

5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

04 a 06 de Outubro de 2012 - Teatro Marista - Londrina/PR

NOVO LOCAL

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



ORGANIZAÇÃO



Informações e inscrições: www.geraembryo.com.br

PATROCINADOR OFICIAL



SUMÁRIO

1. A CADEIA PRODUTIVA DA CARNE E DO LEITE.....	1
<i>Alcides Torres</i>	
2. CONHECIMENTOS BÁSICOS DA FOLICULOGÊNESE E SUA APLICAÇÃO NAS TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA.....	7
<i>John Kastelic</i>	
3. FATORES QUE INTERFEREM NA QUANTIDADE E NA QUALIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS.....	18
<i>Alex Evans</i>	
4. UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA SELEÇÃO DE REPRODUTORES E MATRIZES.....	30
<i>Fernando Garcia</i>	
5. PARTICULARIDADES DA REPRODUÇÃO DE VACAS DE LEITE.....	33
<i>Roberto Sartori</i>	
6. IATF EM NOVILHAS E PRIMÍPARAS.....	49
<i>Manoel Francisco de Sá Filho</i>	
7. TÉCNICAS DE RESSINCRONIZAÇÃO PARA IATF EM GADO DE CORTE....	82
<i>Márcio de Oliveira Marques</i>	
8. TÉCNICAS DE MANEJO PARA MELHORAR A EFICIÊNCIA DE UM PROGRAMA DE IATF.....	93
<i>Ed Hoffmann Madureira</i>	
9. EMPREGO DA ECG EM PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO.....	109
<i>Lucas Cutaia</i>	
10. AVALIAÇÃO DE QUALIDADE DE SÊMEN: RECONHECENDO AS LIMITAÇÕES E ENCARANDO OS DESAFIOS.....	136
<i>Leonardo Brito</i>	
11. EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NA QUALIDADE DOS GAMETAS DE ZEBUÍNOS E DE TAURINOS.....	150
<i>Ciro Moraes Barros</i>	
12. ATUALIDADES DAS TÉCNICAS DE SUPEROVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.....	168
<i>Gabriel Bo</i>	

<i>13. NOVAS APLICAÇÕES DO USO DE EMBRIÕES PRODUZIDOS IN VITRO (PIV).....</i>	<i>185</i>
<i>Marcelo Seneda</i>	
<i>14. EMPREGO DO SÊMEN SEXADO NA IATF, NA SUPEROVULAÇÃO E NA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES.....</i>	<i>188</i>
<i>Pietro Sampaio Baruselli</i>	
<i>15. PERSPECTIVAS PARA AS TÉCNICAS DE PIV, CLONAGEM E TRANSGENIA.....</i>	<i>227</i>
<i>Vilceu Bordignon</i>	

A CADEIA PRODUTIVA DA CARNE E DO LEITE NO BRASIL

Alcides M. Torres Júnior; Rafael R. L. Filho
Scot Consultoria

O papel da pecuária no Brasil vai muito além da geração de renda e do crescimento da economia. A atividade foi fundamental na demarcação das fronteiras nacionais e ocupação do território.

Hoje o cenário é diferente. O setor se profissionalizou e está consolidado. Essa consolidação não significou aumento de renda, pelo contrário. As margens do negócio se estreitaram. Não existe espaço para erros.

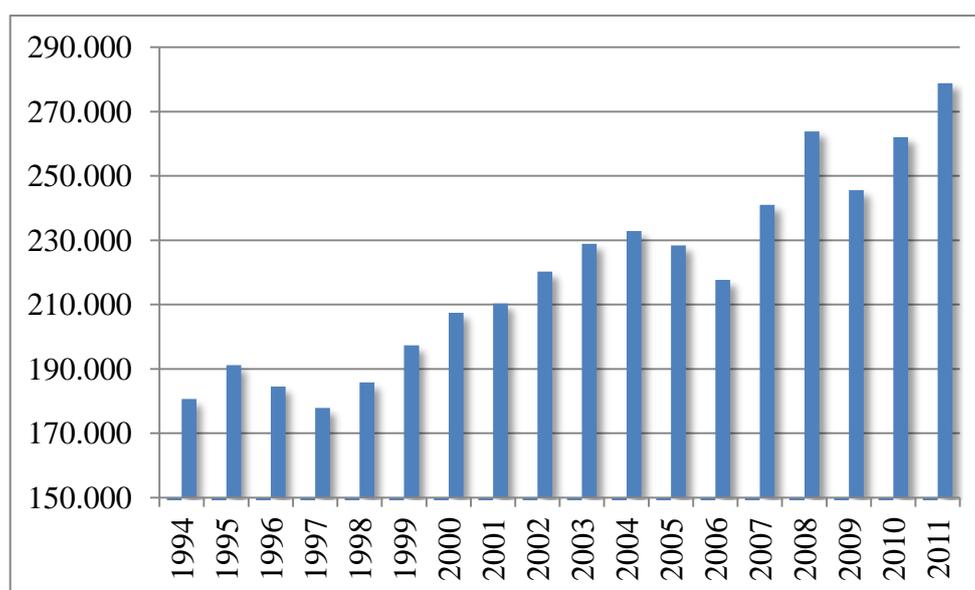
A importância da pecuária e as responsabilidades inerentes à sua exploração não diminuíram e são crescentes.

Além de ser um importante gerador de divisas, tendo em vista que o agronegócio tem mantido a balança comercial brasileira superavitária nas últimas duas décadas, o setor pecuário contribui fortemente com o crescimento do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro.

Na figura 1 está o PIB da pecuária no Brasil. Nos últimos dez anos o setor cresceu 32,5%.

Figura 1.

Produto Interno Bruto (PIB) da pecuária no Brasil - em milhões de R\$.



Fonte: CEPEA / CNA / Interpretação Scot Consultoria - www.scotconsultoria.com.br

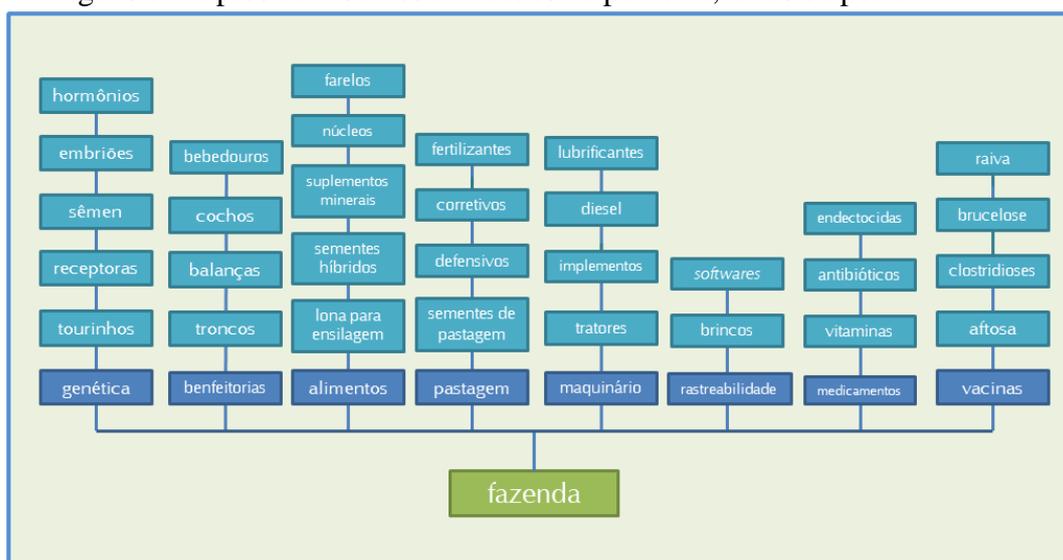
Em 2011, considerando todo o PIB brasileiro que foi de R\$4,14 trilhões, a pecuária respondeu por 6,7% desse valor. A participação do agronegócio no PIB foi de 22,1%.

A cadeia é ampla e envolve diversos segmentos.

Na figura 2 está um quadro resumo com alguns elos que abastecem a cadeia pecuária, antes da porteira.

Figura 2.

Alguns exemplos de insumos utilizados na pecuária, antes da porteira.



Fonte: Scot Consultoria – www.scotconsultoria.com.br

A Scot Consultoria estima que em 2010 o faturamento com as vendas de insumos, animais para abate, leite e impostos recolhidos pela pecuária ultrapassou R\$95 bilhões. Veja a tabela 1.

Tabela 1.

Faturamento com as vendas de insumos, animais para abate, leite e impostos recolhidos - em R\$.

Segmentos	Faturamento bruto (R\$)
Reprodutores	1.087.392.074,35
Sêmen	86.487.481,50
Embriões	444.036.486,60

Receptoras	685.770.635,68
Concentrados proteicos	467.504.817,43
Concentrados energéticos	505.926.537,96
Fertilizantes	584.796.979,43
Calcário	190.043.016,85
Defensivos Agrícolas	1.907.405.312,33
Sementes forrageiras	357.165.565,33
Suplementos Minerais	2.300.000.000,00
Vitaminas e aditivos	40.631.954,61
Vacinas	485.605.597,20
Endectocidas	387.099.655,88
Diesel	6.610.037.418,94
Tratores	854.893.234,67
Implementos	73.847.102,01
Brincos (SISBOV)	3.322.423,42
Mourões	1.559.690.510,86
Arames	1.403.399.540,48
Animais para abate	54.134.659.445,60
Produção de leite	21.700.000.000,00
Faturamento bruto total	95.869.715.791,13

Fonte: Scot Consultoria - www.scotconsultoria.com.br

Isto sem considerar os serviços e bens gerados depois da porteira: indústrias processadoras (frigoríficos e laticínios), indústrias de embalagens, transporte, o próprio varejo e intermediários.

A SITUAÇÃO DA PECUÁRIA NO BRASIL

O Brasil é o segundo produtor global de carne bovina e está entre os líderes quando o assunto é mercado mundial (exportação).

No leite, o país ocupa a sexta posição em produção e o potencial de crescimento é indiscutivelmente grande. Nas mesmas proporções dos desafios.

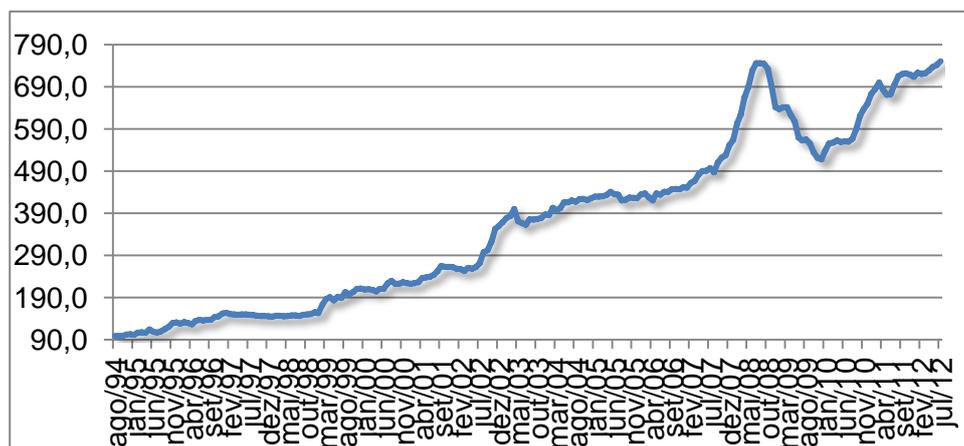
Pressões das mais diversas naturezas exigem da pecuária de corte e leite elevados índices para ser uma atividade rentável.

Na figura 3 está o Índice Scot de Custo de Produção da Pecuária de Corte. O custo para produzir um bovino para abate tem aumentado ano a ano.

As mesmas considerações valem para a pecuária de leite.

Figura 3.

Índice de Custo da Pecuária de Corte de Alta Tecnologia. Base 100=agosto de 1994.



Fonte: Scot Consultoria - www.scotconsultoria.com.br

Diante desse cenário, os ganhos em produtividade são essenciais para diluição dos custos e melhoria da rentabilidade da atividade pecuária.

Estamos falando, portanto, de investimentos em tecnologia. E tecnologia no campo significa manejo, nutrição, sanidade, genética e gestão, principalmente. É um dos muitos gargalos da atividade e que pode ser entendida como um potencial.

Vamos pegar o exemplo do leite.

Existe uma diferença muito grande em termos de produtividade e eficiência entre as regiões produtoras no Brasil.

Falta assistência técnica, falta uma política de governo, além é claro de questões como: clima, genética em uso, sistema de produção empregado, investimentos por parte

dos produtores e também da indústria e questões relacionadas à logística, que estão intimamente ligadas ao resultado da atividade.

Considerando um incremento na produtividade média brasileira para os níveis que temos hoje no Sul do país, de mais de 2,3 mil litros de leite por vaca por ano, teríamos condições de produzir mais de 55 bilhões de litros de leite. Isto levando em conta a área e rebanho atuais.

É lógico que um incremento deste não ocorre de uma hora para outra, nem poderia, em função da demanda não absorver o excedente da produção, o que levaria a queda de preços ou à implosão da atividade. A ideia é mostrar o potencial que a atividade leiteira detém.

Aliás, é um dos poucos países com capacidade para aumento da produção.

Na pecuária de corte, poderíamos pensar em redução da idade de abate, no aumento da taxa de desfrute, no aumento do peso médio das carcaças, na melhoria das condições das pastagens e, conseqüentemente no aumento da taxa de lotação.

CONCENTRAÇÃO DO SETOR

Com a crise mundial de 2008, muitos frigoríficos fecharam. Muitos.

Parte dessas indústrias foi adquirida ou incorporada a outras empresas em um processo de fusão e aquisição muito forte.

A JBS Friboi, maior empresa de proteína animal do mundo, tem hoje 20,7% do mercado brasileiro. Um crescimento de 80,0% em quatro anos. Juntos, os dois maiores frigoríficos brasileiros - JBS e Marfrig - possuem mais de um terço do mercado.

A questão é que em alguns estados ou regiões pecuárias a concentração é maior e o pecuarista fica refém de um único comprador. Isto significa perda da concorrência e significa pressão de baixa do sobre os produtos (arroba de boi ou bezerros, por exemplo).

No leite, o processo de concentração está ocorrendo, mas em um ritmo menor.

A Nestlé, maior captadora de leite no país, com mais de dois bilhões de litros captados em 2011, possui menos de 7,0% do mercado.

Um exemplo de fusão na indústria de laticínios é a Lácteos Brasil, que incorporou as marcas Parmalat, Bom Gosto e LeitBom. Após a fusão, a empresa passou a ocupar a segunda posição no *ranking* de captação nacional.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existem outros pontos a serem discutidos quando o assunto é a cadeia pecuária.

Recentemente, o boi passou a ser acusado de ser o vilão de todo o desmatamento no país. Ou seja, as questões ambientais (leia-se custo) estarão presentes na produção pecuária. O pecuarista e a indústria envolvida não poderão ignorar tais questões.

Outros desafios envolvem a disseminação de tecnologia com foco no aumento de produtividade, além do aumento da qualidade e redução dos custos de produção.

Há que se considerar ainda que a competitividade da pecuária moderna não envolve somente a superioridade técnica no campo. É preciso compreender as diferentes demandas e produzir carne e produtos lácteos com valor agregado e que ofereça maior rentabilidade para toda a cadeia produtiva.

Isto significa entender a perspectiva do consumidor para dentro da pecuária brasileira, saber onde o produto será vendido e quem é o cliente final. Investir na comunicação com o consumidor e promover o envolvimento de todos os elos é tão importante quanto produzir com eficiência.

As oportunidades de mercado mostram bom potencial. O Brasil precisa correr para fazer valer este potencial.

O incremento da renda que vem acontecendo no Brasil e deve elevar o consumo de carne bovina e de produtos lácteos.

Mais do que investir na cadeia é preciso conservar e expandir o mercado. O Brasil tem espaço de sobra para isto.

Basic knowledge of folliculogenesis and its application in assisted reproduction techniques

J.P. Kastelic, Agriculture and Agri-Food Canada, Lethbridge Research Centre, Box 3000, Lethbridge, AB, Canada T1J 4B1 (therio@shaw.ca)

Abstract

Ovarian follicles in cattle grow in waves, simultaneous growth of several antral follicles. Typically, one follicle becomes dominant, and the remaining follicles in the wave cease growth and eventually regress. The dominant follicle reaches a plateau, and either regresses, or ovulates in response to an LH surge. Knowledge of factors controlling follicular development has enabled development of protocols to control follicular development for insemination, superstimulation, or ovum pick up. In these protocols, the key factors are to control wave emergence, create an optimal progesterin environment for development for development of dominant follicle(s), and then either recover follicles or have them ovulate at an optimal diameter and time, with formation of a corpus luteum that supports pregnancy.

Introduction

Historically, artificial insemination in cattle was done following detection of estrus. Once synthetic progestins became available, they were given to cattle for extended intervals (e.g 2 weeks); a synchronous estrus was induced in a majority of cattle, but fertility was poor, due to ovulation of persistent follicles with aged ova. Subsequently, prostaglandins provided a practical means of inducing luteolysis. However, in the absence of controlling follicular development, estrus and ovulation were not sufficiently synchronous to yield satisfactory fertility to timed insemination. Increasing knowledge of ovarian follicular dynamics, and the ability to control follicle growth and ovulation gave rise to protocols that resulted in synchronous ovulation of a fertile follicle, yielding acceptable pregnancy rates to timed-insemination. The purpose of this article is to review key concepts of ovarian follicular development and indicate how follicular development can be controlled for application of assisted reproduction techniques.

Follicular growth and puberty

Follicular growth in prepubertal heifers occurs in waves; each wave is preceded by a peak in serum FSH concentrations (Adams et al, 1992; Adams et al, 1994). Waves are present in heifers at 2 weeks of age (Evans et al, 1994). Numbers of small, medium and large follicles (3–5, 6–8 and ≥ 9 mm in diameter, respectively) and diameter of the largest follicle all increase from 2 to 14 weeks of age. Between 6 and 24 weeks of age, there is a marked but transient increase in blood concentrations of both LH and FSH (Evans et al, 1992; Evans et al, 1994). The release of LH is pulsatile; the early increase is attributed to increased LH pulse amplitude. Thereafter, serum concentrations of LH and FSH decrease. However, 30–80 days before the first ovulation (Evans et al, 1994),

increases in LH pulse frequency increase follicle diameter and serum estradiol concentrations, the sensitivity of LH secretion to negative feedback suppression decreases, and an LH surge causes the first ovulation. Heifers usually do not express estrus prior to their first ovulation, the first corpus luteum is small, and may have a short lifespan (Berardinelli et al, 1979); this is usually followed by estrus and a normal, full-length luteal phase.

Growth phases

The interval from a primordial to an ovulatory follicle in cattle is approximately 180 days (Lussier et al., 1987). There are two stages of ovarian antral follicle development, a 'slow' and a 'fast' growth phase (Fair, 2003). The first (slow) phase takes > 30 days from antrum acquisition (approximately 300 µm) to the 'small' follicle stage (3–5 mm in diameter; Lussier et al, 1987). The second phase usually takes ~5–7 days, and includes emergence of a wave, follicle growth, selection of a dominant follicle, and a dominance period, followed by ovulation or regression.

Follicular waves and deviation

Follicles develop in waves; on average, 7–11 follicles (4 mm in diameter) initiate growth. Emergence of a new wave is preceded by a rise in FSH, with wave emergence concurrent with the peak (Adams et al, 1992). Suppression of FSH prevents further growth of 3–5 mm follicles (Turzillo and Fortune, 1990), whereas exogenous FSH stimulates wave emergence (Bergfelt et al, 1994). Treatment with FSH (without steroids or LH) results in follicles with limited capacity to produce steroids and lack of selection of a dominant follicle (Crowe et al, 2001). The transient FSH rise stimulates all antral follicles that have completed their 'slow' growth phase; they subsequently depend on elevated FSH for continued cell proliferation and enhanced steroidogenesis. Following emergence of a new wave, follicles grow (common-growth phase) for approximately 3 days, until dominance is apparent. The future dominant follicle emerges 6 hours earlier than other follicles in the wave and is larger than the other follicles at the end of the common-growth phase (Ginther et al, 2003a).

The FSH surge peaks, on average, when the largest follicle is ~5 mm; mean concentrations then decrease, with a 3-day interval between peak concentrations and the start of deviation, when rapid development of the deviation mechanism blocks development of the second-largest follicle (Ginther et al, 2003a). Mean diameters of the two largest follicles at the beginning of deviation were 8.5 and 7.7 mm in heifers (Ginther et al, 2003b). During the common growth phase, all follicles have potential for future dominance. A subordinate follicle remains viable for at least 1 day after deviation starts; it can become the new dominant follicle if the existing dominant follicle fails or is removed. Loss of dominance during the luteal phase or induced atresia of a dominant follicle that was artificially maintained is followed by increased FSH concentrations and emergence of a new wave (Sunderland et al, 1994).

Between the peak FSH surge and the start of deviation, all follicles of the wave continue to require FSH and more than one follicle contributes to the FSH decrease. In association with the onset of deviation, the FSH/follicle relationship changes; instead of several follicles requiring FSH, only the dominant follicle continues to grow, despite low FSH concentrations. The FSH decline is necessary for the establishment of deviation; increasing endogenous FSH or administering FSH early in a wave induces several follicles to become dominant. With decreasing serum FSH concentrations, follicles begin to undergo changes, including reduced production of estrogens, reduced levels of higher molecular weight (MW) inhibins and increased amounts of lower MW insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins, culminating in granulosa cell apoptosis (Sunderland et al, 1996; Mihm et al, 1997). In this environment, only the dominant follicle is able to continue to grow and produce steroids. FSH stimulates the production of estradiol, activin-A and inhibin-A (Glister et al, 2001). Both estradiol and inhibin act alone (as well as synergistically) to suppress blood FSH concentrations. Blood estradiol concentrations begin to increase at the beginning of deviation in cattle (Ginther et al, 2003a). Inhibin (probably inhibin-A) is produced by and suppresses FSH. The largest and the second-largest follicles at similar diameters had similar follicular-fluid estradiol concentrations during the common-growth phase; increasing concentrations were detected beginning at 7.6–7.7 mm in heifers (Ginther et al, 2003b). Estradiol began to increase in the largest follicle 4 h before diameter deviation (Ginther et al, 2003b); this increases blood estradiol concentrations, which enhance expression of genes for aromatase, 3-beta-HSD, and receptors for FSH and LH in granulosa cells (Bao and Garverick, 1998).

The IGF system is involved in cell growth and differentiation. It consists of IGF-1, IGF-2, IGF receptors, and a family of binding proteins (IGFBPs) and IGFBP proteases (Fortune et al, 2004). The proteases degrade the IGFBPs, liberating IGF from the IGFBP-IGF complex. Intrafollicular concentrations of IGFBP-2 and free IGF-1 and were lower and higher, respectively in the largest compared to the second largest follicle in heifers (Beg et al, 2001). It appears that an FSH-induced increase in pregnancy-associated-plasma protein-A (PAPP-A) is the earliest change detectable in the future dominant follicle (Fortune et al, 2004). PAPP-A is a protease that degrades IGFBP-4 and IGFBP-5, thereby increasing intrafollicular IGF-I concentrations. Increased IGF-I acts together with FSH to increase estradiol synthesis, thereby suppressing plasma FSH concentrations and preventing other (subordinate) follicles from acquiring PAPP-A (Fortune et al, 2004). Estradiol stimulates the production of IGF-1, and IGF-1 stimulates estradiol production (Ginther et al, 2003a).

LH stimulates intrafollicular steroid and growth-factor systems involved in selection (Ginther et al, 2003a). In that regard, granulosa cells of the future dominant follicle acquire LH receptors before selection is apparent. In addition to FSH, LH is essential to stimulate theca cells to produce androgens (as precursors of estradiol). Reductions in plasma LH prior to selection reduced the growth and lifespan of the CL (Ginther et al, 2001); LH was regarded as essential for antral follicles to grow beyond 9

mm (Gong et al, 1996). Following follicle selection, growth, estrogen production and the lifespan of the dominant follicle are all controlled by the LH pulse pattern (Mihm and Bleach, 2003); atresia of the dominant follicle occurs if LH pulse frequency is < 1 pulse/2 hours (Mihm and Bleach, 2003). This has important clinical implications. Treatment with progesterone, GnRH or estradiol result in apoptosis and atresia of the dominant follicle (Mihm and Bleach, 2003), whereas increased LH pulse frequency (due to low-dose progestin treatment) causes persistent follicles (Stock and Fortune, 1993).

Co-dominance

More than one dominant follicle during a follicular wave in animals that normally ovulate only a single follicle can be considered defective selection. Double ovulations are usually due to co-dominance, but occasionally the follicles originate from different waves. The incidence of double ovulations was much higher in dairy cows with high versus low milk production (20 versus 7%, respectively; Fricke and Wiltbank, 1999). In high-producing cows, selection of multiple dominant follicles was related to transient increases in plasma FSH and LH (probably due to decreased inhibin and progesterone) in the 24-hour interval before follicle selection, resulting in continued growth of follicles that would have otherwise regressed (Lopez et al, 2004). Furthermore, the normal increase in blood estradiol concentrations and decrease in blood FSH concentrations at deviation are partially suppressed in lactating cows with high milk production (Wiltbank et al, 2000); they have steroid catabolism due to increased hepatic blood flow; with decreased blood estradiol concentrations, blood FSH is increased long enough for more than one follicle to become dominant and ovulate.

Final growth and ovulation

Dominant follicles continue to grow for a few days after selection. In the absence of an LH surge, the dominant follicle starts to regress and triggers the recruitment of a new wave of growing follicles. If there is an LH surge, the dominant follicle continues to grow and the oocyte undergoes final maturation, culminating in follicle rupture and ovulation. Final maturation includes expansion of the cumulus, disruption of the contact between the corona radiata cells and the oocyte membrane and perivitelline space formation. The cortical granules are aligned just inside the oocyte membrane, meiosis resumes and the oocyte nucleus membrane breaks down. The chromosomes condense, progress through meiosis I, and arrest at metaphase of meiosis II.

In cattle given GnRH to induce ovulation, follicles that were ≤ 11 mm in diameter prior to ovulation were associated with decreased plasma estradiol concentrations on the day of insemination, reduced serum progesterone concentrations and pregnancy rates, and increased late embryonic mortality (Perry et al, 2005). Furthermore, ovulation of excessively large follicles can also reduce fertility (Wiltbank et al., 2011).

Two versus three waves

Lactating Holstein dairy cows tend to have two-wave cycles (Townson et al, 2002), whereas beef and dairy heifers have discrete populations with a majority of cattle having either two- or three-wave cycles (Ginther et al, 1989). The number of waves per cycle is highly repeatable, as is the number of follicles per wave (Burns et al, 2005). The peak and average plasma concentrations of FSH and inhibin A are lower in the two non-ovulatory waves of a three-wave cycle than in the ovulatory wave, but are similar in two-wave cycles (Parker et al, 2003). Holstein cows that had a three-wave cycle preceding insemination had higher conception rates than those with two waves (Townson et al, 2002), and beef cows with the equivalent of three waves in the cycle following insemination also had a higher conception rate (Ahmad et al, 1997). Higher fertility in three-wave cycles could be due to a shorter interval for development of the ovulatory follicle (Townson et al, 2002). There was an inverse relationship between the interval from ovulatory follicle emergence and ovulation and Day 35 pregnancy rate in dairy cows; on average, this interval was 1 day shorter in pregnant versus nonpregnant cows (Bleach et al, 2004). Furthermore, increased fertility in three-wave cycles could be due to delayed regression of the corpus luteum in cattle with three versus two waves (Ginther et al, 1989) providing more opportunity for maternal recognition of pregnancy.

Antral follicle count

The number of antral follicles (≥ 3 mm) varies greatly among cattle (range, 5 to 50), is repeatable within individuals, and is highly correlated with the number of healthy follicles (Evans et al., 2010). Cattle with a low antral follicle count have increased serum concentrations of FSH and LH, but decreased serum concentrations of Anti-Mullerian Hormone (AMH; Evans et al., 2010). Restricting maternal nutrition (60% of maintenance) during the first third of gestation resulted in a 60% lower antral follicle count in heifer calves (compared to control heifers with dams fed 100% maintenance; Evans et al., 2010). Furthermore, cows with a high antral follicle count had higher pregnancy rates, a shorter calving to conception interval, and required fewer inseminations than cows with a low follicle count (Evans et al., 2010).

Managing the dominant follicle

In high-producing dairy cows, the following conditions (reviewed by Wiltbank et al., 2011) affect fertility: reduced blood estradiol concentrations near estrus (due to increased liver metabolism of steroids); preovulatory follicles have greater than optimal diameter (decreased blood estradiol concentrations delay the LH surge); increased incidence of double ovulations (attributed to decreased blood progesterone concentrations due to liver metabolism); and increased incidence of anovulation (perhaps due to hypothalamic resistance to positive feedback of estradiol). Therefore, there are treatment protocols to manage growth and ovulation of the dominant follicle in these cattle, with similar protocols for beef cattle and heifers.

Regarding protocols for controlling ovarian follicular development and synchronizing ovulation, the following are the key concepts (reviewed in Wiltbank, 2011):

1. **Synchronization of a follicular wave.** This can be accomplished either mechanically (removal of large follicles by ovum pick up, with wave emergence approximately 1 day later), exogenous estradiol (wave emergence in 3 to 5 days), or exogenous GnRH or LH. Although follicle removal or estradiol treatment are very reliable for synchronizing wave emergence, GnRH or LH are less reliable, resulting in ovulation in perhaps 50 to 70% of animals (generally require a follicle responsive to LH). Consequently, many protocols using GnRH or LH to induce wave emergence are preceded by presynchronization. Although tight synchrony of wave emergence is critical for superstimulation, most synchronization programs will yield reasonable fertility to timed AI even in the absence of highly synchronous wave emergence, although cattle that fail to ovulate will have lower fertility.
2. **Optimized growth of the follicular wave and proestrus.** High progesterone concentrations during growth of the new dominant follicle, followed by low progesterone concentrations during proestrus, optimize growth of the dominant follicle, minimize the incidence of double ovulations, and optimize fertility (Wiltbank et al., 2012). However, high progesterone concentrations can be difficult to obtain, particularly in high-producing dairy cows. Since prolonged follicular development can result in excessively large follicles (with premature activation of the oocyte and poor fertility), recent protocols have shorter intervals between wave emergence and decreased progesterone concentrations, and a longer proestrus interval. Fertility is optimized by an abrupt and complete removal of progestins during proestrus; therefore, PGF may be given prior to removal of progestin-releasing implants, or two doses of PGF are given. Since blood estradiol concentrations during proestrus may be suboptimal, particularly in high-producing dairy cows, fertility may be improved with exogenous estradiol. Equine chorionic gonadotropin (eCG) has improved follicular development and fertility in timed-AI programs for beef cattle with a high prevalence of anestrus or low body condition scores, but was of less benefit in dairy cows (reviewed by Baruselli et al., 2012).
3. **Synchronization of ovulation.** To overcome anovulation in dairy cows and to enable fixed-time AI, ovulation is induced, either by treatments with LH or GnRH (which results in an LH surge in approximately 1-2 hours), or a small dose of estradiol (which stimulates an LH surge approximately 18 hours later). Most synchronization protocols will result in the majority (approximately 90%) of cattle ovulating. However, fertility will be limited by the timing of ovulation, preovulatory follicle diameter, and the integrity of the oocyte. Furthermore, the timing of insemination, inseminator skill, and semen quality, will also have profound effects on fertility

4. **Post-insemination environment.** Progesterone concentrations after insemination can significantly affect fertility (Wiltbank et al., 2012); increased progesterone 3 to 7 days after ovulation induces changes in the uterus that increase embryo elongation by 14 days (Wiltbank et al., 2012). Remarkably, treatment with exogenous progesterone starting 3 days after estrus increased pregnancy rates when an in vitro-produced embryo was transferred 4 days later (Clemente et al., 2009)

Superstimulation

When exogenous gonadotropins are given for superstimulation, the population of gonadotropin-sensitive follicles has a profound influence on the response (Aerts and Bols, 2010). In general, superstimulation response can be maximized by removing the dominant follicle (ovum pick up or exogenous estradiol) or hormonal priming (e.g. gonadotropins or growth hormone) to increase antral follicles (Aerts and Bols, 2010). Furthermore, high progesterone concentrations during superstimulation increased embryo quality 7 days after superovulation (Rivera et al., 2011). In that regard, although, total number of embryos/oocytes that were collected did not differ among groups, the percentage of transferable embryos was much less for cows superstimulated during the first follicular wave (55.9%), than during the second wave (88.5%) or during the first wave with exogenous progesterone (78.6%; Rivera et al., 2011).

Ovum pick up and in vitro embryo production

Ovum pick up and in vitro embryo production are becoming increasingly popular, especially in South America, as the number of ova recovered from *Bos indicus* cattle is generally much higher than in *Bos taurus* cattle (Baruselli et al., 2012). The ideal follicular phase to maximize performance of ovum pick up remains unclear, although recovery rates were generally optimized when ova were recovered close to follicular wave emergence (reviewed in Baruselli et al., 2012). Pre-treatment with gonadotropins increased the number of ova recovered in *Bos taurus* cattle, but not in *Bos indicus* cattle (reviewed in Baruselli et al., 2012).

Conclusions and Future Perspectives

Clearly, substantial new knowledge has been generated regarding ovarian follicular dynamics, ovulation, and luteal function in cattle. Consequently, we have functional tools to synchronize follicular wave emergence, ensure a luteal phase, terminate the luteal phase, and synchronize ovulation, thereby enabling timed-insemination, superstimulation, and ovum pick up. Despite substantial insights into many mechanisms, our knowledge remains incomplete. Furthermore, physiology of cattle, particularly the high-producing dairy cow, challenges our ability precisely control follicular development and ovulation, and in particular, suppresses fertility. Consequently, further studies are needed to elucidate underlying mechanisms, and to provide better tools to control ovarian function and enhance fertility.

