Grupo BED9-54H (n=125), os animais receberam 1mg de BE no dia 9 e foram inseminados em tempo fixo 54 a 58 horas após a retirada do implante. No Grupo BED8-IA48H (n=126), os animais receberam 1mg de BE no dia 8 e foram inseminados em tempo fixo 48 a 52 horas após a retirada do implante e no Grupo BED8-54H (n=125), os animais receberam 1mg de BE no dia 8 e foram inseminados em tempo fixo 54 a 58 horas após a retirada do implante. Os resultados estão apresentados na tabela 4. Verificaram-se semelhantes taxas de prenhez com a administração de BE na retirada do dispositivo, desde que a IATF seja realizada antecipadamente (48 a 52 horas), permitindo manejar somente 3 vezes os animais para a IATF empregando o BE como indutor de ovulação (Tabela 2).

Os resultados acima mencionados são indicativos de que é possível facilitar o manejo da IATF prendendo no máximo três vezes o lote de fêmeas. Ainda, são sugestivos de que é possível utilizar estrógenos para a sincronização da ovulação, que apresentam custos inferiores quando comparados aos tratamentos com GnRH e hCG.

REUTILIZAÇÃO DO IMPLANTES AURICULARES OU DOS DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS

A utilização de implantes auriculares ou dispositivos intravaginais previamente usados tem sido uma alternativa para viabilizar economicamente a IATF em larga escala para rebanhos comerciais. Diversos experimentos foram realizados com o objetivo de avaliar o número de reutilizações dos implantes auriculares ou dos dispositivos intravaginais para IATF em vacas de corte (Colazo et al., 2004; Maio et al., 2008; Sá Filho et al., 2008; Sá Filho et al., 2009; Medalha et al., 2009; Meneghetti et al., 2009). Os resultados são indicativos de que os dispositivos contendo 1 grama de progesterona podem ser reutilizados por até 2 vezes sem afetar a eficiência do protocolo. Maio et al (2008) analisaram o perfil plasmático de P4 em novilhas ovariectomizadas tratadas com dispositivo intravaginal de P4 reutilizados. Os autores observaram que dispositivos intravaginais contendo 1 grama de P4 com diferentes usos (novos, previamente usados por 8 ou 16 dias) foram eficientes em manter a concentração plasmática de P4 acima de 1ng/mL durante 8 dias. Sá Filho e Vasconcelos (2008) utilizando dispositivo intravaginal contendo 1,9 gramas de P4 (CIDR) novos, previamente usados por 9, 18 ou 27 dias não observaram diferença na taxa de ovulação, na taxa de concepção e no diâmetro do folículo no D11, indicando que o CIDR pode ser utilizado por até quatro vezes. Santos et al. (2004) observaram que o CIDR foi eficiente para manter concentrações plasmáticas de progesterona acima de 1 ng/mL durante 25 dias,

enquanto que o DIB foi eficiente por 13 dias. Essa diminuição na concentração sérica de P4 observada com o uso do DIB poderia aumentar a pulsatilidade de LH, aumentando a taxa de crescimento folicular e antecipando a ovulação (Carvalho al., 2008). Entretanto, em um estudo recentes (Medalha et.al, 2009) verificou-se não existir diferenças na taxa de concepção de fêmeas bovinas sincronizadas para IATF com DIB novo (56,7%; 174/307), previamente utilizado por 8 (55,2%; 196/355) ou 16 dias (51,2%; 170/332) e inseminação 48 horas após a retirada dos dispositivos de P4. Similarmente, Colazo et al. (2004) não observaram diferença nas taxas de prenhez de vacas de corte *Bos taurus* submetidas a protocolos para IATF com dispositivos de P4 novos ou previamente utilizados. Em outro estudo, Meneghetti et al. (2009) não observaram diferença na taxa de ovulação e taxa de concepção em vacas Nelore tratadas com dispositivo intravaginal de 1,9 grama de P4 novo, previamente usado por 9 ou 18 dias e IATF 48 horas após a retirada em dois diferentes experimentos

Outros estudos foram conduzidos avaliando a reutilização de implantes auriculares de contendo Norgestomet em programas de IATF em vacas lactantes e novilhas zebuínas (Sá Filho et al., 2010b). Em novilhas, foi avaliado o efeito da utilização de diferentes tipos de indutores de ovulação nas fêmeas tratadas com implante auricular contendo Norgestomet novo ou reutilizado. Neste experimento, 620 novilhas ciclando (com CL) foram distribuídas aleatoriamente em dois grupos experimentais que receberam um implante auricular (Crestar® Novo ou Crestar® utilizado previamente por nove dias). Na retirada dos implantes, as fêmeas foram distribuídas homogeneamente em três grupos experimental: BE, Cipionato de estradiol (CE) ou GnRH. As fêmeas do grupo CE receberam 0,5mg de cipionato de estradiol (CE), no momento da retirada do implante auricular (D8; 3 manejos). No grupo BE, administrou-se 1mg de BE 24 horas após a retirada do implante (D9; 4 manejos). No grupo GnRH as novilhas receberam 100µg de Gonadorelina (GnRH) no momento da IATF (D10; 3 manejos). Todas as fêmeas foram inseminadas em tempo fixo 54 horas após a retirada do implante auricular. 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 ($p>0,05$).

Em vacas de corte lactantes, Sá Filho et al., (2010b) avaliaram a utilização de diferentes indutores de ovulação em protocolos utilizando implante auricular reutilizado. Um total de 655 fêmeas com 30 a 60 dias pós-parto foram tratadas com implante auricular previamente utilizado por nove dias e BE. Na remoção dos implantes alem do tratamento com PGF e 300 IU de eCG, as fêmeas foram subdivididas em três grupos experimentais [1mg de CE (n=228) na remoção dos implantes, 10µg acetato de buserelina (GnRH; n=212) no momento da IATF, ou ambos os tratamentos (EC+GnRH; n=215)]. Todas as fêmeas foram inseminadas em tempo fixo entre 48 e 52 horas após a remoção dos implantes. A mesma taxa de prenhez ($P = 0.71$) foi observada após a utilização de GnRH (50.9%), CE (51.8%) ou ambos os tratamentos (54.9%).

ADEQUAÇÃO DO MOMENTO DA IATF DE ACORDO COM O NÚMERO DE USOS DOS IMPLANTES AURICULARES OU DOS DISPOSITIVOS INTRAVAGINAIS

Como citado anteriormente, a reutilização dos dispositivos previamente usados é uma necessidade para viabilizar economicamente a IATF em larga escala no Brasil. No entanto, diferentes respostas das fêmeas tratadas com implantes auriculares ou dispositivos intravaginais previamente utilizados têm sido descrito na literatura (Castro Junior et al. 2008, Crepaldi 2009). O momento de ovulação e a taxa de concepção

destas fêmeas parecem estar associados ao tipo de implante ou dispositivo utilizado (novos ou usados) e ao momento em que as fêmeas são inseminadas em tempo fixo.
Estudos prévios relatam a existência de momentos mais adequados para se realizar a IA em relação ocorrência da ovulação da fêmea. Este momento é depende da viabilidade do oócito e da sobrevivência dos espermatozóides no trato genital feminino (Hunter, 1994). Dransfield et al. (1998) demonstraram que a probabilidade de ocorrer a concepção diminui à medida que a IA se aproxima muito ao momento da ovulação. Além disso, relataram diminuição da concepção quando a IA é realizada em animais já ovulados. Entretanto, para maximizar disponibilidade de espermatozóides para fecundação do ovócito, a inseminação artificial deve ocorrer próximo ao momento da ovulação, porém não tão tardiamente de modo que o ovócito envelheça (Dalton e Saacke, 2007).
Em vacas paridas, a ocorrência das ovulações após os tratamentos a base de progesterona ou progestágeno associado a estradiol parece ser influenciada pelo número de usos das fontes de progesterona. Em um estudo recente, Crepaldi (2009) descreve que vacas *Bos indicus* paridas tratadas com dispositivos intravaginais previamente utilizados por oito (72,0±0,0h^{ab}) ou por 16 (68,0±2,0h^{b}) dias apresentam menor intervalo entre a retirada do dispositivo e a ovulação em relação às fêmeas tratadas com dispositivos novos (74,4+1,6h^{a}). Resultados semelhantes foram descritos por Sales et al., (2009; dados não publicados), que verificaram antecipação das ovulações conforme o número de usos do dispositivo (novo = 77,1 horas; previamente usado 8 dias = 73,3 horas e previamente usado por 16 dias = 71,8 horas). Esse efeito do número de reutilizações dos dispositivos intravaginais sobre momento da ovulação sincronizada poderia influenciar a fertilidade das fêmeas após IATF.
Para testar esta hipótese alguns estudos foram conduzidos para verificar a taxa de prenhez à IATF de fêmeas tratadas com implantes auriculares ou dispositivos intravaginais novos e previamente utilizados com diferentes momentos de inseminação. Em um primeiro estudo, Castro Junior et al. (2008) encontraram menor taxa de prenhez em vacas Nelore lactantes sincronizadas com implantes auriculares contendo Norgestomet previamente utilizados e CE como indutor de ovulação quando a inseminação foi realizada 54 horas (38,5%; 35/91) quando comparado à IATF 48 horas (49,5%; 45/91) após a remoção. Em novilhas *Bos indicus*, Sá Filho et al., (2010, dados ainda não publicados) avaliaram o efeito do momento da realização da IATF (48 vs. 54 horas após a remoção do implante) de acordo com o tipo do implante auricular (novo ou previamente utilizado). Foi observada interação entre o número de usos do implante e o momento da IATF (P=0.02), ou seja, o efeito do momento da inseminação sobre a taxa de prenhez depende do número de utilizações do implante. As novilhas inseminadas 54 horas após tratamento com implante auricular reutilizado apresentaram menor taxa de concepção (40.0%, 42/105) do que novilhas tratadas com implante usado e inseminadas 48 horas (56.6%, 56/99) ou aquelas tratadas com implantes novos e inseminadas 48 horas (47.6%, 50/105) ou 54 horas (53.3%, 57/107) após a retirada da fonte de progesterona.
Em vacas Nelore lactantes, efeito semelhante foi observado após o tratamento com dispositivos intravaginais de P4. Sá Filho et al. (2009; dados não publicados) observaram redução (P=0.07) da taxa de concepção conforme o número de usos do CIDR e inseminação 54 horas após a retirada [novo = 58,1% (79/136) vs. previamente usado 8 dias 51,2% (66/129) e previamente utilizado por 16 dias 46,7% (56/120); P=0,07]. No entanto, em outro experimento do mesmo autor (2009; dados não publicados) não foram verificadas diferenças entre os diferentes usos do CIDR quando a IATF foi realizada 48 horas após a retirada [novo = 48,4% (77/159); previamente usado 8 dias 54,0% (68/126) e previamente utilizado por 16 dias 55,0% (72/131);

p>0,10]. Sendo assim, devido à antecipação do momento da ocorrência das ovulações após o protocolo de sincronização e da redução na taxa de concepção verificada nos experimentos quando do emprego de dispositivos previamente utilizados, indica-se que a IATF seja realizada às 48 horas após a remoção dos implantes ou dispositivos reutilizados.

Diante desses estudos apresentados, o protocolo para IATF para vacas lactantes com período pós-parto precoce (30 a 60 dias pós parto), com apenas três manejos é proposto (Figura 1). Esse protocolo além de facilitar o manejo, principalmente em programas com grande número de vacas por lote, não compromete a eficiência reprodutiva do rebanho.

AVANÇOS NOS PROTOCOLOS DE TETF USANDO ESTRADIOL, DISPOSITIVO P4 E GONADOTROFINA CORIÔNICA EQÜINA

Na América do Sul, protocolos que associam E2 mais P4 são sem dúvida um dos mais utilizados para TETF em bovinos (Bó et al. 2002, Baruselli et al., 2010). Em geral, os tratamentos são muito semelhantes àqueles usados para IATF, exceto pelo momento de administração da PGF e do eCG, que visam principalmente aumentar o crescimento folicular e do diâmetro máximo do folículo dominante, com conseqüente aumento das concentrações de P4 no ciclo subseqüente. Vários trabalhos demonstraram efeito positivo da P4 no desenvolvimento embrionário e na manutenção da gestação (Binelli et al., 2001).

Em um primeiro momento, estudou-se o efeito do tratamento com PGF no dia 5 do protocolo comparando com a administração tradicional do agente luteolítico no momento da retirada do dispositivo intravaginal de P4 em receptoras. O objetivo da antecipação da PGF é o de diminuir a concentração sanguínea de P4 para aumentar a pulsatilidade de LH e promover aumento do crescimento do folículo dominante durante o tratamento de sincronização (Carvalho et al., 2008). Neste estudo as fêmeas receberam um dispositivo de P4, 2 mg (i.m.) de BE e 50 mg (i.m.) de P4 no dia 0; a PGF foi administrada no dia 5 (um dia após a emergência da onda); o dispositivo de P4 é removido no dia 8 e 1 mg de BE é administrado no dia 9. O dia 10 é considerado o dia do estro e por isso, os embriões são transferidos em tempo fixo em todas as receptoras que apresentam um CL no dia 17. Obtiveram-se elevadas taxas de aproveitamento nas receptoras tratadas após a antecipação da administração de PGF no protocolo de TETF (Bó et al., 2002).

Outra ferramenta utilizada para melhorar os resultados da TETF foi a inclusão da gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) no dia 5 no protocolo (Baruselli et al., 2000). A eCG é uma glicoproteína secretada pelos cálices endometriais da égua prenha que se liga aos receptores de LH e FSH nos folículos ovarianos (Murphy e Martinuk 1991). Estudos em vacas e novilhas (Baruselli et al. 2004; Sá Filho 2010a,b), bem como em vacas leiteira de alta produção (Souza et al. 2009), demonstraram que a administração de 400 UI de eCG aumentou a taxa de ovulação e a concentração plasmática de P4 durante a fase luteal subsequente. Em receptoras cruzadas (Bó et al. 2002), o tratamento com eCG aumentou o diâmetro CL (18,5 ± 0,4 vs 17,7 ± 0,4 mm), bem como, a taxa de concepção [76/132 (57,6 %) v. 53/127 (41,7%)] em relação ao grupo controle. Embora estudos anteriores demonstrem a eficácia desse protocolo na obtenção de altas taxas de aproveitamento e satisfatórias taxas de concepção, as receptoras tinham que ser trazidas ao curral pelo menos cinco vezes (quatro vezes para a administração dos fármacos e uma para a transferência dos embriões). Neste sentido, com o intuito de reduzir o número de manejos necessários para realização da

TETF, estudos foram conduzidos para simplificar o protocolo de sincronização (Baruselli et al., 2010).

Em um primeiro estudo, avaliou-se o efeito da alteração do momento de administração da eCG e da PGF do dia 5 para o dia 8, coincidindo com a remoção do dispositivo de P4 para tentar evitar o tratamento do dia 5. Além disso, avaliou-se o efeito de diferentes doses de eCG (400 UI, 500 UI e 600 UI) sobre a taxa de prenhez de receptoras B. indicus x B. taurus que receberam embriões produzidos *in vitro* (Reis et al. 2004). Os resultados demonstraram que a dose de eCG não interfere na eficácia do protocolo. No entanto, administração da eCG no dia 8 do protocolo reduziu a taxa de prenhez quando comparados a administração no dia 5 [44,1% (132/299) vs. 36,6% (108/295)]. Resultados semelhantes foram relatados por Nasser et al. (2004), o qual receptoras tratadas com eCG no dia 5 obtiveram maiores taxas de prenhez do que as tratadas no dia 8 [(47,0% (71/151) e 40,7% (61/150), respectivamente]. Esses estudos demonstraram que a mudança do dia de administração da eCG (Dia 5 para o Dia 8) influenciou negativamente os resultados do protocolo de TETF. Essa redução pode estar relacionada a supressão do crescimento folicular entre os dias 5 e 8. Pelo fato da maioria das receptoras utilizadas possuírem um CL no momento da inserção do dispositivo de P4, o atraso na administração da PGF para o dia 8 do protocolo pode ter exposto essas receptoras a altas concentrações circulantes de P4 (CL mais a dispositivo de P4), que pode ter reduzido a pulsatilidade de LH (Savio et al. 1993, Carvalho et al. 2008). Esse fator, associado à ausência do tratamento com eCG para estimular o crescimento folicular desde o início da onda, pode ter comprometido o crescimento do folículo dominante.

Em outro estudo, duas hipóteses foram testadas: (1) O tratamento com eCG no dia 5 ou dia 8 (protocolo utilizando um implante auricular contendo 3 mg de norgestomet) apresentam a mesma eficiência em protocolos de TETF e (2) a substituição do indutor da ovulação BE (administrado no dia 9) pelo CE (administrado no momento da retirada do implante-D8) não afeta os programas de TETF (Ferreira et al. 2006). O objetivo desses tratamentos foram, mais uma vez, tentar reduzir o número de manejo das receptoras de embriões do protocolo tradicional (de 5 para 3 manejos). Nesse estudo, utilizou-se o implante auricular de norgestomet para minimizar os efeitos supressivos do excesso de progesterona no crescimento folicular (Torres-Júnior et al. 2005), que podem diminuir a taxa de aproveitamento, concepção e prenhez. As receptoras receberam um implante auricular de norgestomet, associado a 2 mg de BE i.m. no Dia 0. No dia 5, as receptoras do grupo controle (cinco manejos) receberam i.m. 400 UI de eCG e 150 mg de D-cloprostenol. No dia 8, o implante auricular foi removido e 24 horas depois foi administrado 1 mg de BE (dia 9). As receptoras do grupo BE (quatro manejos) foram submetidas ao mesmo protocolo usado no grupo controle, exceto pela administração da eCG e PGF no momento da remoção do implante (dia 8). Receptoras do grupo CE (três manejos), foram submetidos ao mesmo protocolo do grupo BE, sendo a única diferença a administração de CE (0,5 mg) no momento da remoção do implante (Dia 8) em substituição ao BE. Os resultados demonstraram que, quando implantes auriculares de norgestomet são utilizados, é possível reduzir o número de manejos sem afetar a eficiência do protocolo de sincronização para TETF (Tabela 3).

Uma alternativa para reduzir as concentrações de P4 durante o tratamento de sincronização com dispositivo intravinais de P4 sem aumentar o número de manejos é administrar PGF no momento da inserção do dispositivo de P4 (D0). Esse protocolo teve como base estudos preliminares em que avaliou a administração da PGF tanto no dia da remoção (dia 8) quanto da inserção (Dia 0) do dispositivo de P4. Esse protocolo diminuiu as concentrações de P4 durante o tratamento e aumentou a taxa de crescimento do folículo dominante e o tamanho do folículo ovulatório e a taxa de

ovulação (Carvalho et al. 2008). Em outro estudo, novilhas cruzadas *Bos indicus* x B. taurus receberam um dispositivo de P4 associado à administração de 2 mg BE no Dia 0. Nesse mesmo dia, as novilhas foram distribuídas aleatoriamente para receber meia dose de PGF nos dias 0 e 8 ou uma dose única de PGF no dia 8. Todas as receptoras receberam 1 mg CE e 400 UI de eCG no dia 8. Somente as receptoras com CL no dia 17 receberam embrião. Receptoras tratadas com PGF no dia 0 e 8 apresentaram maior diâmetro do folículo dominante (14,7 ± 0,4 vs. 12,6 ± 0,5 mm), do CL na TE (19,3 ± 0,5 vs. 18,1 ± 0,4 mm) e taxa de prenhez [50,5% (50/99) vs. 39,4% (39/99)] do que as receptoras que receberam PGF somente no dia 8 apenas.
Finalmente, Nasser et al. (2004) testou a hipótese que a administração de 2 mg BE sem 50 mg de progesterona no início do protocolo TETF não reduziria a eficiência do protocolo de TETF. O tratamento com BE+P4 apresentou a mesma taxa de prenhez do que os tratamentos somente com BE [(45,3% (68/150) para BE e 42,4% (64/151) BE + P4]. Diante desses estudos apresentados, um novo protocolo para TETF, com apenas três manejos foi proposto (Figura 2). Esse protocolo facilita o manejo, sem reduzir a eficiência reprodutiva.

CONCLUSÃO

Inúmeras vantagens são obtidas com a adoção da inseminação artificial e da transferência de embriões em rebanhos bovino de corte. No entanto, a baixa taxa de serviço, seja pela ineficiência na detecção do cio ou pelo alto grau de anestro no período pós-parto, são os principais fatores que comprometem a eficiência destes programas reprodutivos. Dessa forma, a IATF e a TETF apresentam-se como alternativas para superar esses entraves. Na atualidade, existem protocolos que manejam apenas três vezes os animais, facilitando consideravelmente o manejo e sem perder a eficiência dos tratamentos de sincronização.

REFERÊNCIAS

AYRES H, TORRES-JÚNIOR JRS, PENTEADO L, SOUZA AH, BARUSELLI PS. Efeito do momento da inseminação e do tratamento com GnRH na IATF sobre a taxa de concepção de vacas de corte lactantes sincronizadas com Norgestomet e Benzoato de estradiol. *Acta Scienciae Veterinariae* 2006a;34:409.

AYRES H, TORRES-JÚNIOR JRS, PENTEADO L, SOUZA AH, BARUSELLI PS. Taxa de concepção de vacas Nelore lactantes sincronizadas com implante auricular de progestágeno associado ao Benzoato ou ao Cipionato de estradiol. *Acta Scienciae Veterinariae* 2006b;34:410.

AYRES H, MARTINS CM, FERREIRA RM, MELLO JE, DOMINGUEZ JH, SOUZA AH, VALENTIN R, SANTOS ICC, BARUSELLI PS. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (Bos indicus) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. Animal Reproduction Science. 2008;109:77-87.

BARROS CM, MOREIRA MBP, FIGUEIREDO RA, TEIXEIRA AB, TRINCA LA. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using GnRH, PGF2alpha and estradiol benzoate. Theriogenology 2000;53:1121-34.

BARUSELLI PS, FERREIRA RM, SÁ FILHO MF, NASSER LFT, RODRIGUES CA, BÓ GA. Bovine embryo transfer recipient synchronization and management in tropical environments. Reprod Fertil Develop 2010;22:67-74.

BARUSELLI PS, REIS EL, MARQUES MO, NASSER LF, BO GA. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science* 2004;82:479-86.

BARUSELLI PS, MARQUES MO, MADUREIRA EH, COSTA NETO WP, GRANDINETTI RR, BÓ GA. Superestimulação ovariana de receptoras de embriões bovinos visando o aumento de corpos lúteos, concentração de P4 e taxa de prenhez. Acta Scientiae veterinariae 2000;28:218.

BARUSELLI PS, MARQUES MO, CARVALHO NAT, BERBER RCA, VALENTIM R, CARVALHO FILHO AF, COSTA NETO WP, Follicular dynamics and pregnancy rate in embryo recipient (*Bos taurus* indicus x *Bos taurus* taurus) treated with "Ovsynch" protocol for fixed-time embryo transfer. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci 2003;40:96-106.

BERGFELT DR, LIGHTFOOT KC, ADAMS GP. Ovarian synchronization following ultrasound - guide transvaginal follicle ablation in heifers. Theriogenology 1994;42:895-907.

BINELLI M, THATCHER WW, MATTOS R, BARUSELLI PS. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. Theriogenology 2001;56:1451-63.

BO GA, ADAMS GP, CACCIA M, MARTINEZ M, PIERSON RA, MAPLETOFT RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progesterone and estradiol in cattle. Animal Reproduction Science 1995 ;39:193-204.

BÓ GA, BARUSELLI PS, MORENO D, CUTAIA L, CACCIA M, TRÍBULO R, TRÍBULO H, MAPLETOFT RJ. The control of follicular wave development for selfappointed embryo transfer programs in cattle. Theriogenology 2002;57:53–72.

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

BÓ GA, ADAMS GP, PIERSON RA, TRIBULO HE, CACCIA M, MAPLETOFT RJ. Follicular wave dynamics after estradiol-17β treatment of heifers with or without a progestogen implant. Theriogenology 1994;41:1555-69.

CARVALHO JB, CARVALHO NA, REIS EL, NICHI M, SOUZA AH, BARUSELLI PS. Effect of early luteolysis in progesterone based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. Theriogenology 2008;69,167-75.

CASTRO JÚNIOR JD, SALES JNS, CREPALDI GA, AYRES H, FERREIRA RM, BARUSELLI PS. Efeito do tratamento com diferentes indutores da ovulação (cipionato e benzoato de estradiol) e do momento da inseminação artificial (48 e 54h após a retirada do implante de norgestomet) na taxa de prenhez de vacas nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. In: XXII REUNIÃO ANUAL DA

SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 2008, Guarujá. Acta Scientiae Veterinariae. 2008;36:617.

COLAZO MG, BÓ GA, ILLUMINANTI H, MEGLIA G, SCHMIDT, EE, BARTOLOMÉ J. Fixed-time artificial insemination in beef cattle using CIDR-B devices, progesterone and estradiol benzoate. Theriogenology 1999;51:404 (abstr).

COLAZO MG, KASTELIC JP, WHITTAKER PR, GAVAGA QA, WILDE R, MAPLETOFT RJ. Fertility in beef cattle given a new or previously used CIDR insert and estradiol, with or without progesterone. Theriogenology 2004;60:855–65.

COLAZO MG, KASTELIC JP, MAPLETOFT RJ. 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 2003;60:855-65.

CREPALDI GA. Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF. Dissertação de Mestrado, Departamento de Reprodução Animal- FMVZ-USP, 2009.

CUTAIA L, MORENO D, VILLATA ML, BÓ GA. Syncrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 hours later. Theriogenology 2001;55:408 (abstr).

DALTON JC, SAACKE RG. Parâmetros da Qualidade do Sêmen para Programas de Sincronização. In: curso novos enfoques na produção e reprodução de bovinos, 11., 2007, Uberlândia. 2007:154-61.

DRANSFIELD MB, NEBEL RL, PEARSON RE, WARNICK LD. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. J Dairy Sci 1998;81:1874-82.

GINTHER OJ, WILTBANK MC, FRICKE PM, GIBBONS JR, KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. Biological Reproduction 1996;55:1187-94.

HUNTER RHF. Causes for failure of fertilization in domestic species. In**:** Embryonic Mortality in Domestic Species. CRC Press, Boca Raton, FL, VS, 1994:1–22.

KESLER DJ, FAVERO RJ. Estrus synchronization in beef females with norgestomet and estradiol valerate. Part 1: Mechanism of action. *Agriculture Practice* 1995;16:6-11.

KINDER JE, KOJIMA FN, BERGFELD EG, WEHRMAN ME, FIKE KE. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. J Anim Sci. 1996;74:1424-40.

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 Scencei 1993;33:1-25.

MAIO JRG, SALES JNS, CREPALDI GA, BARUSELLI OS, CARVALHO MM, SENEDA MM. Perfil plasmático de progesterona e taxa de prenhez à IATF de fêmeas

bovinas tratadas com Sincrogest (Dispositivo Intravaginal de Progesterona). A Hora Veterinária 2008;165:41-4.

MAIO JRG, SANDOVAL GAF, SOUZA EDF, NOGUEIRA GP, CIPRIANO RS, PERECIN F, GARCIA JM. Concentração sérica de LH em vacas Nelore ciclando ou ovariectomizadas submetidas ao tratamento com 2,0mg de Benzoato de estradiol. Acta Scientiae veterinariae 2006;34:360.

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 *Bos taurus* taurus x *Bos taurus* indicus no período pós-parto. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 5., 2003a, Córdoba. **Anais...**Córdoba: Instituto de Reproducción Animal de Córdoba 2003a:392.