References

- Adams, GP, Matteri, RL, Kastelic, JP, Ko, JCH and Ginther, OJ, 1992. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil* 94:177–188.
- Adams, GP, Evans, ACO and Rawlings, NC, 1994. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. *J Reprod Fertil* 100:27–33.
- Aerts JM, Bols PE, 2010. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reprod Domest Anim* 45:180-7.
- Ahmad, N, Townsend, EC, Dailey, RA and Inskeep, EK, 1997. Relationships of hormonal patterns and fertility to occurrence of two or three waves of ovarian follicles, before and after breeding, in beef cows and heifers. *Anim Reprod Sci* 49:13–28.
- Bao, B and Garverick, HA, 1998. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. *J Anim Sci* 76:1903–1921.
- Baruselli P, Sá Filho M, Ferreira R, Sales J, Gimenes L, Vieira L, Mendanha M, Bó G, 2012. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reprod Domest Anim*.47 Suppl 4:134-41
- Beg, MA, Bergfelt, DR, Kot, K, Wiltbank, MC and Ginther, OJ, 2001. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. *Biol Reprod* 64:432–441.
- Berardinelli, JG, Dailey, RA, Butcher, RL and Inskeep, EK, 1979. Source of progesterone prior to puberty in beef heifers. *J Anim Sci* 49:1276–1280.
- Bergfelt, DR, Plata-Madrid, H and Ginther, OJ, 1994. Counteraction of follicular inhibitory effect of follicular fluid by administration of FSH in heifers. *Can J Anim Sci* 74:633–639.
- Bleach, ECL, Glencross, RG and Knight, PG, 2004. Association between ovarian follicle development and pregnancy rates in dairy cows undergoing spontaneous oestrous cycles. *Reprod* 127:621-629.
- Burns, DS, Jimenez-Krassel, F, Ireland, JLH, Knight, PG, Ireland, J.J, 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: Evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol Reprod* 73:54-62.
- 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.
- Crowe, MA, Kelly, P, Driancourt, MA, Boland, MP and Roche, JF, 2001. Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth, and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin-releasing hormone-immunized heifers. *Biol Reprod* 64:368–374.
- Evans, ACO, Currie, WD and Rawlings, NC, 1992. Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. *J Reprod Fertil* 96:847–855.
- Evans, ACO, Adams, GP and Rawlings, NC, 1994. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. *J Reprod Fertil* 102:463–470.
- Evans AC, Mossa F, Fair T, Lonergan P, Butler ST, Zielak-Steciwko AE, Smith GW, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Ireland JJ, 2010. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl.* 67:421-9.
- Fair, T, 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 78:203-216.
- Fortune, JE, Rivera, GM and Yang, MY, 2004. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim Reprod Sci* 82-83:109-126.
- Fricke, PM and Wiltbank, MC, 1999. Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology* 52:1133–1143.
- Ginther, OJ, Knopf, L and Kastelic, JP, 1989. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. *J Reprod Fertil* 87: 223–230.
- Ginther, OJ, Bergfelt, DR, Beg, MA and Kot, K, 2001. Follicle selection in cattle: role of luteinizing hormone. *Biol Reprod* 64:197–205.
- Ginther, OJ, Beg, MA, Donadeu, FX, and Bergfelt, DR, 2003a. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* 78:239-257.
- Ginther, OJ, Beg, MA, Kot, K, Meira, C and Bergfelt, DR, 2003b. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. *Biol Reprod* 68:524–529.
- Glister, C, Tannetta, DS, Groome, NP and Knight, PG, 2001. Interactions between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of

- steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. *Biol Reprod* 65:1020–1028
- Gong, JG, Campbell, BK, Bramley, TA, Gutierrez, CG, Peters, AR and Webb, R, 1996. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod* 55:68–74.
- Lopez, H, Sartori, R and Wiltbank, MC, 2004. Reproductive hormones and follicular growth during development of one or multiple dominant follicles in cattle. *Biol Reprod* 72:788-795.
- Lussier, JG, Matton, P and Dufour, JJ, 1987. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J Reprod Fertil* 81:301–307.
- Mihm, M, Good, TEM, Ireland, JLH, Ireland, JJ, Knight, PG and Roche, JF, 1997. Decline in serum follicle-stimulating hormone concentrations alters key intrafollicular growth factors involved in selection of the dominant follicle in heifers. *Biol Reprod* 57:1328–1337.
- Mihm, M and Bleach, ECL, 2003. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim Reprod Sci* 78:217-237.
- Parker, KI, Robertson, DM, Groome, NP and Macmillan, KL, 2003. Plasma concentrations of inhibin A and follicle-stimulating hormone differ between cows with two or three waves of ovarian follicular development in a single estrous cycle. *Biol Reprod* 68:822–828.
- Perry, GA, Smith, MF, Lucy, MC, Green, JA, Parks, TE, MacNeil, MD, Roberts, AJ and Geary, TW, 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:5268-5273.
- Rivera FA, Mendonca LGD, Lopes G, Santos JEP, Perez RV, Amstalden M, Correa-Calderon A, Chebel RC. 2011. Reduced progesterone concentration during growth of the first follicular wave affects embryo quality but has no effect on embryo survival post transfer in lactating dairy cows. *Reproduction*, 141:333-342.
- Stock, AE and Fortune, JE, 1993. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 132:1108–1114.
- Sunderland, SJ, Crowe, MA, Boland, MP, Roche, JF and Ireland, JJ, 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil* 101:547–555.
- Sunderland, SJ, Knight, PG, Boland, MP, Roche, JF and Ireland, JJ, 1996. Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during

development of follicular- and luteal-phase dominant follicles in heifers. *Biol Reprod* 54:453–462

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

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

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

Wiltbank MC, Sartori R, Herlihy MM, Vasconcelos JL, Nascimento AB, Souza AH, Ayres H, Cunha AP, Keskin A, Guenther JN, Gumen A. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2011; 76:1568-1582.

Wiltbank MC, Souza AH, Giordano JO, Nascimento AB, Vasconcelos JM, Pereira MHC, Fricke PM, Surjus RS, Zinsly FCS, Carvalho PD, Bender RW and Sartori R, 2012. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. *Anim Reprod*;9 (in press).

Factors affecting the quantity and quality of ovarian follicles in cattle

A.C.O. Evans

School of Agriculture & Food Science, College of Agriculture Food Science and Veterinary Medicine, University College Dublin, Belfield, Dublin 4, Ireland.

E-mail: alex.evans@ucd.ie

Abstract

In cattle antral follicle count (AFC, follicles ≥ 3 mm in diameter) varies greatly among animals (from 5 to 50), is repeatable within animals, and is highly correlated with the total number of healthy follicles in ovaries. This variation in the ovarian reserve is reflected in the numbers of antral follicles in the ovaries at all ages after birth. Since numbers of follicles in ovaries are determined during gestation, the role of maternal nutrition and health during gestation (at time of ovarian development in their fetuses) has been investigated as factors that may impact oogonia proliferation and thus follicle numbers postnatally. We have investigated the effect of maternal environment during gestation on their offspring AFC by restricting maternal nutrition to 60% of maintenance requirements (compared with 100% in controls) during the first third of gestation. Calves born to nutritionally restricted mothers had 60% lower AFC compared with calves born to mothers fed control diets. The idea that numbers of follicles and oocytes in ovaries impact fertility is a long held belief in reproductive biology. We have evidence to indicate that fertility may be compromised in animals with low AFC due to effects on oocytes, progesterone and the endometrium compared with animals with high AFC. This has recently been tested in cattle and it has been shown that cows with a relatively high number of antral follicles in ovaries have higher pregnancy rates, shorter calving to conception intervals and fewer artificial inseminations during the breeding season compared with cows with a lower number of follicles, and similarly heifers with many follicles had higher pregnancy rates than those with fewer follicles. In addition, the high variation in follicle numbers in adults may not only be reflective of reproductive disorders and suboptimal fertility, but there is evidence to indicate that it may be associated with alterations in the function of other non-reproductive systems (e.g. cardiovascular) that may have profound effects on the animal's health and welfare. The practical recommendations arising from this work are that animals with very low AFC (<10) should be selected against in breeding programmes and that pregnant animals should be managed to maximise the numbers of follicles in their offspring (in particular avoid nutritional and disease stress).

Introduction

Successful reproduction and fertility is the cornerstone of most animal based agricultural enterprises; with none being more important than cattle-based industries for the production of milk and meat. The development of ovarian follicles has been investigated in many studies in the literature, but only recently have the numbers of ovarian follicles in ovaries and the factors that affect the size of the ovarian follicle reserve in cattle received attention (Evans et al., 2010; Ireland et al., 2011; Evans et al., 2012).

Ovarian follicles in cattle

Ovarian follicles are endocrine structures located within ovaries of all mammals that are essential for female reproductive function. The events of follicle development are similar in a wide range of species (Evans, 2003; Mihm and Evans, 2008). Ovarian follicles are formed in ovaries during the fetal period in most species (also including the early prenatal period in rodents) resulting in a large pool of resting primordial follicles that develop during the lifetime of animals. Mammals such as cattle (Erickson, 1966b; a), swine (Black and Erickson, 1968), sheep (McNatty et al., 1995; Steckler et al., 2005) and human beings (Block, 1952) are born with a highly variable number of morphologically healthy follicles and oocytes in the ovaries that dwindle rapidly during aging and are never replenished. Development of primordial into larger preantral then into ovulatory follicles takes about 4-6 months in cattle. Once preantral develop into antral follicles their antral cavity fills with a serum-like fluid rich in hormones and growth factors and the diameter continues to increase until ovulation or atresia. These antral follicles develop in cohorts (groups) in a pattern that has been described as a follicle wave (Ireland et al., 2000; Evans, 2003). The wave-like pattern of follicle growth was first proposed by Rajakoski in 1960 (Rajakoski, 1960) after a large study examining the number of follicles >1 mm in diameter in the ovaries of slaughtered cattle on different days of the cycle (Ireland et al., 2000). The development of ultrasonography as a tool to noninvasively monitor the growth and regression of individual ovarian follicles repeatedly in the same animal (Pierson and Ginther, 1984) firmly established that antral follicles grow in cohorts, in two or three wave-like patterns during estrous cycles in cattle (Evans, 2003).

The observations that the number of primordial follicles is highly variable at birth in cattle (Erickson, 1966b), that the number of different follicle types vary greatly among adult cattle, and that they reliably ovulate one, or occasionally two, follicles during each estrous cycle prompted further investigations into the physiological significance of the high variation in ovarian follicle numbers in an agriculturally important single-ovulating species like cattle.

Variation in the numbers of ovarian follicles in the ovaries of cattle

A number of studies have systematically catalogued numbers of antral follicles on different days of the estrous cycle in cattle and have established that numbers of follicles in ovarian follicular waves of the estrous cycle are highly variable among animals but very highly repeatable (0.85 to 0.95) within individuals (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007; Ireland et al., 2008; Jimenez-Krassel et al., 2009; Mossa et al., 2010). This observation holds true when considering the peak or nadir numbers associated with waves or the mean numbers across all days of the cycle. However, the follicle count must include all follicles ≥ 3 mm in diameter in both ovaries (the antral follicle count or AFC), which explains why many studies in the last 20 years that focused on counting follicles ≥ 5 mm in diameter did not observe the high variability of follicle numbers growing during follicular waves among animals nor the remarkably high repeatability of follicle numbers during waves in individuals. For example, we have noted that AFC during different follicular waves of an estrous cycle may be consistently lower than 5 during follicular waves in some animals and greater than 50 in others (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007; Mossa et al., 2010) (Figure 1)! Moreover, this high repeatability of follicle numbers during waves persists for at least one year

(Burns et al., 2005). Taken together, these results firmly establish that cattle can be phenotyped reliably based on AFC.

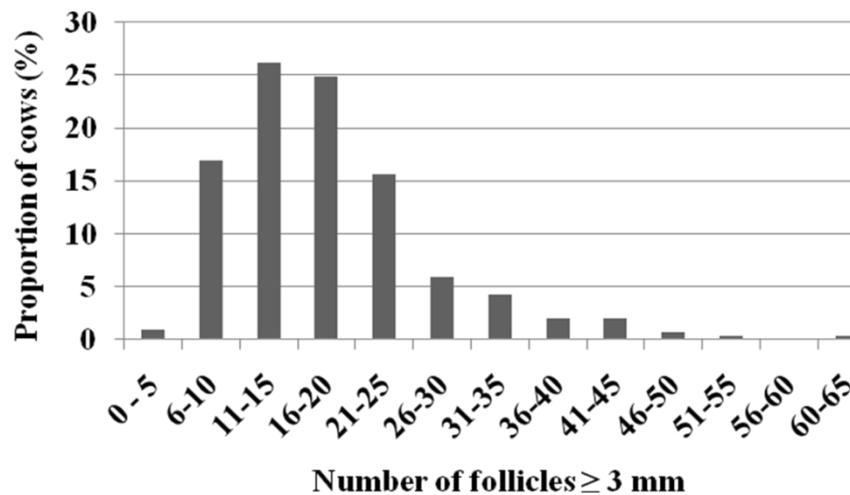


Figure 1. Frequency distribution of the total number of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter (Antral Follicle Count) in post-partum Holstein-Friesian dairy cows (n=383) measured using ultrasonography (Mossa et al., 2012)

Whether the high variation in number of antral follicles or AFC, which accounts for much less than 1% of the total number of follicles in ovaries, was associated with the inherently high variation in numbers of morphologically healthy follicles in ovaries (ovarian reserve) is unknown. To address this question, ovaries were surgically removed from age-matched heifers (adult cycling animal 12 to 18 months of age) that had high (≥ 25 follicles ≥ 3 mm in diameter) or low (≤ 15) AFC, and numbers of all follicles in ovaries were counted in histological sections (Ireland et al., 2008). This study showed that AFC was highly correlated with total number of morphologically healthy follicles in ovaries, and for example cattle with a low AFC also had 80% fewer total number of healthy primordial, preantral and antral follicles in ovaries compared with cattle with a high AFC.

Causes of the variation in the numbers of follicles in the ovaries

Follicle formation during fetal development

In ruminants, follicle formation occurs during fetal life, starting with migration of primordial germ cells to the genital ridge followed by differentiation into oogonia (Pepling, 2006), which is completed by the first or second month of fetal life (Smitz and Cortvrindt, 2002; Binelli and Murphy, 2010). After arrival of the primordial germ cells into the gonadal ridge, the germ cells continue to proliferate and differentiate into primordial follicles, comprised of an oocyte surrounded by squamous granulosa cells, (primordial follicles are arrested in meiosis) (Webb and Campbell, 2007). In cattle, differentiation of primordial follicles starts between 90 and 140 days of fetal life (Erickson, 1966b; Russe, 1983; Tanaka et al., 2001; Yang and Fortune, 2008). In addition, it is well established that the population of oogonia in the developing bovine ovary reaches an estimated maximum number of 2.1 million (Smitz and Cortvrindt, 2002), which rapidly declines during mid to late fetal life due to apoptosis until the

population of follicles is reduced at birth to approximately 130,000 with a high variation among individuals (Erickson, 1966b; Aerts and Bols, 2010).

David Barker (hence the Barker Hypothesis (Barker, 1992), or more recently the Thrifty Phenotype Hypothesis, (Hales and Barker, 2001)) suggests that environmental influences early in human fetal life are reflected in impaired growth, development and metabolism leading to increased risk for diseases in adulthood. The Hypothesis proposes that some diseases originate through fetal adaptations to malnutrition that permanently alter body function. This hypothesis is supported by animal models (McMillen and Robinson, 2005). Most studies have examined the link between malnutrition with cardiovascular disease, obesity and diabetes (McMillen and Robinson, 2005; Boo and Harding, 2006), but only a few studies have examined the impact of maternal environment on reproduction. Hence, it is reasonable to speculate that the maternal environment during gestation, at the time of ovarian development in their fetuses, may impact oogonia proliferation and thus follicle numbers postnatally.

Evidence that maternal disease during gestation negatively impacts antral follicle count in their offspring

We have recently examined the effect of disease during pregnancy in cattle on ovarian development and function of their offspring. Somatic cells normally present in milk of dairy cows are predominantly white blood cells. When somatic cells are counted results are referred to as the Somatic Cell Count (SCC). The major factor affecting SCC in milk is a mammary gland infection. SCC in milk samples collected from individual dairy cows at various intervals (*e.g.*, monthly) during lactation are commercially determined and recorded in dairy herds. Consequently, high SCC in milk (*e.g.*, >200,000) is useful as an index for potential previous or current udder infections/inflammation that may have been caused by mastitis or injury (Caraviello et al., 2005). In a preliminary study, we have recently shown that dairy cows with a high number of SCC measurements >200,000 during pregnancy produce daughters with relatively low circulating concentrations of anti-Müllerian hormone (AMH) as adults. AMH is a glycoprotein produced exclusively by granulosa cells of healthy growing follicles (La Marca and Volpe, 2006), and circulating AMH concentrations are not only static during reproductive cycles, but also highly correlated with AFC and size of the ovarian reserve in cattle and other species (see review (Ireland et al., 2010)). In a recent follow up study with larger animal numbers, we subjected two groups of 12 month old Holstein heifers to two injections of prostaglandin F_{2α} (PG) spaced 11 days apart to synchronize estrous cycles. A single blood sample was removed from the tail vein of each animal 96 hours after the last PG injection, and serum AMH concentration was determined using our previously validated AMH assay (intra- and inter-assay cv = < 10%; (Ireland et al., 2008)). One group of heifers were from dams (n = 25 animals) that had 4 or 5 SCC measurements > 200,000 during pregnancy while the other group of heifers were from dams (n = 20) with 0 or 1 SCC measurement > 200,000 during pregnancy. Like our previous preliminary study (Ireland et al., 2010), results showed that the heifers from dams with chronically high SCC had AMH concentrations nearly 50% lower (0.13 ± 0.03 vs 0.075 ± 0.01 ng/ml, $P < 0.05$) compared with heifers from dams with zero or a low SCC. Taken together, these results imply that chronic infections during pregnancy of dairy cows diminish size of the ovarian reserve (and lower AMH) and potentially future reproductive performance in their offspring.

Evidence that maternal nutrition during gestation negatively impacts antral follicle count in their offspring

Most studies examining the Thrifty Phenotype Hypothesis investigate the consequences of nutritional challenges imposed on the dam on health of their offspring as young adults. However, we tested the hypothesis that restriction of maternal nutrition during gestation, at the time of ovarian development in their fetuses, negatively impacts proliferation of primordial germ cells (to be consistent with Introduction) and thus follicle numbers postnatally. We tested this hypothesis by restricting nutrition of cows to 0.6 of their maintenance energy requirements shortly before conception to the end of the first trimester of pregnancy. The first trimester of pregnancy coincides with the peak in number of follicles and oocytes in fetal ovaries (Erickson, 1966a). Results show that, although weight of offspring was unaltered at birth, AFC and circulating AMH concentrations in calves born to nutritionally restricted mothers were 60% lower compared with calves born to control mothers (Mossa et al., 2009) (Table 1). Because AFC and AMH concentrations are positively correlated with size of the ovarian reserve (Ireland et al., 2008), these findings imply that maternal nutrition as well as chronic infections during pregnancy may have a previously unrecognized yet important role in regulation of size of the ovarian reserve and perhaps fertility of cattle.

Table 1. Mean (\pm SEM) number of follicles ≥ 3 mm in diameter (Antral Follicle Count) during follicle waves in heifer calves born to mothers fed a control diet (Control) or who were nutritionally restricted (Restricted, 60% energy requirement) for the first 110 days of gestation. From (Mossa et al., 2009).

Weeks of age	Control (n=13)	Nutrient Restricted (n=10)
7	23.8 \pm 2.1	14.1 \pm 0.9**
18	26.0 \pm 2.8	16.2 \pm 1.1**
35	23.9 \pm 2.2	16.6 \pm 1.2**
56	21.9 \pm 2.0	17.5 \pm 1.9
86	23.6 \pm 1.9	15.8 \pm 1.8*

*P<0.05 and **P<0.01 compared to the control animals at the same age

Effects of genotype on antral follicle count

Another intriguing observation of the numbers of follicles in cattle is a comparison of *Bos indicus* versus *Bos taurus* breeds of cattle. While there are small differences in the characteristics of estrous cycles and follicle waves between these types of cattle (Sartori et al., 2010), it is clear that there are different number of follicles in follicle waves. At the onset of each follicular wave there are on average 18 (Ireland et al., 2007) to 24 (Ginther et al., 1996) small antral follicles detected in the ovaries of *Bos taurus* cattle, whereas there appear to be at least double this is *Bos indicus* cattle (Gimenes et al., 2009) with reports of average counts ranging from 40 (Alvarez et al., 2000) to 50 (Buratini et al., 2000; Sartori et al., 2010) follicles.

While these difference in antral follicle numbers between breeds have been suggested to be due to differences in circulating concentrations of insulin and IGF-I (Sartori et al., 2010; Sartori and Barros, 2011), it is also possible that they arise due to differences in the maternal environment during gestation affecting numbers of follicles in the ovarian reserve. In addition, it is interesting to note that while *Bos indicus* cattle have more follicles than *Bos Taurus* breeds there is some evidence to support the notion that prenatal maternal nutrition also negatively impacts the ovarian reserve in offspring of *Bos indicus* breeds of cattle (Sullivan et al., 2009), as shown in our studies (Mossa et al., 2009).

Association of the numbers of ovarian follicles and fertility

It has long been known that there is very high variation in the size of ovaries and the ovarian reserve (Erickson, 1966b; a). Moreover, the idea that quantity of follicles and oocytes in ovaries impacts fertility is a long-held tenet in reproductive biology (Hunter, 1787; Erickson, 1966b; te Velde and Pearson, 2002). However, the association of AFC with fertility has only recently received interest in human beings (Rosen, 2011; Styer and Toth, 2011).

It is clear that the quantity of follicles and oocytes are highly variable throughout reproductive life spans of adults (see above) and also that oocyte quantity rapidly declines during ageing (Fayad et al., 2004; Kuhn et al., 2006). Furthermore, in women, the decline in fertility about 20 years before menopause (cessation of reproductive cycles and depletion of oocytes from ovaries) and high variability of age at menopause (range = 40 to 60 yrs old) are both hypothesized to be caused by the high variation in number of follicles and oocytes in women at birth (Faddy and Gosden, 1996; te Velde and Pearson, 2002). Nevertheless, the extent and mechanisms whereby the inherently high variation in quantity of follicles and oocytes in ovaries of individuals (Block, 1952; Erickson, 1966b; a; Burns et al., 2005; Ireland et al., 2007; Ireland et al., 2008; Ireland et al., 2009; Jimenez-Krassel et al., 2009) may cause or contribute to the relatively large differences in fertility amongst *young adults* are unknown and have not been previously directly examined for any species.

To test the hypothesis that AFC is positively associated with fertility in cattle we recently completed a study showing that cows with a high AFC had higher pregnancy rates (Figure 2), shorter calving to conception intervals and received fewer services during the breeding season compared with cows with a low AFC (Mossa et al., 2012). This finding is supported by a study in beef heifers showing higher pregnancy rates in heifers with high versus a lower AFC (Cushman et al., 2009).

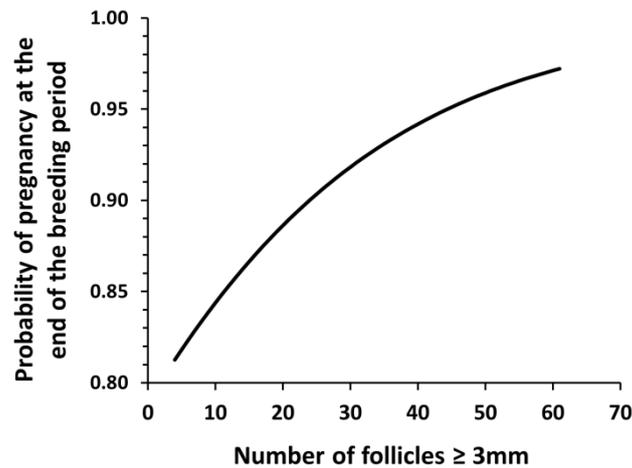


Figure 2. Probability of pregnancy at the end of the breeding period in 306 lactating dairy cows plotted against the numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter (AFC). Logistic regression, utilising a logit link function, was used to quantify the association between AFC and pregnancy at the end of the breeding period ($P=0.06$). (Mossa et al., 2012)

Antral follicle count and superovulation

Responsiveness to superovulation and reduced success of IVF and embryo transfer are well established to be negatively associated with ageing and to correspond to a reduction in number of follicles and oocytes in ovaries in single-ovulating species like cattle (Kawamata, 1994; Cushman et al., 1999; Taneja et al., 2000; Singh et al., 2004) and humans (Beckers et al., 2002; Styer and Toth, 2011). Our results show that young adult cattle with low versus high AFC respond poorly to superovulation and have a reduced number of transferable embryos (Ireland et al., 2007).

Conclusions

In cattle the number of antral follicles in the ovaries is reflective of the size of the ovarian reserve (Ireland et al., 2008) and there is increasing evidence that size of the ovarian reserve is negatively impacted by maternal environment during gestation. The size of the ovarian reserve is also associated with fertility, but the mechanisms whereby the inherent high variation in follicle numbers negatively impact ovarian function, endometrial development and embryo survival are complex and poorly understood. These findings highlight: i) the importance of the maternal environment during gestation in determining the size of the ovarian reserve in their offspring, ii) the contribution of the ovarian reserve to subsequent fertility in cattle, and iii) the importance of future studies to unravel the factors and associated mechanisms that regulate not only size of the ovarian reserve, but also the linkage between the inherently high variation in numbers of follicles in the ovarian reserve with subsequent ovarian and uterine function and optimal fertility.

Future Perspectives

This research is important as it shows that low follicle numbers are associated with poor fertility in cattle. Two practical recommendations can now be made. Firstly, since follicle numbers are heritable ($h^2 = 0.31$), animals with very low numbers of follicles (AFC < 10 in *Bos taurus* breeds) should be selected against in breeding programmes. Secondly, since the numbers of follicle in ovaries are determined during gestation, pregnant animals must be managed to maximise the numbers of follicles in their offspring (in particular avoid nutritional and disease stress). Managing animals to have high fertility is a lifelong task and not just relevant at the time of breeding.

Acknowledgements

The Author is grateful to Science Foundation Ireland (07/SRC/B1156) and the Department of Agriculture Food and the Marine, Ireland (RSF 06328) for funding to support his research.

References

- Aerts, J.M., Bols, P.E., 2010. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 171-179.
- Alvarez, P., Spicer, L.J., Chase, C.C., Jr., Payton, M.E., Hamilton, T.D., Stewart, R.E., Hammond, A.C., Olson, T.A., Wettemann, R.P., 2000. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *J. Anim. Sci.* 78, 1291-1302.
- Barker, D.J., 1992. The effect of nutrition of the fetus and neonate on cardiovascular disease in adult life. *Proceedings of the Nutrition Society* 51, 135-144.
- Beckers, N.G.M., Macklon, N.S., Eijkemans, M.J.C., Fauser, B.C.J.M., 2002. Women with regular menstrual cycles and a poor response to ovarian hyperstimulation for in vitro fertilization exhibit follicular phase characteristics suggestive of ovarian aging. *Fertility and Sterility* 78, 291-297.
- Binelli, M., Murphy, B.D., 2010. Coordinated regulation of follicle development by germ and somatic cells. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 1-12.
- Black, J.L., Erickson, B.H., 1968. Oogenesis and ovarian development in the prenatal pig. *Anat Rec* 161, 45-56.
- Block, E., 1952. Quantitative morphological investigation of the follicular system in women. *Acta Anat* 14, 108-123.
- Boo, H.A.D., Harding, J.E., 2006. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology* 46, 4-14.
- Buratini, J., Jr., Price, C.A., Visintin, J.A., Bo, G.A., 2000. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology* 54, 421-431.

- Burns, D.S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L., Knight, P.G., Ireland, J.J., 2005. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. *Biol. Reprod.* 73, 54-62.
- Caraviello, D.Z., Weigel, K.A., Shook, G.E., Ruegg, P.L., 2005. Assessment of the impact of somatic cell count on functional longevity in Holstein and Jersey cattle using survival analysis methodology. *J. Dairy. Sci.* 88, 804-811.
- Cushman, R.A., Allan, M.F., Kuehn, L.A., Snelling, W.M., Cupp, A.S., Freetly, H.C., 2009. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight. *J. Anim. Sci.* 87, 1971-1980.
- Cushman, R.A., DeSouza, J.C., Hedgpeth, V.S., Britt, J.H., 1999. Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. *Biol. Reprod.* 60, 349-354.
- Erickson, B.H., 1966a. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.* 11, 97-105.
- Erickson, B.H., 1966b. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J. Anim. Sci.* 25, 800-805.
- Evans, A.C.O., 2003. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod. Domest. Anim.* 38, 1-7.
- Evans, A.C.O., Mossa, F., Fair, T., Lonergan, P., Butler, S.T., Zielak-Steciwko, A.E., Smith, G.W., Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L.H., Ireland, J.J., 2010. Causes and consequences for the variation in the number of ovarian follicles in cattle, In: Lucy, M.C., Pate, J.L., Smith, M.F., Spencer, T.E. (Eds.), *Reproduction in Domestic Ruminants VII*. Society for Reproduction and Fertility, Volume 67, Nottingham University Press, Nottingham, pp. 412-429.
- Evans, A.C.O., Mossa, F., Walsh, S.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Ireland, J.J., 2012. Effects of maternal environment during gestation on ovarian folliculogenesis and consequences for fertility in bovine offspring. *Reprod. Domest. Anim.* 47 (Supplement 4), 31-37.
- Faddy, M.J., Gosden, R.G., 1996. A model conforming the decline in follicle numbers to the age of menopause in women. *Hum. Reprod.* 11, 1484-1486.
- Fayad, T., Levesque, V., Sirois, J., Silversides, D.W., Lussier, J.G., 2004. Gene expression profiling of differentially expressed genes in granulosa cells of bovine dominant follicles using suppression subtractive hybridization. *Biol. Reprod.* 70, 523-533.
- Gimenes, L.U., Fantinato Neto, P., Arango, J.S.P., Ayres, H., Baruselli, P.S., 2009. Follicular dynamics of *Bos indicus*, *Bos taurus* and *Bubalus bubalis* heifers treated with norgestomet ear implant associated or not to injectable progesterone. *Anim. Reprod.* 6, 256.
- Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Gibbons, J.R., Kot, K., 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* 55, 1187-1194.
- Hales, C.N., Barker, D.J., 2001. The thrifty phenotype hypothesis. *British medical bulletin* 60, 5-20.

- Hunter, J., 1787. An experiment to determine the effect of extirpating one ovary upon the number of young produced. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 77, 233-239.
- Ireland, J.J., Mihm, M., Austin, E., Diskin, M.G., Roche, J.F., 2000. Historical perspective of turnover of dominant follicles during the bovine estrous cycle: key concepts, studies, advancements, and terms. *J. Dairy Sci.* 83, 1648-1658.
- Ireland, J.J., Scheetz, D., Jimenez, F., Folger, J.K., Smith, G.W., Mossa, F., Evans, A.C.O., 2010. Evidence that mammary gland infection/injury during pregnancy in dairy cows may have a negative impact on size of the ovarian reserve in their daughters 43rd Annual Meeting for the Society for Study of Reproduction, Milwaukee, WI.
- Ireland, J.J., Smith, G.W., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Folger, J.K., Ireland, J.L., Mossa, F., Lonergan, P., Evans, A.C., 2011. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Mullerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 23, 1-14.
- Ireland, J.J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J.L., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum. Reprod.* 22, 1687-1695.
- Ireland, J.J., Zielak, A.E., Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Bettegowda, A., Scheetz, D., Walsh, S., Mossa, F., Knight, P.G., Smith, G.W., Lonergan, P., Evans, A.C.O., 2009. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. *Biol. Reprod.* 80 954-964.
- Ireland, J.L.H., Scheetz, D., Jimenez-Krassel, F., Themmen, A.P., Ward, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Perez, G.I., Evans, A.C., Ireland, J.J., 2008. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol. Reprod.* 79, 1219-1225.
- Jimenez-Krassel, F., Folger, J., Ireland, J.L.H., Smith, G.W., Hou, X., Davis, J.S., Lonergan, P., Evans, A.C.O., Ireland, J.J., 2009. Evidence that high variation in ovarian reserves of healthy young adults has a negative impact on the corpus luteum and endometrium during reproductive cycles of single-ovulating species. *Biol. Reprod.* 80, 1272-1281.
- Kawamata, M., 1994. Relationship between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. *J. Vet. Med. Sci.* 56, 965-970.
- Kuhn, M.T., Hutchison, J.L., Wiggans, G.R., 2006. Characterization of Holstein heifer fertility in the United States. *J. Dairy Sci.* 89, 4907-4920.
- La Marca, A., Volpe, A., 2006. Anti-Mullerian hormone (AMH) in female reproduction: is measurement of circulating AMH a useful tool? *Clinical Endocrinology* 64, 603-610.

- McMillen, I.C., Robinson, J.S., 2005. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiological Reviews* 85, 571-633.
- McNatty, K.P., Smith, P., Hudson, N.L., Heath, D.A., Tisdall, D.J., O, W.-S., Braw-Tal, R., 1995. Development of the sheep ovary during fetal and early neonatal life and the effect of fecundity genes *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 3-16.
- Mihm, M., Evans, A.C., 2008. Mechanisms for dominant follicle selection in monovulatory species: a comparison of morphological, endocrine and intraovarian events in cows, mares and women. *Reprod. Domest. Anim.* 43 Suppl 2, 48-56.
- Mossa, F., Jimenez-Krassel, F., Walsh, S., Berry, D.P., Butler, S., Folger, J., Smith G.W., Ireland, J.L.H., Lonergan, P., Ireland, J.J., Evans, A.C., 2010. The inherent capacity of the pituitary gland to produce gonadotropins is not influenced by the number of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter in cattle. *Reprod. Fertil. Dev* 22, 550-557.
- Mossa, F., Kenny, D., Jimenez-Krassel, F., Smith G.W., Berry, D., Butler, S., Fair, T., Lonergan, P., Ireland, J.J., Evans, A.C.O., 2009. Undernutrition of heifers during the first trimester of pregnancy diminishes size of the ovarian reserve in female offspring, 42nd Annual Meeting of the Society for Study of Reproduction, Pittsburg, PA, p. 77.
- Mossa, F., Walsh, S.W., Butler, S.T., Berry, D.P., Carter, F., Lonergan, P., Smith, G.W., Ireland, J.J., Evans, A.C.O., 2012. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 95, 2355-2361.
- Pepling, M.E., 2006. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis* 44, 622-632.
- Pierson, R.A., Ginther, O.J., 1984. Ultrasonography of the bovine ovary. *Theriogenology* 21, 495-504.
- Rajakoski, E., 1960. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonally, cyclical, and left-right variations. *Acta Endocrinologica Supplement* 52, 1-68.
- Rosen, M.P., 2011. Do oocyte quality and quantity as measured by antral follicle count decline in parallel? *Fertil Steril* 95, 482-483.
- Russe, I., 1983. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomica* 24, 77-92.
- Sartori, R., Barros, C.M., 2011. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* In press.
- Sartori, R., Bastos, M.R., Baruselli, P.S., Gimenes, L.U., Ereno, R.L., Barros, C.M., 2010. Physiological difference and implications the reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment, In: Lucy, M.C., Pate, J.L., Smith, M.F., Spencer, T.E. (Eds.), *Reproduction in Domestic Ruminants VII*, Nottingham University Press, Nottingham, pp. 357-375.
- Singh, J., Dominguez, M., Jaiswal, R., Adams, G.P., 2004. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle. *Theriogenology* 62, 227-243.
- Smitz, J.E., Cortvrindt, R.G., 2002. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 123, 185-202.

- Steckler, T., Wang, J., Bartol, F.F., Roy, S.K., Padmanabhan, V., 2005. Fetal programming: prenatal testosterone treatment causes intrauterine growth retardation, reduces ovarian reserve and increases ovarian follicular recruitment. *Endocrinology* 146, 3185-3193.
- Styer, A.K., Toth, T.L., 2011. Antral follicle count in clinical practice: building the bridge from ovarian reserve to in vitro fertilization outcome. *Fertil Steril* 95, 480-481.
- Sullivan, T.M., Micke, G.C., Greer, R.M., Irving-Rodgers, H.F., Rodgers, R.J., Perry, V.E., 2009. Dietary manipulation of *Bos indicus* x heifers during gestation affects the reproductive development of their heifer calves. *Reprod. Fertil. Dev.* 21, 773-784.
- Tanaka, Y., Nakada, K., Moriyoshi, M., Sawamukai, Y., 2001. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. *Reproduction* 121, 777-782.
- Taneja, M., Bols, P.E., Van de Velde, A., Ju, J.C., Schreiber, D., Tripp, M.W., Levine, H., Echelard, Y., Riesen, J., Yang, X., 2000. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biol. Reprod.* 62, 206-213.
- Te Velde, E.R., Pearson, P.L., 2002. The variability of female reproductive ageing. *Hum Reprod Update* 8, 141-154.
- Webb, R., Campbell, B.K., 2007. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Society of Reproduction and Fertility Supplement* 64, 141-163.
- Yang, M.Y., Fortune, J.E., 2008. The capacity of primordial follicles in fetal bovine ovaries to initiate growth in vitro develops during mid-gestation and is associated with meiotic arrest of oocytes. *Biol. Reprod.* 78, 1153-1161.

O que está havendo com as tecnologias de seleção e melhoramento assistido por marcadores de DNA?

José Fernando Garcia

Faculdade de Medicina Veterinária – UNESP – Araçatuba

O que se sabe atualmente sobre a influência do DNA na vida?

1. Variações na sequência do DNA (mutações, inserções ou deleções) podem afetar a estrutura ou o controle da expressão de proteínas, consequentemente alterando as funções dessas últimas, com reflexos na manifestação fenotípica.

2. Alterações nos padrões de metilação das cadeias de DNA podem causar variações fenotípicas, independentemente de variações nas sequências de bases do DNA (fenômeno denominado epigenética e não considerado nesse artigo).

3. As tecnologias atualmente disponíveis permitem gerar grandes quantidades de informação sobre as sequências de DNA e suas variações de forma rápida, barata e precisa (área em constante transformação, com novas tecnologias surgindo a cada dia).

4. O acúmulo exponencial de informações sobre os genomas das diferentes espécies biológicas em banco de dados públicos exige/permite o desenvolvimento constante de novas ferramentas bioestatísticas para interpretar essas informações.

Num cenário com essa complexidade, em que conhecemos o alvo de procura (DNA), possuímos as ferramentas necessárias (tecnologias de geração de informação genômica) e temos acesso à informação mais precisa possível (bancos de dados genômicos), porque a tecnologia que envolve as análises do DNA ainda não se transformou no toque de Midas que falta aos processos de seleção e melhoramento animal?