MARTINEZ MF, ADAMS GP, KASTELIC JP, BERGFELT DR, MAPLETOFT RJ. Induction of follicular wave emergence for estrus synchronization and artificial insemination in heifers. Theriogenology 2000;54:757-69.

MARTINEZ MF, KASTELIC JP, BÓ GA, CACCIA M, MAPLETOFT RJ. Effects of oestradiol and some of this esters on gonadotrophin releasing and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. Animal Reproduction Science 2005;86:37–52.

MARTINEZ MF, ADAMS GP, BERGFELT D, KASTELIC JP, MAPLETOFT RJ. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. Anim Reprod Sci 1999;57:23-33.

MARTINS CM, CASTRICINI ESC, SÁ FILHO MF, GIMENES LU, BARUSELLI OS. Dinâmica folicular de vacas nelore tratadas com Cipionato ou Benzoato de estradiol em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. *Acta Scientiae Veterinariae* 2005b;33:285 (Resumo).

MARTINS CM, AYRES H, MELLO JE, DOMINGUEZ JH, SOUZA AH, FERREIRA RM, VALENTIN R, SANTOS ICC, BARUSELLI PS. Impact of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. *Animal Reproduction*. 2007. (submetido para publicação).

MARTINS CM, CASTRICINI ESC, REIS EL, TORRES-JÚNIOR JRS, GIMENES LU, SÁ FILHO MF, BARUSELLI PS. Produção embrionária de vacas Holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. Acta Scientiae Veterinariae 2005;33:227 (Resumo).

MEDALHA AG, SÁ FILHO MF, FERREIRA RM, PENTEADO L, REZENDE CR, NASSER LFT, CREPALDI GA, SALES JNS, SOUZA MIL, BARUSELLI PS. Efeito do número de utilizações do dispositivo intravaginal de progesterona (DIB) na IATF de vacas Nelore (*Bos indicus*). In: XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 2009. Belo Horizonte. **Anais..**. Belo Horizonte. 2009:502.

MENEGHETTI M, SÁ FILHO OJ, PERES R, LAMB G, VASCONCELOS JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. Theriogenology 2009;72:179-89.

MURPHY BD, MARTINUK SD. Equine chorionic gonadotropin. Endocr. Rev. 1991;12:27–44.

NASSER LF, REIS EL, OLIVEIRA MA, BÓ GA, BARUSELLI PS. Comparison of four synchronization protocols for fixed-time bovine embryo transfer in *Bos indicus* X *Bos taurus* recipients. Theriogenology 2004;62:1577–84.

ODDE KG. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. Journal of Animal Science 1990;68:817–830.

PENTEADO L, AYRES H, TORRES-JÚNIOR JR, SOUZA AH, BARUSELLI PS. Taxa de concepção de vacas nelore lactantes sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao benzoato ou ao cipionato de estradiol. Acta Scientiae Veterinariae 2006a;34:401(Resumo).

PENTEADO L, MARQUES MO, SILVA RCP, AYRES H, SOUZA AH, BARUSELLI PS. Taxa de prenhez em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo em diferentes períodos pós parto. Acta Scientiae Veterinariae 2006;34:402 (Resumo).

PETERSON CA, HUHN JC, KESLER DJ. Norgestomet and oestradiol valerate-induced luteolysis is dependent upon the uterus. Animal Reproduction Science 2000;58: 253-9.

REIS EL, NASSER LFT, MENEGATTI JA, RESENDE LF, MANTOVANI AP, BARUSELLI PS. Effect of time and dose of eCG treatment in *Bos indicus* x *Bos taurus* recipients treated with progesterone for timed embryo transfer. In ‘International Congress on Animal Reproduction 2004:395 (abstract).

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

SÁ FILHO MF, GIMENES LU, TORRES-JÚNIOR JRS, CARVALHO NAT, KRAMER MPS, DE FARIA MH, BARUSELLI PS. Emergência folicular conforme a dose e o momento da aplicação de benzoato de estradiol e da sua associação com progesterona injetável em vacas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona. In: Anais VI Simpósio Internacional de Reproducción Animal, CD-ROM, Córdoba-Argentina, 2005.

SÁ FILHO MF, REIS EL, AYRES H, GIMENES LU, PERES AAP, CARVALHO CAB, CARVALHO JB, ARAUJO CASC, BARUSELLI OS. 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 2006;18:289 (Abstract).

SÁ FILHO MF, AMARAL JPB, MANTOVANI AP, REIS EL, NICHI M, BARUSELLI PS. Effect of synthetic progesterone (Afisterone®) administration at the moment of CIDR® insertion on follicular wave emergence in beef heifers. In: INTERNATIONAL

CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 1., 2004a, Porto Seguro. **Proceedings…** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal 2004:127.

SÁ FILHO MF, TORRES-JÚNIOR JRS, PENTEADO L, GIMENES LU, FERREIRA RM, AYRES H, CASTRO E PAULA LA, SALES JNS, BARUSELLI PS. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. ***Animal Reproduction Science*** 2010;118:182-7.

SÁ FILHO MF, BALDRIGHI JM, SALES JNS, CREPALDI GA, FERREIRA RM, CARVALHO JBP, BÓ GA, BARUSELLI PS. Induction of follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. Anim Reprod. Sci 2010b (enviado para publicação).

SÁ FILHO MF, SALES JNS, CREPALDI GA, GIROTTO RW, CAVALHEIRO I, BARUSELLI PS. 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.

SÁ FILHO OG, VASCONCELOS JLM. Emprego de dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) previamente utilizado por 27 dias em protocolo de sincronização da ovulação em vacas nelore pós-parto. Acta Scientiae veterinariae 2008;36:615.

SÁ FILHO OJ, MENEGHETTI M, PERES R, LAMB G, VASCONCELOS JLM. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. Theriogenology 2009;72:210-18.

SALES JNS, CREPALDI GA, CARVALHO JBP, GIROTTO RW, MAIO JRG, RODRIGUES MP, CARVALHO CAB, FERREIRA RM, AYRES H, BARUSELLI PS. Momento da ovulação e taxa de concepção de vacas Nelore tratadas com diferentes fontes de cipionato ou de benzoato de estradiol para induzir a ovulação em protocolos de IATF. Acta Scientiae Veterinariae 2008;36:486 (Resumo).

SALES JNS, CREPALDI GA, MAIO JRG, SOUZA EFD, CARREIRO SS, VERONEZ DG, NOGUEIRA GP, BARUSELLI PS. Perfil de liberação de LH após o tratamento com cipionato de estradiol em novilhas Nelore ovariectomizadas. Acta Scientiae Veterinariae 2008;35:1028 (Resumo).

SANTOS RM, VASCONCELOS JLM, PEREZ GC, SÁ FILHO OG, MACIEL ABB. Concentração sérica de progesterona em novilhas cruzadas Nelore/Angus tratadas com diferentes dispositivos intravaginais de progesterona. Acta Scientiae Veterinariae 2004; 32:217.

SAVIO JD, THATCHER WW, MORRIS GR, ENTWISTLE K, DROST M, ATTIACCI MR. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing device on follicular turnover and fertility in cattle. J. Reprod. Fertil 1993;98:77–84.

SOUZA AH, VIECHNIESKI S, LIMA FA, SILVA FF, ARAÚJO R, BÓ GA, WILTBANK MC, BARUSELLI PS. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. Theriogenology 2009;72:10–21.

STOCK AE, FORTUNE JE. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. Endocrinology 1993;132:1108-14.

TORRES-JÚNIOR JRS, SÁ FILHO MF, GIMENES LU, MADUREIRA EH, BARUSELLI PS. Effect of PGF2α administration at norgestomet implant insertion on follicular dynamics in Nelore (*Bos indicus*) heifers. In XIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. Acta Sci. Vet.2005;33:222.

WILTBANK MC, HAUGHIAN JM. GnRH: Bases fisiológicas para entender sua utilização em protocolos de sincronização. In: Curso novos enfoques na produção e reprodução de bovinos, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: CONAPEC Jr., 2003;1:121-31.

Tabela 1. Efeito do tipo de estradiol (benzoato de estradiol ou valerato de estradiol) na indução da emergência de uma nova onda de crescimento folicular em vacas e novilhas *Bos indicus* tratadas com implante auricular contendo Norgestomet.

	Tratamento						*Valor de P*		
	Novilhas			Vacas					
	BE	½ VE	VE	BE	½ VE	VE	Categoria	Estradiol	Interação
Número de animais	10	10	9	10	10	10	---	---	---
Emergência (dias)	2.5±0.2[a]	4.2±0.3[b,x]	6.1±0.6[c,x]	2.5±0.2[a]	3.1±0.4[ab,y]	4.0±0.5[b,y]	0.002	<0.0001	0.05
Variação	2-3	3-6	3-8	2-4	2-6	2-6	---	---	---

[a,b,c] Valores de emergência de onda de acordo com a categoria (novilha ou vaca) diferem estatisticamente (a≠b≠c; $P < 0.05$).

[x,y] Valores de emergência de onda de acordo com o estradiol (EB, ½ EV or EV) diferem estatisticamente (x≠y; $P < 0.05$).

Tabela 2. Efeito do momento da administração do Benzoato de estradiol e da IATF na taxa de concepção em vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes.

	IATF	N	Taxa de concepção (%)
BE Dia 8*	48 h (manhã)	119	58,8 (70/119)[a]
	54 h (tarde)	134	34,3 (46/134)[b]
BE Dia 9	48 h (manhã)	126	58,7 (74/126)[a]
	54 h (tarde)	125	63,2 (79/125)[a]

***momento da retirada do dispositivo, a≠b, P < 0.05.**

Tabela 3. Taxas de prenhez e ovulações múltiplas, número e área do corpo lúteo em receptoras tratadas com implante auriculares de norgestomet e benzoato de estradiol, eGC e PGF em protocolos de 3, 4 e 5 manejos (Ferreira et al., 2006).

	Controle (5 manejos)	BE (4 manejos)	CE (3 manejos)	*P* value
Aproveitamento (%)	92/100 (92,0)	93/100 (93,0)	96/100 (96,0)	> 0,05
Concepção (%)	42/92 (45,6[a])	42/93 (45,2[a])	59/96 (61,5[b])	0,03
Prenhez (%)	42/100 (42,0[a])	42/100 (42,0[a])	59/100 (59,0[b])	0,02
N. de CL	1,51 ± 0,89[b]	1,11 ± 0,32[a]	1,19 ± 0,64[a]	0,0002
Área do CL (cm^2)	3,55 ± 0,99[b]	3,14 ± 0,86[a]	3,21 ± 0,94[a]	0,03
Superovulação (%)	31/100 (31,0[b])	11/100 (11,0[a])	13/100 (13,0[a])	0,002

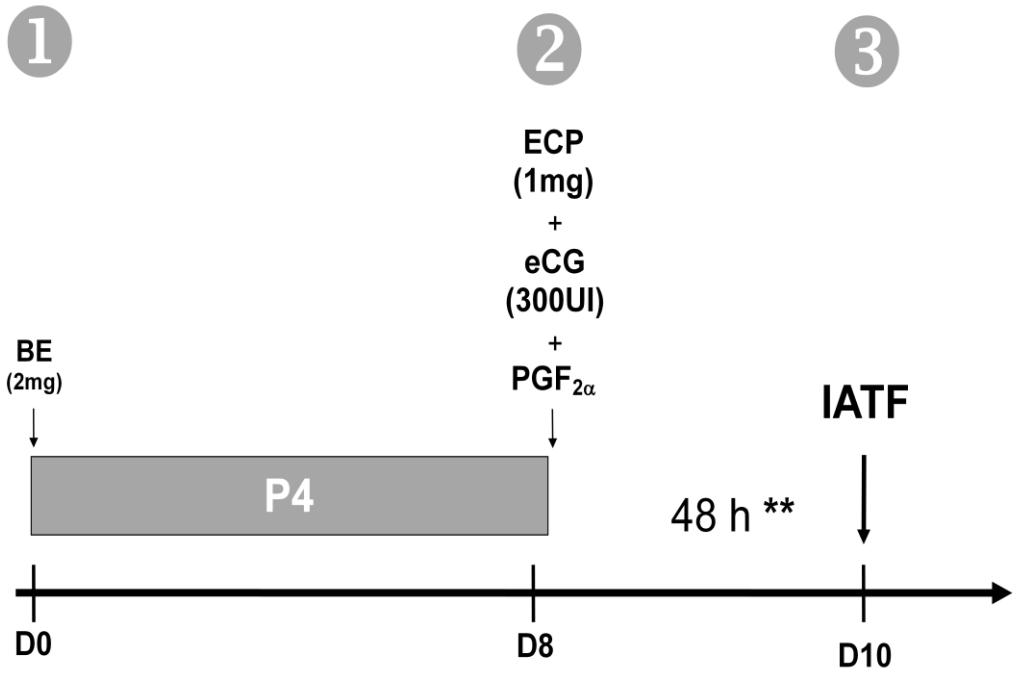


Figura 1. Protocolo para IATF em vacas lactantes com período precoce utilizando somente três manejos. ** No caso de dispositivos novos a IATF pode ser realizada tanto as 48 quanto as 54 horas após a remoção dos dispositivos.

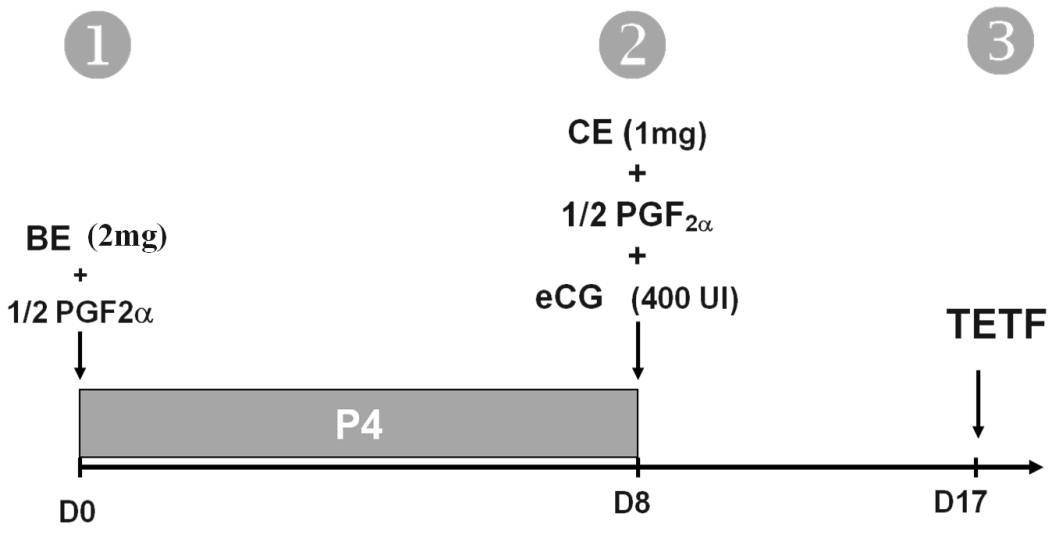


Figura 2. Novo protocolo para transferência de embriões em tempo fixo. No caso do emprego de implante auricular de norgestomet (Crestar®), recomenda-se a administração de prostaglandina (PGF2α) somente no Dia 8.

TÉCNICAS DE SINCRONIZAÇÃO PARA SUPEROVULAÇÃO DE DOADORAS *BOS TAURUS E BOS INDICUS*

Oliveira, A.C.S.[1]; Rosa, F.S[2].; Ereno, R.L.[2]; Barros, C.M.[2]

[1]Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ - UNESP, Botucatu;
[2]Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências de Botucatu, São Paulo, Brasil, cmbarros@ibb.unesp.br

A indução de ovulação múltipla para a produção e transferência de embriões é uma das biotécnias da reprodução mais importantes para acelerar o melhoramento genético do rebanho bovino. Na última década inúmeros tratamentos superovulatórios foram desenvolvidos, porém, não se observou aumento no número de embriões viáveis produzidos nas fêmeas bovinas superestimuladas. O tratamento hormonal denominado protocolo P-36, possibilita sincronizar o momento da ovulação e viabiliza a inseminação em tempo fixo (IATF) em doadoras de embriões. Na presente revisão serão enfatizados aprimoramentos no protocolo P-36, entre eles a substituição das últimas duas doses de pFSH por eCG ou LH. Estudos recentes indicam que um estímulo extra de LH (por meio da aplicação de eCG ou LH), no último dia do tratamento superestimulatório, pode aumentar o número de embriões viáveis de doadoras zebuínas e taurinas.

Palavras-chave: Superovulação, transferência de embriões, bovino, FSH, eCG, LH.

INTRODUÇÃO

O agronegócio brasileiro destaca-se por contribuir com 25,1% do produto interno bruto (PIB) do país (CEPEA, 2007). A pecuária bovina insere-se neste contexto por possuir o maior rebanho comercial do mundo. Dentre as raças de corte, a Nelore (*Bos indicus)* é a que possui o maior contingente numérico (acima de 100 milhões de cabeças, ACNB, 2008)

Em decorrência da facilidade de adaptação ao ambiente tropical, os zebuínos, predominam não só no Brasil como em muitos países do hemisfério sul, contrastando com o hemisfério norte, onde prevalecem as raças européias (*Bos taurus*).

Nesse contexto, a indução de ovulação múltipla (superovulação) para a produção e transferência de embriões (TE) insere-se como uma das biotecnologias mais importantes para acelerar o melhoramento genético de nosso gado zebuíno. Sendo assim a utilização dessas biotécnicas tem sido amplamente difundida entre os rebanhos de elite, a fim de aperfeiçoar as linhagens populacionais já existentes, tendo como principal objetivo, obter o máximo número de embriões com altas taxas de prenhez (MAPLETOFT e PIERSON, 1993). Todavia, há uma variação individual na resposta ao tratamento superestimulatório com gonadotrofinas pelas doadoras de embriões, esta variabilidade na resposta ovariana continua a ser um dos maiores entraves nos programas comerciais de TE (ADAMS, 1994; ARMSTRONG, 1993; BOLAND e ROCHE, 1993; BARROS e NOGUEIRA, 2001), apesar das diversas pesquisas realizadas nesta área (CALLESEN et al., 1987; DEL CAMPO et al., 1990; HYTELL et al., 1991; STOCK et al., 1996; NOGUEIRA et al., 2002).

Com o advento da ultra-sonografia e o conhecimento da dinâmica folicular para bovinos (SAVIO et al., 1988; SIROIS e FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989), tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o

crescimento folicular e o momento da ovulação, viabilizando a IA com tempo fixo (IATF) (BARROS et al., 1998). Similarmente, o desenvolvimento folicular e o momento da ovulação podem ser controlados farmacologicamente para melhorar os tratamentos superovulatórios empregados na TE (BARROS e NOGUEIRA, 2001; NOGUEIRA et al., 2002; BARUSELLI et al., 2006; BARROS et al., 2010).

Dentre os tratamentos superovulatórios utilizados, Barros e Nogueira (2001) desenvolveram um protocolo no qual a fonte de progesterona é mantida por 36 horas após a aplicação de PGF2α (daí a denominação P-36) e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 horas mais tarde. Graças à administração exógena de LH é possível controlar o momento da ovulação, que ocorre entre 24 e 36 horas após a injeção de LH (NOGUEIRA e BARROS, 2003). Consequentemente, a IA é realizada em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após a aplicação de LH, dispensando a detecção do cio das doadoras.

Entretanto, a utilização do protocolo P-36 em raças européias diminui o número de embriões viáveis quando comparado a protocolos convencionais com observação do estro. Esta observação motivou ajustes no mesmo, a fim de torná-lo eficaz também, em raças européias. Nas raças Holandesa (MARTINS et al., 2005) 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 PGF2α. De forma similar, resultados obtidos por Barcelos et al. (2006), na raça Bonsmara (⅝ Africâner e ⅜ Hereford e Shorthorn) indicam que a aplicação de pLH 60 h após a PGF2α, pode ser vantajosa também para esta raça. Além disso, estes autores testaram outra modificação no protocolo P-36, ou seja, substituíram as duas últimas doses de pFSH 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 entre os tratamentos, os resultados promissores estimularam novos experimentos com a eCG na raça Nelore.

Recentemente, Barcelos et al. (2007) testaram, em vacas da raça Nelore, se a substituição do pFSH por eCG (Novormon®, 2 doses 200UI), no último dia do tratamento superestimulatório, aumentaria o crescimento folicular, a taxa de ovulação e a produção de embriões. 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. Apesar de não ter ocorrido aumento significativo na média de embriões viáveis nas vacas tratadas com eCG (7,30±1,20) quando comparadas as que não receberam esta gonadotrofina (5,10±1,10), o número total de embriões viáveis produzidos pelas vacas tratadas com o protocolo foi de 146 e 102, respectivamente para os protocolos P-36/eCG e P-36/LH48, desta forma fica evidente a vantagem de se substituir as duas últimas doses de pFSH por eCG.

Entretanto, o uso frequente de eCG na espécie bovina induz a formação de anticorpos (BECKERS et al., 1995; ROY et al., 1999) e diminui a produção de embriões viáveis (BARUSELLI et al., 2007). Por este motivo seria desejável substituir o eCG por uma molécula que não induza a formação de anticorpos.

Objetiva-se com a presente revisão de literatura ressaltar os avanços recentes nos tratamentos utilizados para induzir a ovulação múltipla em doadoras de embriões.

FOLICULOGÊNESE E DINÂMICA FOLICULAR

A foliculogênese bovina é um processo contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos (MATTON et al., 1981; WOOLUMS e PETER, 1994), que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade (EVANS et al., 1994) e continua na vida reprodutiva até a senelidade (HAFEZ, 1993). Este processo está presente inclusive no pós-parto que precede a ciclicidade (ROCHE et al., 1992; MCDOUGALL et al., 1995) e durante a prenhez (TAYLOR e RAJAMAHENDRAN, 1991). Em bovinos, são necessários cerca de três meses para que os folículos pré-antrais (primordial) cresçam até o estágio de folículo pré-ovulatório (WEBB et al., 2003).

Os folículos encontrados nos ovários de uma fêmea pré-púbere podem ser classificados em: primordiais em repouso (primário), pré-antrais em crescimento (secundário), antrais em maturação (terciários) e folículo pré-ovulatório (WOOLUMS e PETER, 1994).

O início do crescimento folicular (ativação) inicia-se com a transformação das células planas da pré-granulosa do folículo primordial em uma única camada de células da granulosa cubóides, formando o folículo primário. O folículo secundário surge a partir da proliferação das células da granulosa em duas a seis camadas ao redor do oócito. Ambos são folículos pré-antrais. O passo seguinte da foliculogênese é a formação do antro, a partir da secreção de fluído folicular pelas células da granulosa (LUSSIER et al., 1987; BRAW-TAL et al., 2005).

O fluido folicular é um meio de suporte nutricional e de desenvolvimento do ovócito, bem como um veículo no qual o ovócito é transportado para a tuba uterina durante a ovulação (WOOLUMS e PETER, 1994). O fluído é rico em glicoproteínas como a inibina (inibe a secreção de FSH e o crescimento de folículos subordinados) (DEKHESTER e ROBERTSON, 1989; RICE, 1991), a folistatina (suprime a liberação de FSH e se liga à ativina bloqueando sua atividade) e a ativina (estimula a síntese e/ou a liberação do FSH), (KNIGHT, 1996).

O processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos antrais ovarianos que induz o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório é conhecido como dinâmica de crescimento folicular, enquanto que o padrão de crescimento e atresia de um grupo de folículos ovarianos é denominado onda de crescimento folicular (LUCY et al., 1992). O crescimento folicular em padrão de ondas ocorre em vários estágios da vida reprodutiva, como no período anterior à puberdade (6 a 8 meses de idade, ADAMS et al., 1992; EVANS et al., 1994), durante o ciclo estral, a gestação (GINTHER et al., 1996b) e no pós-parto (MURPHY et al., 1990; SAVIO et al., 1990a, b).

A dinâmica de crescimento folicular dos bovinos é caracterizada pela presença de duas ou três ondas de crescimento folicular (SAVIO et al., 1988; SIROIS e FORTUNE, 1988; GINTHER et al., 1989; FIGUEIREDO et al., 1997; VIANA et al., 2000; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2007; GIMENES et al., 2008) e, esporadicamente, uma ou quatro ondas (SAVIO et al., 1988; SIROIS e FORTUNE, 1988; MURPHY et al., 1990; VIANA et al., 2000).

A emergência da onda folicular, também denominada de recrutamento folicular, consiste na emergência simultânea de um grupo de folículos com diâmetro aproximado de 4 a 5 mm (GINTHER et al., 1996a) estimulados por um aumento transitório do FSH (FORTUNE, 1993). Mais recentemente, com o avanço na qualidade dos aparelhos de ultra-sonografia acoplados a transdutores de 9,0 MHz, foi possível a visualização de folículos com diâmetro a partir de 1,0 mm (JAISWAL et al., 2004; ERENO, 2008). Além disso, pode-se observar a emergência da onda folicular cerca de 12 horas antes da ovulação (ERENO, 2008) ou 48 horas antes do surgimento de folículos de 4 mm (JAISWAL et al., 2004).

Aproximadamente três dias após a emergência folicular (folículos com 4 a 5 mm), quando o maior folículo atinge o diâmetro médio de 8,5 mm para *Bos taurus* (GINTHER et al., 1996a), ocorre o evento denominado desvio folicular, momento em que ocorre diferença na taxa de crescimento entre os dois maiores folículos da onda (GINTHER et al., 1996a, 1997).

Do ponto de vista ultra-sonográfico, pode-se definir a seleção pelo momento do "desvio" folicular. Os mecanismos de seleção são controversos, mas provavelmente o folículo selecionado apresenta mais precocemente a capacidade de responder ao estímulo promovido pelo LH (DRIANCOURT, 2001; SARTORI et al., 2001). Em resposta ao LH o folículo selecionado continua a crescer e sua capacidade de produzir estradiol e inibina aumenta. Desta forma, o folículo selecionado exerce "dominância" sobre os demais folículos, ou seja, inibe o crescimento dos outros folículos ovarianos (KARSH et al., 1997).

Apesar do mecanismo preciso para a seleção do folículo dominante ainda não estar completamente elucidado, sabe-se que durante este evento além do possível papel do LH e seus receptores estão também envolvidos os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGFs), que parecem desempenhar papel importante neste processo (FORTUNE et al., 2004). Embora não se tenha encontrado diferenças nas concentrações de IGF total de folículos dominantes em relação aos subordinados (DE LA SOTA et al., 1996), a concentração de IGF-I livre foi maior no fluido folicular do maior folículo comparado ao segundo maior da mesma onda, mesmo antes da observação de diferenças no diâmetro e na concentração de estradiol (BEG et al., 2002). Essas observações sugerem a existência de um sistema modulador da disponibilidade de IGF intrafolicular, diferencialmente regulado em folículos dominantes e subordinados, o que permitiria ao maior folículo ter uma dominância bioquímica antes do estabelecimento da dominância morfológica (FORTUNE et al., 2004).

Austin et al. (2001) propuseram que as primeiras mudanças intrafoliculares que distinguem o folículo destinado a tornar-se dominante dos outros folículos da população em crescimento, seria a capacidade aumentada em produzir estradiol e a manutenção de baixos níveis de IGFBPs. O aumento nas concentrações intrafoliculares de estradiol, bem como os de ativina A e a diminuição dos níveis de IGFBP-2 e -4 estão relacionados à dominância folicular (GINTHER et al., 2002; KOJIMA et al., 2003).

Na presença de um corpo lúteo (CL) funcional e de altas concentrações plasmáticas de progesterona, há decréscimo na freqüência de pulsos de LH (ROBERSON et al., 1989). Conseqüentemente, o folículo dominante sofre atresia e falha em ovular (GINTHER et al., 1989; LUCY et al., 1992; STOCK e FORTUNE, 1993).