A despeito de todos os grandes avanços no conhecimento do genoma humano, área que primeiramente motivou o desenvolvimento de toda essa tecnologia, somente agora (início da segunda década do século XXI) começa-se a enxergar uma ou outra aplicação concreta da tecnologia/informação no dia-a-dia da medicina. Exemplos são os marcadores como indicativos para o uso de medicamentos de forma customizada (farmacogenômica) e para a predição de risco/susceptibilidade a doenças (câncer, diabetes, obesidade, etc...). Em ambos os casos, trata-se de testes preditivos parciais, com uso restrito a situações específicas, de custo alto e que permitem ao médico tomar decisões clínicas com precisão apenas um pouco maior do que ele possuía até então. Essa é uma área promissora e muito se especula sobre a dimensão que esse tipo de aplicação tecnológica terá no futuro.

Levando em consideração o curso do desenvolvimento da área genômica em humanos, poderíamos supor que muito em breve, senão imediatamente, esse tipo de uso também seria possível na produção animal. Porque isso não está acontecendo?

As tentativas de aplicação das tecnologias de marcadores moleculares na produção animal, especificamente em bovinos, ocorreu ao longo dos últimos 20 anos na forma de “ondas”.

Primeira “onda”: Uso de marcadores do tipo microsatélite para a identificação de QTL (locus de característica quantitativa). Muito em voga da década de 90,

tratava-se da tecnologia mais moderna e precisa para tentar encontrar as variações do DNA que pudessem explicar as diferenças fenotípicas observadas entre os animais. Sua limitação advinha do fato de que existiam poucos marcadores disponíveis (pouca informação), não existiam genomas de referência nas espécies animais (o primeiro foi o do bovino taurino concluído em 2009) e o custo das análises era muito caro e difícil (restringindo seu uso ao ambiente acadêmico).

Segunda “onda”: Variações pontuais no DNA, evidenciadas por marcadores do tipo SNP (polimorfismo de sítio único), associados a genes relacionados a características de produção (crescimento, produção de leite, qualidade da carne, fertilidade). Essa era marcada pela entrada de empresas transnacionais do setor farmacêutico na arena. À luz do conhecimento pré-existente em 2005, quando esse movimento começou, a idéia de reunir todo o conhecimento disponível sobre SNP associados a características funcionais e propor um teste único e completo que pudesse prever a capacidade produtiva de um determinado animal de maneira precoce e precisa fazia todo o sentido. A limitação dessa estratégia fundamentou-se nas seguintes situações: i. os poucos SNP testados (por volta de 200) explicavam apenas parcialmente cada um dos fenótipos a eles associados, ii. o custo da tecnologia ainda era alto para seu uso em larga escala nos sistemas de produção (em torno de US\$ 50,00), iii. dificuldade em quantificar os benefícios (econômicos) de seu uso ao longo do tempo e iv. o aumento rápido na quantidade e qualidade das informações genômicas e o surgimento de novas tecnologias analíticas (SNP chips de alta densidade), tornaram esse tipo de teste de tecnologia de valor questionável no âmbito das cadeias produtivas de corte e leite, não tendo sido incorporado de forma contundente aos programas de melhoramento genético tradicionais.

Terceira “onda”: Surgido em 2007, sobre a revolucionária plataforma de SNP chip de alta densidade (mais de 50.000 marcadores em um único teste) e denominado de “Seleção Genômica”, esse processo consiste em interrogar a variabilidade de dezenas de milhares de pontos (SNP) distribuídos ao longo do genoma, e associar essa informação, única e exclusiva para cada animal, a bancos de dados fenotípicos, permitindo o cálculo de DEP (diferenças esperadas na progênie) fortalecidas pela genômica. Nesse caso não se identificam os genes envolvidos na manifestação fenotípica (como na “onda” anterior), mas sim realiza-se um “pente fino” ao longo de todos os cromossomos, associando cada um dos milhares de SNP analisados com cada fenótipo em questão, gerando valores que são computados ao final gerando a DEP genômica. Em 2008 esse processo passou a ser utilizado oficialmente na rotina do programa de melhoramento da raça Holandesa no Canadá e Estados Unidos, e a partir daí nas diferentes raças de leite do mundo. Com isso agregou-se valor (mensurável) aos processos de melhoramento genético tradicionais, por aumentar a acurácia das DEP, que no caso das raças leiteiras significou aumento de 25-30% para 75-80% na acurácia das DEP de animais jovens (ainda não provados por outros métodos). As razões para esse sucesso assentaram-se nos seguintes fatores: i. custo compatível com o sistema de produção leiteira (US\$ 50,00 por um teste que permite determinar antecipadamente qual o melhor animal, com precisão de 80%), ii. sinergia com os programas de melhoramento genético pré-existent e sólidos, proporcionando o aumento da sua eficiência, iii. possibilidade de mensurar a relação custo-benefício (o uso do processo de “Seleção Genômica” permitiu a redução de custos com testes de progênie, aumentou a velocidade e a precisão do processo de seleção), iv. os bancos de dados (fenotípicos e genotípicos) e sua manipulação são de

propriedade exclusiva dos criadores, através das suas associações, sendo a análise genômica realizada em laboratórios de prestação de serviço específica.

Em raças de corte, a “Seleção Genômica” não se estruturou da mesma forma que nas raças de leite. Razões para essa diferença são: i. gargalo do custo unitário de um teste genômico (US\$ 50,00 por animal pode ser muito caro para seu uso extensivo em grandes rebanhos de corte nos mesmos moldes do que foi observado no gado de leite), ii. baixa qualidade e complexidade dos bancos dados fenotípicos em rebanhos de corte (o que não permite a visualização de resultados tão impactantes como no caso das raças leiteiras) e iii. diferenças na dinâmica da cadeia de produção de carne quando comparada a de leite (ciclo de produção mais rápido e menor valor agregado do indivíduo).

O cenário atual do uso de marcadores moleculares para a seleção e melhoramento animal pode ser resumido da seguinte forma: 1. Diferentes tentativas relacionadas a implantação de métodos e estratégias para o bom uso de marcadores moleculares na pecuária foram experimentadas nas últimas duas décadas, 2. A única aplicação concreta e economicamente sustentável atualmente existente é a “Seleção Genômica” em raças leiteiras e de dupla aptidão, ligadas a programas de melhoramento consistentes, 3. Em bovinos de corte, bem como em outras espécies (ovinos, caprinos, bubalinos), ainda existem gargalos a serem superados, 4. A terceira “onda” deverá ser suplantada por uma “quarta” onda, à medida que o volume de informação e conhecimento for aumentando com o passar dos anos.

Pode-se vislumbrar, principalmente pelo que se tem observado na área de genômica em humanos, que em menos de cinco anos talvez seja possível propor novas abordagens para a aplicação dos marcadores na área de produção animal, que desconectem-se um pouco dos princípios da genética quantitativa, alinhando-se mais com o entendimento da complexidade da relação entre os genes e suas variantes com a manifestação dos fenótipos de interesse.

PARTICULARIDADES DA REPRODUÇÃO DE VACAS DE LEITE

Roberto Sartori; Monique M. Guardieiro; Pedro L. J. Monteiro Jr; Murillo A. Porto Meschiatti; Ricardo S. Surjus

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil - 13418-900

robertosartori@usp.br

1. Introdução

Nos países de clima tropical há diversos sistemas para produção de leite. Dentre eles, destacam-se o intensivo, com rebanhos compostos principalmente por vacas *Bos taurus* de elevada produção leiteira e o sistema extensivo ou a pasto com vacas mestiças de menor produção leiteira oriundas do cruzamento entre *Bos taurus* (geralmente Holandês) e *Bos indicus* (principalmente Gir). Independente do sistema, vacas leiteiras têm problemas relacionados à eficiência reprodutiva que afetam diretamente o sucesso econômico do empreendimento.

Devido a problemas cada vez mais frequentes de detecção de cio e queda nas taxas de concepção (TC) em vacas leiteiras, o intervalo de partos (IP) tem sido cada vez mais prolongado. Sendo assim, após o período de espera voluntário (PEV) deve-se intensificar o manejo na tentativa de alcançar uma alta taxa de serviço (TS), que na maioria das vezes obriga a lançar mão de uma intensa observação de estro ou/e de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). O PEV do rebanho deve ser determinado levando em conta principalmente a persistência da lactação e a TC. Desta forma, tendo em que a TP é o produto da TC pela TS, se aumentar ambas ou qualquer uma das duas se consegue aumentar a TP, e conseqüentemente ocorrerá uma redução do IP.

Nota-se, ao longo dos anos, que vacas, especialmente as de elevada produção leiteira, apresentam um aumento gradativo em problemas reprodutivos, aparentemente devido a causas multifatoriais (Lucy, 2001). Uma dessas causas, e talvez a mais relevante seja o próprio aumento na produção de leite, associado ao maior consumo de alimentos, e subsequente elevação do fluxo sanguíneo hepático (Sangsristavong et al., 2002). Tal fato resulta em baixas concentrações circulantes de hormônios esteróides e subsequente alteração no comportamento de estro, qualidade ovocitária/embrionária e fertilidade (Lopez et al., 2004; Wiltbank et al., 2006). A seleção genética para produção de leite aparentemente não alterou a fertilidade, pois a TC das novilhas permaneceu constante e acima dos 60% ao longo dos anos.

Diversos trabalhos têm demonstrado uma correlação negativa entre o aumento da produção de leite e a eficiência reprodutiva em vacas leiteiras (Royal et al., 2000; Lucy, 2001; Washburn et al., 2002). Por exemplo, as TC em vacas lactantes apresentavam-se acima de 50% nos anos 40 e 50. Atualmente, a TC relatada tem sido abaixo de 40%. Associado à baixa TC em vacas com maior produção leiteira observou-se um aumento nos problemas reprodutivos, tais como, cistos ovarianos e anovulação (Jordan & Fourdraine, 1993; Garverick, 1997; López-Gatius et al., 2002; Wiltbank et al., 2002), retardo na ovulação pós-parto (Nakao et al., 1992; Lamming & Darwash, 1998; Royal et al., 2000), duração e/ou intensidade de estro reduzidos (Nebel et al., 1997; Dransfield et al., 1998; Lopez et al., 2004), aumento nas taxas de ovulações

múltiplas (Nielen et al., 1989; Kinsel et al., 1998), luteólise prematura resultando em ciclos estrais curtos (Lucy, 2001) e perda gestacional (Santos et al., 2004).

Esta revisão discorre sobre algumas particularidades da fisiologia reprodutiva da vaca de alta produção e das diferenças nas funções ovarianas, uterinas e metabólicas entre as vacas de alta produção de leite, baixa ou não produtoras, além de propor algumas estratégias de manejo para elevar a eficiência reprodutiva.

2. Primeira ovulação pós-parto

Após o parto, na primeira semana, ocorre um pico de FSH circulante (Ginther et al., 1996), provavelmente resultante da redução nos níveis de estradiol (E2). Em seguida, ocorre a primeira onda folicular entre quatro e 12 dias pós-parto (Ginther et al., 1996; Haughian et al., 2002). A primeira ovulação pós-parto, geralmente ocorre na ausência (cio silencioso) ou com uma discreta manifestação de estro. De fato, Lopez et al. (2004) e Endo et al. (2012) utilizando o sistema de radiotelemetria HeatWatch (DDx Denver, CO), observaram que apenas 12% das vacas tiveram duas ou mais aceitação de monta durante o estro que precedeu esta primeira ovulação. Além disso, entre 11 e 54% das vacas apresenta ciclo estral curto (< 16 dias), após esta primeira ovulação (Stevenson & Britt, 1979; Hinshelwood et al., 1982; Savio et al., 1990; Staples et al., 1990; Royal et al., 2000).

De maneira geral, o tempo decorrido até a primeira ovulação é em média de 33 dias, em vacas holandesas nos EUA (compilação de 10 estudos; relatada por Ferguson, 1996). Considerando vacas holandesas mantidas a pasto, estas ovulam, em média, aos $43,4 \pm 5,3$ d pós-parto (McDougall et al., 1995).

Para avaliar a ciclicidade de vacas da raça Holandês (n = 13) ou cruzadas (Jersey x Holandês; n = 37), em sistema de pastejo, realizamos colheitas de sangue, durante um ano, duas vezes por semana, a partir do sétimo dia do pós-parto, para posterior dosagem de progesterona (Meschiatti et al., não publicado). Interessantemente, o retorno à ciclicidade foi similar entre as raças e estações do ano, em que 80% das vacas apresentavam corpo lúteo antes de 60 dias pós-parto (40/50). Por outro lado, multíparas retomaram a ciclicidade antes que primíparas, sugerindo efeito do balanço energético negativo (BEN) mais acentuado nesta categoria, demonstrado pela maior perda de condição corporal entre o parto e os 60 dias pós-parto (Tabela 1). Outro estudo realizado no Brasil, vacas da raça Girolando apresentaram retorno à ciclicidade superior aos 100 dias, e em torno de 25% das vacas não estavam ciclando até os 120 dias quando o estudo foi finalizado (Ruas et al., 2004). O retorno atrasado de ciclicidade está relacionado ao contato com o bezerro, genética (*Bos indicus*) e principalmente ao manejo nutricional dessas vacas.

Tabela 1. Variáveis produtivas e reprodutivas (média \pm EP) no período entre o parto e a primeira IA (60 dias pós-parto), em vacas leiteiras criadas em sistema de pastejo e confinadas no inverno, em clima tropical.

Variáveis	Retorno à ciclicidade e (dias) ¹	ECC ao Parto (1 a 5)	Perda de ECC entre o parto e 60 DPP	Pico de produção de leite (litros/dia)	P4 máxima (ng/mL) ¹
Categoria					
Primíparas (n = 16)	30,3 \pm 2,8 ^a	3,5 \pm 0,1	0,96 \pm 0,2 ^a	20,1 \pm 0,9 ^a	6,9 \pm 0,8
Múltiparas (n = 34)	20,4 \pm 1,7 ^b	3,4 \pm 0,1	0,52 \pm 0,1 ^b	25,5 \pm 0,8 ^b	6,1 \pm 0,5
Raça					
HPB (n = 13)	26,4 \pm 2,9	3,4 \pm 0,1	0,67 \pm 0,2	22,6 \pm 1,4	6,4 \pm 0,9
HPB x Jersey (n = 37)	24,3 \pm 1,6	3,5 \pm 0,1	0,79 \pm 0,1	23,0 \pm 0,8	6,5 \pm 0,5
Estação do ano					
Outono/inverno (n=29)	25,9 \pm 1,9	3,3 \pm 0,1	0,60 \pm 0,1	22,3 \pm 0,9	6,7 \pm 0,8
Primavera/verão (n=21)	24,8 \pm 2,6	3,6 \pm 0,1	0,88 \pm 0,2	23,3 \pm 1,2	6,2 \pm 0,8

^{a,b}P < 0,05.

¹Dados referentes às vacas que haviam ovulado em até 60 dias pós parto (80%; 13/16 primíparas e 27/34 múltiparas; 29/37 cruzadas e 11/13 HPB).

Além do BEN, outro fator determinante para o retorno à ciclicidade no pós-parto é a condição corporal ao parto. Em um estudo recente, Adrien et al. (2012) forneceram diferentes dietas para vacas primíparas e múltiparas do dia -100 até o dia -30 da data prevista ao parto. Após este período, a dieta foi similar entre os grupos. As vacas que receberam dieta para ganhar ECC durante o pré-parto tenderam a retornar mais cedo à ciclicidade, apesar dos ECCs aos 21 do pós-parto terem sido similares.

A condição anovulatória pode ser classificada em bases fisiológicas fundamentadas no tamanho máximo do folículo e na concentração de E2 circulante (Wiltbank et al., 2002). Em um estudo realizado em Wisconsin, a maioria das vacas anovulatórias (63%) tinha ECC adequado e folículos com tamanho superior ao tamanho de folículos ovulatórios (20 mm). Por exemplo, 20% das vacas com ECC \geq 3,25 foram consideradas em condição anovulatória. Assim, o BEN e o crescimento folicular inadequado podem explicar uma parte das vacas leiteiras anovulatórias, mas parece não ser uma explicação adequada para todas (Wiltbank et al., 2006).

Apesar de o atraso na primeira ovulação esteja associado ao BEN no início da lactação, o papel do nível de produção de leite não está esclarecido. Vacas selecionadas para alta produção de leite, comparadas a linhagens controle (menor mérito genético para rendimento leiteiro), apresentam intervalo mais longo até a primeira ovulação pós-parto (+14 dias [revisão de Lucy, 2001]; +8 dias [Gong et al., 2002]) e até o primeiro estro detectado pós-parto (+4,5 dias, [Hageman et al., 1991]). Entretanto, um estudo mais recente, não detectou correlação entre o nível de produção de leite e a porcentagem

de vacas anovulatórias aos 71 dias em lactação (DEL; Lopez et al., 2005). Nesse estudo, 25% das vacas apresentavam-se anovulatórias entre 50 e 71 dias pós-parto, independentemente do nível de produção (25 a 60 kg de leite/dia). Erb (1984) revisou quatro estudos norte-americanos em que foram comparados os níveis ou potencial genético para produção de leite entre vacas ovulatórias e anovulatórias. O autor concluiu que a alta produção de leite não causa anovulação em vacas leiteiras holandesas, mas vacas anovulatórias produziam mais leite que as demais.

Há divergências sobre o efeito do retorno a ciclicidade na fertilidade. Alguns autores relatam queda na eficiência reprodutiva de vacas com atividade luteal precoce, no período pós-parto (Ball & McEwan, 1998; Smith & Wallace, 1998), outros não observaram efeito (Kruip et al., 1998; Royal et al., 2000) e a maioria observou um efeito benéfico (Stevenson et al., 1983; Staples et al., 1990; Senatore et al., 1996; Darwash et al., 1997). Em um estudo recente Galvão et al. (2010), trabalhando com 445 vacas lactantes oriundas de cinco fazendas observaram que vacas que retornaram a ciclicidade mais precocemente tiveram uma melhor TC à primeira IA (38,6 vs. 28,1%, $P < 0,05$) e tiveram 50% a mais de chance de se tornarem gestantes até os 300 DEL, comparadas com vacas que retornam à ciclicidade mais tardiamente. Isso pode ser explicado devido à menor taxa de endometrite sub-clínica nas vacas com retorno mais precoce à ciclicidade. Dubuc et al. (2012) demonstraram que vacas que começaram a ciclar precocemente apresentaram menores concentrações circulantes de ácidos graxos não esterificados (AGNEs) e menos haptoglobulina no útero, indicando um menor BEN e mais saúde. Então, possivelmente o efeito benéfico do retorno à ciclicidade precoce pode ser devido ao maior número de ciclos estrais prévios à IA (Senatore et al., 1996; Darwash et al., 1997) ou por essas vacas serem mais saudáveis (Galvão et al., 2010; Dubuc et al., 2012).

3. Fisiologia reprodutiva da vaca lactante

Agrupando resultados de diversos trabalhos científicos que avaliaram função ovariana em novilhas holandesas (Sirois & Fortune, 1988; Ginther et al., 1989; Knopf et al., 1989; Ko et al., 1991; Lucy et al., 1994; Wilson et al., 1998; Ronchi et al., 2001), e vacas holandesas lactantes (Savio et al., 1990; Schemm et al., 1990; Taylor & Rajamahendran, 1991; Pursley et al., 1993; Kirby et al., 1997; Trout et al., 1998; Roth et al., 2000; Townson et al., 2002), um total de 230 ciclos de 224 vacas e 104 ciclos de 97 novilhas foi estudado, sendo observado que a duração média nas vacas lactantes foi de 23 dias e nas novilhas de 21 dias. A duração do ciclo estral nas vacas lactantes tem mostrado mais longa do que os conceituados 21 dias. Nos estudos citados acima, em ciclos estrais típicos, a luteólise ocorreu entre os dias 14 e 19 em novilhas e entre os dias 16 e 24 nas vacas. Quando vacas lactantes de alto e baixo mérito genético para produção de leite foram comparadas (Lucy et al., 1998), observou-se que a luteólise ocorreu um pouco mais tardiamente nas vacas com alto mérito genético.

Em estudos realizados em Wisconsin (Tabela 2, Sartori et al., 2002a, 2002b, 2004), foi comparado vacas lactantes ($n = 31$; >40 kg de leite/dia) com novilhas púberes ($n = 29$; 12 a 16 meses de idade), durante o verão, e vacas lactantes ($n = 27$; >45 kg de leite/dia) com vacas não lactantes não gestantes ($n = 26$), durante o inverno. Durante o verão, as vacas lactantes ovularam folículos maiores do que as novilhas, mas apesar disso, o pico de E2 antes da ovulação foi menor nas vacas. Na comparação entre vacas lactantes e não lactantes durante o inverno, o pico de E2 antes da ovulação foi similar (7,6 vs. 8,5 pg/ml), apesar das vacas lactantes terem ovulado folículos maiores (18,6 vs. 16,2 mm). Seis dias após a ovulação, as vacas lactantes tiveram CLs maiores do que as

vacas não lactantes (7600 vs. 5100 mm³) e a concentrações séricas de P4 similares (2,2 e 1,9 ng/ml).

Vacas lactantes desenvolvem folículos dominantes/ovulatórios maiores, porém têm concentrações séricas de E2 mais baixas quando comparadas a novilhas nulíparas (Ahmad et al., 1996; Wolfenson et al., 2004; Sartori et al., 2004) ou a vacas não lactantes (De La Sota et al., 1993). As razões para menores concentrações de E2 circulantes em vacas lactantes estão provavelmente relacionadas ao maior metabolismo deste hormônio ou a menor produção pelos folículos. A última hipótese não foi confirmada. Sangsritavong et al. (2002) demonstraram que vacas lactantes têm um metabolismo de E2 muito maior do que não lactantes. Portanto, é muito provável que os folículos das vacas lactantes tenham que crescer mais, para produzirem E2 suficiente para induzir comportamento de cio e o pico pré-ovulatório de GnRH/LH. Se as vacas lactantes ovulam folículos maiores, é esperado que também tenham CLs maiores, uma vez que há uma correlação positiva entre tamanho do folículo ovulatório e volume de tecido luteal (Vasconcelos et al., 2001; Sartori et al., 2002a). Apesar disso, vacas lactantes possuem concentrações séricas de P4 reduzidas (Wolfenson et al., 2004, De La Sota et al., 1993). Estes efeitos do metabolismo hepático na fisiologia de vacas lactantes comprometem a qualidade embrionária (Sartori et al., 2004) e concepção (Pursley et al., 1995) comparado a novilhas.

Tabela 2. Comparação (médias \pm EP e porcentagens) entre novilhas nulíparas (n = 27) e vacas em lactação (n = 14) com intervalos interovulatórios típicos (adaptado de Sartori et al., 2004).

	Novilhas	Vacas lactantes	P
Intervalo interovulatório (dias)	22,0 \pm 0,4	22,9 \pm 0,7	0,28
Dia da luteólise	18,5 \pm 0,4	18,9 \pm 0,6	0,53
Ciclos com duas ondas; % (n/n)	55,6 (15/27)	78,6 (11/14)	0,15
Ciclos com três ondas; % (n/n)	33,3 (9/27)	14,3 (2/14)	0,19
Ciclos com quatro ondas; % (n/n)	11,1 (3/27)	7,1 (1/14)	0,68
Dia da emergência da segunda onda folicular	8,9 \pm 0,3	11,1 \pm 0,6	<0,01
Dias entre a emergência da última onda e ovulação	10,1 \pm 0,5	10,9 \pm 0,5	0,30
Dias entre luteólise e ovulação	4,6 \pm 0,1	5,2 \pm 0,2	<0,01
Folículos codominantes na primeira onda; % (n/n)	3,7 (1/27)	35,7 (5/14)	<0,01
Taxa de ovulação múltipla; % (n/n)	1,9 (1/54)	17,9 (5/28)	0,02
Diâmetro máximo do maior folículo ovulatório (mm)	14,9 \pm 0,2	16,8 \pm 0,5	<0,01
Pico de E2 que antecedeu a ovulação (pg/mL)	11,3 \pm 0,6	7,9 \pm 0,8	<0,01
Volume máximo de tecido lúteo (mm ³)	7303 \pm 308	11120 \pm 678	<0,01
Pico de progesterona (ng/mL)	7,3 \pm 0,4	5,6 \pm 0,5	<0,01

A relação entre produção de leite e incidência de taxa de ovulação múltipla é alta em vacas lactantes (10 a 39%, Santos et al., 2000; Vasconcelos et al., 2001; Sartori et al., 2002a, 2004, Fricke & Wiltbank, 1999; Lopez et al., 2005) comparada à novilhas nulíparas (2%, Sartori et al., 2004). Além disso, a taxa de dupla ovulação em vacas que apresentavam produção acima da média do rebanho foi mais alta do que de vacas abaixo da média (20,2% vs. 6,9%; Fricke & Wiltbank, 1999, e 50% vs. 2,5%; Lopez et al., 2005).

4. Alterações na expressão do estro em vacas de leite

A duração e intensidade de estro em bovinos leiteiros estão diretamente relacionadas à categoria dos animais (novilha ou vaca lactante) e ao nível de produção leiteira. Estudos com grande acurácia, utilizando-se o sistema de radiotelemetria HeatWatch® que possibilita a observação contínua durante 24 horas por dia e detecta estro, Nebel et al. (1997) compararam novilhas nulíparas e vacas lactantes das raças Holandesa e Jersey. Os autores observaram que as novilhas aceitaram mais montas por estro comparadas às vacas (Holandesa: 17 vs. sete aceites de monta; Jersey: 30 vs. 10 aceites de monta, respectivamente) e tiveram maior duração de estro (Holandesa: 11 vs. 7 horas; Jersey: 14 vs. 8 horas). No mesmo estudo, foi observado que vacas múltíparas, tanto da raça Holandesa como Jersey, aceitaram mais montas por estro no inverno do que no verão (Holandesa: 9 vs. 4,5; Jersey: 12 versus 5, respectivamente).

No Brasil, entretanto, estudando vacas Gir, Pires et al. (2003) não detectaram diferenças entre inverno e verão na duração de estro (inverno: 12,3 horas; verão: 11,8 horas) ou número de montas por estro (inverno: 28; verão: 23), porém observaram duração e intensidade de estro superiores aos relatados em vacas das raças Holandesa e Jersey. Esses resultados, provavelmente, devem-se ao fato das vacas Gir estudadas não estarem lactando.

Avaliando a associação entre níveis de produção de leite e comportamento de estro, Lopez et al. (2004) verificaram menor duração e intensidade (6,3 vs. 8,8 aceites de monta) de estro nas vacas de maior produção de leite (>39,5 kg/dia) comparado às de menor (<39,5 kg/dia). Da mesma forma, Aungier et al. (2012) mostraram que, para cada 10 kg de leite a mais produzidos, a taxa de movimentação dos animais diminuiu em torno de 35%. Tal fato parece estar relacionado às menores concentrações circulantes de E2 em vacas lactantes comparadas às novilhas (Sartori et al., 2004) e vacas de maior produção de leite comparadas às vacas de menor produtividade.

No intuito de auxiliar a observação de estro, métodos baseado no controle de atividades físicas foram desenvolvidos (pedômetro ou colar). No entanto, em um estudo realizado na Grã-Bretanha utilizando colares, demonstrou-se grandes falhas de detecção utilizando apenas este método, onde 28% das vacas detectadas em cio apresentavam P4 circulante alta.

5. Manejo reprodutivo de vacas em lactação

Vacas leiteiras geralmente têm baixa eficiência reprodutiva, o que praticamente impossibilita a obtenção de um IP ideal (13,5 meses para vacas de alta produção; Nebel, 2003). IP curtos aumentam a produção de leite por dia de vida útil da vaca e resultam em maior número de bezerros nascidos. Principalmente em vacas mestiças, a diminuição do IP é uma necessidade, considerando-se que estas vacas têm uma persistência de lactação mais curta (275 dias; Vaz de Oliveira et al., 2004) quando comparadas a vacas taurinas (≥ 305 dias). Freitas et al. (2001) avaliaram a duração da lactação de vacas com diferentes graus de sangue do cruzamento de Holandês com Gir

(1/2, 3/4, 7/8, 15/16 e 31/32) e mostraram que quanto maior o grau de Holandês maior a persistência da lactação.

Dentre as principais razões para IP prolongados encontram-se a baixa taxa de detecção de cio, como descrito acima, e conseqüentemente baixas TS e TP. Vacas mestiças têm TC aceitáveis, entretanto apresentam baixa TS devido a limitações na expressão e detecção de cio, assim como retorno à ciclicidade longo no pós-parto (70 dias em média; Ruas et al. [2002], ou mais de 100 dias; Ruas et al. [2004]). No manejo de vacas no pré e pós-parto, deve-se ter atenção especial com a nutrição desses animais, para que estejam com CC adequada ao parto e percam pouca condição durante o pós-parto.

Outra estratégia de manejo durante o período peri-parto deve focar na redução do estresse dos animais. Aumento do estresse nessa fase está correlacionado positivamente com aumento de incidência de doenças no pós-parto, principalmente retenção de placenta. Suplementação com níveis adequados de Vitamina E e Selênio também pode reduzir a incidência de retenção de placenta (revisado por Wiltbank., 2006). Além da retenção de placenta, atraso na involução uterina e infecções uterinas pós-parto estão relacionadas ao aumento no IP em vacas (Sheldon et al., 2000).

Em situações de baixa eficiência na detecção de cios, a IATF é uma ferramenta que tem demonstrado resultados satisfatórios. Atualmente, existem diversos protocolos de sincronização de ovulação para IATF. Uns baseiam-se no princípio do protocolo Ovsynch (GnRH – 7 dias – PGF_{2α} – 2 dias – GnRH – 16 horas – IA) e outros na associação de P4 e benzoato de estradiol (BE). Para vacas de alta produção leiteira ciclando, o Ovsynch clássico tem apresentado resultados satisfatórios, entretanto há algumas modificações que potencialmente melhoram sua eficiência e/ou facilitam o manejo. Uma das alterações é a adição de um implante de P4/progestágeno ao protocolo, o que parece ser benéfico principalmente para as vacas anovulatórias (Stevenson et al., 2006), entretanto Bisinotto e Santos (2012) encontraram efeito positivo da adição da P4 somente em vacas cíclicas. Outra possibilidade é a IA no momento da aplicação da segunda dose de GnRH (Cosynch). Entretanto, apesar de alguns estudos sugerirem taxas de concepção similares ou superiores com o uso do Cosynch (Portaluppi & Stevenson, 2005), um trabalho que comparou Cosynch com 48 ou 72 h após a PGF_{2α} versus Ovsynch 56 (GnRH 56 h após PGF_{2α} e IA 16 h após GnRH) demonstrou menores TC quando foi utilizado Cosynch (Brusveen et al., 2008).

A substituição do segundo GnRH por estrógenos também tem sido empregada, como é o caso do Heatsynch em que, ao invés de aplicar a segunda dose de GnRH, injeta-se cipionato de estradiol (CE; 1 mg) 24 horas após a PGF_{2α} e insemina-se 48 horas após o CE. Apesar de apresentar TC similar ao Ovsynch (Pancarci et al., 2002), o Heatsynch tem a vantagem de ter um custo mais baixo e de manejar os animais sempre no mesmo horário do dia.

Vacas mestiças têm atraso no retorno à ciclicidade, como citado anteriormente, e portanto, são recomendados protocolos de IATF que se utilizam de implantes de P4 ou progestágenos. Com isso, aumenta-se a taxa de sincronização, previne-se a ocorrência de ciclos curtos após a IATF e induz-se ciclicidade nas vacas anovulares. Outro aspecto importante na sincronização de vacas mestiças é a antecipação em um dia da aplicação de PGF_{2α} no protocolo Cidrsynch (GnRH e dispositivo de P4 – 6 dias – PGF_{2α} e retira dispositivo – 2 dias GnRH – 0 a 24 horas – IA). Utilizando-se esse protocolo, a TC observada em vacas mestiças tem sido entre 40 e 50% (José L. M. Vasconcelos, comunicação pessoal).

A manipulação do desenvolvimento folicular antes do início do protocolo de IATF (Pré-sincronização) em vacas de alta produção leiteira tem demonstrado resultados positivos por permitir o início do protocolo em um momento ideal (entre os dias 5 e 10 do ciclo estral) (Vasconcelos et al., 1999). Nesse período, espera-se que a maioria das vacas tenha um folículo ovulatório que responda à primeira dose de GnRH do protocolo Ovsynch. Em um estudo descrito por Thatcher et al. (2001), houve aumento na TC à primeira IA pós-parto de 25 para 43% nas vacas cíclicas que foram pré-sincronizadas com duas injeções de $\text{PGF}_{2\alpha}$ com 14 dias de intervalo. Nesse programa, a segunda dose de $\text{PGF}_{2\alpha}$ foi aplicada 12 dias antes do início do protocolo Ovsynch. Uma limitação a esse tipo de pré-sincronização encontra-se na possibilidade de um elevado número de vacas estarem anovulatórias no momento da aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$. Nesse caso, a pré-sincronização não será eficiente. Uma alternativa viável é a utilização de um implante de progestágeno por 7 dias, com aplicação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ no momento da retirada do implante (Sartori, 2002; Santos e Chebel, 2005). Doze dias depois se inicia o Ovsynch. A vantagem deste programa é que potencialmente sincroniza vacas cíclicas e acíclicas. Além disso, vacas detectadas em cio após a remoção do dispositivo, podem ser inseminadas tendo TC aceitável, contanto que tenham ultrapassado o PEV.

Após a IA, é importante que as vacas sejam observadas para retorno ao cio e que seja realizado diagnóstico de gestação o mais precoce possível com o propósito de se detectar as vacas não gestantes e re-sincronizá-las o quanto antes, para com isso, elevar a TP do rebanho.

No Brasil, atualmente, o protocolo de IATF mais utilizado é à base de P4 e E2, tendo em vista que associação de um progestágeno com E2 causa um feedback negativo no hipotálamo, provocando uma redução na secreção de GnRH (consequentemente FSH/LH) promovendo a atresia folicular com a regressão fisiológica do folículo dominante, cerca de 36 h após o tratamento (Burke et al., 2003), e a emergência de uma nova onda de crescimento folicular em aproximadamente 3 a 4 dias (Bó et al., 1995).

O uso de protocolos baseado em P4 e E2, em vacas de leite, foi descrito pela primeira vez por Souza et al. (2009), que consistiu na inserção de um dispositivo de P4 e aplicação de 2 mg de BE (D0), com retirada do implante de P4 no D8, juntamente com a aplicação de uma $\text{PGF}_{2\alpha}$ e 1 mg de CE, e a IA no D10. A eficiência de sincronização do protocolo varia de 60% (Monteiro et al., 2012) a 70% (Souza et al., 2009) em vacas de alta produção. O tratamento resultou na emergência de uma nova onda em 3,8 dias. Para a indução da ovulação, o CE é eficiente em vacas em lactação (Souza et al., 2009), no entanto a utilização de BE no D9 parece ser mais efetiva (Sartori e Monteiro Jr, dados não publicados).

Em um experimento do nosso grupo, as vacas holandesas de alta produção (33,8 kg de leite), criadas em regime intensivo, foram submetidas a protocolo de P4 e E2, sendo que as vacas que tiveram a onda sincronizada efetivamente e ovularam ao final do protocolo (60%) apresentaram TC de 56% (42/75). No entanto, analisando 40% dos animais que não apresentaram uma sincronização eficiente, foi constatado que 22% não ovularam ao fim do protocolo e que 18% ovularam folículos persistentes. A TC dos animais que ovularam folículos persistentes foi de apenas 26% (6/23) (Monteiro et al., 2012). Esta falha pode ser devido a diversos fatores, ainda não completamente esclarecidos, tais como dose inadequada de E2 (BE), concentração sanguínea de P4 insuficiente ao início do protocolo, ausência de uma luteólise completa no D10, assim como a fase do ciclo estral que se encontra o animal ao início do protocolo (também

relatado por Vasconcelos et al. [1999] utilizando o protocolo Ovsynch). Esta última hipótese foi reforçada por Vasconcelos et al. (2012) que encontraram maiores TC quando o protocolo baseado em P4 e BE foi iniciado entre o dia 5 e 9 do ciclo estral.