Em determinado momento do ciclo estral (17 a 20 dias após a ovulação) o CL sofre regressão morfológica e funcional causada pela liberação de PGF2α proveniente do endométrio (HORTON e POYSER, 1975). Este processo, denominado luteólise, é caracterizado pela queda na produção de progesterona e fragmentação dos componentes celulares, incluindo a redução do suporte vascular, a proliferação do tecido conjuntivo, a desorganização celular, a degeneração e a fagocitose das células luteais (MILVAE et al., 1996). Como resultado, ocorre queda nas concentrações plasmáticas de progesterona (<1 ng/mL), permitindo a ovulação do folículo dominante por meio do pico pré-ovulatório de LH.

CONTROLE DA DINÂMICA FOLICULAR E TRATAMENTOS SUPERESTIMULATÓRIOS

Segundo Adams et al. (1994), aproximadamente 20 a 30 folículos de 3 a 4 mm de diâmetro emergem em cada onda folicular em fêmeas taurinas e boa parte desses folículos tem o potencial de atingir o estágio pré-ovulatório, fato esse que pode ser demonstrado pela possibilidade de estimular o crescimento e a ovulação de vários folículos através da administração de gonadotrofinas . Ao passo que, em fêmeas zebuínas, a emergência de uma onda folicular conta com aproximadamente 45 folículos de 3 a 4 mm de diâmetro (BURATINI et al., 2000).

Diversos tratamentos capazes de promover a ovulação múltipla (superovulação) foram propostos (GORDON, 1996; BARROS e NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI et al., 2006; BARROS et al., 2010). Dentre os fármacos testados destacam-se a gonadotrofina coriônica equina (eCG) administrada isoladamente (ROWSON et al., 1972; ELSDEN et al., 1976; BOLAND et al., 1978) ou associada a soro anti-PMSG (DIELEMAN et al., 1987; ALFURAIJI et al., 1993; GONZALEZ et al., 1994) e o hormônio folículo estimulante (pFSH) proveniente de extrato de pituitárias de suínos, ovinos e equinos (DONALDSON, 1989) ou ainda, FSH recombinante bovino (LOONEY e BONDIOLI, 1988; BELLOWS et al., 1991; WILSON et al., 1993).

Devido à função de estimular o crescimento folicular ovariano, desempenhada pelo hormônio folículo estimulante (FSH), a utilização deste como agente indutor de superovulação foi amplamente pesquisada. Esses estudos envolveram dose, eficiência de produtos comerciais e diferenças na proporção FSH:LH das várias apresentações comerciais (DONALDSON e WARD, 1987; DONALDSON, 1990). Os trabalhos evidenciaram a diferença de potência do FSH (BRAILEANU et al., 1998) e a variação da relação FSH:LH existente não só entre diferentes produtos comerciais, como também no mesmo produto.

Altas concentrações de LH promovem um efeito negativo relacionado à qualidade e produção embrionária bovina, demonstrado por Donaldson et al. (1986), Gonzalez et al. (1990) e Mapletoft et al. (1993), a partir desses trabalhos foi sugerido que o máximo de contaminação de LH no FSH não ultrapasse 20%.

A produção embrionária também pode ser afetada diante da presença de um folículo dominante no início do tratamento superestimulatório (GUIBAULT et al., 1991; LUSSIER et al., 1995). A fim de evitar o folículo dominante no início dos tratamentos, algumas estratégias foram desenvolvidas, como por exemplo, começar a superestimulação com FSH no primeiro dia do ciclo estral (GOULDING et al., 1990; ROBERTS et al., 1994; STOCK et al., 1996), aspirar o folículo dominante ou todos os folículos acima de 5 mm de diâmetro antes da superestimulação com gonadotrofinas (BERGFELT et al., 1994; BODENSTEINER et al., 1996; HILL e KUEHNER, 1996) e sincronizar o início das ondas foliculares (BÓ et al., 1995, 2003).

O uso de dispositivos intravaginais liberadores de progesterona (DIV) é uma das principais estratégias utilizadas para promover a sincronização da emergência da onda folicular em taurinos e zebuínos. Uma série de trabalhos publicados por R. J. Mapletoft e G. A. Bó (revisto por BÓ et al., 1995, 2003) caracterizaram o uso de dispositivos intravaginais à base de progesterona associados à administração de estrógenos (estradiol 17-β ou benzoato de estradiol) como agentes promotores da atresia folicular e, consequentemente, capazes de originar uma nova onda folicular, cerca de 3 a 4 dias após o início dos tratamentos. A fim de evitar a presença de um folículo dominante o tratamento superestimulatório com FSH começa concomitantemente com a nova onda folicular, ou seja, 4 ou 5 dias após a colocação do dispositivo intravaginal e aplicação de estrógeno. Dois dias após a primeira aplicação de FSH, é administrada uma dose

luteolítica de PGF2α 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 inovulados ou ainda criopreservados. Como atrativos este protocolo apresenta a possibilidade de ser iniciado aleatoriamente em relação ao ciclo estral e ainda dispensa a observação do cio base. Porém, traz a inconveniência da detecção do estro para a inseminação artificial das doadoras.

INDUÇÃO DA OVULAÇÃO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO NAS DOADORAS SUPERESTIMULADAS

A detecção do estro é um dos maiores entraves nos programas de coleta e transferência de embriões, particularmente em fêmeas superovuladas, tendo em vista que tanto o estro, quanto o pico endógeno de LH e ainda a ovulação são extremamente variáveis (BÓ et al., 2006). Somado a essas ressalvas, a curta duração (em torno de 11 horas) associada à incidência de estro noturno em *B. indicus* (PINHEIRO et al., 1998), dificultam a detecção e prejudicam a implantação de programas convencionais de IA (BARROS et al., 1995, PINHEIRO et al., 1998, MIZUTA, 2003).

Em função dessas inconveniências, muitos foram os estudos desenvolvidos na tentativa de permitir a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em fêmeas bovinas submetidas à superovulação (BARROS e NOGUEIRA, 2001 e 2005; BARUSELLI et al., 2006; BARROS et al., 2010). Ademais, sugeriu-se que folículos não ovulados, após a superestimulação farmacológica, provavelmente apresentavam desenvolvimento anormal, ou ainda insuficiência na quantidade de receptores de LH, dessa forma seriam incapazes de responder ao pico pré-ovulatório de LH (XU et al., 1995; D'OCCHIO et al., 1997; LIU et al., 1998). Por esse motivo promover o atraso do pico pré-ovulatório de LH poderia ampliar o número de embriões obtidos D'OCCHIO et al., 1997; VAN DE LEEMPUT et al., 2001).

Tendo como base trabalhos desenvolvidos por pesquisadores holandeses (VOS et al., 1994; VOS et al., 1995; VAN DE LEEMPUT et al., 2001) e australianos (D'OCCHIO et al., 1997), Barros e 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 e NOGUEIRA, 2001; NOGUEIRA et al., 2002). Estes protocolos não aumentaram significativamente o número de embriões viáveis quando comparados a protocolos com detecção do estro. Contudo, esses novos trabalhos forneceram informações importantes, que permitiram o controle do momento da ovulação e conseqüentemente a utilização da IATF e ainda a manutenção de níveis plasmáticos médios (ao redor de 1,5 a 2,5 ng/mL) de progesterona após a última aplicação de FSH. A manutenção dos níveis de progesterona elevados poderia ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário, se mantida durante tempo prolongado (BARROS e NOGUEIRA, 2001; MELO et al., 2004).

Baseado nos dados obtidos a partir desses estudos foi desenvolvido um protocolo no qual a fonte de progesterona é mantida por até 36 horas após a aplicação de PGF2α, por esse motivo recebeu a denominação P-36 (BARROS e NOGUEIRA, 2001) e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12 horas mais tarde (ou seja, 48 horas após a aplicação de PGF2α). Devido à administração exógena de LH é possível controlar o momento da ovulação, que ocorre entre 24 e 36 horas após a injeção de pLH (NOGUEIRA e BARROS, 2003). Consequentemente, a inseminação artificial é realizada em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após aplicação de LH, dispensando a detecção do cio das doadoras.

A diminuição da dose de 25 para 12,5 mg de pLH em vacas Nelore não altera significativamente o número de embriões viáveis (9,8±1,09, e 9,2±0,77, respectivamente) ou a taxa de viabilidade (73,7 e 69,5%, respectivamente; NOGUEIRA et al., 2002; NOGUEIRA e BARROS, 2003). Outrossim, é possível utilizar-se de diversas fontes exógenas de progesterona sem que hajam alterações na produção de embriões (BARROS e NOGUEIRA, 2005; BARUSELLI et al., 2006, NOGUEIRA e BARROS, 2006).

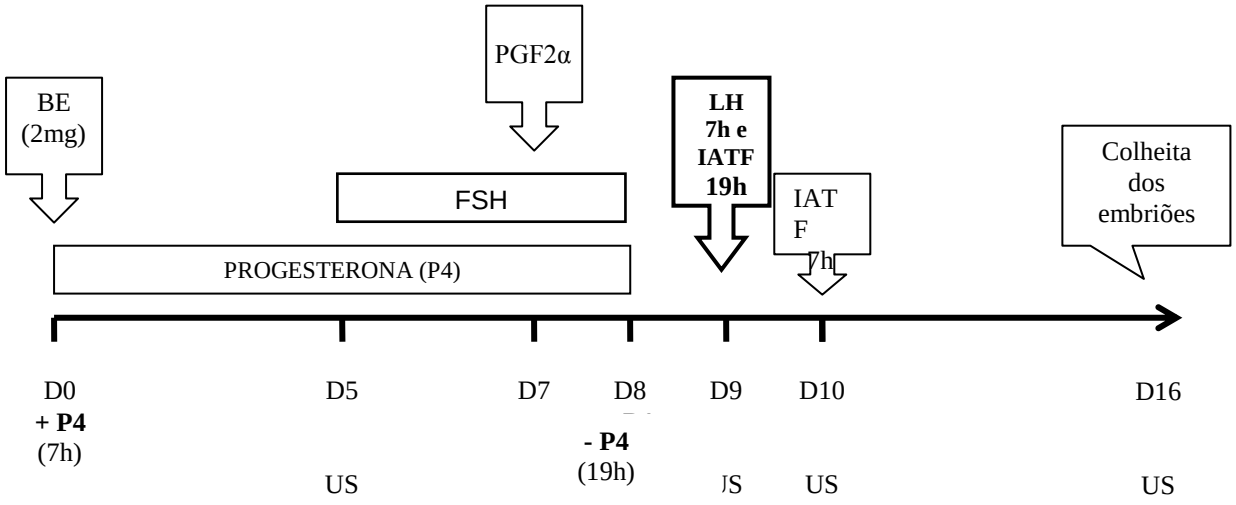


Figura 1. Protocolo de superovulação conhecido como P-36.

PARTICULARIDADES DO PROTOCOLO P-36

Em várias publicações o protocolo P-36 tem sido apontado como eficaz em animais da raça Nelore (BARROS e NOGUEIRA, 2001; BARROS e NOGUEIRA, 2005; BARUSELLI et al., 2006, NOGUEIRA et al., 2007). Em 2007, Nogueira e colaboradores relataram em 136 coletas a média de 13,3±0,75 estruturas totais e 9,4±0,63 embriões viáveis, com 71,0% (1279/1807) de viabilidade, em doadoras da raça Nelore tratadas com o protocolo P-36. Todavia, quando doadoras taurinas (*Bos taurus*) são submetidas a este protocolo, o número de estruturas totais tem sido insatisfatório (BARUSELLI et al., 2006). Estes resultados podem ser atribuídos às particularidades fisiológicas que diferenciam vacas *Bos taurus* e *Bos indicus.* Dentre elas, o diâmetro folicular, sendo que fêmeas *Bos taurus* atingem a fase de desvio folicular com diâmetro superior ao de fêmeas *Bos indicus* (8,5 mm para *Bos taurus*; GINTHER et al., 1996a e 6,1 mm para *Bos indicus*; SARTORELLI et al., 2005). Deste modo supõe-se que os folículos de fêmeas taurinas, para atingirem capacidade ovulatória, necessitem alcançar diâmetros maiores do que as fêmeas zebuínas.

De fato Sartori et al. (2001) verificaram que fêmeas *Bos taurus* ovulam à administração de LH somente folículos com diâmetro acima de 10 mm ao passo que Gimenes et al. (2008) e Simões et al. (2010) observaram que fêmeas *Bos indicus* apresentaram capacidade ovulatória com folículos de diâmetro em torno de 8 mm, sendo que, a capacidade ovulatória está relacionada ao aumento do diâmetro folicular e expressão de receptores de LH nas células da granulosa (SIMÕES et al., 2010). Desta forma, protocolos nos quais, a administração do indutor da ovulação (pLH) é atrasada 12 horas (P-36/LH60), talvez por disponibilizar maior tempo para que os folículos atinjam

diâmetros condizentes com a capacidade ovulatória, são mais efetivos em fêmeas taurinas do que o protocolo P-36/LH48 (MARTINS et al., 2005).
Esta hipótese motivou alterações no protocolo P-36, tanto na raça Holandesa (MARTINS et al., 2005) quanto na Angus (CHESTA et al., 2007, ROSA et al., 2009) 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 PGF2α. De forma similar, resultados obtidos por Barcelos et al. (2006), na raça Bonsmara (⅝ Africâner e ⅜ Hereford e Shorthorn) indicam que a aplicação de pLH 60 h após a PGF2α, pode ser vantajosa também para esta raça.

USO DA ECG OU LH COMO AGENTE SUPEROVULATÓRIO

Várias publicações destacam o uso da gonadotrofina coriônica da égua prenhe (eCG) como agente superovulatório, (ROWSON et al., 1972; ELSDEN et al., 1976; BOLAND et al., 1978). Produzida pelos cálices endometriais da égua prenhe entre os dias 40° a 120º de gestação (COMBARNOUS, 1992), quando administrada em outras espécies a eCG pode exercer atividade tanto de FSH como de LH. Nos bovinos essa gonadotrofina apresenta longo tempo de ação, variando de 50 a 100 horas, devido à proporção de ácido siálico (10 a 15%) presente em sua molécula (SCHAMS et al., 1978).
Em função da longa meia-vida, essa gonadotrofina persiste por até 10 dias na circulação das fêmeas bovinas, dessa forma pode ser administrada normalmente em uma única aplicação para promover a superestimulação (DIELEMAN et al., 1993). Enquanto que a meia vida do FSH na vaca foi estimada em 5 horas ou menos, por isso deve ser aplicada duas vezes ao dia, durante 4 dias, para induzir superovulação (MONNIAUX et al., 1983). A meia vida longa da eCG pode provocar uma estimulação contínua dos ovários, folículos anovulatórios, perfis endócrinos anormais e redução da qualidade embrionária (SAUMANDE et al., 1978; MIKEL-JENSON et al., 1982; MOOR et al., 1984). Entretanto, o uso da eCG em dose única, (2000 UI) após a sincronização do inicio da onda folicular com progesterona e benzoato de estradiol, originou um número semelhante de embriões viáveis e congeláveis quando comparado ao grupo que recebeu 8 aplicações de FSH em doses decrescentes (MARTINS et al., 2006).
Com o objetivo de melhorar a resposta superestimulatória das doadoras de embriões *B. indicus*, alguns estudos preconizaram alterações no protocolo superestimulatório à base de gonadotrofinas, com a finalidade de aumentar o crescimento folicular, a taxa de ovulação e a produção embrionária.
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, doadoras da raça 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). As vacas do grupo P-36 receberem o tratamento P-36 e no grupo P-36/eCG as duas últimas aplicações de pFSH foram substituídas por duas doses de 200 UI da gonadotrofina coriônica equina (eCG, total de 400 UI IM). Os autores observaram melhora na resposta superestimulatória (folículos ≥ 6 mm no momento da indução da ovulação) dos animais tratados com FSH-P/eCG em relação aos animais tratados apenas com FSH (21,05 ± 2,76 *vs.* 15,25 ± 2,06; $P < 0,01$; respectivamente). O número total de estruturas colhidas, também, foi maior no grupo P-36/eCG (10,0 ± 1,48 *vs*. 6,65 ± 1,18; $P \leq 0.03$). 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, consequentemente,

aumentou o número total de estruturas recuperadas. Apesar da média de embriões viáveis nas vacas tratadas com eCG não ter diferido, 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.

Resultados positivos também foram obtidos na raça Brangus, onde o protocolo P-36/eCG melhorou a quantidade de embriões viáveis (10,9±1,5) quando comparado ao protocolo P-36 (7,1±1,4; Reano et al., 2009). Porém, Sartori et al. 2008 não observaram aumento na produção de embriões ao compararem o protocolo P-24/eCG (3,7±0,5 embriões viáveis) com o P-24 (4,9±0,7) em novilhas Nelore. Já na raça Sindi (*Bos indicus*), os mesmos autores verificaram que a adição de eCG no protocolo P-36 aumentou o número de embriões viáveis (6,5±1,2 vs 2,4±0,7; p<0,01, MATTOS et al., 2010). Estes resultados indicam que a adição de eCG ao protocolo P-36 parece ser vantajosa, porém o seu uso no protocolo P-24 precisa ser melhor estudado. A diferença entre estes protocolos é que no P-24 a fonte de progesterona é retirada 12 horas antes, em relação ao P-36 e, conseqüentemente, pode permitir uma liberação precoce de LH que poderia adiantar a maturação oocitária e prejudicar a fertilização após a IATF.

Entretanto, Baruselli et al. (2008) demonstraram uma diminuição na resposta superovulatória após a terceira aplicação consecutiva de 2.000 UI de eCG, devido, provavelmente, à produção de anticorpos anti-eCG. Em cabras, já foi demonstrada a presença desses anticorpos após a utilização da eCG em protocolos de IATF, com consequente diminuição na fertilidade após a IA (Roy et al., 1999).

A fim de evitar os efeitos deletérios provocados pela utilização frequente da eCG, Rosa et al. (2010) trataram vacas Angus (n=22) com os protocolos P-36/LH60 (grupo controle), P-36/eCG (as últimas doses de FSH foram substituídas por duas doses de 200UI de eCG), P-36/LH (as duas últimas doses de FSH foram substituídas por duas doses de 1,0mg de LH) e P-36/FSH+LH (juntamente com as duas últimas doses de FSH foi administrado 1,0mg de LH). Os autores observaram que a substituição da eCG pelo LH (grupo P36/LH) resultou em declínio (p<0,05) no número de embriões viáveis, quando comparado aos outros grupos. No entanto, a adição de LH as duas últimas doses de FSH (P-36/FSH+LH) melhorou a qualidade e aumentou numericamente a quantidade total de embriões coletados (87) quando comparado ao grupo controle (43) e P-36/LH (13), e foi similar ao P36/eCG (67). Estes resultados indicam que a eCG não pode ser substituída apenas pelo LH (2,0mg) no último dia do tratamento superestimulatório de vacas Angus. Entretanto, a combinação FSH+LH pode ser utilizada no lugar da eCG, no último dia do tratamento superestimulatório.

Para verificar se o aumento na dose do LH poderia ter efeito benéfico na produção de embriões, Oliveira et al. (2010) distribuíram vacas Nelore (n=25) em quatro grupos: P-36, P-36/eCG, P-36/LH2,0 (as duas últimas doses de FSH foram substituídas por 2 doses de 1,0mg de LH) e P-36/LH4,0 (as duas últimas doses de FSH foram substituídas por 2 doses de 2,0mg de LH). Todas as doadoras foram superestimuladas quatro vezes e receberam todos os tratamentos ("*crossover*"). Apesar da tendência de diminuição na taxa de ovulação nas vacas do grupo LH2,0 quando comparadas às do grupo eCG (50,6 vs 67,8%, respectivamente, p=0,06), não houve diferença significativa na média de embriões viáveis recuperados nos quatro tratamentos: P-36 (3,3±0,7), P-36/eCG (4,5±0,5), P-36/LH2,0 (3,7±0,8) e P-36/LH4,0 (4,2±1,0). Os autores concluíram que a eCG pode ser substituída pelo LH (4,0mg), no último do tratamento superestimulatório sem afetar a viabilidade de embriões recuperados de vacas Nelore.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em suma, o protocolo P-36 facilitou o manejo de doadoras de embriões e originou taxas de embriões viáveis tão boas quanto às obtidas após a utilização de outros tratamentos superovulatórios, que requerem a detecção do estro. Trabalhos recentes indicam que um estímulo extra de LH (usando eCG ou LH), no último dia do tratamento superestimulatório do protocolo, pode melhorar a quantidade de embriões viáveis recuperados em bovinos (*Bos indicus e Bos taurus*).

REFERÊNCIAS

ACNB, Associação dos criadores de Nelore do Brasil, 2008. Disponível em: http://www.nelore.org.br. Acesso em: 14/05/2010.

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. Association between surges of FSH and emergence of follicular waves in heifers. **J. Reproduction Fertil.**, v.94, p.177-188, 1992.

ADAMS, G.P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, v.41, p.19-24 1994.

ALFURAIJI, M.M.; ATKINSON, T.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, J.S.M. Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG-monoclonal antibodies. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.99-109, 1993.

ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.39, p.7-24, 1993.

AUSTIN, E.J.; MIHM, M.; EVANS, A.C.O.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.L.H.; IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. Alterations in intrafollicular regulatory factors and apoptosis during selection of follicles in the first follicular wave of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v.64, p.839-848, 2001.

BARCELOS, A.C.Z.; SATRAPA, R.A.; NOGUEIRA, M.F.G. Superstimulatory protocol P-36 in Bonsmara breed: use of eCG and delay on induction of ovulation with LH. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.513, 2006.

BARCELOS, A.C.Z.; GOUVÊA, L.M.; MENEGHEL, M.; BARCELOS, D.S.; BARCELOS, L.N.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Efeito benéfico da substituição das duas últimas doses de pFSH por eCG no protocolo superestimulatório P-36, em vacas Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae,** v.35, p.1260, 2007.

BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; PINHEIRO, O.L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.19, p.9-22, 1995.

BARROS, C.M.; MOREIRA, M.B.P.; FERNANDES, P. Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de transferência de embriões. **Arq. Fac.Vet.**, UFRGS, supl.26, p.179-189, 1998.

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1483-1496, 2001.

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. **Embryo Transfer Newsletter**, v.23, p.5-9, 2005.

BARROS, C.M.; ERENO, R.L.; SIMÕES, R.A.L.; FERNANDES, P.; BURATINI, J.; NOGUEIRA, M.F.G. The use of knowledge on changing receptor population in the superstimulation of cattle. **Reprod. Fert. and Dev.**, v.22, p.132, 2010.

BARUSELLI, P.S.; DE SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BÓ G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006.

BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.205-211, 2007.

BARUSELLI, O.S.; MARTINS, C.M.; SALES, J.N.S.; FERREIRA, R.M. Novos avanços na superovulação de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.433-448, 2008.

BECKERS, J.F.; REMY, B.; BARIL, G.; FIGUEIREDO, J.R.; BUREAU, F.; SULON J.; SAUMANDE, J. Anti-eCG antibodies are transmitted via the colostrum in goats. **Theriogenology**, v.43, p.165, 1995.

BEG, M.A..; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; GINTHER, O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of Reproduction**, v.66, p.120-126, 2002.

BELLOWS RA, STAIGMILLER RB, WILSON JM, PHELPS DA, DARLING A. Use of bovine FSH for superovulation and embryo production in beef heifers. **Theriogenology**, v.35, p.1069-1082, 1991.

BERGFELT, D.R.; LIGHTFOOT, K.C.; ADAMS, G.P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, v.42, p.895-907, 1994.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.39, p.193-204, 1995.

BÓ, 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.

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.

BODENSTEINER, K.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Synchronization of emergence of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.45, p.1115-1128, 1996.

BOLAND, M.P.; CROSBY, T.F.; GORDON, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. **Theriogenology**, v.10, p.175, 1978.

BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Embryo production: alternative methods. **Mol. Reprod. Dev.**, v.36, p.266-270, 1993.

BRAILEANU, G.T.; ALBANESE, C. CARD C.; CHEDRESE, P.J. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. **Theriogenology**, v.49, p.1031-1037, 1998.

BRAW-TAL, R.; ROTH, Z. Gene expression for LH receptor, 17α-hydroxylase and STAR in the theca interna of preantal and early antral follicles in the bovine ovary. **Reprod.**, v.129, p.453-461, 2005.

BURATINI, JR. J.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BÓ, G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v.54 p.421-431, 2000.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Premature ovulations in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.28, p.155-166, 1987.

CASTILHO, C.; GARCIA, J.M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G.P.; BRITO, L.F. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (Bos indicus) heifers**. Theriogenology**, v.98, p.189-196, 2007.

CEPEA. Agribusiness. Piracicaba CEPEA, 2007; www.cepea.esalq.usp.br.

CHESTA, P.; TRIBULO, L.; TRIBULO, H.; BALLA, E.; BARUSELLI, P.S.; BO, G.A. Effect of time of ovulation induction by gonadotrophin releasing hormone or pituitary luteinizing hormone on ova/embryo production in superstimulated beef cows inseminated at a fixed time. **Reprod. Fert. and Dev.**, v.19, p.307, 2007.

COMBARNOUS, Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. **Endocrine Reviews**, v. 13, n. 4, p. 670-669, 1992.

DEKRESTER, D.M.; ROBERTSON, P.M. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. **Biology of Reproduction**, v.40, p.33-47, 1989.

DEL CAMPO, M.R.; BECERRA, F.; GONZALEZ, M.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation with three different commercial pituitary extracts in the cow. **Theriogenology**, v.33, p.208, 1990.

DE LA SOTA, R.L.; SIMMEN, F.A.; DIAZ, T.; THATCHER, W.W. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, p.803-812, 1996.

DIELEMAN, S.J.; BEVERS, M.M.; GIELEN, J.T.H. Increase of the number of ovulations in PMSG/PG-treated cows by administration of monoclonal anti-PMSG shortly after the endogenous LH peak. **Theriogenology**, v.27, p.222, 1987.

DIELEMAN, S.J.; BEVERS M.M.; VOS, P.L.A.M.; DE LOOS, F.A.M. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment. **Theriogenology**, v.39, p.25-41, 1993.

D'OCCHIO, M.J.; SUDHA, G.; JILLELA, D.; WHITE, T.; MACLELLAN, L.J.; WHLSH, J.; TRIGG, T.E.; 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**, v.47, p.601-613, 1997.

DONALDSON, L.E.; WARD D.N.; GLENN S.D. Use of porcin follicle stimulating hormone after chromatographic purification of cattle. **Theriogenology**, v.25, p.747-757, 1986.

DONALDSON, L.E.; WARD D.N. LH effects on superovulation and fertilization rates, **Theriogenology**, v.27, p.225, 1987.

DONALDSON, L.E. Porcine, equine and ovine FSH in the superovulation of cattle. **Theriogenology**, v.31, p.138, 1989.

DONALDSON, L.E. Embryo production by SUPER-OV and FSH-P. **Theriogenology**, v.33, p.214, 1990.

DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulations of reproduction. **Theriogenology**, v.55, p.1211-1239, 2001.

ELSDEN, R.P.; HASLER, J.F.; SEIDEL G.E. JR. Non-surgical recovery of bovine eggs. **Theriogenology**, v.6, p.523, 1976.

ERENO, R.L. Expressão gênica do receptor do hormônio luteinizante (LHR), em células da granulosa de folículos de novilhas Nelore antes, durante e após a divergência folicular. 65p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2008

ERENO, R.L.; ROSA, F.S.; OLIVEIRA, A.C.S.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M. Uso de LH ou eCG no último dia de tratamento superestimulatório. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, 2010.