Um incremento na TC de 18% (30/168) para 32% (76/238) foi observado quando se aumentou o proestro, de vacas holandesas de alta produção, passando de 2 para 3 dias (Pereira et al., 2012), considerando a PGF_{2α} administrada no D8 ou no D7, respectivamente. Observou-se uma maior porcentagem dos animais que tiveram proestro mais longo, com concentrações séricas de P4 abaixo de 0,1 ng/mL no dia da IA.

6. Monta natural, IATF e transferência de embrião

O uso da MN, em fazendas produtoras de leite, apresenta mais pontos negativos do que positivos. A presença de touros pode ser uma alternativa para a detecção de cio (Ribeiro et al., 2012), entretanto aumenta o risco de acidentes ao manejá-los (Ribeiro et al., 2012). Esses reprodutores, na maioria das vezes, não são provados e conseqüentemente, não contribuem para melhoramento genético do rebanho. Adicionalmente, pode-se relatar o efeito do estresse calórico sobre a fertilidade, riscos de transmissão de doenças e gastos com a aquisição destes animais, exames andrológicos, vacinas e alimentação (Ribeiro et al., 2012). Apesar das desvantagens apresentadas com o uso de touros, no Brasil, ainda poucas fazendas utilizam IA.

Associadas aos aspectos desfavoráveis da MN e às falhas de detecção de cio, principalmente em sistemas leiteiros intensivos com vacas de alta produção e em sistemas a pasto com vacas mestiças, os programas de IATF são estratégias eficientes para serem implementados. Os protocolos de sincronização de IA aumentam a TP por aumentar o número de animais inseminados, sem necessariamente elevar a taxa de concepção (Pursley et al., 1995; Tenhagen et al., 2004; Santos e Chebel, 2005) e como principal benefício econômico, reduz o IP e o número de vacas descartadas por infertilidade (Pursley et al., 1995; Risco et al., 1998; LeBlanc, 2001).

Apesar de em geral, a IATF apresentar uma melhora na eficiência reprodutiva, deve-se avaliar o custo-benefício do emprego desta ferramenta, antes de começar a utilizá-la em larga escala. Para a IATF ser economicamente viável em fazendas com boa taxa de detecção de cio, os custos com os tratamentos devem ser menores do que aqueles despendidos especialmente com a mão de obra. A IATF comparada à MN apresenta maior vantagem econômica em relação ao progresso genético, principalmente, quando os preços de alimentação e do leite se elevam (Ribeiro et al., 2012).

Relata-se que, quando a eficiência de detecção de cio for abaixo de 70%, o custo da prenhez é similar ao da IATF (Ribeiro et al., 2012). Em termos gerais, fazendas com boas taxas de detecção de cio e de concepção, não devem se preocupar em utilizar IATF, entretanto, esta não é a realidade da grande maioria das propriedades leiteiras. A taxa de detecção média de cio nos EUA é abaixo de 50% (Nebel, 2003), e no Brasil, apesar de não haver estudos aprofundados, os índices não devem ser muito diferentes, baseando-se em dados de diversas fazendas produtoras de leite.

De forma resumida, a combinação da utilização da detecção de cio e IA, em vacas que retornam ao estro após IATF é uma maneira eficiente de aumentar os índices reprodutivos, quando a detecção de cio for $\leq 60\%$. Este programa reprodutivo pode melhorar as TP e reduzir o período de serviço, resultando em aumento do lucro por vaca

serviço e redução do custo por prenhez (Galvão et al., 2012, citado em Ribeiro et al, 2012).

Outra estratégia utilizada para contornar problemas reprodutivos em vacas leiteiras, principalmente durante o verão ou em repetidoras de serviço, é a transferência de embriões (Ambrose et al., 1999; Al-Katanani et al., 2002; Demetrio et al., 2007, Stewart et al., 2011). Entretanto, os custos de embriões produzidos *in vitro* ou por superovulação (Stewart et al., 2011), bem como a mão de obra empregada (Ribeiro et al., 2012) devem ser considerados ao usar tal técnica.

Referências Bibliográficas

- Adrien, ML, Mattiauda DA, Artegoitia, V, Carriquiry M, Motta G, Bentancur O, Meikle A. Nutritional regulation of body condition score at the initiation of the transition period in primiparous and multiparous dairy cows under grazing conditions: milk production, resumption of postpartum ovarian cyclicity and metabolic parameters. *Animal* 2012 (no prelo). doi:10.1017/S175173111100142X.
- Ahmad N, Beam SW, Butler WR, Deaver DR, DUBY RT, Elder DR, Fortune JE, Griel LC, Jones LS, Milvae RA, Pate JL, Revah I, Schreiber DT, Townson DH, Tsang PCW, Inskip EK. Relationship of fertility to patterns of ovarian follicular development and associated hormonal profiles in dairy cows and heifers. *J Anim Sci* 1996;74:1943-52.
- Al-Katanani YM, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Krininger CE 3rd, Block J, Thatcher WW, Hanse PJ. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology* 2002;58:171-82.
- Ambrose JD, Drost M, Monson RL, Rutledge JJ, Leibfried-Rutledge ML, Thatcher MJ, Kassa T, Binelli M, Hansen PJ, Chenoweth PJ, Thatcher WW. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen *in vitro* produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. *J Dairy Sci* 1999;82:2369-76.
- Ball PJB, McEwan EEA. The incidence of prolonged luteal function following early resumption of ovarian activity in post partum dairy cows. In *Brit Soc Anim Sci* 1998;187.
- Bó GA, Adams GP; Caccia M; Martinez M; Pierson RA; Mapletoft RJ. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Anim Rep Sci* 1995;39:193-204.
- Brusveen DJ, Cunha AP, Silva CD, Cunha PM, Sterry RA, Silva EP, Guenther JN, Wiltbank MC. Altering the time of the second gonadotropin-releasing hormone injection and artificial insemination (AI) during Ovsynch affects pregnancies per AI in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2008;91:1044-52.
- Burke CR; Mussard ML; Gasser CL; Grum DE; Day ML. Estradiol benzoate delays new follicular wave emergence in a dose-dependent manner after ablation of the dominant ovarian follicle in cattle. *Theriogenology* 2003;60:647-58.
- Darwash AO, Lamming GE, Woolliams JA. The phenotypic association between the interval to post-partum ovulation and traditional measures of fertility in dairy cattle. *Anim Sci* 1997;65:9-16.

- De La Sota RL, Lucy MC, Staples CR, Thatcher WW. Effects of recombinant bovine somatotropin (Sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. *J Dairy Sci* 1993;76:1002-13.
- Demetrio DG, Santos RM, Demetrio CG, Vasconcelos JL. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci* 2007;90:5073-82.
- 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.
- Dubuc J, Duffield TF, Leslie KE, Walton JS, LeBlanc SJ. Risk factors and effects of postpartum anovulation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 2012;95:1845-54.
- Endo N, Nagai K, Tanaka T, Kamomae H. Comparison between lactating and non-lactating dairy cows on follicular growth and corpus luteum development, and endocrine patterns of ovarian steroids and luteinizing hormone in the estrous cycles. *Anim Reprod Sci* 2012 (no prelo).
- Erb HN. High milk production as a cause of cystic ovaries in dairy cows: Evidence to the contrary. *Comp Cont Edu* 1984;6:215-9.
- Ferguson JD. Diet, production and reproduction in dairy cows. *Anim Feed Sci Tech* 1996;5:173-84.
- Freitas MS, Durães MC; Freitas AF; Barra RB. Comparação da produção de leite e de gordura e da duração da lactação entre cinco “graus de sangue” originados de cruzamentos entre Holandês e Gir em Minas Gerais. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2001;53:708-13.
- Fricke PM, Wiltbank MC. Effect of milk production on the incidence of double ovulation in dairy cows. *Theriogenology* 1999;52:1133-43.
- Galvao KN, Frajblat M, Butler WR, Brittin SB, Guard CL, Gilbert RO. Effect of early postpartum ovulation on fertility in dairy cows. *Reprod Domest Anim* 2010;45:e207-11.
- Garverick HA. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 1997;80:995-1004.
- Ginther OJ, Knopf L, Kastelic JP. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *J Reprod Fertil* 1989;87:223-30.
- Ginther OJ, Kot K, Kulick LJ, Martin S, Wiltbank MC. Relationships between FSH and ovarian follicular waves during the last six months of pregnancy in cattle. *J Reprod Fertil* 1996;108:271-79.
- Gong JG, Lee WJ, Garnsworthy PC, Webb R. Effect of dietary-induced increases in circulating insulin concentrations during the early postpartum period on reproductive function in dairy cows. *Reproduction* 2002;123:419-427.
- Hageman WH, Shook GE, Tyler WJ. Reproductive performance in genetic lines selected for high or average milk yield. *J Dairy Sci* 1991;74:4366-76.
- Haughian JM, Sartori R, Guenther JN, Gümen A, Wiltbank MC. Extending the postpartum anovulatory period in dairy cattle with estradiol cypionate. *J Dairy Sci* 2002;85:3238-49.

- Hinshelwood MM, Hansen PJ, Hauser ER. Short estrous cycles in postpartum cows as influenced by level of milk-production, suckling, diet, season of calving and interval to 1st estrus. *Theriogenology* 1982;18:383-92.
- Jordan ER, Fourdraine RH. Characteristics of the management practices of the top milk producing herds in the country. *J Dairy Sci* 1993;76:3247-56.
- Kinsel ML, Marsh WE, Ruegg PL, Etherington WG. Risk factors for twinning in dairy cows. *J Dairy Sci* 1998;81:989-93.
- Kirby CJ, Smith MF, Keisler DH, Lucy MC. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. *J Dairy Sci* 1997;80:273-85.
- Knopf L, Kastelic JP, Schallenberger E, Ginther OJ. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. *Domest. Anim Endocrinol* 1989;6:111-9.
- Ko JCH, Kastelic JP, Del Campo MR, Ginther OJ. Effects of a dominant follicle on ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers. *J Reprod Fert* 1991;91:511-9.
- Kruip TAM, Meijer GAL, Rukkwamsuk Th, Wensing Th. Investigation into the mechanisms of reduction in fertility of high yielding cows. In 10th Intern. Conf. Production Diseases in Farm Animals. 1998;183-190: Utrecht, The Netherlands.
- Lamming GE, Darwash AO. The use of milk progesterone profiles to characterize components of subfertility in milked dairy cows. *Anim Reprod Sci* 1998;52:175-90.
- LeBlanc S. The OvSynch breeding program for dairy cows – A review and economic perspective. *Bov. Pract.* 2001;35:13-22.
- Lopez H, Caraviello DZ, Satter LD, Fricke PM, Wiltbank MC. Relationship between level of milk production and multiple ovulations in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2005;88:2783-93.
- Lopez H, Satter LD, Wiltbank MC. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004;81:209-23.
- López-Gatius F, Santolaria P, Yaniz J, Rutllant J, López-Bejar M. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology* 2002;57:1251-61.
- Lucy MC, Byatt JC, Curran TL, Curran DF, Collier RJ. Placental lactogen and somatotropin: hormone binding to the corpus luteum and effects on the growth and functions of the ovary in heifers. *Biol Reprod* 1994;50:1136-44.
- Lucy MC, Stevenson JS, Call EP. Controlling 1st service and calving interval by prostaglandin-f2-alpha, gonadotropin-releasing-hormone, and timed insemination. *J Dairy Sci* 1986;69:2186-94.
- Lucy MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? *J Dairy Sci* 2001;84:1277-93.
- Macmillan KL, Watson JD. Fertility differences between groups of sires relative to the stage of oestrus at the time of insemination. *Anim Prod* 1975;21:243-249.
- Mares SE, Menge AC, Tyler WJ, Casida LE. Genetic factors affecting conception rate and early pregnancy loss in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 1961;44:96-103.

- McDougall S, Burke CR, MacMillan KL, Williamson NB. Patterns of follicular development during periods of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. *Res Vet Sci* 1995;58:212-6.
- Monteiro Jr PLJ; Rodrigues TN; Silva FLM; Borsato M; Surjus RS; Prata AB; Silva LD; Mourão GB; Wiltbank MC; Sartori R. Evaluation of timed artificial insemination protocols in dairy cattle: presynchronization with GnRH, increasing estradiol benzoate, and limitations to success during the protocol. *Anim Reprod* 2012;9:541.
- Nakao T, Moriyoshi M, Kawata K. The effect of postpartum ovarian dysfunction and endometritis on subsequent reproductive-performance in high and medium producing dairy-cows. *Theriogenology* 1992; 37: 341-349.
- Nebel RL, Jobst SM, Dransfield MBG, Pandolfi SM, Bailey TL. Use of a radiofrequency data communication system, Heat Watch, to describe behavioral estrus in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1997;80:151.
- Nebel RL. The key to a successful reproductive management program. *Advances in Dairy Technology* 2003;15:1-16.
- Nielen M, Schukken YH, Scholl DT, Wilbrink HJ, Brand A. Twinning in dairy cattle: A study of risk factors and effects. *Theriogenology* 1989;32:845-62.
- Pancarci SM, Jordan ER, Risco CA, Schouten MJ, Lopes FL, Moreira F, Thatcher WW. Use of estradiol cypionate in a pre-synchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 2002;85:122-31.
- Pereira MHC; Rodrigues ADP; Carvalho ER Sanches CP; Guzella TG; Veras MB; Lima FA; Borges PT; Wiltbank MC; Vasconcelos JLM. Effect of proestrus length on fertility in dairy cows submitted to ovulation synchronization. *Anim Reprod* 2012; 9:517.
- Pires MFA, Alves NG, Silva Filho JM, Camargo LSA, Verneque RS. Comportamento de vacas da raça Gir (*Bos taurus indicus*) em estro. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2003;55:187-96.
- Portaluppi MA, Stevenson JS. Pregnancy rates in lactating dairy cows after presynchronization of estrous cycles and variations of the Ovsynch protocol. *J Dairy Sci* 2005;88:914-21.
- Pursley JR, Stevenson JS, Minton JE. Ovarian follicular waves in dairy cows after administration of gonadotropin-releasing hormone at estrus. *J Dairy Sci* 1993;76:2548-60.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenology* 1995;44:915-23.
- Ribeiro ES, Galvão KN, Thatcher WW, Santos JEP. Economic aspects of applying reproductive technologies to dairy herds. *Anim Reprod* 2012;9:370-87.
- Risco CA, Moreira F, DeLorenzo M, Thatcher WW. Timed artificial insemination in dairy cattle – Part II. *Comp Cont Educ Pract Vet Food Anim* 1998;20:1284-9.
- Ronchi B, Stradaioli G, Verini Supplizi A, Bernabucci U, Lacetera N, Accorsi PA, Nardone A, Seren E. Influence of heat stress or feed restriction on plasma progesterone, oestradiol-17β, LH, FSH, prolactin and cortisol in Holstein heifers. *Livest Prod Sci* 2001;68:231-41.

- Roth Z, Meidan R, Braw-Tal R, Wolfenson D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *J Reprod Fert* 2000;120:83-90.
- Royal MD, Darwash AO, Flint APF, Webb R, Woolliams JA, Lamming GE. Declining fertility in dairy cattle: changes in traditional and endocrine parameters of fertility. *Anim Sci* 2000;70:487-501.
- Ruas JRM, Borges LE, Marcatti Neto A, Amaral R. Cria e recria de fêmeas F1: Holandês x Zebu para produção de leite. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 2004;25:40-6.
- Ruas JRM, Marcatti Neto A, Amaral R, Borges LE. Programa de bovinos da EPAMIG – pesquisa com animais F1: projetos e resultados preliminares. In: Encontro de produtores de gado leiteiro F1, 4., 2002, Belo Horizonte, Anais... Belo Horizonte: UFMG – Escola de Veterinária, 2002, p.60-8.
- Bisinotto RS, Santos JEP. The use of endocrine treatments to improve pregnancy rates in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2012;24:258-66.
- Sangsrivong S, Combs DK, Sartori R, Wiltbank MC. High feed intake increases blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. *J Dairy Sci* 2002;85:2831-42.
- Santos JEP, Cerri RLA, Ballou MA, Higginbotham GE, Kirk JH. Effect of timing of first clinical mastitis occurrence on lactational and reproductive performance of Holstein dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2004;80:31-45.
- Santos JE, Huber JT, Theurer CB, Nussio CB, Nussio LG, Tarazon M, Fish D. Effects of grain processing and bovine somatotropin on metabolism and ovarian activity of dairy cows during early lactation. *J Dairy Sci* 2000;83:1004-15.
- Sartori R, Haughian JM, Shaver RD, Rosa GJ, Wiltbank MC. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. *J Dairy Sci* 2004;87:905-20.
- Sartori R, Rosa GJM, Wiltbank MC. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002a;85:2813-22.
- Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens SA, Guenther JN, Parrish JJ, Wiltbank MC. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci* 2002b;85:03-2812.
- Savio JD, Boland MP, Roche JF. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. *J Reprod Fert* 1990;88:581-91.
- Schemm SR, Deaver DR, Griel Jr. LC, Muller LD. Effects of recombinant bovine somatotropin on luteinizing hormone and ovarian function in lactating dairy cows. *Biol Reprod* 1990;42:815-21.
- Senatore EM, Butler WR, Oltenacu PA. Relationships between energy balance and post-partum ovarian activity and fertility in first lactation dairy cows. *Anim Sci* 1996;62:17-23.
- Sheldon IM, Noakes DE, Dobson H. The influence of ovarian activity and uterine involution determined by ultrasonography on subsequent reproductive performance of dairy cows. *Theriogenology* 2000;54:409-19.

- Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol Reprod* 1988;39:308-17.
- Smith MC, Wallace JM. Influence of early post partum ovulation on the re-establishment of pregnancy in multiparous and primiparous dairy cattle. *Reprod Fertil Dev* 1998;10:207-16.
- 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.
- Staples CR, Thatcher WW, Clark JH. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. *J Dairy Sci* 1990;73:938-47.
- Stevenson JS, Britt JH. Relationships among luteinizing hormone, estradiol, progesterone, glucocorticoids, milk yield, body weight and postpartum ovarian activity in Holstein cows. *J Anim Sci* 1979;48:570-577.
- Stevenson JS, Schmidt MK, Call EP. Factors affecting reproductive performance of dairy cows first inseminated after five weeks postpartum. *J Dairy Sci* 1983;66:1148-1154.
- Stevenson JS, Pursley JR, Garverick HA, Fricke PM, Kesler DJ, Ottobre JS, Wiltbank MC. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *J Dairy Sci* 2006;89:2567-78.
- Stewart BM, Block J, Morelli P, Navarette AE, Amstalden M, Bonilla L, Hansen PJ, Bilby TR. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. *J Dairy Sci* 2011;94:3437-45.
- Taylor C, Rajamahendran R. Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. *Can J Anim Sci* 1991;71:61-8.
- Tenhagen B-A, Drillich M, Surholt R, Heuwieser W. Comparison of Timed AI after synchronized ovulation to AI at estrus: reproductive and economic considerations. *J Dairy Sci* 2004;87:85-94.
- Thatcher WW, Moreira F, Santos JEP, Mattos RC, Lopes FL, Pancarci SM, Risco CA. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 2001;55:75-89.
- Townson DH, Tsang PCW, Butler WR, Frajblat M, Griel Jr. LC, Johnson CJ, Milvae RA, Niksic GM, Pate JL. Relationship of fertility to ovarian follicular waves before breeding in dairy cows. *J Anim Sci* 2002;80:1053-8.
- Trout JP, McDowell LR, Hansen PJ. Characteristics of the estrous cycle and antioxidant status of lactating Holstein cows exposed to heat stress. *J Dairy Sci* 1998;81:1244-50.
- Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 2001;56:307-14.
- Vasconcelos JL, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR, Wiltbank MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of

- ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1999;52:1067-1078.
- Vaz de Oliveira HT, Reis RB, Ribeiro da Glória J. Comportamento da lactação de vacas mestiças F1 Holandês x Zebu. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, 2004;25:73-9.
- Washburn SP, Silvia WJ, Brown CH, McDaniel BT, McAllister AJ. Trends in reproductive performance in southeastern Holstein and Jersey DHI herds. *J Dairy Sci* 2002;85:244-51.
- Wilson SJ, Kirby CJ, Koenigsfeld AT, Keisler DH, Lucy MC. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. heifers. *J Dairy Sci* 1998;81:2132-2138.
- Wiltbank MC, Gümen A, Sartori R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 2002;57:21-52.
- Wiltbank MC, Weigel KA, Caraviello DZ, Souza A. Factors affecting reproductive efficiency in U.S. dairy herds. In: *Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos*. 10, 2006b, Uberlândia, Anais... Uberlândia, p. 3-9.
- Wiltbank MC. Prevenção e tratamento da retenção de placenta. In: *Novos enfoques na produção e reprodução de bovinos*. 10, 2006a, Uberlândia, Anais... Uberlândia, p.61-70.
- Wolfenson D, Inbar G, Roth Z, Kaim M, Bloch A, Braw-Tal R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. *Theriogenology* 2004;62:1042-55.

Manejo reprodutivo estratégico e IATF em novilhas e vacas primíparas zebuínas de corte

Manoel F. Sá Filho¹; Bruno M. Monteiro¹; Marcio F. Mendanha¹; André A. Souza²;
Renato W. Giroto³; Gustavo R. Siqueira⁴; Pietro S. Baruselli¹

¹Departamento de Reprodução Animal FMVZ-USP, São Paulo SP. ²PlanPec, Campo Grande, MS. ³RG Genética Avançada, Agua Boa MT; ⁴Apta, Polo Regional Alta Mogiana, Colina, SP. email: manoelsa@usp.br.

Resumo

Quais seriam os programas reprodutivos ideais para novilhas e vacas primíparas criadas a pastos nas condições de Brasil central? Normalmente tais categorias sofrem períodos de desafio nutricional que determinam pior desempenho reprodutivo do que as fêmeas adultas. Durante os períodos de estiagem, tanto novilhas virgens quanto novilhas gestantes (futuras vacas primíparas), são mantidas em pastagens que, geralmente, não alcançam as exigências nutricionais mínimas da categoria. Tal situação determina perdas de peso e de escore de condição corporal. Dessa forma, acredita-se que a dependência do uso exclusivo de pastagens aumenta os riscos de falha no programa reprodutivo. Para o sucesso do manejo reprodutivo das categorias em questão, é necessária total integração entre o manejo nutricional (forragem e suplemento) e o preparo do animal (idade e peso específicos). Essa integração possibilita que sejam alcançadas a puberdade em novilhas e satisfatória taxa de reconcepção pós-parto em vacas primíparas. Somente com tal integração é possível reduzir os riscos de insucesso dos programas reprodutivos nessas categorias. Dessa forma, o presente artigo tem como objetivo discutir alguns conceitos e peculiaridades referentes ao manejo reprodutivo de novilhas e vacas primíparas, bem como abordar algumas estratégias de manejo que podem melhorar o desempenho reprodutivo dessas categorias.

Introdução

A eficiência econômica da pecuária de corte está vinculada à produção de bezerros, destinados à produção de carne ou à reposição do rebanho. Neste contexto, a eficiência reprodutiva das novilhas e de fêmeas primíparas destaca-se como de grande importância.

A manipulação estratégica das gestações, e consequentemente dos partos, deve ser considerada uma importante ferramenta do manejo reprodutivo em bovinos. A ocorrência dos partos em momentos mais favoráveis do ano determina maiores pesos ao desmame dos bezerros e 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 estratégica para determinados lotes. Em novilhas, esses tipos de ferramentas podem aumentar a taxa de ciclicidade durante os períodos que antecedem a estação reprodutiva, evitar perdas de peso durante os períodos de restrição alimentar (inverno - seca) e melhorar o desempenho durante os períodos de

maior disponibilidade e qualidade de alimentos, como durante os meses das chuvas (verão). Já em fêmeas primíparas, tais estratégias podem minimizar as perdas de peso e condição corporal durante o parto, ou melhorar a condição corporal dessa categoria no momento do parto, aumentando a reposição das fêmeas em programas de IATF e incrementando a taxa de prenhez ao final após a estação reprodutiva.

Diante desses fatos, o presente artigo tem como objetivo discutir alguns conceitos importantes referentes à puberdade e aos fatores que influenciam à taxa de ciclicidade ao início da estação reprodutiva de novilhas zebuínas, bem como discutir alguns aspectos que devem ser considerados no estabelecimento do manejo reprodutivo de tais novilhas de reposição. Também serão abordadas algumas peculiaridades e pontos críticos para o sucesso dos programas de IATF em fêmeas primíparas. Por fim serão discutidas algumas estratégias de manejo nutricional, que podem melhorar o desempenho reprodutivo tanto de novilhas quanto de fêmeas primíparas.

Puberdade e maturidade sexual

Em novilhas, a puberdade pode ser definida como momento em que ocorre a primeira ovulação. A partir desse momento, a fêmea 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 uma gestação. Sendo assim, a maturidade sexual da novilha é adquirida após a ovulação acompanhada de um ciclo estral 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, 2004).

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). A idade ao primeiro parto do rebanho de corte nacional está em torno de quatro anos e o intervalo entre partos de 20 a 21 meses (Torres, 1996). Essa 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 falta 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 and 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).

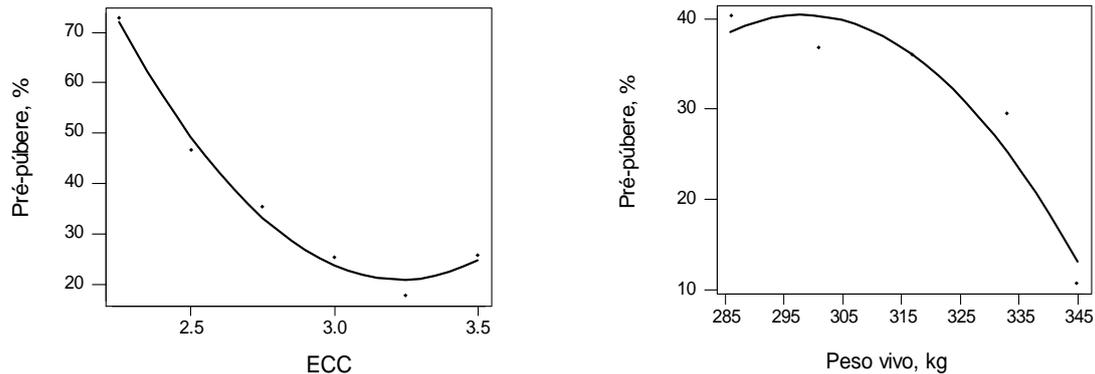


Figura 1. Relação entre o escore de condição corporal (ECC) e o peso vivo com a porcentagem de novilhas Nelore classificadas como pré-púbere entre dois a três anos de idade (Santos e Sá Filho, 2006).

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 frequência de novilhas Nelore ($n=1803$) que apresentaram corpo lúteo no primeiro dia da estação reprodutiva. Os resultados (Figura 2) corroboram com o observado no estudo anterior, no qual o incremento no escore de condição corporal aumenta a porcentagem de novilhas ciclando no início da estação de monta.

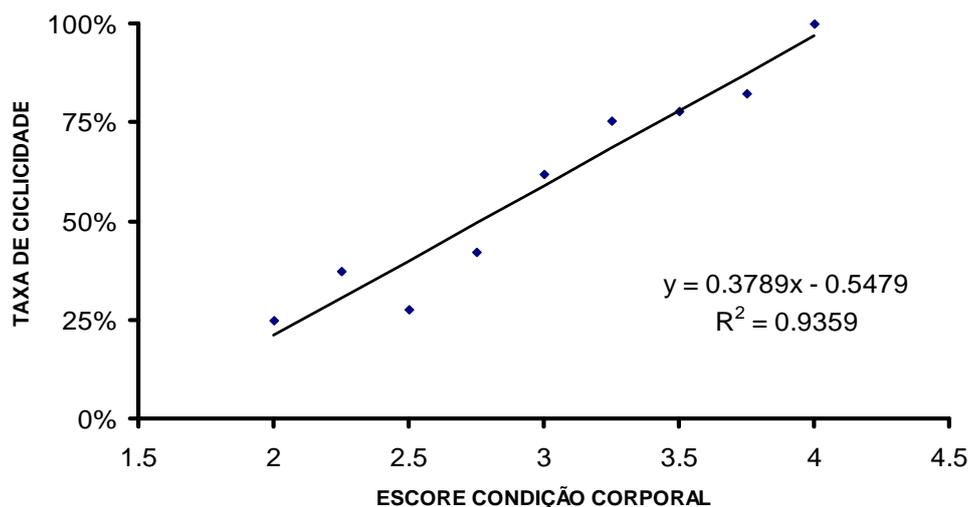


Figura 2. Relação entre o escore de condição corporal e a porcentagem de novilhas Nelore (n=1803) com presença de corpo lúteo no primeiro dia da estação de monta.

No início da estação reprodutiva, as novilhas devem atingir um peso equivalente a 60-65% 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 viabilidade econômica da suplementação alimentar para obtenção de um peso vivo de 300 a 350 kg aos 24 meses depende do manejo específico de cada propriedade, principalmente quando se leva em consideração o aumento na produção final de quilos de carne/área/ano.

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 and 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 foram cobertas 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.

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 e o aumento do número de bezerros produzidos ao final da vida produtiva de cada matriz dentro do rebanho, devido à antecipação da idade

ao primeiro parto. 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 15 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 reprodutivos.

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 central, 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 75 a 95%. Entretanto, um ponto importante e muitas vezes esquecido pelos pecuaristas ou técnicos é a distribuição da ocorrência das gestações durante este período de cobertura, ou seja, o momento em que as novilhas estão apresentando cio e estão 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 45 a 60 dias de estação de monta está diretamente relacionada à condição e peso corporais bem como à taxa de ciclicidade ao início da estação reprodutiva (Sá Filho 2010 dados não publicados). 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.

Estratégias nutricionais e não nutricionais para aumentar a taxa de ciclicidade de novilhas

Como citado, o sistema de reposição de matrizes no Brasil é baseado principalmente em fêmeas criadas e mantidas em sistema de lotação contínua, principalmente em pastagem de *Brachiaria ssp.*. A estação reprodutiva é realizada principalmente durante os meses da primavera e verão, quando se observa maior disponibilidade de forragem. O baixo peso ao desmame e a baixa taxa de ciclicidade das fêmeas durante o período pré-monta sugerem falta de gestão adequada de forragem, associado a problemas relacionados à genética ou saúde do rebanho.

Melhorias genéticas e nutricionais visando redução da idade à puberdade contribuem para o aumento na vida reprodutiva do animal e conseqüentemente a produção de maior número de bezerras, com benefícios para toda a cadeia produtiva (Cardoso and Nogueira, 2007). Segundo Nogueira (2004), para que a novilha zebuína possa expressar seu potencial genético é necessário que disponha de alimentação adequada e bom manejo sanitário. Melhorias na dieta pode afetar a idade em que a puberdade é atingida sendo possível antecipá-la (Romano et al., 2007).

Para que novilhas zebuínas consigam expressar seu potencial produtivo e serem acasaladas ao redor dos 24 meses de idade é necessário que essas estejam ciclando antes do início da estação reprodutiva (primavera-verão). Dessa forma, durante o desenvolvimento das novilhas, existem duas fases críticas que devem ser controladas: 1) Desenvolvimento pré-desmame e 2) Desenvolvimento pós desmame (2A - primeiro inverno, 2B - primeiro verão, 2C - segundo inverno).

Desenvolvimento pré desmame

O principal objetivo do sistema de produção de bezerras é a produção de bezerras que alcancem o máximo do seu potencial produtivo. Para isso ser alcançado, as bezerras devem ser desmamadas pesadas, tendo tamanho e musculosidade adequados, no entanto, sem acumular gordura. O adequado peso ao desmame de novilhas reduz a necessidade de peso adicional para o alcance da puberdade, permitindo a cobertura aos dois anos de idade. Dessa forma, quanto maior o peso ao desmame, menor será o peso adicional necessário para a bezerra alcançar a puberdade. Se a meta de peso na puberdade é de 325 kg a 330 d de idade, uma bezerra que é desmamada com 150 kg aos 7 meses de idade requererá melhor aporte nutricional do que uma bezerra desmamada com a mesma idade mas com 205 kg.

Diversas estratégias podem ser utilizadas para melhorar do desenvolvimento das novilhas durante a fase de pré-desmame. Dentre tais estratégias, se pode citar o melhoramento genético das matrizes, manipulação da época da parição (aumentando a proporção de fêmeas que apresentam partos em agosto, setembro e outubro) e suplementação nutricional pré-desmame (creep-feeding).

Estes efeitos maternos que podem influenciar o crescimento do bezerro do nascimento a desmama. Dentre tais fatores, o plano nutricional da fêmea gestante, a produção de leite, a idade da fêmea ao parto ou a época do parto podem influenciar o crescimento das crias e o peso dos bezerros ao desmame (Corah et al., 1975). Das variáveis citadas, a época da parição é uma das que mais influenciam o peso ao desmame. Em um estudo retrospectivo (Bocchi et al., 2004), foram analisados dados de peso à desmama de 333.259 animais da raça Nelore, nascidos entre 1976 e 2000, provenientes da Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ). Os nascimentos ocorreram durante todo o ano e os animais foram desmamados, em média, entre 210-240 dias de idade. Somente registros de animais criados em pastagem foram considerados. Os resultados demonstraram que existe efeito significativo entre época de nascimento, região do Brasil e peso ao desmame (Figura 3). Portanto, para melhorar o peso ao desmame e a recria de bezerra é importante concentrar as partições nas épocas mais adequadas para cada região brasileira.

Outra alternativa para aumentar o peso ao desmame é fornecer suplemento para a bezerra durante o período de aleitamento (creep-feeding). O creep-feeding consiste em fornecimento de alimentos suplementares aos bezerros criados ao pé das matrizes, sem que estas tenham acesso ao suplemento. Em animais taurinos mantidos a pasto, o sistema de creep aumenta o peso ao redor de 19 Kg com desmame aos 205 dias de idade (Bagley, 1993). Além disso, os mesmos autores indicam que os efeitos benéficos da utilização do creep-feeding em bezerras podem apresentar posterior reflexo positivo sobre o peso ao desmame de seus futuros filhos. Em bezerros Nelore, filhos de fêmeas primíparas, a suplementação com creep-feeding (0.6 Kg/cab/dia) aumentou ($P < 0.05$) o ganho de peso diário em 8% (0,59 vs. 0,64 Kg/cab/dia), o que refletiu em maior peso ao desmame (155,1 vs. 163,8 Kg) (Nogueira et al., 2006). Em animais cruzados Angus x Nelore o efeito do creep-feeding é ainda mais evidente, com acréscimo de até 18 kg no peso ao desmame quando comparados aos bezerros não suplementados (Araújo Marques et al., 2005). Nesse estudo, os autores relatam peso ao desmame de 210 Kg para os bezerros suplementados e 192 kg para os não suplementados.

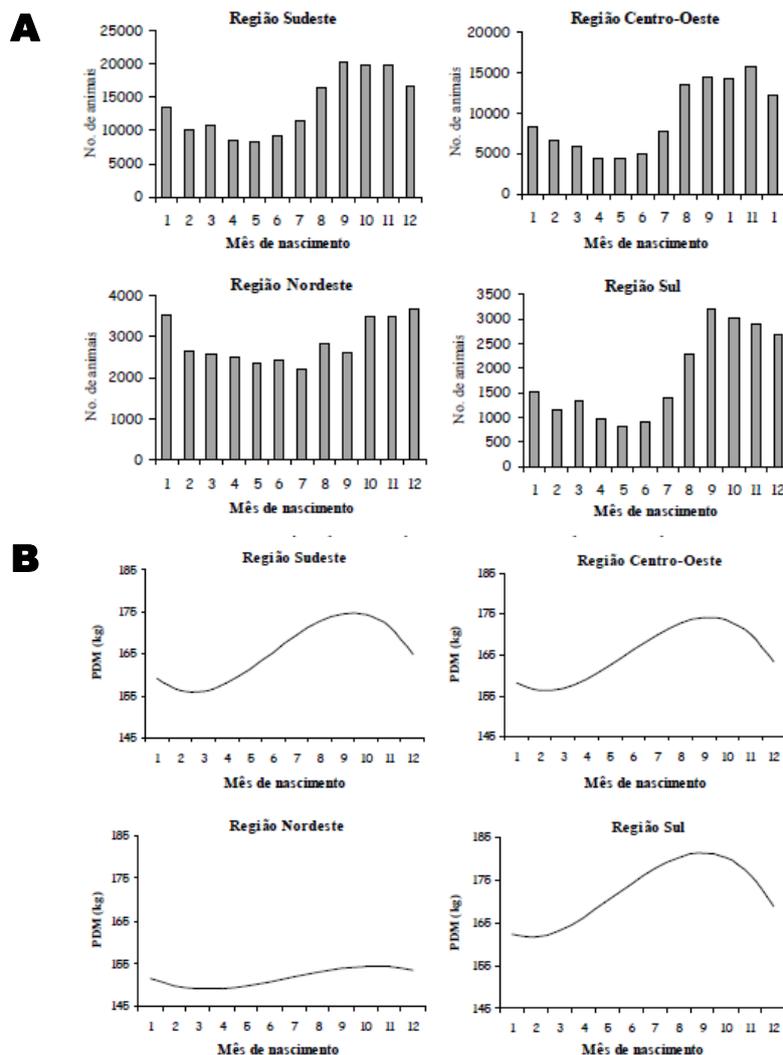


Figura 3. Frequência de nascimentos (A) e peso ao desmame (PDM; B) em cada mês do ano, para bezerros da raça Nelore, de acordo com a região do Brasil (Bocchi et al., 2004).

Desenvolvimento pós desmame

Novilhas com diferentes tipos de alimentação pós desmame chegam à puberdade em diferentes idades, mas com o mesmo estágio relativo de desenvolvimento (Patterson et al., 1992). O fator nutricional possui uma importante participação na expressão do potencial de puberdade precoce. Mais importante que o peso é o fato do animal estar ganhando ou perdendo peso, o que interfere na secreção de gonadotrofinas e no desenvolvimento folicular (Nogueira, 2004). O estado nutricional e a taxa de ganho de peso vivo são determinantes no momento do início da puberdade (Gasser et al., 2006a).

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 (Santos and Sá Filho, 2006). A densidade de energia da dieta parece ser um dos principais fatores envolvidos no crescimento folicular, ovulação e desenvolvimento embrionário (Santos et al., 2008; Santos and Sá Filho, 2006).

Em sistemas intensivos de produção, a dependência do uso exclusivo de pastagens aumenta os riscos de fracasso. Para a cobertura precoce das novilhas, é indispensável um elevado nível alimentar, que pode ser suprido através do fornecimento de suplementos concentrados. De maneira geral, a suplementação de animais em pastejo é realizada com os objetivos de corrigir as deficiências de nutrientes da forragem, aumentar a capacidade de suporte das pastagens, potencializar o ganho de peso, e fornecer aditivos ou promotores de crescimento (Reis et al., 2005). A manipulação nutricional através de suplementação estratégica representa uma forma de melhorar o desempenho animal em pastejo por meio da melhora da atividade microbiana ruminal, em que, busca-se atender às exigências nutricionais dos microrganismos ruminais afim de aumentar o desempenho dos animais. Condições favoráveis à proliferação de microrganismos são fundamentais para que os ruminantes utilizem os carboidratos estruturais dos pastos (Vieira, 2011). Portanto, a suplementação com concentrados e o manejo intensivo das pastagens tropicais são importantes fatores a serem considerados, os quais influenciam o ganho de peso diário, necessário para os bovinos anteciparem a puberdade, bem como reduzir o intervalo entre partos, principalmente nas fêmeas primíparas (Selk et al., 1988).

Efeito da suplementação durante a recria

As bezerras de corte no Brasil central são tradicionalmente desmamadas no outono, sendo necessário assegurar ganho de peso satisfatório destes animais nos 100 dias em média posteriores à desmama (outono-inverno), o que constitui um desafio no sistema de cria e recria brasileiro (Rocha and Lobato, 2002).

Para assegurar um desenvolvimento corporal adequado para o acasalamento das novilhas antes dos 24 meses, é necessário ganho de peso satisfatório e contínuo para o

rebanho. A possível ocorrência de fatores climáticos adversos ao estabelecimento e manejo correto das pastagens pode prejudicar o acasalamento precoce em situação exclusiva de pastejo. A utilização de forragem conservada ou suplementação estratégica, nesse período, surge como alternativa para diminuir o risco de insucesso nesse sistema de concepção precoce (Rocha and Lobato, 2002).

É importante ressaltar que para o sucesso do sistema de reposição de matrizes existe a necessidade de um complexo ajuste no manejo nutricional e na idade das fêmeas ao início do programa reprodutivo. Geralmente, novilhas prenhes ao início da estação reprodutiva são aquelas mais pesadas, mais velhas e que tiveram melhor condição corporal e maiores ganhos médios diários desde o seu nascimento até o final do primeiro acasalamento que as novilhas não gestantes (Rocha and Lobato, 2002; Vieira et al., 2006).

Além disso, outro fator determinante é o componente genético. Dados de literatura indicam que novilhas Hereford e 1/4 Nelore-Hereford apresentaram maior eficiência reprodutiva (63,31; 69,18 vs. 41,82% TP) quando primíparas aos 24 meses que novilhas 3/8 Nelore-Hereford (Rocha and Lobato, 2002).

Em um interessante estudo (Santos et al., 2005), os autores desmamaram novilhas com idade entre 60 e 90 dias e média de 95,5 Kg, onde foram mantidas em pastagem de milheto dos três aos cinco meses de idade, sob lotação contínua com carga variável, recebendo ou não suplementos energéticos, durante o verão. As novilhas iniciaram o período de pastejo distribuídas nos tratamentos: PAST1- pastagem de milheto, sem suplementação aos animais; PAST1/M pastagem de milheto + suplementação com grão de milho moído; PAST1/P- pastagem de milheto + suplementação com polpa cítrica peletizada e moída. O teor de proteína bruta (PB) dos suplementos utilizados nesta etapa foi analisado previamente ao experimento, sendo corrigido com uréia para 12% PB. No inverno, as mesmas novilhas permaneceram dos oito aos onze meses de idade em pastagem de aveia preta e azevém, sob pastejo contínuo com lotação variável. As novilhas ingressaram na pastagem com peso médio de 110 kg, distribuídas nos tratamentos: PAST2 - pastagem de aveia preta e azevém, sem suplementação aos animais; PAST2/M - pastagem de aveia preta e azevém + suplementação com grão de milho moído; PAST2/C - pastagem de aveia preta e azevém + suplementação com casca de soja (Figura 4).

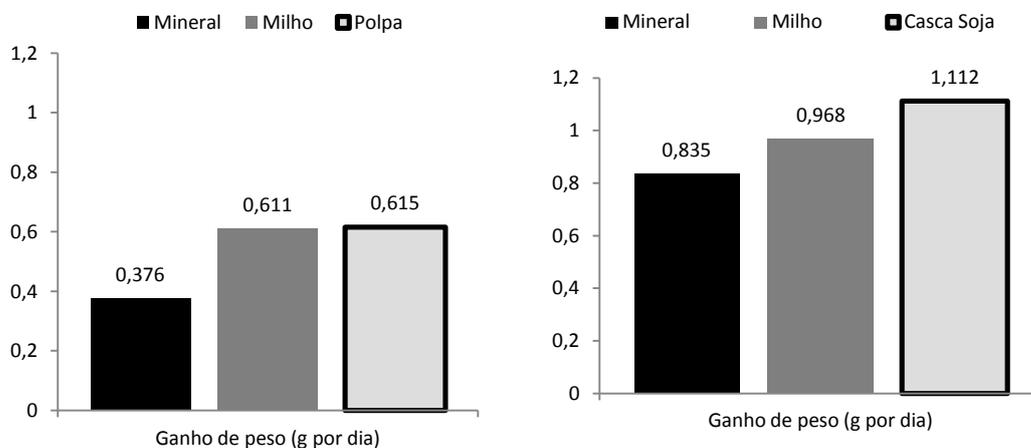


Figura 4. Ganho de peso diário médio (GDM) de novilhas criadas em pastos de milho + suplementação energética no verão (esquerda), e em pastos de aveia e azevém + suplementação energético-protéica no inverno (direita), de acordo com cada tratamento (Santos et al., 2005).

Dessa forma os autores (Santos et al., 2005) concluíram que a suplementação energética em pastagem de milho é uma alternativa viável para que novilhas desmamadas aos 60-90 dias apresentem desempenho individual satisfatório no período inicial pós-desmama (Figura 5); o fornecimento de suplementos energéticos durante a utilização da pastagem de verão e/ou da pastagem de inverno, no primeiro ano de recria, permite desenvolvimento satisfatório para o primeiro serviço das novilhas aos 18 ou 24 meses; do ponto de vista nutricional, os subprodutos polpa cítrica e casca de soja podem substituir o grão de milho como suplemento energético para recria de novilhas de corte.

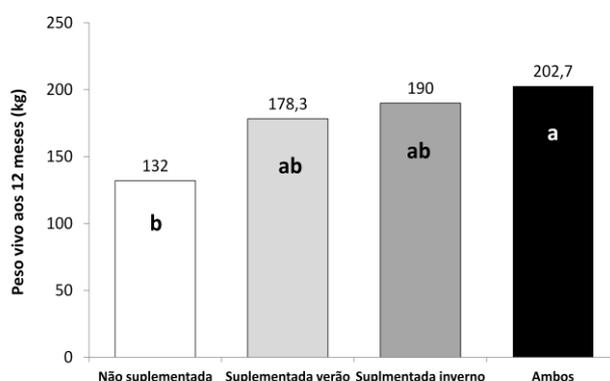


Figura 5. Peso aos 12 meses de novilhas submetidas a diferentes tratamentos nutricionais de desmame precoce (Santos et al., 2005).

Portanto, os sistemas alimentares podem influenciar de maneira significativa o desenvolvimento e o desempenho reprodutivo das fêmeas, sendo a escolha por uma ou outra técnica dependente da identificação da melhor relação entre preço produto/preço insumos, e o potencial de resposta da categoria de animal trabalhada.

Efeito da suplementação durante o período das chuvas

A utilização de suplementos concentrados na época seca é uma técnica cada vez mais utilizada na bovinocultura de corte, com objetivo de evitar a perda de peso dos animais e aumentar a produtividade por área durante o ano (Reis et al., 2009). No entanto, a suplementação da dieta de animais mantidos a pasto durante o período da estação de chuvas é prática relativamente recente. A suplementação com concentrados no período chuvoso e o manejo intensivo das pastagens podem ser tecnologias que permitam aumentar o desempenho dos animais, reduzindo ainda mais a idade de abate ou a da primeira cria (Reis et al., 2009). Neste tipo de suplementação, tem-se adotado basicamente duas linhas em relação às características dos nutrientes a serem fornecidos,

podendo-se utilizar energia ou proteína (Reis et al., 2004). Entretanto, a forma com que essas condições ocorrem aliadas às estratégias de manejo utilizadas, às interações entre qualidade e quantidade do pasto e ao fornecimento de nutrientes via suplemento, proporciona diferenças na magnitude das respostas com a técnica de suplementação sobre o desempenho do animal e por área de pastagem explorada (Reis et al., 2009).

Alguns trabalhos conduzidos no sudeste brasileiro com suplementação de animais em pastejo têm mostrado que, em determinadas condições que proporcionem forragem com alto valor nutritivo, pode ocorrer excesso de nitrogênio na dieta (Bertipaglia, 2008; Correia, 2006; Ramalho, 2006), sendo que nessas condições o desempenho é favorecido com o fornecimento de energia. Já em condições onde o valor proteico da forragem for inferior a 12% a suplementação com proteína é indicada (Detmann et al., 2010).

A suplementação proteica-energética, independente da relação entre proteína degradável ruminal e nutrientes digestíveis totais, no período das águas é uma estratégia eficiente para aumentar o desempenho de novilhas Nelore (Figura 6), seja ganho de peso ou ganhos em carcaça, em pastos com diferentes características estruturais (Casagrande, 2010).

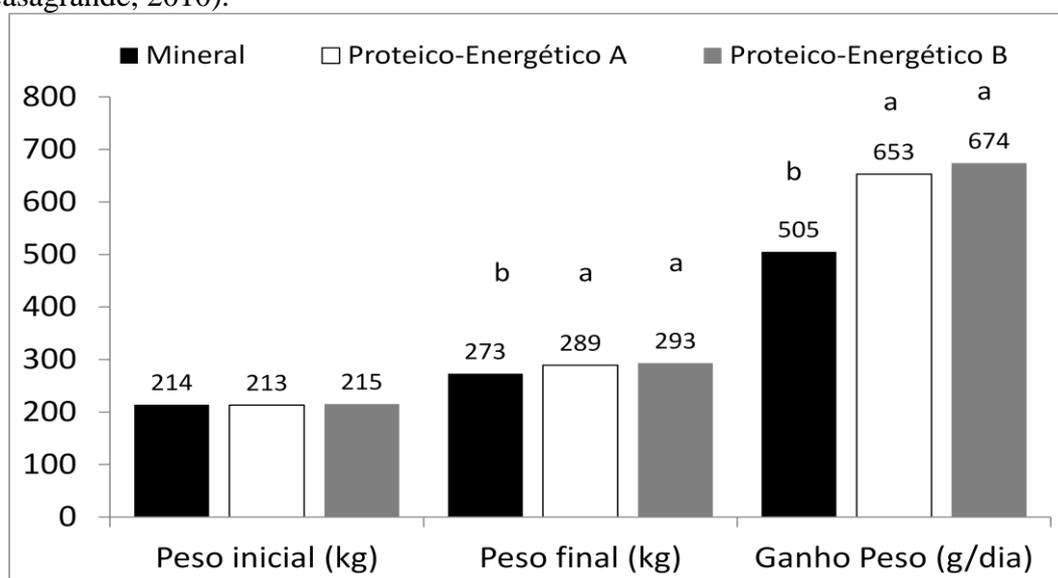


Figura 6. Peso de novilhas Nelore, em função do tipo de suplementação dos animais (direita), em pastos de capim-marandu submetidos a diferentes ofertas de forragem em lotação contínua (esquerda), durante o período das águas de 2008. (Casagrande, 2010). Proteico-Energético A = Alta relação PDR/NDT e Proteico-Energético B = Baixa relação PDR/NDT.

Além disso, o suplemento energético, adicionado em quantidade relativa a 0,3% do PV/dia a dieta de novilhas da raça Nelore, criadas em pastagens de capim-marandu com teores de proteína bruta acima de 13%, proporcionam ganhos de peso adicional de aproximadamente 185 g/dia, sem que haja necessidade de suplementação proteica (Figura 7) (Vieira, 2011).

Portanto, a identificação de índices qualitativos da forragem que guardem relação com os efeitos da suplementação seria determinante para a tomada de decisão de qual a melhor estratégia a ser adotada, uma vez que o mesmo suplemento pode gerar respostas diferentes em função do valor nutritivo da forragem (Casagrande, 2010; Vieira, 2011). Dessa forma, a suplementação energética em pastagens durante o período chuvoso constitui uma alternativa para aumentar a velocidade de crescimento dos animais, a partir de melhor balanceamento dos nutrientes da dieta e de aumento no consumo total de matéria seca. De qualquer forma, a suplementação concentrada durante esse período deve ser analisada em termos da meta a ser alcançada dentro de um determinado sistema de produção, já que o custo total da suplementação pode aumentar, sendo que os ganhos adicionais com a suplementação nas águas a serem obtidos podem chegar a 100 a 200 g/dia a mais por animal (Thiago and Silva, 2001). No entanto, esse ganho adicional pode ser determinante para alcançar o peso ideal antes da estação reprodutiva.

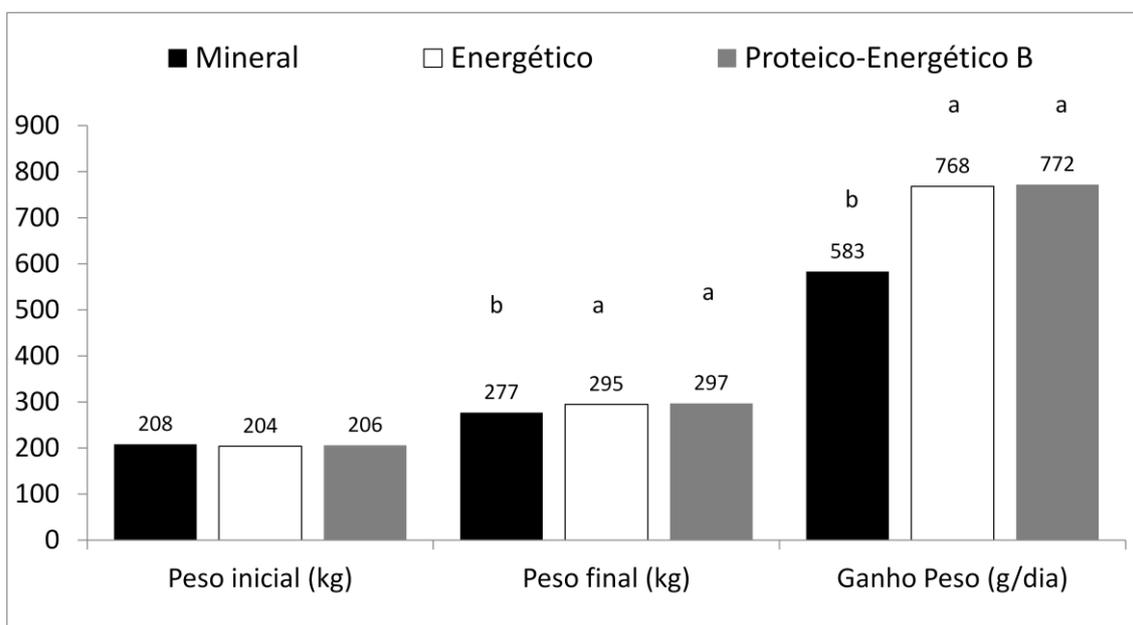


Figura 7. Peso de novilhas Nelore, em função do tipo de suplementação dos animais, em pastos de capim-marandu submetidos a diferentes ofertas de forragem em lotação contínua, durante o período das águas de 2009 (Vieira, 2011).

Simulação do ganho de peso necessário para melhorar o desempenho de novilhas zebuínas criadas a pasto

Diante o que foi exposto, realizou-se uma simulação (Figura 8) do uso potencial da suplementação estratégica sobre o ganho de peso de novilhas zebuínas que são mantidas sob condições de manejo exclusivamente à pasto (Controle) ou recebendo suplementação durante todo o período de cria e recria (Suplementado). Para tal simulação foi considerado que a disponibilidade de pasto apresenta uma variação de acordo com os meses do ano, sendo mais disponível durante os meses do verão e menos

disponível durante os meses do inverno. Valores intermediários foram considerados para a disponibilidade de forragem durante os meses do outono e primavera. Para a suplementação foi considerado como as novilhas recebendo creep-feeding durante o período pré-desmame, suplementação proteica de baixo a médio consumo (0.1% a 0.2% do peso vivo) durante o período do primeiro e segundo inverno e suplementação energética durante o período das águas.

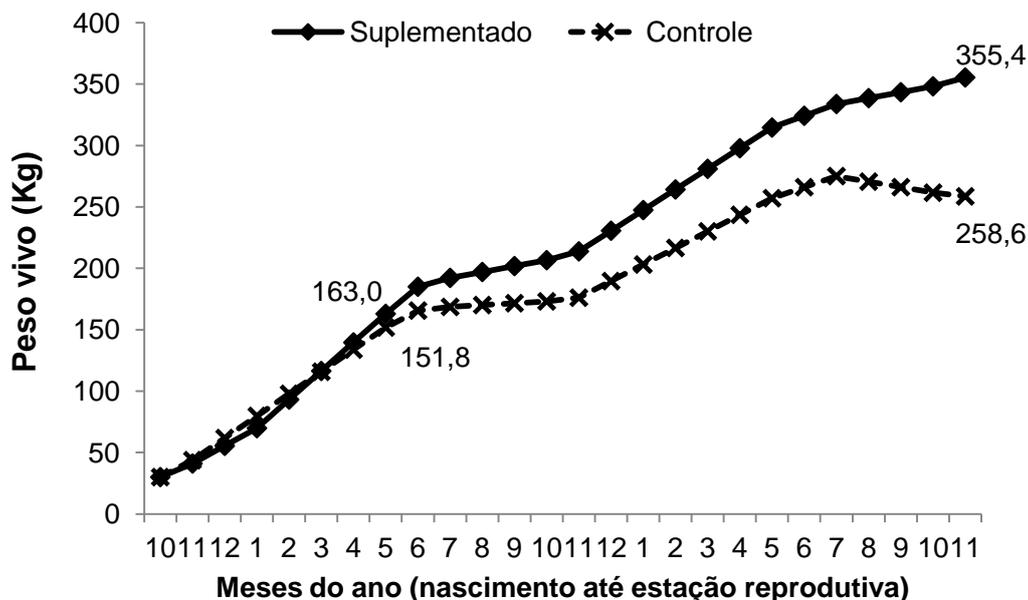


Figura 8. Desenvolvimento corporal em novilhas Nelore, em função da suplementação dos animais durante todas as fases de cria e recria (simulação). Os ganhos de peso simulam fêmeas recebendo creep-feeding durante o período pré-desmame, suplementação proteica durante os períodos secos (primeiro e segundo inverno) e suplementação energética durante o período das águas. O ganho de peso médio foi de 434 g/cab/dia para as fêmeas suplementadas e 305 g/cab/dia para as fêmeas não suplementadas. Durante as fases críticas do desenvolvimento (primeiro e segundo inverno e o período das águas) foram propostos para as fêmeas suplementadas ou não suplementadas ganhos de pesos médios de: Primeiro inverno (Suplementadas = 192 vs. Não suplementada = 70 g/cab/dia); Segundo inverno (Suplementadas = 180 vs. Não suplementada = -138 g/cab/dia); Águas (Suplementadas = 500 vs. Não suplementada = 413 g/cab/dia).

Dessa forma, fica evidente que é possível alcançar pesos satisfatórios em novilhas durante o período pré-estação reprodutiva desde que se realize um programa nutricional adequado.

Efeito da raça e do melhoramento genético

A idade à puberdade é considerada o evento mais importante da vida reprodutiva de uma fêmea bovina, devendo ser incluído como critério de seleção dentro de um sistema de produção de bovinos de corte (Nogueira, 2004). A capacidade da novilha Nelore em alcançar a puberdade precocemente apresenta média herdabilidade (Eler et al., 2002). Consequentemente, novilhas selecionadas pela idade ao primeiro parto podem produzir progênes que exibem puberdade precoce.

Apesar da possibilidade do melhoramento genético, novilhas *Bos indicus* apresentaram idade tardia para alcançar a puberdade quando comparadas com novilhas *Bos taurus* (Sartori and Barros, 2011). Portanto, novilhas zebuínas necessitaram serem mantidas em ambientes favoráveis para alcançar maior peso corporal e consequentemente reduzir a idade à puberdade.

No caso de animais cruzados, a porcentagem superior de fêmeas que manifestam puberdade precocemente evidencia o efeito da heterose. Raças cruzadas apresentam melhor desempenho do que as raças puras, sendo considerada como estratégia para reduzir a idade à puberdade de novilhas zebuínas mantidas em clima tropical.

Portanto, o manejo de novilhas para reposição de matrizes exige total integração entre o manejo nutricional (forragem e suplemento) e o preparo do animal (idade e peso específicos) para o alcance da puberdade antes do início da estação reprodutiva. Somente integrando todas as áreas do conhecimento será possível aumentar a produtividade e a eficiência reprodutiva de novilhas Nelore criadas em condições tropicais no Brasil.

Terapias hormonais para a indução de ciclicidade em novilhas

Diversos estudos foram conduzidos para induzir puberdade de novilhas taurinas (Gasser et al., 2006b; Grings et al., 1998). 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 ou durante a fase de recria (Gasser et al., 2006a; Gasser et al., 2006b; Grings et al., 1998). Além disso, existe a possibilidade de induzir a puberdade por suplementação hormonal com tratamentos à base de progesterona ou progestágenos (Anderson et al., 1996; Claro-Júnior et al., 2010; Grings et al., 1998; Sá Filho et al., 2006; Sá Filho et al., 2009a; Sales et al., 2009).

Nosso grupo de pesquisa tem realizado estudos para avaliar a resposta a diferentes protocolos hormonais de indução de puberdade em novilhas zebuínas, principalmente da raça Nelore. Em um primeiro estudo (Sá Filho et al., 2006), foram utilizadas 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 (IND) na indução de ciclicidade. Observou-se aumento na taxa de ciclicidade das novilhas tratadas (85,6% para o Grupo IND, 81,1% para o Grupo IND-BE início protocolo e 63,6% para o Grupo Controle ($P < 0,0001$). Além disso, observou-se que o protocolo para indução de ciclicidade foi mais eficiente em novilhas com maior ECC (61,3% para $ECC \leq 2,5$; 76,7% para $ECC = 2,75$; e 85,5% para $ECC > 3,0$).

Em outro estudo realizado por nosso grupo (Sales et al., 2009), avaliou o efeito do tratamento com P4, associado à administração de Cipionato de estradiol (ECP) no dia da retirada do dispositivo de P4, na indução de ciclicidade em novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) pré-púberes. Verificou-se aumento na taxa de ciclicidade nos grupos que receberam a indução [Controle=18,7^b (14/75); CIDR=44,0^a (33/75); e CIDR+ECP=48,0^a (36/75)]. Além disso, o tratamento aumentou (P=0,003) o diâmetro uterino das novilhas tratadas com CIDR (D0=13,0±0,3^b e D18=14,1±0,3^a) e CIDR+ECP (D0=13,3±0,2^b e D18=14,4±0,3^a), o mesmo não foi observado nas novilhas do grupo controle (D0=13,4±0,7 e D18=13,9±0,3, P=0,53).

Resultados semelhantes foram demonstrados pelo tratamento com progesterona em vacas de corte primíparas e pluríparas (Wheaton and Lamb, 2007). 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 (Sales et al., 2008).

Dando seqüência aos estudos (Sá Filho et al., 2009a), foram avaliados diferentes tipos de indutores da ovulação em protocolos de indução de puberdade em novilhas *Bos indicus*. Verificou-se que é importante a utilização de um indutor de ovulação ao final do tratamento da indução de puberdade em novilhas zebuínas (Figura 9). Além disso, 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).

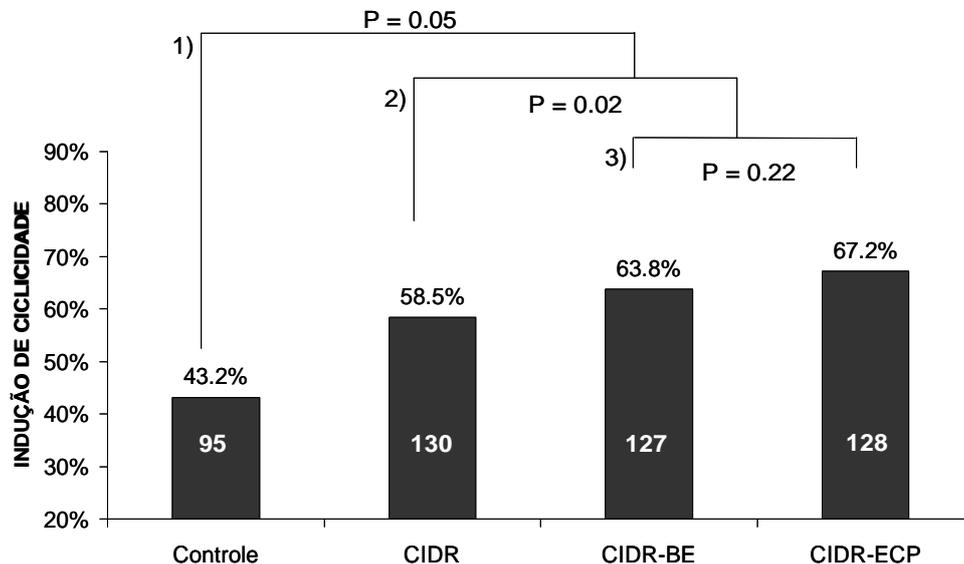


Figura 9. Efeito dos diferentes estímulos ovulatórios (ECP = cipionato de estradiol ou BE = benzoato de estradiol) no protocolo de indução de ciclicidade em novilhas zebuínas (Sá Filho et al., 2009).

Um aspecto importante e ainda não totalmente cientificamente elucidado esta relacionado ao intervalo entre o final do protocolo de indução de puberdade e o início da estação reprodutiva. Em estudo recente (Reis et al., 2012), foram utilizadas 670

novilhas oriundas de duas fazendas (Colina-SP e Araguaiana-MT). As novilhas receberam protocolo de indução de puberdade aos -90 dias (P4-90d) ou -45 dias (P4-45d) antes do início da estação reprodutiva. Verificou-se maior presença de CL ($P < 0,01$) nas novilhas do grupo P4-90d [52,0% (118/227)] do que nas do grupo controle [19,3% (42/218)] e grupo P4-45d [21,8% (49/225)] 45 dias antes da estação de monta. Além disso, no início da estação de monta, verificou-se maior presença de CL ($P < 0,01$) em ambos os grupos tratados [P4-45=60,4% (136/225) e P4-90=63,9% (145/227)] em relação ao grupo controle [45,4% (99/218)]. No entanto, não foi observada diferença nas taxas de concepção à IATF ($P = 0,72$) entre os grupos [P4-90d=51,9% (54/104) vs. P4-45d=54,1% (60/111) vs. Controle=45,3% (34/75)]. Portanto, a indução, tanto aos 90 quanto aos 45 dias antes do início da estação reprodutiva aumentam as taxas de ciclicidade em novilhas Nelore.

IATF em novilhas zebuínas

Os programas de sincronização da ovulação apresentam resultados satisfatórios e possibilitam o emprego da IATF em vacas zebuínas (Baruselli et al., 2004b). 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., 2004a). 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. Na literatura existem estudos demonstrando que elevadas concentrações de P4 diminuem a frequência de liberação de hormônio luteinizante (LH) e do crescimento folicular (Adams et al., 1992; 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, indicando baixa resposta ao tratamento de sincronização.

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 frequência da liberação de LH o que

compromete o crescimento folicular e a ovulação, inviabilizando o emprego deste tratamento para a IATF em novilhas zebuínas.

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, nosso grupo de pesquisa (Carvalho et al., 2008) também 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_{2α} (PGF) no dia da inserção do dispositivo (D0). O objetivo do estudo foi antecipar a luteólise e diminuir as concentrações sanguíneas de progesterona durante o tratamento. A hipótese levantada foi que menores concentrações circulantes de P4 aumentaria a taxa de crescimento folicular e ovulação, e consequentemente a eficiência do tratamento de sincronização. 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.

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

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., 2008). Ainda, o bloqueio do LH promovido durante o tratamento de sincronização varia em função da fonte de progesterona utilizada, visto que, os progestágenos promovem menor supressão na frequência de LH (Fike et al., 2004; Rathbone et al., 2001).

Diversos 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., 2011a). Em resumo, é possível obter satisfatórias taxas de ovulação e de prenhez que justificam o emprego da IATF em novilhas tratadas com implante auricular de norgestomet.

Assim, com o objetivo melhorar os resultados da IATF em novilhas, nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito da administração de 400 UI de eCG no momento da retirada do implante auricular contendo Norgestomet em novilhas Nelore (Tabela 1)(Sá Filho et al., 2010c).

Tabela 1 - Efeito da administração de eCG (400UI) na dinâmica folicular de novilhas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante auricular contendo Norgestomet associado ao benzoato de estradiol.

	sem eCG (n=87)	com eCG (n=90)	Valor P
Ø FD D8 (cm)	0,82±0,02	0,86±0,02	0,28
Ø 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
Ø do CL (cm)	1,39±0,03	1,55±0,03	0,0001
Taxa prenhez %(n)	36,8 (32/87)	50,0 (45/90)	0,04

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 outro estudo (Sá Filho et al., 2011a) foi avaliado o efeito da utilização de diferentes tipos de indutores de ovulação em novilhas Nelore cíclicas tratadas com implante auricular novo ou reutilizado contendo Norgestomet (Fatorial 2x3). 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) na taxa de prenhez à IATF (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito da utilização de diferentes indutores de ovulação em novilhas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com implante auricular contendo Norgestomet novo ou reutilizado no diâmetro folicular no momento da inseminação e na taxa de prenhez.

		Taxa de Prenhez (%)
Indutor de ovulação	BE	40,4 (88/218)
	CE	48,3 (99/205)
	GnRH	48,7 (95/195)
Tipo do implante	Novo	46,6 (142/305)
	Reutilizado	44,3 (139/314)

Portanto é possível empregar os diferentes indutores (BE, CE ou GnRH) de ovulação durante tratamentos utilizando tanto implante auricular novo ou re-utilizado para sincronização da ovulação e IATF de novilhas Nelore ciclando.

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 and 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 após a puberdade. Como descrito anteriormente, a maturidade sexual é evidenciada pelo aumento da incidência de manifestação de estro e da fertilidade (Byerley et al., 1987) e 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 and Sá Filho, 2006).

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 de 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) (Figura 10). Além 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%; $P = 0.07$). .

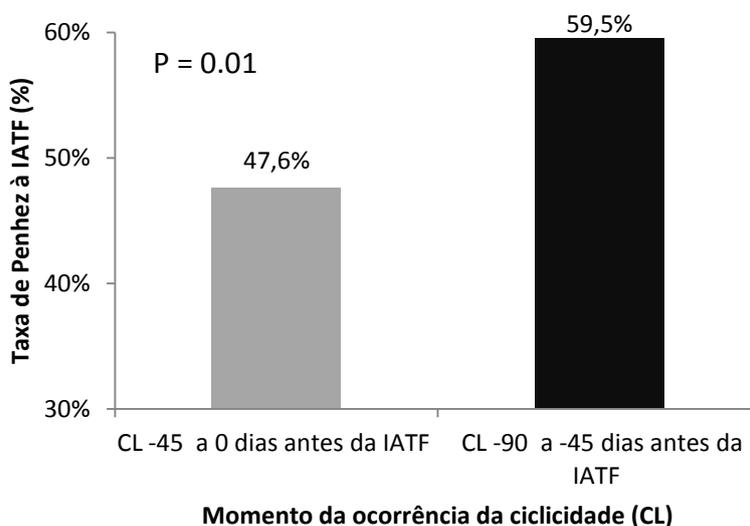


Figura 10. Efeito do momento da ocorrência da ciclicidade na taxa de prenhez à IATF de novilhas Nelore.

Os resultados demonstram que novilhas que foram submetidas à IATF e estavam ciclizando 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.

Manejo reprodutivo de fêmeas primíparas

Vacas primíparas mantidas a pasto frequentemente são associadas baixos a índices reprodutivos em relação das vacas pluríparas (Sá Filho et al., 2012; Sá Filho et al., 2009b). Essa baixa eficiência pode ser atribuída a maior incidência de anestro em vacas de primeira cria quando mantidas exclusivamente a pasto (Wiltbank, 1970). O anestro pós parto ocorre devido o comprometimento do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, mais especificamente a produção de GnRH e pulsatilidade de LH, componentes necessários para que ocorra a ovulação e a prenhez (Yavas and Walton, 2000).

Alguns fatores são condicionantes para as maiores taxas de anestro pós-parto em vacas primíparas, dentre eles: 1) época da parição em relação ao início da estação reprodutiva e, 2) escore condição corporal durante o período pré e pós-parto. Tais fatores são evidenciados principalmente pela distinta exigência nutricional das fêmeas primípara quando comparadas as fêmeas pluríparas. Fêmeas de primeira cria apresentam o parto durante um período ainda de crescimento, determinando que além do estresse do parto, da produção de leite e dos cuidados com o bezerro essas fêmeas

ainda necessitam dispensar nutrientes para crescer. Dessa forma, fêmeas mantidas em regimes exclusivamente a pasto tropical, frequentemente são associadas a períodos de restrição alimentar, agravando o anestro pós-parto e reduzindo a eficiência reprodutiva.

A amamentação é outro fator que afeta a duração do anestro pós-parto em vacas de corte, sendo a relação mãe-cria o fator regulador da frequência de pulsos de LH em vacas amamentando (Wiltbank et al., 2002; Yavas and Walton, 2000). A remoção dos bezerros durante um período de 48 h aumentou o número de pulsos de LH a cada 6 horas em relação as que foram mantidas com seus bezerros (3,0 vs. 1,2)(Williams et al., 1983). Tal informação tem sido frequentemente incorporada em programas de sincronização da ovulação para IATF utilizando a associação entre GnRH+PGF (Sá Filho et al., 2009d; Williams et al., 2002) ou progesterona e estradiol (Barreiros et al., 2003; Penteado et al., 2004; Sá Filho et al., 2009c).