EVANS, A.C.O.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **J. Reprod. Fertil.**, v.103, p.463-470, 1994.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P. Ovarianfollicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*). **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

FORTUNE, J.E. Follicular dynamics during the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? **Animal Reproduction Science**, v.33, p.111-125, 1993.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. v.82-83, **Animal Reproduction Science**, p.109-126, 2004.

FRICKE, P.M.; KIRSCH, J.D.; REYNOLDS, L.P.; REDMER, D.A. Studies of FSH-P induced follicular growth in cows. **Theriogenology**, v.42, p.43-53, 1994.

GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; CARVALHO, N.A.T.; TORRES-JUNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.H.; MADUREIRA, E.H.; TRINCA. L.A.; SARTORELLI, E.S.; BARROS, C.M.; CARVALHO, J.B.P.; MAPLETOFT, R.J.; BARUSELLI, P.S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v.69, p.852-858, 2008.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod. Fertil.**, v.87, p.223-230, 1989.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1187-1194, 1996a.

GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; MARTIN, S.; WILTBANK, M.C. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during last six months of pregnancy in cattle., **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.108, p.271-279, 1996b.

GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULICK, L.J.; WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.48, p.75-87, 1997.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K. Activin A, estradiland free insulin-like growth factor I in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v.67, p.14-19, 2002.

GONZALES, A.; LUSSIER, J.G.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT R.J. Superovulation of beef heifers with Folltropin-V: A new FSH preparation containing reduced LH activity. **Theriogenology**, v.33, p.519, 1990.

GONZALEZ, A.; WANG, H.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin serum. **Can. Vet. J.**,v.35, p.158-162, 1994.

GORDON, I. **Controlled reproduction in cattle & buffaloes**, Cambridge: CAB Internacional, p.492, 1996.

GOULDING, D.; WILLIAMS, D.H.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Superovulation in heifers given FSH initiated either at day 2 or day 10 of the estrous cycle. **Theriogenology**, v.34, p.767-778, 1990.

GUIBAULT, L.A.; GRASSO, F.; LUSSIER, J.G.; ROULLIER, P.; MATTON, P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. **J. Reprod. Fertil.**, v.91, p.89, 1991.

HAFEZ, E.S.E. Reproduction in farm animals. 6. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 585p, 1993.

HILL, B.R.; KUEHNER, L.F. Follicle aspiration prior to superovulation in cattle: a field study. **Theriogenology**, v.43, p.324, 1996.

HORTON, E.W.; POYSER, N.L. Plasma progesterone levels in guinea-pigs actively immunized against prostaglandin F2alpha, hysterectomized or treated with intra-uterine indomethacin. **J. Endocrinol**., v.67, p.81-88, 1975.

HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T.; SCHMIDT, M. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.35, p.91-108, 1991.

JAISWALL, R.S.; SINGH, J.; ADAMS, G.P. Developmental patterns of small antral follicles in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.71, p.1244-1251, 2004.

KARSCH, F.J.; BOWEN, J.M.; CARATY, A.; EVANS, N.P.; MOENTER, S.M. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. **Biology of Reproduction**, v.56, p.303-309, 1997.

KNIGTH, P.G. Roles of Inhibins, Activins, and Follistatin in the Female Reproductive System. **Front Neuroendocrinol.**, v.17, p.476-509, 1996.

KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMAN, M.E.; CUPP, A.S.; FIKE, K.E.; MARISCAL-AGUAYO, D.V.; SANCHEZ-TORRES, T.; GARCIA-WINDER, M.; CLOPTON, D.T.; ROBERTS, A.J.; KINDER, J.E. Frequency of hormone pulses in cattle influences duration of persistence of dominant ovarian follicles, follicular fluid concentration of steroids, and activity of insulin-like growth factor binding proteins. **Animal Reproduction Science**, v.77, p.187-211, 2003.

LIU, J.; SIROIS, J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.58, 1527-1532,1998.

LOONEY, C.R.; BONDIOLI, K.R. Bovine FSH produced by recombinant DNA technology. **Theriogenology**, v.29, p.235, 1988.

LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.3615-3626, 1992.

LUSSIER, J.P.; LAMOTHE, P.; PACHOLEK, X. Effects of follicular dominance and different gonadotrophin preparations on the superovulatory response in cows. **Theriogenology**, v.43, p.270, 1995.

LUSSIER, J.P.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **J. Reprod. Fertil.**, v. 81, p.301-307, 1987.

MACDOUGALL, S.; BURKE, C.R.; MACMILLAN, K.L.; WILLIAMSON, N.B. Patterns of follicular development during periods anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. **Revis. Vet. Sci.**, v.58, p.212-216, 1995.

MAPLETOFT, R.J.; PIERSON, R.A. Factors affecting superovulation in the cow: practical considerations. IETS **Embryo Transfer Newsl.**, v.11, p.14-24, 1993.

MARTINS, C.M.; CASTRICINI, E.S.C.; REIS, E.L.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F. Produção embrionária de vacas holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.286, 2005.

MARTINS, C.M.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; SOUZA, A.H.; BAUSELLI, P.S. Efeito do momento da aplicação do LH na resposta superovulatória e na produção embrionária em vacas Nelore (Bos indicus) inseminadas artificialmente em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34 p.529, 2006.

MATTON, P.; ADELAKOUN, V.; COUTURE, Y.; DUFOUR, J.J. Growthand replacement of the bovine follicles during the estrus cycle. **Animal Reproduction Science***,* v.52, p.813-820, 1981.

MATTOS, M.C.C.; BASTOS, M.R.; GUARDIEIRO, M.M.; CARVALHO, J.O.; MOURÃO, G.B.; BARROS, C.M.; SARTORI; R. Improvement of embryo quality by the replacement of the last tow doses of porcine follicle-stimulating hormone by equine gonadotropin in superstimulated Sindi donors. **Reprod. Fert. and Dev.**, v.22, p.364, 2010.

MELO, D.S.; FERREIRA, M.M.G.; MONTEIRO, F.M.; NOGUEIRA, M.F.G.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. Manutenção de níveis sub-luteais de progesterona, após tratamento superestimulatório, pode diminuir a taxa de recuperação de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, 2004.

MIKEL-JENSON, A.; GREVE, T.; MADEJ, A.; EDQVIST, L.E. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSF-PGF2α treated cow. **Theriogenology**, v.18, p.33-34, 1982.

MILVAE, R.A.; HINCKLEY, S.T.; CARLSON, J.C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum.**Theriogenology**, v.45, p.1327-1349, 1996.

MIZUTA, K. Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, Progesterona e Estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus)*, Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus)*. São Paulo, 2003, – Departamento de Reprodução Animal – Universidade de São Paulo.

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v.19, p.55-82, 1983.

MOOR, R.M.; KRUIP, T.H.; A.M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? **Theriogenology**, v.21, p.103-116, 1984.

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

NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, B.J.P.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A.; D'OCCHIO, M.J.; BARROS, C.M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation

and fixed time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology**, v.57, p.1625-1634, 2002.

NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.509, 2003.

NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M. Aspectos práticos e perspectivas futuras do modelo P-36 de superovulação em doadoras da raça Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, 34, p.25-29, 2006.

NOGUEIRA, M.F.G.; FRAGNITO, P.S.; TRINCA, L.A.; BARROS, C.M. The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-time AI in a progestin-based superstimulatory protocol in Nelore cattle. **Theriogenology**, v. 67, p.655-660, 2007.

OLIVEIRA, A.C.S.; MATTOS, M.C.C.; BASTOS, M.R.; LUNARDI, L.H.; SURJUS, R.S.; SARTORI, R.; BARROS, C.M. Eficiência do protocolo superestimulatório P-36, associado à administração de eCG ou LH, em vacas da raça Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38, 2010.

PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; VALLE, E.R.; ENCARNAÇÃO, R.O.; PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin $F_2\alpha$ or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-681, 1998.

REANO, I.; CARBALLO, D.; TRIBULO, A.; TRIBULO, P.; BALLA, E.; BO, GA. Efecto de la adicion de eCG a los tratamientos superovulatorios con Folltropin-V en la produccion de embriones de donantes de embriones. **VIII Simposio Internacional de Reproduccion Animal – IRAC**, v.1, p.54, 2009.

RICE, C.H. The control of FSH secretion in the larger domestic species. **J. Endocrinol.**, v.131, p.177-184, 1991.

ROBERTS, A.J.; GRIZZLE, J.M.; ECHTERNKAMP, S.E. Follicular development and superovulation response in cows administred multiple FSH injections early in the estrous cycle. **Theriogenology**, v.35, p.917-929, 1994.

ROCHE, J.F.; CROWE, M.A.; BOLAND, M.P. Postpartum anestrous in dairy and beef cows. **Animal Reproduction Science**, v.28, p.371-378, 1992.

ROWSON, L.E.A.; LAWSON, R.A.S.; MOOR, R.M.; BAKER, A.A. Egg transfer in the cow: synchronization requirements. **J. Reprod. Fertil.,** v.28, p.427-431, 1972.

ROSA, F.S. Eficiência do protocolo supervovulatório P-36, associado à administração eCG ou LH em doadoras da raça Angus. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Departamento de Farmacologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2010.

ROY, F.; MAUREL, M.C.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CRIBIU, E.P.; LANTIER, I.; POBEL, T.; DELÉTANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotrophin treatment on subsequent fertility in alpine

goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. **Biology of Reproduction**, v.60, p.805-813, 1999.

SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, R.D.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. 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.; GINTHER, O.J.; WILTBANK M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1403-1409, 2001.

SARTORI, R.; GUARDIEIRO, M.M.; BARROS, C.M.; BASTOS, M.R., MACHADO, G.M.; LEME, L.O.; RUMPF, R. Lack of improvement on embryo production by the replacement of the last two doses of pFSH by eCG in superetimulated Nelore heifers. **Reprod. Fertil. and Develop.**, v. 21, p.245-246, 2008a.

SAUMANDE, J.; CHUPIN, D.; MARIANA, J.C.; ORTAVANT, R.; MAULEON, P. Factors affecting the viability of ovulation rates after PMSG stimulation. In: Control of reproduction in the cow, **Sreenan JM**, ed. Martinus Nijhoff, p.195-224, 1978.

SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers. **J. Reprod. Fertil.,** v.83, p.663-671, 1988.

SAVIO, J.D.; BOLAND, M.P.; HYNES, N.; ROCHE, J.F. Resumption of follicular activity in the early postpartum period of dairy cows. **J. Reprod. Fertil.**, Cambridge, v.88, p.569-579, 1990a.

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

SCHAMS, S.; MENZER, C.H.; SCHALLENBERGER, E.; HOFFMAN, B.; HAHA, R. Some studies on pregnant mare serum gonadotrophin (PMSG) and on endocrine responses after application for superovulation in cattle, In: Control of Reproduction the Cow. **Commission of the European Communities**, Luxembourg, p.25-80, 1978.

SIMÕES, R.A.L.; SATRAPA, R.A.; ROSA, F.S.; PIAGENTINI. M.; CASTILHO, A.C.S.; ERENO, R.L.; NOGUEIRA, M.F.G.; BURATINI, J.; BARROS, C.M. Follicular diameter, ovulation rate, and LH receptor gene expression in Nelore cows. **Reprod. Fert. and. Dev.**, v.22, p.270, 2010.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by Real-Time Ultrasonography. **Biology of Reproduction,** v.39, p.308-317, 1988.

STOCK, J., FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinol.,** v.132, p.1108-1116, 1993.

STOCK, A.E.; ELLINGTON, J.E.; FORTUNE, J.E. A dominant follicle does not affect follicular recruitment by superovulatory doses of FSH in cattle but can inhibit ovulation. **Theriogenology**, v.45, p.1091-1102, 1996.

TAYLOR, C.; RAJAMAHENDRAN, R. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function pregnant versus nonpregnant dairy cows. **J. Dairy Sci.,** v.74, p.115-123, 1991.

VAN LEEMPUT, E.; VOS, P.; HYTTEL, P.; VAN DEN HURK; R.; BEVERS; M.; VAN DER WEIJDEN, G.; DIELEMAN, S.J. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. **Theriogenology**, v.55, p.573-592, 2001.

VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesq. agropec. bras**., v.35, n.12, p.2501-2509, 2000.

VOS, P.L.A.M.; BEVERS, M.M.; WILLEMSE, A.H.; DIELEMAN, S.J. Effects of supression by a progesterone-releasing device and subsequent induction by GnRH of the preovulatory LH surge on follicular function in PMSG/PG-treated heifers. **J. Reprod. Fertil.***,* v.101, p.43-49, 1994.

VOS, P.L.A.M.; BEVERS, M.M.; WILLEMSE, A.H.; DIELEMAN, S.J. Does postponement of preovulatory LH surge affect ovulation rate and embryo yield in superovulated holstein heifers ? **Theriogenology***,* v.43, p.344, 1995.

XU, Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v.53, p.951-957, 1995.

WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; GUTIERREZ, C.G.; GARVERICK, H.A.; ARMSTRONG, D.G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reprod. Suppl.**, v.61, p.71-90, 2003.

WILSON, J.M.; JONES, A.L.; MOORE, K.; LOONEY, C.R.; BONDIOLI, K.R. Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. **Animal Reproduction Science**, v.33, p.71-82, 1993.

WOOLUMS, A.R.; PETER, A.T. Cystic ovarian condiction in cattle; Part I. Folliculogenesis and ovulation. **Compend. Cont. Educ. Article**, v.16, p.935-943, 1994.

NOVAS ALTERNATIVAS PARA A APLICAÇÃO EM LARGA ESCALA DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*

Andréa Cristina Basso[1], Carine Letícia Schneider[2] e José Henrique Fortes Pontes[2]

[1] In vitro Brasil Ltda, Laboratório de Fertilização In Vitro, Rodovia Campinas-Mogi Mirim, Km 166, s/n, Fazenda São Fransisco, Caixa Postal 238, CEP 13800-970, Mogi Mirim/ SP, Brasil, josehenrique@invitrobrasil.com.br
[2] Laboratório de Reprodução Animal, DCV, CCA, UEL, Londrina/ PR, Brasil.