Em um trabalho clássico sobre a importância da nutrição das mães no desenvolvimento de suas crias (Corah et al., 1975), futuras matrizes, os autores submeteram novilhas (primíparas pré-parto) nos 100 últimos dias de gestação à diferentes manejos nutricionais. Um grupo recebeu 100% das suas necessidades nutricionais, segundo o NRC, e o outro grupo somente 65% das suas necessidades nutricionais. Foi observado efeito deletério tanto no peso ao desmame das bezerras como atraso na puberdade das filhas das mães mal nutridas (Figura 11).

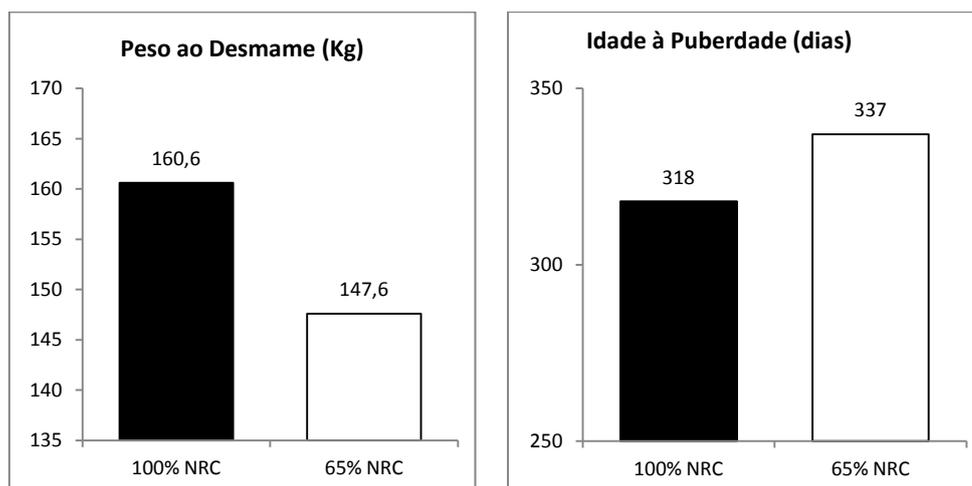


Figura 11. Peso ao desmame e idade a puberdade de bezerras cujas mães foram alimentadas com diferentes níveis nutricionais (Corah et al., 1975).

Como discutido anteriormente, a época da parição apresenta impacto significativo sobre o peso ao desmame de bezerros. Em relação ao manejo de novilhas e vacas primíparas é comum iniciar a estação reprodutiva das novilhas antes do restante do rebanho. A principal justificativa para esse manejo é proporcionar maior intervalo entre o parto e o início da estação reprodutiva, disponibilizando maior tempo para recuperação das fêmeas de primeira cria antes do início da estação de monta. No entanto, como os partos geralmente se concentram no final do inverno e durante a primavera, os animais têm o período final de gestação e início da lactação em épocas de menor disponibilidade de alimento, em termos de quantidade e qualidade, tal prática pode levar à redução das reservas corporais no periparto.

Em um elegante trabalho, foi demonstrado que vacas primíparas que têm partos no início da estação de parição (setembro) apresentaram redução mais acentuada do escore de condição corporal do que fêmeas que apresentam o parto nos meses subsequentes (Figura 12)(Meneghetti and Vasconcelos, 2008). O escore de condição

corporal das fêmeas Nelore paridas em setembro foi menor ($P<0,05$) que o das vacas paridas em novembro e dezembro; já o escore corporal das vacas paridas em outubro foi menor ($P<0,05$) apenas ao das vacas paridas em dezembro. A redução do escore de condição corporal durante o período pós-parto das vacas Nelore foi 0,91, 0,54 e 0,13 para as fêmeas paridas nos meses de setembro, outubro e novembro, respectivamente.

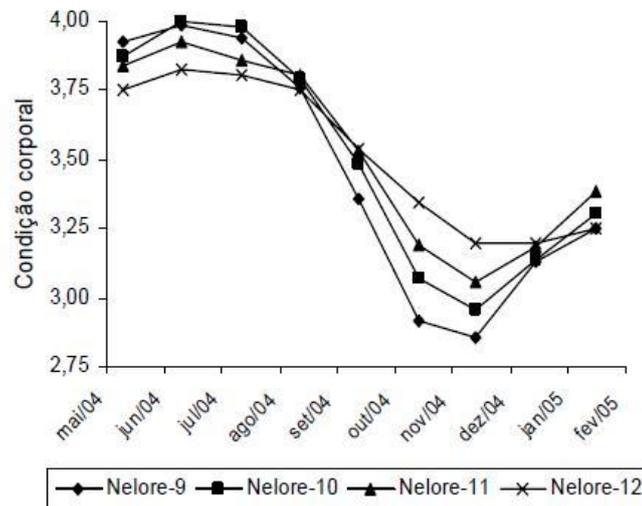


Figura 12. Condição corporal (médias dos quadrados mínimos) no pré e pós-parto de vacas primíparas Nelore e 1/2 Nelore + 1/2 Red Angus, de acordo com o mês de parição (Meneghetti and Vasconcelos, 2008).

Em outro estudo dos mesmos autores (Meneghetti and Vasconcelos, 2008) foi observado redução do escore de condição corporal quando as fêmeas apresentavam maior intervalo entre o parto e o início da sincronização para IATF. Nas vacas 1/2 Nelore + 1/2 Red Angus ocorreu menor redução no escore de condição corporal do que nas vacas Nelore (Figura 13). Foi observado efeito ($P<0,05$) do escore de condição corporal na taxa de ovulação após o protocolo de sincronização, sendo que as fêmeas com menor escore de condição corporal tiveram menor taxa de ovulação. Também houve efeito do escore de condição corporal ($P<0,0001$) na taxa de concepção à IATF. O aumento na taxa de concepção foi proporcional ao aumento no escore de condição corporal das fêmeas, de forma que o incremento médio na concepção foi de 6 pontos percentuais para cada 0,25 ponto no escore de condição corporal.

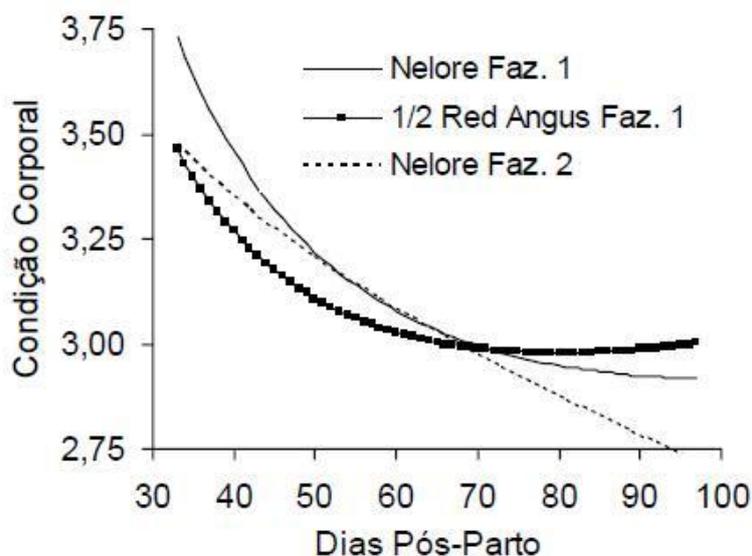


Figura 13. Condição corporal das vacas Nelore e 1/2 Nelore + 1/2 Red Angus na Faz. 1 e vacas Nelore na Faz. 2, de acordo com o número de dias pós-parto (Meneghetti and Vasconcelos, 2008).

Resumidamente, vacas primíparas com maior escore de condição corporal no início do protocolo de sincronização tiveram maior concepção à IATF. Em contrapartida, as vacas com maior dias pós-parto apresentaram menor escore de condição corporal, sugerindo que as propriedades devem ajustar o momento da ocorrência dos partos das novilhas, visando minimizar as perdas de peso e condição corporal das fêmeas primíparas para o início de estação de monta.

IATF em primíparas

Os programas de IATF têm sido aplicados com sucesso em fêmeas bovinas. Tais programas proporcionam uma abordagem organizada para melhorar o uso da inseminação artificial e para melhorar a eficiência reprodutiva em bovinos (Bó et al., 2007; Sá Filho et al., 2012). Vários fatores têm sido associados ao sucesso de tais programas reprodutivos em fêmeas *Bos indicus* (Sá Filho et al., 2010b; Sá Filho et al., 2011b; Sá Filho et al., 2009b). Dentre esses a condição corporal ao parto e no início do tratamento, bem como a categoria animal (novilhas, primíparas ou pluríparas) merecem destaque. Estudos demonstram que a condição corporal ao parto apresenta influência na probabilidade das vacas zebuínas se tornarem prenhes após a IATF (Figura 14)(Ayres, 2008). Da mesma forma, a menor condição corporal no início do protocolo de sincronização tem sido associada com menores índices reprodutivos em vacas *Bos indicus* (Bó et al., 2007; Meneghetti et al., 2009; Sá Filho et al., 2009b). Fêmeas com menor condição corporal no início do protocolo de sincronização apresentam menor taxa de prenhez à IATF, menor taxa de prenhez na metade e ao final da estação de monta (Sá Filho et al., 2012). Dessa forma, a redução das perdas de peso no início da

lactação e o melhor suporte nutricional durante os períodos pré e pós-parto com o objetivo de melhorar o ECC ao parto e durante o início da estação reprodutiva devem ser metas importantes a serem buscadas com o objetivo de melhorar os índices reprodutivos nos programas de IATF.

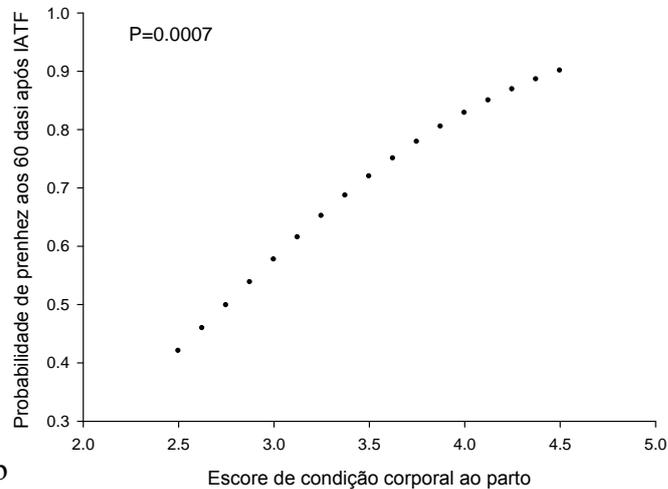


Figura 14. Probabilidade de prenhez aos 60 dias após IATF em função do escore de condição corporal ao momento do parto (Ayres, 2008).

A ordem do parto das vacas (primíparas vs. pluríparas) pode influenciar o risco de concepção 30 dias após a IATF. Normalmente, as vacas primíparas mantidas em sistema de pastejo apresentam longos períodos de anestro pós-parto (Wiltbank, 1970) e menor taxa de prenhez tanto após a IATF (Sá Filho et al., 2012; Sá Filho et al., 2009b) quanto ao término da estação reprodutiva em comparação com vacas pluríparas (Sá Filho et al., 2012). No entanto, essa resposta não tem sido consistente em vacas Nelore (Meneghetti et al., 2009). Meneghetti et al. (2009) não relataram diferenças na fertilidade de vacas primíparas e pluríparas da raça Nelore. Além disso em rebanhos de leite, onde o suporte nutricional é adequado, fêmeas primíparas são associadas a maior risco de se tornarem gestantes à primeira inseminação e ao final da lactação quando comparada a fêmeas pluríparas (Santos et al., 2009).

Um aspecto importante dos protocolos de sincronização da ovulação associadas ao sucesso dos protocolos de fêmea primíparas é a utilização do tratamento com eCG concomitante a retirada da fonte de progesterona (momento da indução da luteólise; Sales et al., 2012). O tratamento com eCG fornece o suporte de gonadotrofina para o desenvolvimento folicular final e esse efeito positivo é especialmente benéfico a vacas com baixo escore de condição corporal (Souza et al., 2009), em anestro (Baruselli et al., 2004b; Sá Filho et al., 2010a; Sales et al., 2011) ou vacas primíparas (Sales et al., 2012; Small et al., 2009).

Além disso, como discutido anteriormente, o período pós-parto no qual as fêmeas são submetidas ao protocolo de sincronização da ovulação pode influenciar os resultados da IATF em primíparas. De maneira geral, recomenda-se que os protocolos de sincronização para IATF sejam iniciados quando as fêmeas apresentavam entre 30 e 60 dias pós-parto. Normalmente, o pico da produção de leite para vacas de corte *Bos taurus* ou *Bos indicus* é alcançado entre 8,8 a 11,1 semanas de lactação (Jenkins and Ferrell, 1992; Oliveira et al., 2007), e vacas primíparas tendem a atingir o pico mais

tarde do que vacas multíparas. É possível que, iniciando os programas de sincronização para IATF antes dos períodos de maior exigência nutricional pode beneficiar a fertilidade. Isso pode ser particularmente importante em vacas primíparas em condições de pastejo, não só porque elas têm que manter a produção de leite para o aleitamento, mas também por apresentarem maiores necessidades nutricionais para suporte de seu crescimento.

Por fim, quando analisamos o efeito do escore de condição corporal sobre as taxas de concepção à IATF de vacas primíparas (Figura 15; Giroto et al., dados ainda não publicados), se observar um efeito positivo do escore de condição corporal sobre a prenhez à IATF, semelhante a pluríparas. Entretanto, a taxa de prenhez à IATF apresenta acentuado incremento quando as vacas primíparas apresentam escore de condição corporal ≥ 3 . Para visualizar tal efeito em resultados de programas de IATF de diferentes fazendas ($n=24.328$ IATF) do Mato Grosso, observasse que existe um ponto de equilíbrio, no qual a taxa de prenhez à IATF de primíparas é no mínimo semelhante àqueles obtidos em fêmeas pluríparas (Figura 16).

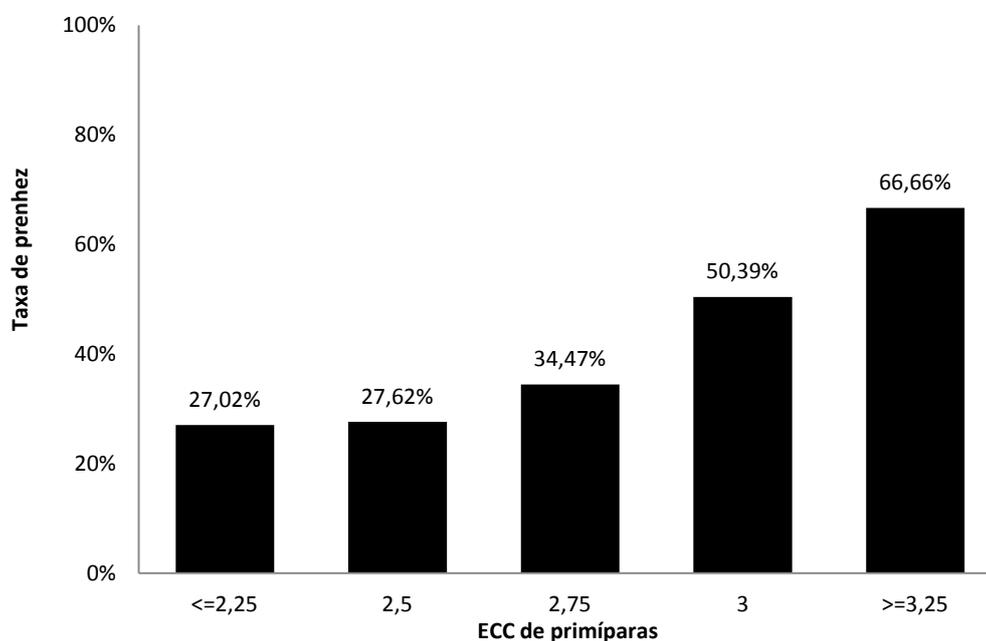


Figura 15. Taxa de prenhez de vacas nelore primíparas submetidas a protocolo de IATF de acordo com o ECC. Fazenda Sto. Antônio, Araguaiana/MT, 2012 (Giroto et al., dados ainda não publicados).

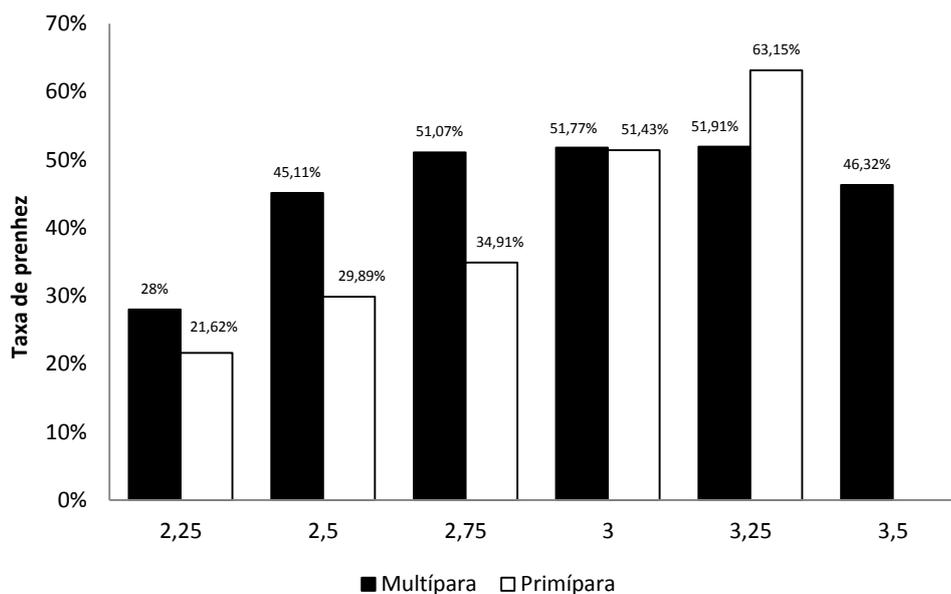


Figura 16. Taxa de prenhez de vacas submetidas à IATF de acordo com ECC. RG Genética Avançada 2011/2012 (24.328 inseminações) (Giroto et al., dados ainda não publicados).

Portanto, acreditasse que utilizando o intervalo de início do parto ao início do protocolo IATF combinado com o suporte gonadotrófico para o crescimento final do folículo (tratamento com eCG), em fêmeas primíparas com escore de condição corporal ≥ 3 , é possível ter resultados satisfatórios na IATF de vacas primíparas, e assim, reduzir as disparidade na taxa de concepção à IATF em relação as fêmeas pluríparas.

Considerações finais

Ao discutir sobre programas reprodutivos de novilhas e vacas primíparas é inevitável tentar imaginar qual seria o protocolo ideal para tais categorias. Diante do que foi apresentado no presente artigo fica claro que existem diversos ajustes no manejo reprodutivo e nutricional dessas fêmeas. Em termos gerais, as informações disponíveis até o presente momento, demonstram a necessidade de uma visão mais ampla do que acontece antes da aplicação dos protocolos de sincronização da ovulação. Dessa forma, acredita-se que a dependência do uso exclusivo de pastagens aumenta os riscos de falha no programa reprodutivo. Para o sucesso do manejo reprodutivo das categorias em questão, é necessária total integração entre o manejo nutricional (forragem e suplemento) e o preparo do animal (idade e peso específicos). Essa integração possibilita que sejam alcançadas a puberdade em novilhas e satisfatória taxa de reconcepção pós-parto em vacas primíparas. Somente com a integração multidisciplinar dos aspectos nutricionais, sanitários, reprodutivos e econômicos vão determinar o sucesso dos programas reprodutivos nessas categorias.

Conclusão

Estratégias nutricionais e hormonais são capazes de aumentar a proporção de novilhas ciclando e sexualmente maduras antes do início da estação reprodutiva. Tais ferramentas de manejo devem ser interpretadas como essenciais durante o planejamento reprodutivo de fazendas de gado de corte. A maior proporção de novilhas ciclando no início da estação de monta aumenta a eficiência reprodutiva e permite concentrar os partos e programar os nascimentos para as épocas mais adequadas do ano. Além disso, adoção de manejo nutricional estratégico em vacas primíparas reduz perdas de peso e de condição corporal durante os períodos pré e pós-parto, aumentando a eficiência reprodutiva dessa categoria e melhorando a respostas de tais fêmeas aos programas reprodutivos como os de IATF.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, G. P., R. L. Matteri, and O. J. Ginther. 1992. Effect of progesterone on ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle-stimulating hormone in heifers. *Journal of Reproduction and Fertility* 96: 627-640.
- Anderson, L. H., C. M. McDowell, and M. L. Day. 1996. Progestin-induced puberty and secretion of luteinizing hormone in heifers. *Biology of Reproduction* 54: 1025-1031.
- Araújo Marques, J. et al. 2005. Efeitos da suplementação alimentar de bezerros mestiços sobre o peso à desmama e taxa de prenhez de vacas multíparas Nelore. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 13: 92-96.
- Ayres, H. 2008. Validação do escore de condição corporal e seu impacto na eficiência reprodutiva de vacas Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo., Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Bagley, C. P. 1993. Nutritional management of replacement beef heifers: a review. *J. Anim. Sci.* 71: 3155-3163.
- Barreiros, T. R. R., M. M. Seneda, E. L. Reis, P. S. Baruselli, and C. M. Barros. 2003. Efeito do desmame temporário na sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. *Acta Sci. Vet.* 31: 238-239.
- Baruselli, P. S., E. L. Reis, N. A. T. Carvalho, and J. B. P. Carvalho. 2004a. 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, Porto Seguro*
- Baruselli, P. S., E. L. Reis, M. O. Marques, L. F. Nasser, and G. A. Bó. 2004b. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 479-486.

- Bertipaglia, L. M. A. 2008. Suplementação protéica associada a monensina sódica e *Saccharomyces cerevisiae* na dieta de novilhas mantidas em pastagens de capim marandú. , UNESP, Jaboticabal.
- Bó, G. A. et al. 2007. Technologies for fixed-time artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64: 223-236.
- Bocchi, A. L., R. A. Teixeira, and L. G. Albuquerque. 2004. Idade da vaca e mês de nascimento sobre o peso ao desmame de bezerros nelore nas diferentes regiões brasileiras. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 475-482.
- Burke, C. R., K. L. Macmillan, and M. P. Boland. 1996. Oestradiol potentiates a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomised cows. *Anim. Reprod. Sci.* 45: 13-28.
- Byerley, D. J., R. B. Staigmiller, J. G. Berardinelli, and R. E. Short. 1987. Pregnancy Rates of Beef Heifers Bred Either on Puberal or Third Estrus. *J. Anim. Sci.* 65: 645-650.
- Cardoso, D., and G. P. Nogueira. 2007. Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Universidade Paranaense* 10: 59-67.
- Carvalho, J. B. P. et al. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus*×*Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* 69: 167-175.
- Casagrande, D. R. 2010. Suplementação de novilhas de corte em pastagem de capim-Marandu submetidos à intensidades de pastejo sob lotação contínua., Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Claro-Júnior, I. et al. 2010. Reproductive performance of prepubertal *Bos indicus* heifers after progesterone-based treatments. *Theriogenology* 74: 903-911.
- Corah, L. R., T. G. Dunn, and C. C. Kaltenbach. 1975. Influence of prepartum nutrition on the reproductive performance of beef females and the performance of their progeny. *J. Anim. Sci.* 41: 819-824.
- Correia, P. S. 2006. Estratégia de suplementação de bovinos de corte em pastagens durante o período das águas, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Cutaia, L. et al. 2001. Efecto de los tratamientos con dispositivos DIV-B nuevos o reutilizados en los índices de preñez en vacas y vaquillonas inseminadas a tiempo fijo (IATF). In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, Córdoba-AR. p 244.
- Desjardins, C., and H. D. Hafs. 1969. Maturation of bovine female genitalia from birth through puberty. *J. Anim. Sci.* 28: 502-507.
- Detmann, E., M. F. Paulino, and S. C. Valadares Filho. 2010. Otimização do uso de recursos forrageiros basais. In: Simposio de produção de gado de corte, Viçosa, MG. p 191-240.

- Dias, C. C., F. S. Wechsler, M. L. Day, and J. L. M. Vasconcelos. 2009. Progesterone concentrations, exogenous equine chorionic gonadotropin, and timing of prostaglandin F2 α treatment affect fertility in postpuberal Nelore heifers. *Theriogenology* 72: 378-385.
- Eler, J. P. et al. 2002. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nelore heifers. *J. Anim. Sci.* 80: 951-954.
- Fike, K. E. et al. 2004. Regulation of frequency of luteinizing hormone pulses by magnitude of acute change in circulating concentration of progesterone of female cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 84: 279-291.
- Gasser, C. L., E. J. Behlke, D. E. Grum, and M. L. Day. 2006a. Effect of timing of feeding a high-concentrate diet on growth and attainment of puberty in early-weaned heifers. *J. Anim. Sci.* 84: 3118-3122.
- Gasser, C. L. et al. 2006b. Induction of precocious puberty in heifers II: Advanced ovarian follicular development. *J. Anim. Sci.* 84: 2042-2049.
- Grings, E. E. et al. 1998. Effect of nutritional management, trace mineral supplementation, and norgestomet implant on attainment of puberty in beef heifers. *J. Anim. Sci.* 76: 2177-2181.
- Honaramooz, A. et al. 2004. Ultrasonographic evaluation of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 80: 15-29.
- Jenkins, T. G., and C. L. Ferrell. 1992. Lactation characteristics of nine breeds of cattle fed various quantities of dietary energy. *J. Anim. Sci.* 70: 1652-1660.
- Meneghetti, M., O. G. S. Filho, R. F. G. Peres, G. C. Lamb, and J. L. M. Vasconcelos. 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. *Theriogenology* 72: 179-189.
- Meneghetti, M., and J. L. M. Vasconcelos. 2008. Mês de parição, condição corporal e resposta ao protocolo de inseminação artificial em tempo fixo em vacas de corte primíparas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 60: 786-793.
- Nogueira, E. et al. 2006. Efeito do creep feeding sobre o desempenho de bezerros e a eficiência reprodutiva de primíparas Nelore, em pastejo. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58: 607-613.
- Nogueira, G. P. 2004. Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 361-372.
- Oliveira, V. C. d. et al. 2007. Produção de leite e desempenho dos bezerros de vacas Nelore e mestiças. *Revista Brasileira de Zootecnia* 36: 2074-2081.
- Patterson, D. J. et al. 1992. Management considerations in heifer development and puberty. *J. Anim. Sci.* 70: 4018-4035.

- Penteado, L., H. Ayres, E. H. Madureira, E. L. Reis, and P. S. Baruselli. 2004. Efeito do eCG e do desmame temporário na taxa de prenhez de vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo. *Acta Scientiae Veterinariae* 32: 223.
- Peres, R. F. G., I. C. Júnior, O. G. S. Filho, G. P. Nogueira, and J. L. M. Vasconcelos. 2009. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology* 72: 681-689.
- Ramalho, T. R. A. 2006. Suplementação proteica ou energética para bovinos recriados em pastagens tropicais, Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- Rathbone, M. J. et al. 2001. 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* 50: 277-320.
- Reis, R. A., L. M. A. Bertiplaglia, G. M. P. Melo, D. Freitas, and M. Balsalobre. 2004. Suplementação protéico-energética e mineral em sistemas de produção de gado de corte nas águas e nas secas. In: *Simpósio sobre Pecuária de Corte Intensiva nos Trópicos*, FEALQ, Piracicaba. p 171-226.
- Reis, R. A., G. M. P. Melo, and L. M. A. Bertipaglia. 2005. Otimização da utilização da forragem disponível através da suplementação estratégica. In: *Volumosos na produção de ruminantes*, Jaboticabal, SP. p 25-60.
- Reis, R. A., B. R. Vieira, I. P. Carvalho, and D. R. Casagrande. 2009. Suplementação na estação chuvosa. In: *International Symposium of Beef Cattle*, Lavras-MG. p 209-242.
- Reis, T. A. N. P. S. et al. 2012. A indução da puberdade em novilhas Nelore aos 45 ou 90 dias antes da estação de monta aumenta as taxas de ciclicidade e de prenhez. In: *XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Foz do Iguaçu, PR. p 386.
- Rocha, M. G., and J. F. P. Lobato. 2002. Avaliação do desempenho reprodutivo de novilhas de corte primíparas aos dois anos de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia* 31: 1388-1395.
- Romano, M. A., V. H. Barnabe, J. P. Kastelic, C. A. de Oliveira, and R. M. Romano. 2007. Follicular dynamics in heifers during pre-pubertal and pubertal period kept under two levels of dietary energy intake. *Reprod. Domest. Anim.* 42: 616-622.
- Sá Filho, M. F. et al. 2010a. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology* 73: 651-658.
- Sá Filho, M. F. et al. 2006. Efeito da indução de ciclicidade com dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção a inseminação artificial em tempo fixo em novilhas Nelore. In: *XX Reunião da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*, Araxá-MG. p 403.

- Sá Filho, M. F. et al. 2011a. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 129: 132-139.
- Sá Filho, M. F., A. M. Crespilho, J. E. P. Santos, G. A. Perry, and P. S. Baruselli. 2010b. 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.* 120: 23-30.
- Sá Filho, M. F. et al. 2012. Timed artificial insemination earlier during the breeding season improves the reproductive performance of suckled beef cows. *Theriogenology* submitted.
- Sá Filho, M. F., R. Prestes, A. G. Medalha, H. Ayres, and P. S. Baruselli. 2009a. Diferentes estímulos ovulatórios na indução de ciclicidade de novilhas *Bos indicus*. In: XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, MG. p 362-362.
- Sá Filho, M. F., J. E. P. Santos, R. M. Ferreira, J. N. S. Sales, and P. S. Baruselli. 2011b. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology* 76: 455-463.
- Sá Filho, M. F. et al. 2010c. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Anim. Reprod. Sci.* 118: 182-187.
- Sá Filho, O. G., M. Meneghetti, R. F. Peres, G. C. Lamb, and J. L. Vasconcelos. 2009b. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology* 72: 210-218.
- Sá Filho, O. G., M. Meneghetti, R. F. G. Peres, G. C. Lamb, and J. L. M. Vasconcelos. 2009c. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology* 72: 210-218.
- Sá Filho, O. G., E. R. Vilela, T. W. Geary, and J. L. Vasconcelos. 2009d. Strategies to improve fertility in postpartum multiparous *Bos indicus* cows submitted to a fixed-time insemination protocol with gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F2alpha. *J. Anim. Sci.* 87: 2806-2814.
- Sales, J. N., R. W. Giroto, T. M. França, and P. S. Baruselli. 2012. Efeito do FSH e da eCG no crescimento folicular e taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* primíparas e pluríparas submetidas à IATF. In: XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, PR. p 363.
- Sales, J. N. S. et al. 2009. Evaluation of different protocols to induce cyclicity in prepubertal beef heifers. In: II International Symposium on Animal Biology of Reproduction, São Paulo SP

- Sales, J. N. S., G. A. Crepaldi, R. W. Giroto, A. H. Souza, and P. S. Baruselli. 2011. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Anim. Reprod. Sci.* 124: 12-18.
- Santos, D. T. et al. 2005. Suplementos energéticos para recria de novilhas de corte em pastagens anuais: Desempenho animal. *R. Bras. Zootec.*, 34: 209-219.
- Santos, J. E. P., R. L. A. Cerri, and R. Sartori. 2008. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology* 69: 88-97.
- Santos, J. E. P., H. M. Rutigliano, and M. F. Sá Filho. 2009. Risk factors for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 110: 207-221.
- Santos, J. E. P., and M. F. Sá Filho. 2006. Nutrição e reprodução em bovinos. In: 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina. p 30-54.
- Sartori, R., and C. M. Barros. 2011. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 124: 244-250.
- Selk, G. E. et al. 1988. Relationships among Weight Change, Body Condition and Reproductive Performance of Range Beef Cows. *J. Anim. Sci.* 66: 3153-3159.
- Small, J. A., M. G. Colazo, J. P. Kastelic, and R. J. Mapletoft. 2009. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. *Theriogenology* 71: 698-706.
- Souza, A. H. et al. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 72: 10-21.
- Souza, E. M., J. C. Milagres, M. A. Silva, R. A. J., and C. A. G. C.;. 1995. Influências genéticas e de meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir leiteiro. *Revista Sociedade Brasileira Zootecnia* 24: 926-935.
- Thiago, L. R. L. S., and J. M. Silva. 2001. Suplementação de bovinos em pastejo, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande.
- Torres, L. F. T. 1996. Inseminação artificial em rebanhos comerciais de gado de corte. In: A. M. Peixoto, Moura; and F. V.P.; (eds.) 4º Simpósio Sobre Pecuária de Corte: Produção do Novilho de Corte. . p 129-159, FEALQ, Piracicaba, SP.
- Vieira, A., J. F. P. Lobato, E. S. Corrêa, R. A. A. Torres Júnior, and F. P. Costa. 2006. Desenvolvimento e desempenho reprodutivo de novilhas Nelore criadas a pasto nos cerrados do Centro-Oeste brasileiro. *R. Bras. Zootec.* 35: 186-192.
- Vieira, B. R. 2011. Manejo do pastejo e suplementação nas águas e seus efeitos em sistemas de terminação de novilhas na seca., Universidade Estadual Paulista (UNESP), Jaboticabal.
- Wheaton, J. E., and G. C. Lamb. 2007. Induction of cyclicity in postpartum anestrus beef cows using progesterone, GnRH and estradiol cypionate (ECP). *Anim. Reprod. Sci.* 102: 208-216.

- Williams, G. L., F. Talavera, B. J. Petersen, J. D. Kirsch, and J. E. Tilton. 1983. Coincident secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone in early postpartum beef cows: effects of suckling and low-level increases of systemic progesterone. *Biology of Reproduction* 29: 362-373.
- Williams, S. W., R. L. Stanko, M. Amstalden, and G. L. Williams. 2002. Comparison of three approaches for synchronization of ovulation for timed artificial insemination in *Bos indicus*-influenced cattle managed on the Texas gulf coast. *J. Anim. Sci.* 80: 1173-1178.
- Wiltbank, J. N. 1970. Research needs in beef cattle reproduction. *J. Anim. Sci.* 31: 755-762.
- Wiltbank, M. C., A. Gümen, and R. Sartori. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57: 21-52.
- Yavas, Y., and J. S. Walton. 2000. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. *Theriogenology* 54: 25-55.

Ressincronização em bovinos de corte

Márcio O. Marques¹, Mario Ribeiro Júnior¹, Rubens C. Pinto Silva¹, Manoel F. Sá Filho², Lais M. Vieira², Pietro S. Baruselli²

¹Geraembryo, Cornélio Procópio, PR, Brasil; ²VRA, FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brasil.

Introdução

O Brasil atualmente ocupa a segunda posição no ranking mundial de produção de carne bovina. Nos últimos 20 anos, o país aumentou 65% sua produção, comparado com o crescimento de 14,4% nos EUA, que é o atual maior produtor mundial (USDA, 2012). Esse aumento na produtividade brasileira está diretamente relacionado aos avanços tecnológicos nas áreas de manejo nutricional, sanitário, reprodutivo, bem-estar animal e no melhoramento genético. Dentre as pesquisas na área de reprodução animal, têm sido desenvolvidas diferentes estratégias de manejo reprodutivo: estação de monta apenas com monta natural (MN), inseminação artificial convencional com observação de estro (IA), inseminação em tempo fixo (IATF) e ressincronização. Estas ferramentas de manejo foram, e estão sendo, incorporadas na rotina das fazendas comerciais visando melhorar da eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos bovinos de corte.

Assim como a produção de carne, o emprego da IA no Brasil tem apresentado crescimento significantivo nos último anos. O país apresentou um salto no percentual do rebanho inseminado, passando de cerca de 5% em 2002 para quase 10% no ano de 2011 (Baruselli et al., 2012). A intensificação do uso da IA tem possibilitado grande avanço no melhoramento genético, pelo incremento do número de bezerros nascidos de touros geneticamente superiores. A crescente utilização da IA está associada ao maior emprego da IATF no rebanho bovino, ultrapassando 50% do total das IA em 2011 (Baruselli et al., 2012). Os principais entraves que reduzem a eficiência reprodutiva de rebanhos de corte inseminados no Brasil estão associados principalmente ao anestro pós-parto e à falha na detecção de cio. Tais fatores são agravados quando consideramos as condições climáticas, o sistema de criação a pasto, as particularidades da espécie *Bos indicus* (estro de menor duração e predominantemente noturno) e as dificuldades com a mão de obra qualificada no campo. Esses desafios têm sido contornados com relativo sucesso pela utilização de protocolos de sincronização da ovulação para IATF.