RESUMO

A crescente demanda por alimentos tem impulsionado o desenvolvimento de biotecnologias que intensifiquem a produção. Dentre elas a produção *in vitro* de embriões (PIV) destaca-se como importante ferramenta para o melhoramento genético na bovinocultura de corte e de leite, pois possibilita a disseminação de animais altamente produtivos de maneira rápida e eficaz. O rebanho nacional essencialmente zebuíno e altamente adaptado às condições naturais do país, o aperfeiçoamento das técnicas envolvidas na PIV, a grande gama de laboratórios em todo o território brasileiro e o crescente interesse dos pecuaristas em implantar tecnologias que incrementem a taxa de produção colocam o Brasil em uma posição peculiar no cenário mundial da produção de alimentos. Este artigo apresenta um panorama geral de como a PIV tem sido implantada em projetos comerciais em larga escala.

INTRODUÇÃO

A pecuária moderna exige um manejo eficiente dos recursos disponíveis. A necessidade de contribuir com a sobrevivência do homem e, principalmente, a importância de deixar às gerações futuras um meio ambiente saudável e capaz de produzir maior quantidade de alimentos imporão cada vez mais o uso racional dos recursos ambientais.

O agronegócio é responsável por 33% do produto interno bruto brasileiro, emprega quase 40% da mão-de-obra disponível e responde por 42% das exportações totais. Sem qualquer dúvida, é o setor mais pujante da economia brasileira e, neste contexto, a pecuária representa algo em torno de 12% deste montante, atingindo o valor de mais de R$ 75 bilhões (MAPA, 2007).

Tais características apresentam conotação ainda mais importante quando se considera os tipos raciais predominantes no nosso país, basicamente animais *Bos taurus indicus* denominados zebuínos, e altamente adaptados aos trópicos. Graças à rusticidade dos animais zebuínos, torna-se possível a utilização de áreas menos nobres para o pastoreio, liberando as terras mais férteis para o cultivo agrícola, mantendo assim uma perfeita integração entre a agricultura e a pecuária, independentemente da extensão territorial da propriedade. Tal proposta está em acordo com o movimento mundial de favorecer a permanência do homem no campo, tanto pela necessidade de geração de alimentos quanto para evitar a explosão demográfica dos grandes centros urbanos.

A reprodução animal, especialmente a tecnologia de embriões, constitui uma importante ferramenta para aumentar a eficiência da pecuária, proporcionando o aproveitamento mais racional das áreas destinadas à bovinocultura e contribuindo para o melhoramento genético. Compreende-se, claramente, a

importância de tais biotécnicas relativas à produção de embriões dentro da bovinocultura.

Segundo dados da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, no ano 2000, a transferência de embriões convencional foi responsável por 75,9% dos embriões transferidos (38.595) e a fertilização *in vitro* (FIV), por 24,6% (12.597 embriões). A partir de 2005, houve inversão na preferência pelas técnicas, com a transferência de 54,3% de embriões produzidos *in vitro* e de 45,6% dos embriões produzidos *in vivo*. Em 2007, a FIV participou com 75% do total (estimativa de 200 mil embriões transferidos) e, atualmente, o Brasil é o maior produtor mundial de embriões bovinos oriundos de fertilização *in vitro*.

Os animais zebuínos produzem mais ovócitos que as raças taurinas. Este maior número de ovócitos se reflete em uma maior produção de embriões e de prenhes, justificando a substituição da produção *in vivo* de embriões pela técnica *in vitro* ocorrida nos últimos anos no Brasil (Pontes et al., 2009). Este dado deve ser considerado como positivo para a aplicação comercial em larga escala da técnica de fertilização *in vitro*. Promovendo uma prévia seleção de doadoras e de touros, consegue-se atingir índices de produtividade elevados que traduzem em custos mais baixos, viabilizando então o uso da FIV em escala comercial.

DISPONIBILIZAÇÃO DA FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* AO MERCADO BRASILEIRO

Com um rebanho bovino estimado em 200 milhões de animais (IBGE, 2007), o Brasil tem dado saltos em qualidade genética em velocidade sem precedentes na história da pecuária nacional. Graças às pesquisas direcionadas à melhoria dos processos de fertilização e de cultivo *in vitro* de embriões, importantes pacotes tecnológicos de ponta foram disponibilizados aos produtores brasileiros.

Após a disseminação da inseminação artificial (IA) e da transferência de embriões produzidos *in vivo* (TE) no mercado brasileiro, a fertilização *in vitro* foi disponibilizada pela iniciativa privada.

Com a satisfatória obtenção de oócitos de bovinos por meio da técnica de aspiração folicular ovariana guiada por ultrassonografia (OPU), a aplicação comercial da FIV ficou ainda mais promissora e com isso, na virada do século, surgiam os primeiros laboratórios comerciais no Brasil.

Inicialmente a demanda era modesta, o interesse por parte de criadores era pequeno e os serviços eram bastante dispendiosos. No entanto, logo ao final do primeiro ano de atividade da FIV comercial, os criadores brasileiros já se mostravam confiantes e dispostos a multiplicar em velocidade surpreendente o seu rebanho de alto potencial genético. A FIV passava de alternativa para animais com infertilidade adquirida para ferramenta principal de aceleração do melhoramento genético animal.

Atualmente, menos de dez anos depois da instalação dos primeiros laboratórios, os criadores brasileiros contam com mais de 50 laboratórios de produção *in vitro* de embriões bovinos em todo o território nacional. Não só empresas atuam no mercado vendendo seus serviços, mas também, muitos pecuaristas têm seus próprios laboratórios com equipe própria de profissionais a fim de multiplicar seu próprio rebanho.

VANTAGENS DA FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

A inseminação artificial em bovinos foi o primeiro passo para acelerar a transferência de características desejáveis. Isso permitiu a disseminação de genes de machos geneticamente superiores e possibilitou a melhoria do nível zootécnico dos rebanhos. Com apenas essa técnica, um reprodutor bovino pode produzir milhares de bezerros em um ano, enquanto no mesmo período uma fêmea pode produzir apenas um bezerro. Assim, o possível ganho genético obtido pela linhagem materna é considerado extremamente limitado. A transferência de embriões permitiu o melhor aproveitamento das matrizes, podendo aumentar em até dez vezes o número de descendentes por ano. Com a utilização da aspiração folicular associada à fecundação *in vitro* (OPU-FIV), maximizou-se a utilização dessas fêmeas, podendo-se atingir médias históricas como a de 25-50 bezerros por vaca por ano (Varago et. al, 2008).

APLICAÇÃO EM LARGA ESCALA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Atualmente, pode-se considerar que tanto a questão do transporte em longas distâncias como a criopreservação dos embriões produzidos *in vitro* estão solucionadas. Com meios de cultivo apropriados e materiais que não interfiram no desenvolvimento embrionário, é possível fazer o cultivo *in vitro* de embriões bovinos em incubadoras de transporte, durante todo o período de desenvolvimento.
Em 2008, a In Vitro Brasil Ltda. desenvolveu um projeto de produção de oito mil matrizes leiteiras da raça Girolando, pela transferência de 20 mil embriões produzidos *in vitro*, em sua totalidade utilizando sêmen sexado para fêmea. Os embriões eram produzidos usando ovócitos oriundos de vacas Holandesas, Gir ou Girolando, acasaladas respectivamente com touros Gir e Holandês, para obtenção de fêmeas Girolandas. Os embriões foram, em sua totalidade, produzidos em Mogi Mirim e em Goiânia e transferidos para receptoras nos Estados do Pará, de Goiás, do Mato Grosso do Sul e do Mato Grosso. O projeto resultou no nascimento de oito mil bezerras em regiões onde quase inexistiam rebanhos leiteiros especializados (Basso A., 2009).

Figura 1. Número de oóctios, embriões e taxa de prenhes obtidos de doadoras Gir (*Bos taurus indicus*), Holandês (*Bos taurus taurus*) e *indicus - taurus* submetidas à aspiração folicular (OPU) e produção *in vitro* de embriões (PIV).

Tipo de doadora	Total oócitos / OPU (n)	Oócitos viáveis/ OPU (n)	Embriões/ total oócitos % (n)	Embriões / OPU-PIV (n)	Prenhes/ OPU-PIV* (n)	Taxa de Prenhes (%)* (n)
Gir	17.1 ± 4.5[a] (64 617 / 3 778)	12.1 ± 3.9[a] (45 838 / 3 778)	18.9 (12 243 / 64 617)	3.2[a] (12 243 / 3 778)	1.2[a] (3 113 / 2 670)	40 (3 113 / 7 763)
Holandês	11.4 ± 3.9[b] (12 977 / 1 138)	8.0 ± 2.7[b] (9 082 / 1 138)	18.7 (2 426 / 12 977)	2.1[b] (2 426 / 1 138)	0.7[b] (604 / 822)	36 (604 / 1 698)
¼ Holandês ¾ Gir	20.4 ± 5.8[c] (5 457 / 267)	16.8 ± 5.0[c] (4 472 / 267)	18.9 (1 033 / 5 457)	3.9[ac] (1 033 / 267)	1.3[ac] (137 / 103)	37 (137 / 368)
½ Holandês ½ Gir	31.4 ± 5.6[d] (7 035 / 224)	24.3 ± 4.7[d] (5 434 / 224)	17.4 (1 222 / 7 035)	5.5[c] (1 222 / 224)	1.7[c] (82 / 47)	37 (82 / 220)
Total	16.7 ± 6.3 (90 086 / 5 407)	12.0 ± 4.4 (64 826 / 5 407)	18.8 (16 924 / 90 086)	3.1 (16 924 / 5 407)	1.1 (3 936 / 3 642)	39 (3 936 / 10 049)

[a-d]Na mesma coluna, médias sem letras iguais são diferentes (P<0.05).
*Dados de prenhes de 10 049 embriões de um total de 16 924 transferidos (resultados de 6 876 transferências de embriões não foram avaliados).

Paralelamente ao projeto, a empresa atentou-se à necessidade de desenvolver um método eficiente para congelar os embriões excedentes e transferi-los nas ocasiões de falta de embriões. Mais uma vez a empresa investiu em pesquisa e desenvolveu um método de vitrificação dos embriões após tratamento específico no cultivo *in vitro* que promove a "delipidação" citoplasmática do embrião. (Sanchez et al., 2009 in press). Em nível nacional e internacional, existe forte interesse econômico na criopreservação de embriões produzidos *in vitro*, visto que o custo do processo seria diminuído, com melhor aproveitamento das fêmeas receptoras e criação de bancos de embriões congelados, que poderiam ser comercializados futuramente.

As empresas do setor leiteiro têm demonstrado grande interesse pelo melhoramento genético através do uso de embriões sexados de fêmea. Entre um dos exemplos, destaca-se a Cooperativa ITAMBÉ em Minas Gerais, que tem como meta elevar a média de produção por vacas para 15 litros diários contra os 9,36 litros atuais. Este aumento elevaria em 1.760.000 litros de leite por dia sem aumentar o número de vacas e ao mesmo tempo viabilizando economicamente seus cooperados.

Vários projetos têm surgido também no setor de gado de corte. Alguns grupos como o CIBRe Caribe, localizado na Colômbia, tem produzido animais F1 de vários tipos de cruzamento visando abater esses animais e atender o mercado local de carnes nobres. Algumas redes de churrascarias de São Paulo já perceberam também que é possível produzir através da tecnologia de embriões, animais de alta qualidade de carcaça, os quais hoje são obrigatoriamente importados de países como Uruguai, Argentina e Austrália.

CONCLUSÃO

Técnicas cada vez mais aprimoradas de congelamento e transporte de embriões a longas distâncias proporcionaram a implantação de rebanhos leiteiros em regiões de novas fronteiras agrícolas. Tamanho progresso viabilizou grandes projetos de exportação de genética, principalmente das raças zebuínas e seus cruzamentos, para países de clima tropical localizados na América Latina, África e Ásia. Nas décadas de 80 e 90 vimos o mundo todo buscando genética bovina na América do Norte e Europa, agora estamos diante de uma grande possibilidade de ver o Brasil sendo usado como fonte de tecnologia e genética pecuária para as futuras gerações. Isto mostra que a biotecnologia de embriões tem o grande potencial de inserir o Brasil como um difusor de tecnologia pecuária no cenário internacional.

BIBLIOGRAFIA

Garcia, J. M.; Avelino, K. B.; Vantini, R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1, 2005, Londrina, PR. Biotecnologia da reprodução em bovinos: anais... Londrina, PR: UEL, 2005. 201 p.

Hasler, J. F. The current status of oocyte recovery, *in vitro* embryo production, and embryo transfer in domestic animals, with an emphasis on the bovine. Journal of Animal Science, v. 76, suppl. 3, p. 52-74, 1998.

IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Atualizado em 14 mai. 2007. Disponível em: http://www.ibge.gov.br. Acesso em 14 mai. 2007.

Lohuis, M. M. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. Theriogenology, v. 43, n. 1, p. 51-60, 1995.

Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). Agronegócio Brasileiro: Uma Oportunidade de Investimentos, 23/11/2007. Disponível em: www.agricultura.gov.br. Acesso em: 24/11/2007.

Sanches, B. V. Uso de propanediol ou DMSO na vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro*, cultivados ou não na presença de forskolin. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2009. 55f.

Pontes, J.H.F.; Nonato-Junior, I.; Sanches, B.V.; Ereno-Junior, J.C.; Uvo, S.; Barreiros, T.R.R.; Oliveira, J.A.; Hasler, J.F.; Seneda, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. Theriogenology, v.71, n.4, p.690-697, 2009.

Varago, F. C.; Mendonça, L. F.; Lagares, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

PATROCÍNIO

ORGANIZAÇÃO

APOIO

A informação contida nesse material é de responsabilidade dos autores.