Apesar de todas as vantagens relacionadas ao uso de programas de IATF no início da estação de reprodutiva, a utilização de touros de repasse após a IATF pode não contemplar todos os objetivos específicos de cada fazenda. Um dos entraves da utilização desse tipo de manejo reprodutivo (IATF seguido de MN) é a necessidade de maior número de touros para a realização do primeiro repasse (Marques et al., 2007 – dados de campo; Penteado et al., 2007 – dados de campo), visto que as fêmeas voltam em estro de maneira bastante sincrônica. Portanto, apesar do investimento para a realização da IATF e a obtenção de 50% das vacas gestantes, a técnica não permite redução da quantidade de touros nas fazendas. Outro ponto importante, é que dependendo do objetivo da fazenda, 50% de bezerros oriundos de IA pode não atender a demanda comercial do sistema produtivo.

Dessa forma, pesquisadores têm avaliado o estabelecimento de programas de ressincronização das fêmeas não gestantes após a primeira IATF. Esse tipo de manejo

elimina a necessidade de observação de cio, reduz o número de touros necessários para o repasse, e principalmente, aumenta o número de produtos oriundos de IA que podem determinar um maior valor agregado ao produtor.

Existem dois momentos que podem ser utilizados para o início dos protocolos de ressincronização: 1) Antes do diagnóstico de gestação, entre o 19^o e o 23^o dia após a primeira IATF (Chebel et al., 2004; El-Zarkouny and Stevenson, 2004; Galvão et al., 2007; Meyer et al., 2007; Stevenson et al., 2003) e 2) No momento do diagnóstico de gestação, ao redor de 28 a 32 dias após a primeira IATF (Bartolome et al., 2005; Giordano et al., 2012). O início da ressincronização antes do diagnóstico de gestação aumenta as chances do animal se tornar gestante nos primeiros 40 dias da EM, no entanto, há um gasto adicional com tratamentos de sincronização (implante de progesterona/progestágeno associado à administração de estrógeno), já que há necessidade de implantarmos as fêmeas gestantes e não gestantes. A realização da ressincronização no momento do diagnóstico é atualmente a maneira mais utilizada, pois além de reduzir o intervalo entre as inseminações (atrasando apenas 8 dias em relação a opção 1; Figura 1), apenas os animais não gestantes à primeira IATF receberão o tratamento de ressincronização.

Portanto, o presente artigo tem como objetivo avaliar a eficiência reprodutiva de protocolos de ressincronização para IATF em fêmeas de corte. Serão abordadas as técnicas de ressincronização iniciadas com e sem diagnóstico de gestação prévio, além da possibilidade da realização de duas ou três sincronizações consecutivas, e seu impacto na eficiência reprodutiva de vacas de corte. Por fim, serão apresentadas informações sobre mortalidade embrionária/fetal após programas de sincronização e ressincronização em vacas zebuínas de corte.

Ressincronização

A ressincronização se refere à sincronização do estro e/ou da ovulação de uma fêmea que foi previamente inseminada após a observação de cio ou após IATF. Essa estratégia é uma ferramenta já conhecida em fazendas de leite em todo o mundo, e recentemente tem ganhado atenção especial por diversos grupos de pesquisa que trabalham com fêmeas de corte. O objetivo da técnica é aumentar o número de bezerros nascidos de IA, eliminar a necessidade de observação de cio, diminuir o número de touros para repasse e por fim, otimizar a eficiência reprodutiva dos rebanhos, reduzindo o intervalo entre partos.

O início da ressincronização em fêmeas de corte no Brasil tem sido realizada em dois momentos distintos: 1. Início da ressincronização em todas as fêmeas 22 dias após a primeira IATF, antes do diagnóstico de gestação; e 2. Início da ressincronização no dia do diagnóstico de gestação (28 a 32 dias após a primeira IATF; Figura 1).

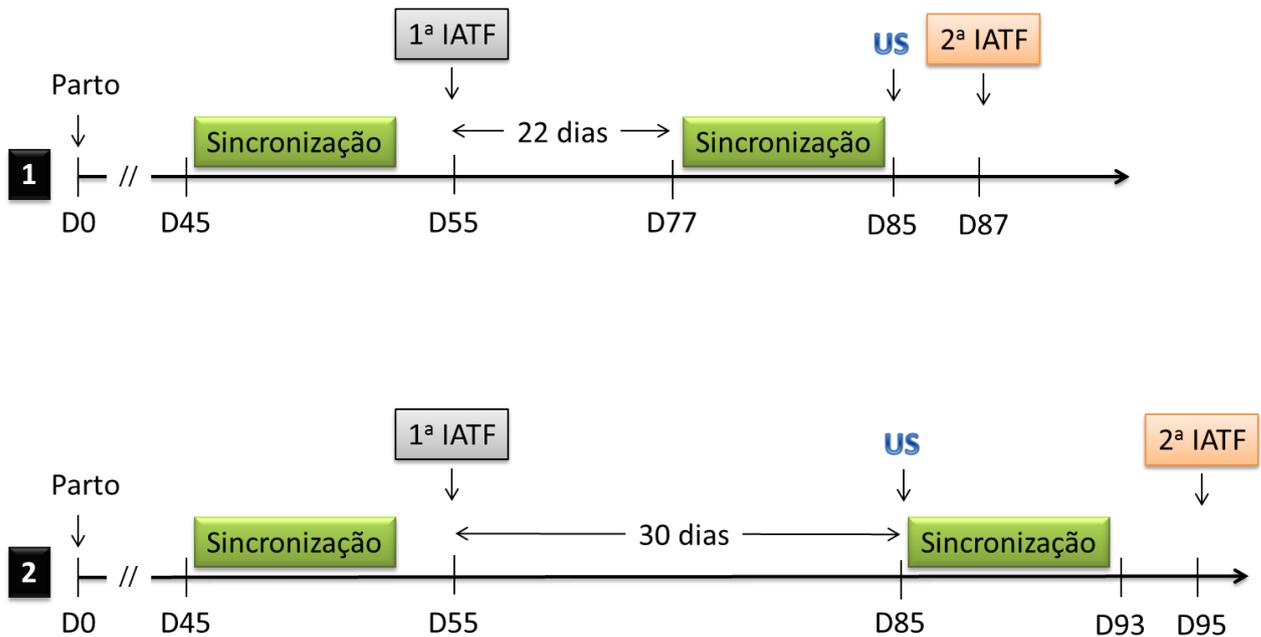


Figura 1. Desenho esquemático dos manejos para a ressincronização de fêmeas de corte para IATF: 1. Início da ressincronização, em todos os animais submetidos à primeira IATF, 22 dias após a IATF; e 2. Início da ressincronização no dia do diagnóstico de gestação (28 a 32 dias após a primeira IATF), apenas nos animais não gestantes. Sincronização - protocolo de sincronização da ovulação; IATF – inseminação artificial em tempo fixo; US – diagnóstico de gestação por ultrassonografia.

A escolha do momento para início do protocolo de ressincronização é dependente do objetivo do proprietário, do manejo de pastos e lotes na fazenda, dos custos envolvidos e da mão-de-obra (disponibilidade do veterinário para realização da ultrassonografia e do pessoal da fazenda). A ressincronização iniciada 22 dias após a IATF prévia proporciona antecipação em oito dias na realização da 2ª IATF do lote, sendo interessante em lotes que poderiam ficar sem ser ressincronizados no fim da estação reprodutiva e proporcionando maior chance dos animais se tornarem gestantes. Essa possibilidade também pode ser de grande interesse para fazendas que precificam os bezerros por quilo vivo ou que tenham data fixa para comercialização dos animais oriundos da ressincronização. Por outro lado, o início do protocolo antes do diagnóstico de gestação obriga a sincronização de 100% dos animais (gestantes e não gestantes) previamente inseminados em tempo fixo. Ainda, com esse tipo de manejo, a realização da ultrassonografia, juntamente com a retirada de implantes passa a ser numa data fixa e não flexível, exigindo maior organização e disponibilidade do médico veterinário. Já nos programas de ressincronização que têm início no momento do diagnóstico de gestação, esses apresentam maior flexibilidade, podendo variar do dia 28 a 32 após a primeira IATF, de acordo com a rotina e disponibilidade do veterinário e do pessoal na propriedade. Além disso, o tratamento somente é realizado nas fêmeas não gestantes, o que reduz os custos com tratamento.

Com relação aos produtos utilizados para a sincronização das fêmeas, o protocolo de ressincronização é semelhante ao utilizado para a realização da primeira IATF. Já naquelas fêmeas submetidas ao diagnóstico de gestação, verificou-se que a aplicação do GnRH em vacas de leite no 21º dia de gestação não apresentou efeitos negativos na gestação, portanto, não interferiu na taxa de prenhez desses animais (Chebel et al., 2003). No entanto, os protocolos comumente utilizados em gado de corte na América do Sul são a base de progesterona e estradiol. Dentre as

funções do estradiol, um efeito questionável é do possível efeito luteolítico desse hormônio (Araujo et al., 2009), podendo afetar a gestação de animais tratados; situação observada quando a ressincronização é realizada antes do diagnóstico de gestação. Porém, assim como o estudo com GnRH, estudos realizados com fêmeas *Bos taurus* concluíram que o tratamento com BE em programas de ressincronização não interferem no estabelecimento da gestação referente à IA prévia (El-Zarkouny and Stevenson, 2004; Stevenson et al., 2003).

Entretanto, é importante ressaltar que existem diferenças com relação ao comportamento e respostas aos tratamentos hormonais empregados entre *Bos taurus* e *Bos indicus* (Baruselli et al., 2011; Bó et al., 2003; Carvalho et al., 2008). Portanto, visto que, não é possível transpor a resposta observada em *Bos Taurus* para fêmeas *Bos indicus*, avaliou-se a taxa de prenhez de fêmeas zebuínas ressincronizadas com BE ou GnRH no 22º dia pós IATF prévia (Sá Filho et al., 2011). Diferentemente dos experimentos com *Bos taurus*, observou-se maior taxa de prenhez em fêmeas (*Bos indicus*) ressincronizadas com BE [49,2% (140)], quando comparadas com as fêmeas ressincronizadas com GnRH [37,2% (137); (Sá Filho et al., 2011)]. No entanto, estes dados ainda são iniciais e mais estudos estão sendo realizados para confirmar tais informações.

Devido aos inúmeros benefícios adquiridos pelo uso da ressincronização, profissionais que trabalham a campo têm despertado interesse por esta estratégia. Os primeiros resultados controlados em nosso grupo de trabalho surgiram na estação de monta de 2009-2010, nos quais foram observados 56,1 % de taxa de prenhez referente à primeira IATF e 49,3% referente à segunda IATF, totalizando 77,8% com ambas IATF. Tais taxas são alteradas conforme a categoria das fêmeas tratadas, sendo possível observar uma queda na taxa de prenhez à ressincronização de vacas primíparas/secundíparas (53,1% e 34,9%; 1ª IATF e ressincronização, respectivamente). Esse efeito não é claro em vacas pluríparas (56,3% e 52,7%) e novilhas (58,4% e 52,6%; Figura 2). Portanto, os dados de campo indicam que quando a ressincronização é utilizada de maneira adequada e em condições propícias (nutrição, sanidade e manejo adequados), é possível obter aproximadamente 75% de taxa de prenhez nos primeiros 40 dias de EM (incluindo todas as categorias animais), mantendo o intervalo entre partos no valor médio de 11,6 meses.

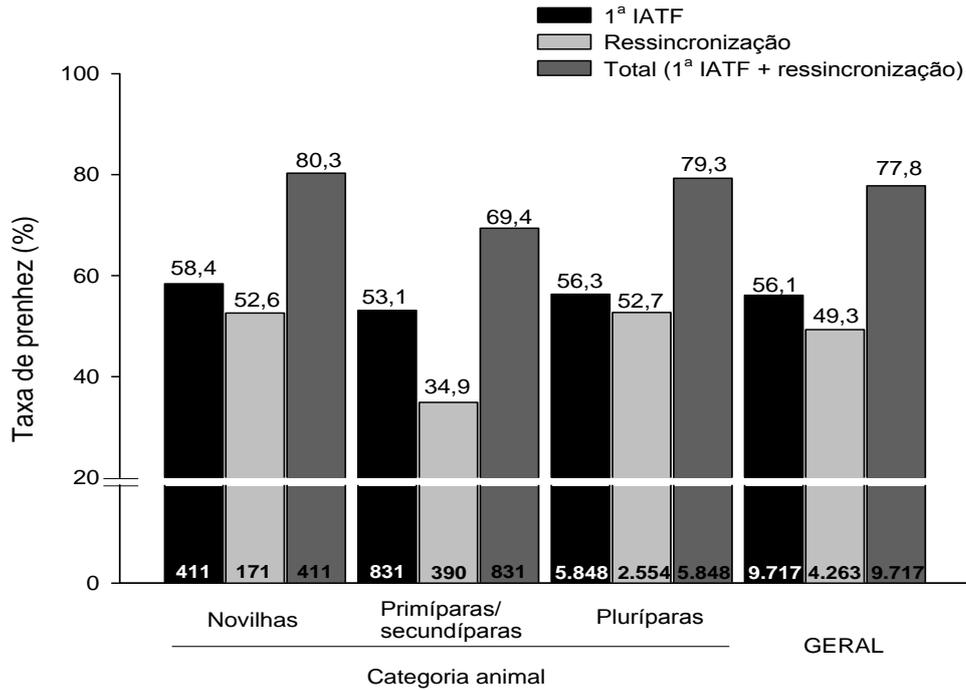


Figura 2. Taxa de prenhez à primeira IATF e à ressincronização para segunda IATF em vacas de corte (*Bos indicus*) de diferentes categorias animais (novilhas, primíparas/secundíparas e pluríparas). Dados de 9.717 sincronizações para IATF durante as EM de 2009/2010 e 2011/2012.

Em estudo recente (Marques et al., 2012) com vacas Nelore primíparas, foram comparados três diferentes manejos: 1. MN + mamada controlada (D20 a D50 da EM); 2. IATF + MN; e 3. IATF + Ressincronização (30 dias após a primeira IATF). Observou-se que mesmo com a mamada controlada, a taxa de prenhez aos 42 dias da EM continua bastante superior ($P < 0,001$) para animais que receberam a IATF no início da EM (Figura 3). Ainda, os animais submetidos à IATF anteciparam o momento de concepção durante a EM ($11,9 \pm 2,9^a$ e $20,5 \pm 2,4^b$ dias; IATF + MN e IATF + Ressincronização, respectivamente), quando comparados aos submetidos ao manejo de MN + mamada controlada ($47,6 \pm 1,7^c$ dias; $P = 0,0001$). Entretanto, não houve diferença ($P = 0,21$) na taxa de prenhez ao final da EM entre os manejos. Portanto, conclui-se que apesar da mesma taxa de prenhez ao final da EM, a utilização de IATF nos programas reprodutivos de primíparas Nelore em condições severas, há uma antecipação do intervalo parto-concepção, o que adiantaria o momento do parto na estação subsequente e aumentaria a possibilidade destas fêmeas prenhes da IATF reconceberem.

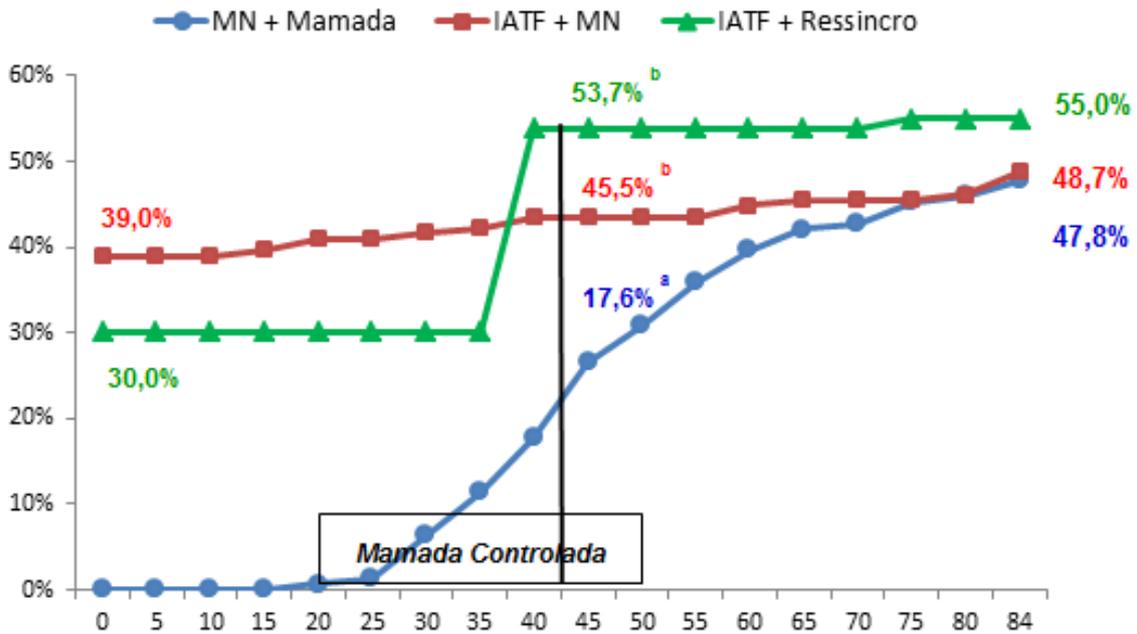


Figura 3. Taxa de prenhez acumulativa em primíparas de acordo com o manejo reprodutivo [MN + mamada controla (D20 a D50 da EM); IATF + MN e IATF + Ressincronização (30 dias após a primeira IATF)]. Letras minúsculas diferentes, diferem com $P < 0,05$.

Com base nas taxas de prenhez de primíparas e secundíparas submetidas à IATF seguida de ressincronização iniciada no diagnóstico de gestação (Figura 2), temos utilizado e recomendado este manejo reprodutivo. Dessa forma, é possível obter ao redor de 70% de taxa de prenhez final com 2 IATF's quando o manejo nutricional é mais adequad, quando comparado com as condições do experimento supracitado.

Diante dos resultados positivos do manejo reprodutivo com IATF associada à ressincronização, alguns veterinários de campo e nosso grupo começaram a intensificar a utilização desse tipo de manejo e ainda, quando possível, proceder a terceira IATF (segunda ressincronização). Resultados prévios de campo indicam que a associação da terceira IATF em vacas pluríparas pode ter efeito bastante positivo na eficiência reprodutiva de um rebanho durante a EM, obtendo aproximadamente 90% de taxa de prenhez em vacas pluríparas nos primeiros 80 dias da estação (Figura 4).

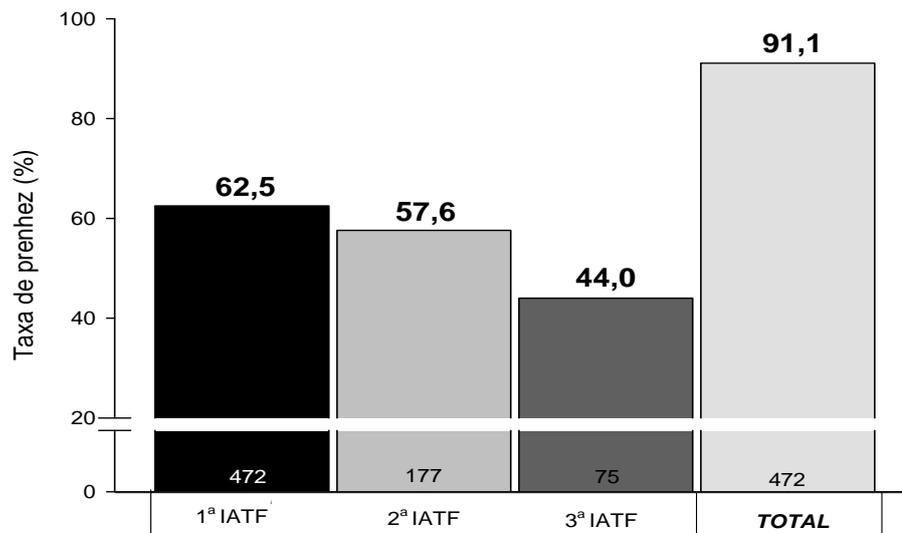


Figura 4. Taxa de prenhez em vacas pluríparas submetidas à primeira, segunda (primeira ressincronização) e terceira IATF (segunda ressincronização) durante os primeiros 80 dias da EM.

O intervalo entre o parto e o início do protocolo de sincronização e o intervalo entre as sincronizações são fatores determinantes para a eficiência dos programas de ressincronização em fêmeas de corte. Tal efeito pode ser exacerbado quando se trabalha com fêmeas submetidas a estações reprodutivas extremamente curtas ou naquelas fêmeas que pariram nos últimos meses da estação de nascimento. Dessa forma, para que a ressincronização dessas fêmeas não fique fora da EM, duas alternativas de manejo podem ser sugeridas: 1. diminuir o intervalo entre as IATF, realizando a ressincronização 22 dias pós a primeira IATF; ou 2. antecipar a primeira IATF pós-parto (início do protocolo de sincronização com menos de 30 dias pós-parto). Como exposto anteriormente é possível ressincronizar fêmeas 22 dias após a primeira IATF, sem a necessidade de diagnóstico de gestação prévio. Sobre a segunda possibilidade, nessa última EM avaliou-se a redução do intervalo entre o parto e a primeira IATF. Um total de 393 fêmeas que apresentaram partos contemporâneos foram sincronizadas em dois lotes diferentes. O primeiro lote (n=224 fêmeas) recebeu a primeira IATF entre 31 e 37 dias pós-parto, enquanto o segundo lote (n=169 fêmeas) recebeu a primeira IATF entre 42 e 49 dias pós-parto (Figura 5). Todas as vacas Nelore múltíparas tinham adequado escore corporal ($2,9 \pm 0,46$; escala de 1 a 5), receberam o mesmo protocolo de sincronização e foram inseminadas com sêmen de um único touro pelo mesmo inseminador. A redução do intervalo não influenciou ($P = 0,32$) a taxa de prenhez geral dos lotes (46,4 vs 51,5%, 31-37 e 42-49 dias pós-parto, respectivamente). No entanto, propomos que mais estudos científicos devam ser realizados para confirmar tal resultado, antes de estabelecermos o período pós-parto mínimo na IATF de zebuínos.

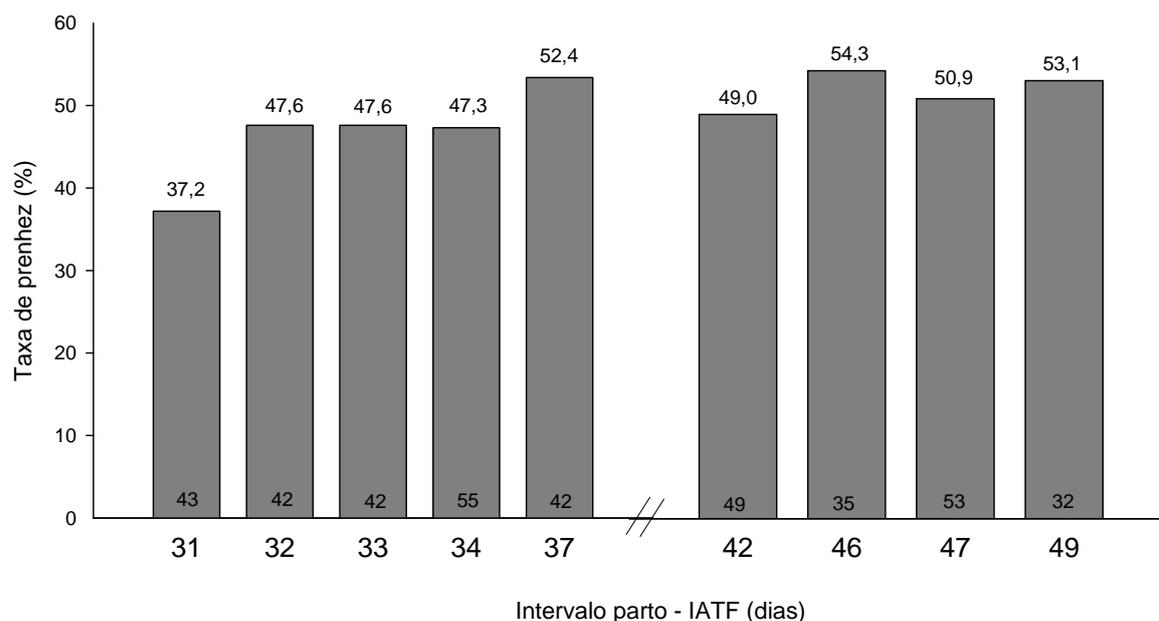


Figura 5. Taxa de prenhez de 393 fêmeas Nelore contemporâneas submetidas à primeira IATF com 31, 32, 33, 34 e 37 dias pós-parto (n=224; Lote1) ou 42, 46, 47 e 49 dias pós-parto (n=169; Lote 2).

Por fim, vale ressaltar que apesar dos inúmeros benefícios relacionados à utilização da ressincronização, existem algumas limitações. Para obtenção de resultados similares aos citados previamente, é muito importante que a fazenda tenha um sistema de controle do rebanho bastante estabelecido e rígido, desde a identificação dos animais até o controle do status reprodutivo, sanitário e nutricional do mesmo (Figura 6, A, B e C). Além disso, visto que esses animais serão manejados com mais frequência e que muitos serão fêmeas paridas com bezerro ao pé, o cuidado e atenção com esses manejos devem ser priorizados. Portanto, para facilitar e melhorar a conduta desse sistema, uma das possibilidades de apartar os bezerros de fêmeas gestantes, que não necessitam retornar ao curral, é com o auxílio de tatuagem dos referidos bezerros ou apartação na cerca entre os piquetes (Figura 6; B e D, respectivamente).



Figura 6. (A) Identificação das vacas sincronizadas; (B) Lista de tatuagem de bezerros e status reprodutivo da genitora; (C) Diagnóstico de gestação por ultrassonografia e consequente ressincronização de animais não gestantes; (D) Sistema de apartação de bezerros entre piquetes.

Mortalidade embrionária tardia e fetal em fêmeas submetidas a programas de IATF

Um dado zootécnico muito importante que deve ser analisado para avaliar a eficiência reprodutiva e econômica de rebanhos de corte é a taxa mortalidade embrionária tardia/fetal (TM). Conforme o *Committee on Bovine Reproductive Nomenclature* (1972), a gestação bovina é dividida em período embrionário – se inicia no momento da fertilização e estende-se até o estágio final de diferenciação embrionária, ao redor do 42º dia após a fecundação - e período fetal - inicia-se aproximadamente aos 42 dias de gestação e estende-se até o nascimento do bezerro. Sendo assim, os pesquisadores definiram os tipos de mortalidade de acordo com a fase da gestação em que a mortalidade ocorre: 1. Perda embrionária precoce - ocorre antes do período de reconhecimento materno; 2. Perda embrionária tardia – ocorre entre os dias 17 e 42 da gestação e; 3. Perda fetal ou aborto – ocorre após os 42 dias de gestação.

Com relação à mortalidade embrionária tardia/fetal, (Santos et al., 2004) relatou que 55,9% das perdas fetais foram causadas por agentes infecciosos e dentre as enfermidades infecciosas a Leptospirose, Rinotraquíte Infecciosa Bovina (IBR) e Diarréia Viral Bovina (BVD) são as mais associadas às desordens reprodutivas (Grooms, 2010a). Ainda, propriedades com fêmeas de corte sem programa de vacinação

contra doenças reprodutivas apresentaram TM superior, quando comparadas às propriedades com vacinação (Aono, 2011). Ou seja, provavelmente, grande parte da mortalidade embrionária/fetal esteja diretamente relacionada ao controle sanitário das propriedades.

Considerando-se a importância do controle da TM, dados de campo foram compilados para avaliar a TM entre o diagnóstico de gestação da segunda IATF (ressincronização) e o diagnóstico de gestação final da EM. Com total de 1.873 fêmeas submetidas a IATF e ressincronização, observou-se que 5,3% das fêmeas tiveram perda embrionária tardia ou fetal, valor semelhante as taxas de mortalidade observadas após a primeira IATF [3,8% - Sá Filho, M.F. (2009) – comunicação pessoal; 5,4% - Thales, R.R.B. (2009) – comunicação pessoal]. Dessa forma, conclui-se que para obtenção de resultados satisfatórios no desempenho reprodutivo a partir das biotécnicas de reprodução, é imprescindível o constante controle e acompanhamento dos demais manejos, principalmente nutricional e sanitário.

Conclusão

A utilização da ressincronização para IATF como ferramenta de manejo reprodutivo em gado corte (*Bos indicus*), aumenta a proporção de animais prenhes na primeira metade da EM, além de aumentar o número de bezerros oriundos de IA. Considerando o maior emprego da IATF por meio da ressincronização, esse tipo de manejo favorece o cruzamento industrial, a reposição de matrizes diferenciadas e pode reduzir a quantidade de touros de repasse. Assim, a ressincronização agrega os benefícios relacionados ao emprego da IA ao sistema de manejo, associada à melhoria de índices reprodutivos e zootécnicos na atividade de cria.

Referências

- Aono, F. H. S. 2011. Incidência de perdas gestacionais e efeito de vacinação contra doenças reprodutivas nas taxas de prenhez em vacas de corte submetidas à inseminação em tempo fixo. Tese de Mestrado.
- Araujo, R. R. et al. 2009. Role of Follicular Estradiol-17beta in Timing of Luteolysis in Heifers. *Biology of Reproduction* 81: 426-437.
- Bartolome, J. A. et al. 2005. Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows. *Theriogenology* 63: 1617-1627.
- Baruselli, P. S. et al. 2011. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology* 76: 1583-1593.
- Baruselli, P. S., J. N. S. Sales, R. V. Sala, L. M. Vieira, and M. F. Sá Filho. 2012. History, evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. *Animal Reproduction* 9: 139-152.
- Bó, G. A., P. S. Baruselli, and M. F. Martinez. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science* 78: 307-326.
- Carvalho, J. B. P. et al. 2008. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus*×*Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology* 69: 167-175.

- Chebel, R. C. et al. 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.
- Chebel, R. C. et al. 2004. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 84: 239-255.
- El-Zarkouny, S. Z., and J. S. Stevenson. 2004. Resynchronizing estrus with progesterone or progesterone plus estrogen in cows of unknown pregnancy status. *Journal of Dairy Science* 87: 3306-3321.
- Galvão, K. N. et al. 2007. Evaluation of Methods of Resynchronization for Insemination in Cows of Unknown Pregnancy Status. *Journal of Dairy Science* 90: 4240-4252.
- Giordano, J. O. et al. 2012. Increased fertility in lactating dairy cows resynchronized with Double-Ovsynch compared with Ovsynch initiated 32 d after timed artificial insemination. *Journal of Dairy Science* 95: 639-953.
- Grooms, D. L. 2010a. Programas para controle de doenças infecciosas e melhoria do desempenho reprodutivo. Anais do XIV Curso Novos Enfoques na Produção e Reprodução de Bovinos.
- Marques, M. O., M. Ribeiro Júnior, S. R.C.P., M. F. Sá Filho, and P. S. Baruselli. 2012. A IATF melhora a eficiência reprodutiva de vacas nelore primíparas durante a estação de monta. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE): 374.
- Meyer, J. P. et al. 2007. Timed artificial insemination of two consecutive services in dairy cows using prostaglandin F₂α and gonadotropin-releasing hormone. *Journal of Dairy Science* 90: 691-698.
- Nett, T. M., A. M. Akbar, G. D. Niswender, M. T. Hedlund, and W. F. A. r. f. g.-r. h. G.-R. i. s. J. C. E. M.-. White. 1973. A radioimmunoassay for gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) in serum. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 36: 880-885.
- Sá Filho, M. F. et al. 2011. Sincronização e resincronização para IATF de novilhas nelore utilizando implante auricular contendo norgestomet. XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE).
- Santos, J. E. P., W. W. Thatcher, R. C. Chebel, R. L. A. Cerri, and K. N. Galvão. 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal Reproduction Science* 82-83: 513-535.
- Stevenson, J. S., J. A. Cartmill, B. A. Hensley, and S. Z. El-Zarkouny. 2003. Conception rates of dairy cows following early not-pregnant diagnosis by ultrasonography and subsequent treatments with shortened Ovsynch protocol. *Theriogenology* 60: 475-483.
- USDA. 2012. Brazil, Livestock and Products Annual. United States Department of Agriculture.

Avanços tecnológicos no emprego de fármacos para controle da reprodução de fêmeas bovinas destinadas à IATF

Technological advances in the use of drugs to control the reproduction of cows intended for TAI

Ed Hoffmann Madureira¹ madureh@usp.br; Milton Maturana Filho¹ milton.maturana@usp.br

¹Departamento de Reprodução Animal Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia ,
Universidade de São Paulo

Introdução

A pecuária atual exige máxima eficiência reprodutiva e produtiva para possibilitar retorno econômico. Nesse sentido, a utilização dos hormônios exógenos se faz muito importante no contexto de se buscar produtividade e rentabilidade. A eficiência reprodutiva é o principal fator para uma produção eficiente, economicamente, viável em gado de corte (DICKERSON, 1970).

Desde a década de 50, do século anterior, quando vários hormônios esteróides se tornaram comercialmente disponíveis, buscam-se avanços tecnológicos para controle farmacológico do ciclo estral, principalmente os ligados à superovulação e sincronização das ovulações.

Na década de 70, a disponibilidade das Prostaglandinas do grupo F2 alfa (PG) trouxe grande avanço e sua associação com progestágenos e estrógenos, possibilitou o emprego da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Na época, os conhecimentos da área da fisiologia da reprodução eram insuficientes para proporcionar resultados economicamente interessantes. Entretanto, na década de 80, o emprego da ultra-sonografia e a disponibilidade de se quantificarem vários hormônios possibilitaram o ajuste dos protocolos de IATF e eles passaram a ser empregados em maior escala nos sistemas de produção de carne e de leite.

Na década de 90, vários produtos hormonais estavam disponíveis comercialmente e os protocolos recomendados já eram suficientes para possibilitar um avanço no emprego da técnica, o que só veio a acontecer cerca de uma década depois.

Programas de IATF servem para concentrar as inseminações e a parições em épocas desejáveis, sendo aplicados em rebanhos de vacas zebuínas. Os protocolos de IATF visam controlar o crescimento das ondas foliculares, regular a função do corpo lúteo e o momento da ovulação (MACMILLAN e BURKE, 1996 ; RIBEIRO et al., 2009).

Para uma eficiente sincronização da ovulação, com taxas de prenhez adequadas, é necessário o atendimento a 4 quesitos:

- 1) Proporcionar um período de 7 a 10 dias de exposição das fêmeas bovinas a teores de progesterona ou progestágenos, que mimetizem a fase luteínica do ciclo estral. Isto pode ser obtido pela administração oral de MGA (acetato de melengestrol), ou pela utilização de implantes vaginais de progesterona, ou MAP (medroxiprogesterona), ou FGA (acetato de fluorogestona), ou implantes auriculares de norgestomet. Existem diferenças de estrutura química, potência, farmacocinética, metabolismo (STANCZYK, 2003) e afinidade de ligação ao receptor de progesterona (MOFFATT et al., 1993; BAUER et al., 2000; PERRY et al., 2005) entre os diversos

progéstágenos. A capacidade deles em mudar a frequência e a amplitude dos pulsos de LH parece ser necessária para a aceleração do início da puberdade (DAY e ANDERSON, 1998) e do retorno à ciclicidade no início do período pós parto, em vacas européias e zebuínas.

2) A Fase progestacional deve ser encerrada em todos os animais de maneira sincronizada e isto pode ser atingido com a retirada dos implantes ou pela interrupção da administração oral de progéstágenos e pela aplicação de PG.

3) Durante o período progestacional, deve ocorrer uma re-organização das ondas foliculares, de sorte que o “status” folicular, no momento do encerramento da fase progestacional, seja muito semelhante entre os animais. Este é um ponto chave do sucesso e pode ser atingido de várias maneiras, como por exemplo: a) aspirando-se todos os folículos ovarianos, no momento da colocação dos implantes. Assim, uma nova onda folicular será iniciada em todos os animais e, no momento da retirada dos implantes e aplicação de PG, uma grande proporção de fêmeas terá um folículo dominante e sadio, que poderá ovular assim que ocorrer um pico do hormônio luteinizante (LH); b) provocando-se a ovulação dos folículos dominantes, pela aplicação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Isto também possibilitará a emergência de uma nova onda folicular, cerca de 30 a 40 horas após. Vale a pena ressaltar que as condições de anestro, que comumente acontecem em 70 a 75% das vacas de corte, no início do período pós-parto, afetam a eficiência dos protocolos que utilizam GnRH para sincronizar a onda. É de grande importância que a vaca esteja ciclando para ovular ao 1º GnRH, o que, subseqüentemente, aumenta a taxa de ovulação ao indutor para inseminação; c) provocando-se a atresia dos folículos ovarianos, independentemente da fase do desenvolvimento na qual se encontrem. Isto é geralmente atingido com a aplicação de 17-beta-estradiol (17B) ou de seus ésteres, como benzoato (BE), cipionato (CE) ou valerato de estradiol (VE). O estradiol, em associação com os progéstágenos, provoca uma inibição da liberação de FSH e LH, de modo que os folículos sofrem atresia. Assim que o efeito dos estrógenos cessa, devido à biotransformação e eliminação dos mesmos do organismo, surge uma nova onda folicular, entre 3 e 6 dias (em média 2,8 d para 17B-estradiol, 3,6 d para benzoato de estradiol e 5 d para valerato de estradiol), dependendo da vida média do estradiol empregado. Na maioria dos animais, no momento da retirada dos implantes, haverá um folículo dominante, com capacidade ovulatória, para responder ao pico de LH e apresentar uma ovulação sincronizada.

4) Por fim, resta sincronizar o pico de LH o que ocorre pela aplicação do próprio LH, ou gonadotrofina coriônica equina (eCG) exógena, ou gonadotrofina coriônica humana (hCG) exógena, ou de um análogo de GnRH, que provocará um pico hipofisário de LH, ou pela aplicação de estradiol, que proporcionará um pico de GnRH, no hipotálamo, que também resultará um pico de LH sincronizado. Como o pico de LH, em todos os casos, ocorrerá em um momento conhecido, resta fazer uma IA, cerca de 15 horas antes do momento esperado da ovulação, para que as taxas sejam aceitáveis. Em média, as ovulações ocorrem cerca de 25 h após a aplicação de LH ou hCG, cerca de 30 h após GnRH e 45h após benzoato de estradiol. Como uma regra prática, recomenda-se atrasar cerca de 6 h a IATF, quando se utiliza o sêmen sexado, mas esta recomendação ainda carece de um maior amparo científico.

As taxas de prenhez podem variar de 20 a 80%, mas em média, são atingidos resultados da ordem de 50%. A que se devem as variações das taxas de prenhez? Ciclicidade? Escore de condição corporal (ECC)? Protocolos? Puberdade? Gostaria, portanto, de tecer alguns comentários, baseados em experimentos científicos, que vêm

sendo realizados no Brasil e no mundo e acrescentar informações baseadas na experiência prática de nosso grupo.

Produtos veterinários disponíveis

De um modo geral, os produtos disponíveis no mercado brasileiro, tanto os nacionais, como os importados, são de boa qualidade e as diferenças entre eles não explicam as diferenças de taxas de prenhez que são comumente obtidas. Há inovações que poderão trazer benefícios e serão citadas ao final do artigo.

Protocolos

Nas duas últimas décadas, muito tem sido dedicado ao desenvolvimento de protocolos IATF para melhorar a fertilidade de vacas de corte. Abordagens distintas, como o uso de diferentes hormônios ou doses em dias diferentes, pré-sincronização etc., têm sido utilizadas para melhorar a sincronia da onda folicular, visando aumentar a fertilidade das vacas.

No entanto, é importante destacar que os protocolos hormonais estão bem ajustados e, desde que implementados de maneira correta, funcionam adequadamente. Há uma tendência de se supervalorizar a importância dos protocolos! É de suma importância o conhecimento da fisiologia e endocrinologia básicas relacionadas, para que decisões e ajustes possam ser feitos. Realmente, existem protocolos mais adequados para novilhas ou vacas de corte, ciclando ou em anestro, ou para vacas leiteiras de alta ou baixa produção, puras ou cruzadas e isto deve ser levado em consideração nos programas de IATF. Atualmente, isto não tem sido um fator limitante dos programas de IATF, pois existe um dedicado trabalho das empresas fornecedoras dos medicamentos, que contam com profissionais capacitados e são assessoradas por pesquisadores de várias instituições. Entretanto, atribuir o sucesso ou insucesso de um programa de IATF ao emprego do produto A ou B, fabricado pela empresa A, B ou C, que utilizam o protocolo X, Y ou Z, é um exagero.

Condição de manejo dos animais

Neste ponto reside, a chave do sucesso e grande parte da explicação do insucesso dos programas de saúde reprodutiva que vêm sendo utilizados. Em vários estudos, tem sido demonstrada a importância dos fatores relacionados com as condições metabólicas, imunológicas, estresse térmico e de saúde de vacas de corte e de leite sobre o desempenho reprodutivo (MATURANA FILHO et al., 2011; BASCHANT e TUCKERMANN, 2010)

Nos sistemas extensivos de criação de bovinos de corte, observa-se que 50% das vacas não recebem um manejo adequado que contribua com melhores índices de fertilidade (LUCY et al., 2001; GASSER et al., 2003 ; MADUREIRA et al., 2006). Os principais fatores são a nutrição, a baixa condição corporal ao parto, a amamentação e incidências de ciclos curtos (MADUREIRA et al., 2006).

Portanto, é necessário dar mais atenção à pergunta: Como podemos manejar os animais para que eles respondam melhor aos bons produtos e protocolos disponíveis?

Vacas no início do período pós parto apresentam-se anovulatórias, principalmente por falhas no manejo nutricional e na maioria das vezes não concebem

no período esperado para que o intervalo médio entre partos seja mantido (YAVAS e WALTON, 2000).

É necessário que haja um sistema eficiente da disponibilidade de pastagens, para otimizar o desempenho animal e o uso de ração suplementar pode superar as deficiências do componente forragem. Quando as necessidades de energia e proteína aumentam por causa de lactação, prenhez e crescimento, poderá ser necessário que parte do componente forragem da dieta seja substituído por concentrados (FONTANELI, 1999).

Os pecuaristas que se dedicam à cria dão muita atenção ao período da estação de monta, entre Novembro e Março (apenas como exemplo), mas muitas vezes não se atentam que grande parte do resultado que obtêm é fruto de como manejaram o rebanho de Abril a Outubro.

É importante maximizar ou manter um oferecimento constante e em quantidade suficiente de forragens, entretanto, quando são oferecidas à livre escolha, juntamente com concentrados suplementares em quantidades restritas, o consumo de matéria seca da forragem pode ser variável (aumentar, diminuir ou permanecer igual) (MOORE, 1992; MOORE et al. 1999). Em geral, essa estratégia auxilia na diminuição do consumo de forragem, principalmente quando a qualidade da mesma é alta. As diferenças no consumo estão principalmente ligadas à qualidade da fibra das forragens e ao tipo de forragem, que irão determinar a digestibilidade e a taxa de passagem, do que às diferenças entre os concentrados (WALDO, 1986). Entretanto, pequenas quantidades de concentrado podem aumentar o consumo voluntário, quando o valor nutritivo das forragens é baixo, especialmente quando a forragem tem elevada proporção entre NDT e PB (MOORE, 1994).

Neste sentido, outros aspectos básicos do manejo devem ser considerados para preparar as vacas para estação de monta, visando a eficiência reprodutiva: sanidade, ECC ao desmame, ao parto e ao início da estação de monta, momento adequado do desmame, mineralização, manejo de pastagens, suplementações estratégicas, planejamento, construção e manutenção de instalações e cercas, investimentos em recursos humanos etc...

A qualidade do sêmen também está diretamente ligada à taxa de concepção na IATF e deve ser avaliada antes do uso.

A qualificação operacional é tão importante quanto a técnica, de modo que a capacitação de recursos humanos deve ser encarada como uma prática rotineira e continuada.

Portanto, em última análise, é a condição das matrizes que impacta o índice de prenhez, tanto da IATF, quanto da EM.

Efeito da CC ao parto sobre a eficiência reprodutiva

É sabido que o desempenho reprodutivo de rebanhos de corte está intimamente ligado à condição nutricional das matrizes. Os ruminantes possuem a capacidade de armazenar energia, na forma de reservas corporais, como gordura, para disponibilizá-las nos momentos de privação. Logo após o parto, a amamentação torna-se prioritária e boa parte do que a vaca consome, ou possui na forma de gordura, é destinada à amamentação. Outro momento crítico do ciclo reprodutivo é o terço final da gestação,

quando o feto aumenta cerca de 10 vezes o seu peso. Neste período, quase todo o metabolismo da vaca está direcionado ao crescimento fetal (NRC, 2000).

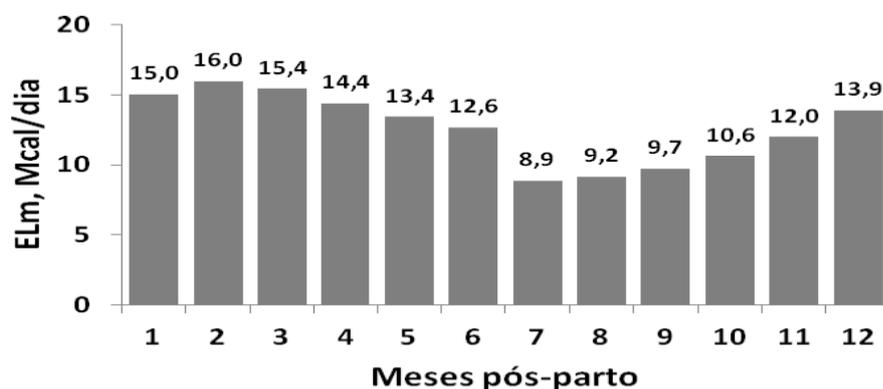


Figura 1. Energia líquida de manutenção (ELm) de vacas de corte durante o ciclo produtivo (NRC, 2000).

Vale lembrar que esta fase do ciclo coincide com o período mais seco do ano. Portanto, é essencial que a vaca recomponha suas reservas corporais, no período logo após o desmame, porém antes que se encontre no terço final da gestação. Rebanhos de cria, em sistemas extensivos, em regiões tropicais (devido ao característico regime de chuvas e, conseqüentemente, da disponibilidade de forrageiras), devem ser manejados no sentido de assegurar a recomposição das reservas corporais das matrizes. A suplementação nutricional durante o terço final da gestação tende a aumentar o peso do bezerro ao nascer e a suplementação após o parto tende a aumentar a produção leiteira, de sorte que, além dos custos não encontrarem justificativa, pouco efeito positivo haverá sobre o ECC das vacas.

Portanto, a produtividade e a rentabilidade do sistema de cria dependem do planejamento nutricional durante o período da seca (NRC, 2000).

A alta proporção de vacas em anestro, no início da estação de monta, é uma condição comum em vacas de corte *Bos taurus indicus* e afeta negativamente a eficiência reprodutiva, causando sérios prejuízos na pecuária brasileira (BARUSELLI *et al.*, 2004; RIBEIRO *et al.*, 2009).

Segundo Spitzer *et al.*, (1995), as vacas que parem com ECC maior ou igual à 5 (escala de 1 a 9) têm uma elevada probabilidade de conceber na próxima EM. Entretanto, vacas que parem com CC menor do que 5 apresentam uma probabilidade de gestação cerca de 35% menor.

Se grande percentual das vacas do rebanho está com $ECC \leq 4$ no parto, ainda pode haver chance dessas vacas emprenharem dentro de uma estação de monta, mas para que isso ocorra é necessário aumentar a oferta de energia e proteína além de suas exigências (aproximadamente 120%) durante o período inicial pós-parto (COOKE *et al.*, 2008). No entanto, este é um procedimento de emergência e, provavelmente, será prejudicial para a eficiência econômica e produtividade da fazenda.

É importante ressaltar que vacas de corte excessivamente condicionadas ($ECC \geq 7$) podem ter dificuldades ao parto, além de custos de manutenção elevados, têm chance reduzida de emprenhar em comparação com vacas com ECC moderado (COOKE *et al.*,

2009). Isto pode ser atribuído aos efeitos de metabólitos como os ácidos graxos não esterificados (AGNEs) e seus compostos, sobre o consumo, ciclicidade e qualidade dos oócitos, o que afeta a capacidade das vacas manterem o início da gestação. No entanto, vacas com ECC > 6 ao parto, não devem ser colocadas em dieta com restrição de nutrientes, pois isso pode intensificar mais o balanço energético negativo e o anestro pós-parto, resultando ainda mais em diminuição do desempenho reprodutivo.

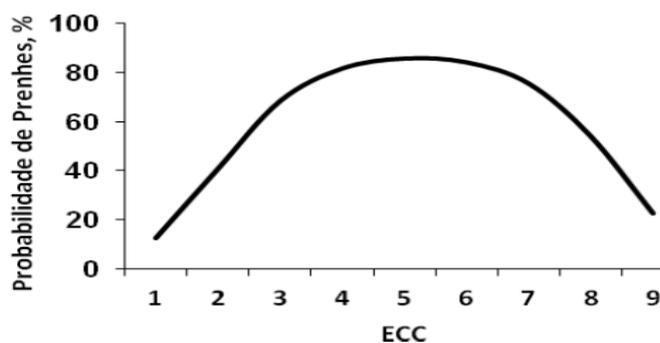


Figura 2. Influência do escore de condição corporal (ECC), avaliados no início da estação de monta, na probabilidade de vacas tornarem-se prenhes. Adaptado de Cooke et al. (2009).

Numa vaca zebuína, um ponto na escala de ECC representa cerca de 40 Kg de peso vivo ou seja, uma diferença de apenas 40Kg ao parto pode significar uma taxa de prenhez da ordem de 60%, ao invés de 90%, ao final da EM. Uma atitude prática de grande importância é avaliar o ECC das vacas ao desmame e manejá-las de forma que atinjam um ECC de pelo menos 5 ao parto, lembrando que, ao atingir o terço final de gestação, a vaca terá dificuldade de ganhar peso.

De maneira prática, a avaliação do ECC tem sido uma ferramenta valiosa para refletir o estado nutricional dos rebanhos. O ECC ao parto tem sido positivamente correlacionado com o desenvolvimento folicular precoce no período pós parto, com o estoque hipofisário de LH aos 30 dias pós parto, com as concentrações circulantes de IGF1, frequência dos pulsos de LH e intervalo pós parto após o desmame precoce (MADUREIRA et al., 2005).

De um modo geral, em fazendas bem manejadas, as vacas concebem, em média, 90 dias após o parto e os bezerros são desmamados aos 8 meses de idade. Por ocasião do desmame, as vacas se encontram ao redor do 5º mês de gestação. Neste período, a exigência nutricional é baixa e a vaca ainda tem um período de 60 a 70 dias para recompor suas reservas corporais, antes que sua exigência nutricional volte a aumentar, ao atingir o terço final da gestação.

Nas fazendas que adotam a IATF, o intervalo entre o parto e a concepção tem diminuído o que faz com que, ao desmame, as vacas estejam numa fase um pouco mais avançada da gestação, sobrando menos tempo para recomposição das reservas corporais. Com a valorização dos bezerros, nos últimos anos, tem sido freqüente a comercialização dos mesmos antes do desmame, o que, de fato, ocorre quando da entrega dos bezerros aos compradores, evitando-se as perdas de peso ocasionadas pelo desmame. Considerando-se os dois fatores em conjunto, conclui-se que um encurtamento do período de serviço e um atraso no desmame praticamente provocam uma sobreposição dos 2 momentos de alta exigência nutricional, abolindo-se o único

período no qual a vaca tem a oportunidade de recompor suas reservas corporais. Isto tem levado a uma diminuição do ECC ao parto, principalmente em anos particularmente secos.

O baixo ECC ao parto leva, de imediato, ao nascimento de bezerros mais leves, a uma diminuição da taxa de prenhez à IATF e, por fim, a uma diminuição da taxa de prenhez ao final da EM, pois há aumento da incidência de anestro, por falta de reservas corporais.

Em vacas com baixo ECC o uso da eCG pode auxiliar as condições de crescimento folicular e de ovulação, principalmente em vacas acíclicas (BARUSELLI et al., 2004; BARUSELLI et al., 2002; CUTAIA et al., 2003).

A vantagem de se utilizar a eCG nos protocolos de sincronização, é que este hormônio é administrado no momento da remoção do implante de progestágenos, evitando assim um trabalho a mais de manipulação.

Tabela 3. Taxa de Prenhez à IATF em novilhas Nelore tratadas com PG no início do tratamento (D0) e com eCG (400UI) na retirada do dispositivo intravaginal de progesterona

	Número	Taxa Prenhez (%)
Sem PG/Sem eCG	100	14,0 (17/100)
Com PG/Sem eCG	97	17,5 (17/97)
Sem PG/Com eCG	98	35,7 (35/98)
Com PG/Com eCG	97	34,0 (33/97)
Efeitos Principais		
Sem PG	198	24,7 (49/198)
Com PG	194	25,8 (50/194)
Sem ECG	197	15,7 (31/197)
Com eCG	195	34,9 (68/125)

Fonte: Marques (2005).

Algumas recomendações úteis são que:

1) as vacas não sejam protocoladas antes de 45 dias pós-parto; 2) os desmames sejam feitos no máximo aos 240 dias de idade e 3) que se aproveitem ao máximo, os 60 dias seguintes ao desmame para oferecer uma condição nutricional que permita a rápida recomposição do ECC, seja pela disponibilização das melhores pastagens ou suplementação nutricional (sal mineral proteinado, por ex.) para esta categoria animal.

Novilhas

Frequentemente, as novilhas apresentam resultados inferiores aos das vacas. Uma das perguntas mais comuns é qual protocolo devo utilizar para novilhas? Mais importante do que isso é saber em que estado estas novilhas se encontram para ser

inseminadas. Em lotes de novilhas têm-se várias categorias como as impúberes, as pré-púberes, as púberes imaturas, as púberes maduras que mantiveram ou interromperam sua ciclicidade. Cada uma destas categorias responde de maneira diferente à IATF.

Vários fatores influenciam na idade à puberdade sendo eles o genótipo, a estação do ano, o comportamento do rebanho (efeito macho), a terapia hormonal, a taxa de crescimento, nutrição e genética das novilhas (FIELDS, 1994; FILHO, 2007).

Novilhas Nelore têm a idade à puberdade em torno de 22 a 36 meses e a idade ao primeiro parto de 44 a 48 meses, ressaltando que zebuínos são mais tardios que os taurinos (SOUZA, 1995). Porém, as novilhas podem atingir a puberdade com idade entre 13 a 15 meses (SÁ FILHO, 2008), considerado o ideal e mais lucrativo.

As novilhas devem ter uma concepção precoce, durante sua primeira estação reprodutiva e, para isso, a maioria das novilhas deve estar ciclando regularmente já ao início desta estação (LOBATO, 1997). Essas novilhas que concebem logo no início da EM irão parir no início da estação de nascimento com maior possibilidade de desmamar bezerras mais pesados, aumentando, conseqüentemente, sua produção ao longo da vida reprodutiva (LESMEISTER, 1973).

A condição corporal dos animais é de grande importância na adoção de alternativas de manejo nutricional com vistas ao aumento da eficiência reprodutiva das novilhas. No início da estação de reprodução, as novilhas devem atingir um peso equivalente a 55-60% do peso adulto da vaca da raça correspondente. No caso de novilhas de corte de raças zebuínas, o peso ao início da estação de monta deve estar em torno de 300 a 330 kg. Pesos inferiores, no início da EM, podem comprometer o desempenho reprodutivo dessas fêmeas, e a fertilidade da EM do ano subseqüente (WILTBANK et al., 1985). No caso de novilhas zebuínas, a suplementação alimentar para obtenção de um peso vivo de 300 a 330 kg aos 18 meses pode não se justificar economicamente, se a maior parte desses animais não estiver apta à reprodução (SANTOS e SÁ FILHO, 2006).

Tabela 1: Efeito do ECC (1-5) no diâmetro do folículo dominante no momento da IATF e na taxa de prenhez de Novilhas Nelore (*Bos Indicus*.)

Variável	ECC			P
	<2,75	3	> 3,25	
Diâmetro Folículo na IATF	8,21±0,03b	8,29±0,03b	9,31±0,03b	0,03
Taxa de prenhez (%)	41,5 (105/253)b	43,1 (84/195)b	54,1 (93/172)a	0,03

Fonte: Adaptado de Sá Filho et al., 2008

Item	Percentual de novilhas prenhes de acordo com os dias indicados no período de monta			
	0	20	40	60
ECC				
4	32	27	43 ¹	56 ²
5	42	35	65 ²	80 ³
6	49	47	90 ³	96 ³
Ganho de peso pós-parto				
Moderado	34 ¹	27 ²	56 ²	70 ²
Alto	48 ²	46 ³	76 ³	84 ³

^aAdaptado de Spitzer et al; 1995¹²³ Médias na mesma coluna, em cada item, sem o mesmo sobrescrito diferem (P < 0,05).

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 teores de progesterona durante o ciclo estral (RANDELI, 1990; BARUSELLI et al., 2004; BURKE et al., 1996).

De qualquer maneira, mesmo novilhas púberes e maduras podem não apresentar o mesmo desempenho reprodutivo de vacas frente à IATF. Programas de IATF em novilhas ainda são um desafio à pesquisa, principalmente em fêmeas bovinas zebuínas.

Estresse térmico e oxidativo

Nosso grupo tem verificado o efeito de vários fatores como estresse térmico, metabólico e oxidativo sobre a fertilidade das vacas na EM. No estudo inicial de Maturana Filho et al., 2011 com 404 vacas Nelore, com bezerro ao pé, e período pós-parto entre 40 e 70 dias, no início do protocolo de IATF e 102 novilhas da raça nelore, mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha*, com livre acesso a suplemento mineral e água. Foram avaliados os parâmetros das variáveis: ECC na escala de 1-9, no início do protocolo, no momento da IATF e no diagnóstico de gestação (DG); Temperatura retal (TR) no momento da IATF; e o índice de temperatura e umidade (ITU) no momento da IATF.

O índice de temperatura e umidade (ITU) foi calculado a partir do modelo definido por Thom, (1959): $ITU: 0,8 \times T + [(UR(\%)/100) \times (T-14,4)] + 46,4$, onde: T = temperatura 0C e UR = umidade relativa do ar.

Posteriormente, de forma retrospectiva, as vacas foram alocadas para os grupos de acordo com o número de partos (novilhas, primíparas, vacas de 2 crias e vacas de 3 crias) e com a temperatura retal (Tretal 1: 37,0°C -39,4 °C; Tretal 2: 39,5°C - 41,5°C), no momento da IATF.

As vacas com temperatura retal abaixo de 39,4°C apresentaram taxa de prenhez significativamente superior à das vacas cuja temperatura retal foi maior do que 39,4°C (75,6% VS 62,4%). No ano seguinte, no mesmo rebanho, com 506 vacas, as taxas de prenhez também diferiram, segundo a temperatura retal: 62% VS 48%.

Tabela 1: Odds Ratio e taxa de prenhez das variáveis, incluindo o modelo final de regressão logística para efeitos climáticos

Fator	Classe	n	Taxa Prenhez (%)	Odds ratio	95% Intervalo confiança	P	
ITU	1	63	84,2	3,8	1,7 – 8,5	0,002	
	2	247	74,9	2,1	1,2 – 3,5		
	3	94	56,4	Referente			
	1 vs 3	157	-				0,009
	2 vs 3	341	-				
TRETAL	1	295	75,6 (Class 1)			0,008	
	2	109	62,4 (Class 2)				
	1 vs 2			1,68	1,1 – 2,7	0,002	
ECG	Sim	246	72,1			0,96	
	Não	158	71,9				
PVE	1	304	70,7			0,30	
	2	100	76				

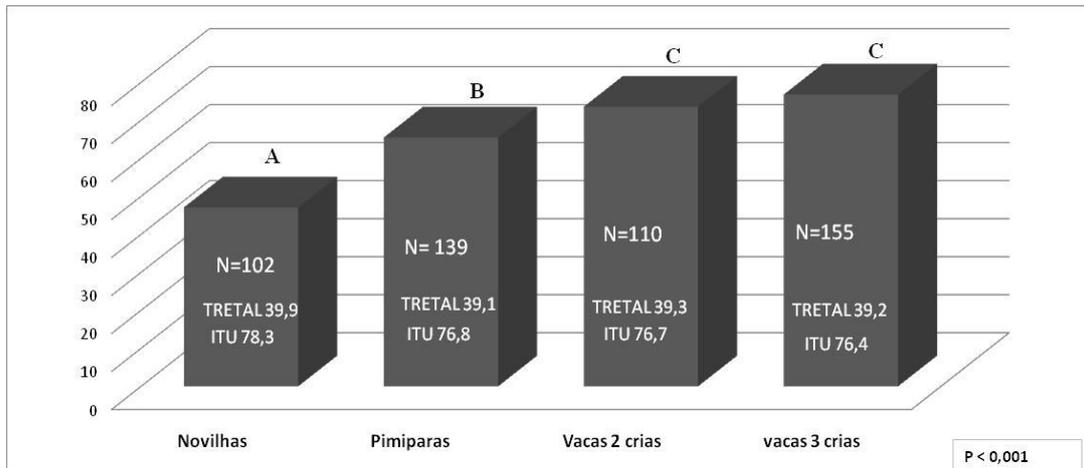
ITU: Classe 1- (69 – 74), Classe 2 (75- 79), Classe 3 (80- 84); TRETAL: Classe 1 (37,0°C -39,4 °C); Classe 2 (39,5°C - 41,5°C); PVE: Classe 1: (20 – 40 dias pós-parto); Classe 2: (50 – 70 dias pós-parto).

Nota-se que a fertilidade de vacas e novilhas de corte também é afetada por fatores climáticos, pois esses distintos grupos têm uma capacidade de regulação metabólica e termorregulatória diferente. Aparentemente, vacas que já atingiram a maturidade sexual possuem melhor fertilidade, mesmo frente a desafios como o estresse calórico. Isto ocorre apesar de já ter sido demonstrado que há um maior grau de resistência celular ao calor por raças zebuínas (PAULA- LOPES et al. 2003).

Outro fator relacionado a essas diferenças na taxa de prenhez estaria ligado à capacidade de tolerância térmica pelo oócito de raças zebuínas, que provavelmente ocorre depois da maturidade sexual completa (PAULA- LOPES et al. 2003; HANSEN, 2005).

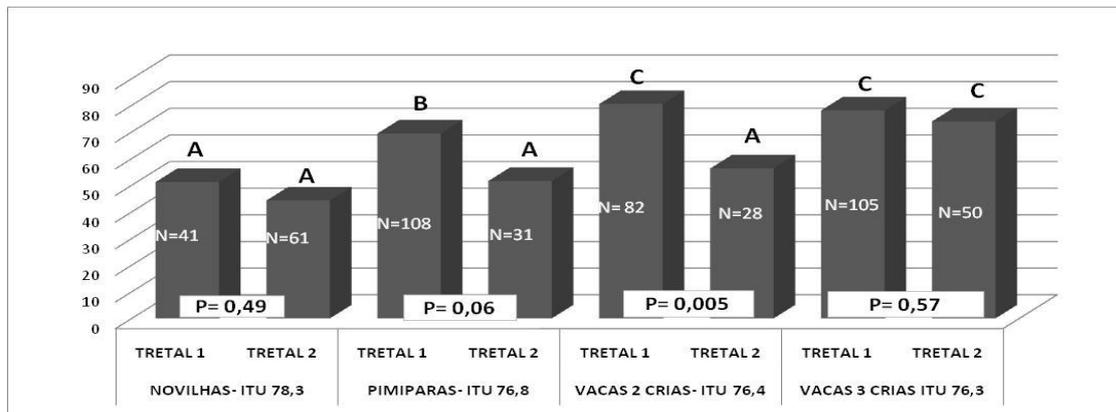
Esse efeito observado sugere que a capacidade termorregulatória pode estar diminuída quando o animal passa por um grande desafio metabólico, como a amamentação e o crescimento, o que vai ao encontro dos dados de Pereira (2005), que demonstrou ser a capacidade termorregulatória diferente entre os zebuínos, corroborando também com os achados de Paula- Lopes et al. (2003).

Gráfico 1: Taxa de prenhez de vacas e novilhas Nelore, dentro da mesma classe de TR e ITU.



Fonte: Maturana Filho et al.,(2011)

Gráfico 2: Taxa de prenhez de vacas e novilhas Nelore, dentro da mesma classe ITU e diferentes TR.



Fonte: Maturana Filho et al.,(2011)

O estresse oxidativo também pode interferir nas taxas de prenhez. Num estudo preliminar, com 532 vacas nelore, avaliou-se a atividade do enzima superóxido dismutase (SOD) e separaram-se as taxas de prenhez segundo atividade alta (acima da média) ou baixa (abaixo da média) da SOD. A média das concentrações de SOD no estudo foi de 2101,36 U/g Hb, sendo de 1665,16 U/g Hb e de 2602,16 U/g Hb para os grupos de alta e baixa respectivamente. No grupo onde a atividade da SOD foi alta, a taxa de prenhez foi de 67,1%, enquanto foi de 55,8% no grupo no qual a atividade foi menor ($p=0,03$).

Gráfico 3 – Taxas de Prenhez aos 30 e 60 dias após IATF de acordo com as concentrações de SOD.

necessitam de doses de progesterona significativamente maiores do que vacas de corte e necessitarão produtos mais específicos.

O fato de se manejarem as vacas 3 ou 4 vezes até que sejam inseminadas é um fator limitante da IATF. O emprego de produtos que contenham reservatórios de hormônios, cuja liberação seja controlada por dispositivos eletrônicos, pode ser uma opção. A progesterona ou progestágeno nano/micro estruturadas podem vir a ser grandes aliadas na solução deste problema. Nestes casos, nano/micro partículas, ou nano/micro-emulsões, ou nano/micro filamentos têm surgido. De um modo geral, estes medicamentos são suspensões injetáveis e os hormônios vão sendo liberados das matrizes poliméricas utilizadas, por mecanismo de simples difusão ou erosão, após absorção dos veículos utilizados, permanecendo no local de aplicação, um depósito de nano/micro partículas.

Nosso grupo de pesquisa em cooperação com grupos da UEM, UNICAMP e EMBRAPA já conseguiu produzir nanopartículas e nanofilamentos de progesterona em matrizes biopoliméricas cujos testes *in vivo* iniciaram-se em 2012 (BRANDÃO, 2009; MADUREIRA e CARDOZO-FILHO, 2010; OLIVEIRA et. al., 2012; PIMENTEL, 2010).

Literatura

- Baruselli, P. S. ; Marques, M. O. ; Carvalho, N. A. T. ; Madureira, E. H. ; Campos Filho, E.P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 218-221, 2002.
- Baruselli, P.S.; Reis, E.L. ; Marques, M.O. ; Nasser, L.F. ; Bo, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.
- Baruselli, P.S.; Reis, E.L.; Marques, M.O.; Nasser, L.F.; Bo, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004.
- Baschant, U., Tuckerman, J. The role of the glucocorticoid receptor in inflammation and immunity. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** v.120, p.69-75, 2010.
- Bauer, E.R., Daxenberger, A; Petri, T ;H. Sauerwein, Hand, H.;Meyer, H.. Characterisation of the affinity of different anabolics and synthetic hormones to the human androgen receptor, human sex hormone binding globulin and to the bovine progestin receptor. **APMIS** v. 108, p.838-846, 2000.
- Brandão, H.M.; Efeito da insulina sobre a superovulação de ovelhas e desenvolvimento de um sistema nano-estruturado para permeação de mucosa. 2009. Tese (doutorado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2009.
- Burke, C. R.; Macmillan, K. L.; Boland, M. P. Oestradiol potencies a prolonged progesterone-induced suppression of LH release in ovariectomised cows. **Animal Reproduction Science**, v. 45, p. 13-28, 1996.
- Cooke, R. F., Arthington, J. D.. Case Study: Effects of the protein source added to molasses-based supplements on performance of mature Brahman-crossbred cows grazing winter range. **Prof. Anim. Sci.** v.24, p.264-268, 2008.

- Cooke, R.F., Arthington, J.D.; Araujo, D.B.; Lamb, G.C.. Effects of acclimation to human interaction on performance, temperament, physiological responses, and pregnancy rates of Brahman-crossbred cows. **J. Anim. Sci.** v. 87, p. 4125-4132, 2009.
- Day, M. L., Anderson, L.H.. Current concepts on the control of puberty in cattle. **J. Anim. Sci.** v. 76, p.1-15, 1998.
- Dickerson, G.. Efficiency of animal production – molding the biological components. **J. Anim. Sci.** v.30, p.849-859, 1970.
- Fields, M.J., Sand R.S. (Ed.) **Factors affecting calf Crop**. 1. ed. Florida: CRC Press, 1994. p. 167-178.
- Filho, A.H.S.S. *et al.* Indução da Puberdade em Novilhas com uso da Hormonoterapia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, **Ciência Animal**, v. 17, n.2, p.83-89,2007.
- Fontaneli, R. 1999. Forage systems for year-round grazing by lactating dairy cows. Ph.D. diss. University of Florida, Gainesville.
- Gasser, C. L.; Behlke, E. J.; Burke, C. R.; Grum, D. E.; Mussard, M. L. Improvement of pregnancy rate to fixedtime artificial insemination with progesterone treatment in anestrous pos-partum cows **J. Anim. Sci.**, v. 81, suppl. 2, abstr.45, 2003.
- Hansen, J.P. Managing the Heat-Stressed Cow to Improve Reproduction. Proceedings of the 7 th Western Dairy Management Conference. March 9-11, 2005.
- Lesmeister, J.L.; Burfening, J.P.; Blackwell, R.L. Date of first calving in beef cows and subsequent calf production. **Journal of Animal Science**, v.31, n.1, p.1 14, 1973.
- Lobato, J.F.P. Sistemas intensivos de produção de carne bovina: I. Cria. In: Simpósio Sobre Pecuária de Corte. 4. Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, p.161-204, 1997.
- Lucy, M. C.; Billings, H. J.; Butler, W. R.; Ehnis, L. R.; Fields, M. J.; Kesler, D. J.; Kinder, J. E.; Mattos, R. C.; Short, R. E.; Thatcher, W. W.; Wetteman, R. P.; Yelich, J. V.; Hafs, H. D. Efficacy of an intravaginal progesteroneinsert and injection of PGF2 α for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows , peripubertal beef heifers and dairy heifers . **J. Anim. Sci.**, v.79, p.982-995, 2001.
- Madureira, E. H., Pimentel, J. R. V. IATF como uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, Goiânia: 2005.
- Madureira, E. H.; Fernandes, R. H. R.; Rossa, L. A. F. Anestro pós-parto em bovinos: a suplementação com óleos vegetais pode encurtá-los. In II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina: 2006, p. 63-70.
- Madureira, E.H.; Cardozo Filho, L.. Nanoparticle-based drug delivery for hormones: new tools for pharmacological control of the estrous cycle in ruminants. In: Internacional Conference On Food And Agriculture Applications Of Nanotechnology – Nanoagri 2010. **Proceedings**. São Pedro.2010, p. 41-43
- Marques, M.O. *et al.* Efeito do tratamento com PGF2 α 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.
- Maturana Filho, M; Kehrlle, A; Scolari, S.C; Miguez, P.H.P; Oliveira, B.M.M. Madureira, E.H. Avaliação e comparação dos efeitos do estresse calórico sobre a eficiência reprodutiva de vacas e novilhas nelore durante a estação de monta. **48° Reunião anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia. P.1-3, 2008.**
- Moffatt, R. J., Zollers JR.; Welshons, W.G.; Kieborz, K.R.; Garverick, H.A. SMITH, M.F.. Basis of norgestomet action as a progestogen in cattle. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 10, p.21-30, 1993.
- Moore, J.E. 1992. Matching protein and energy supplements to forage quality. p. 31-44. *In* B. Haskins and B. Harris, (ed.) **Proceedings**. 3rd Annual Florida Ruminant Nutrition Symposium. Univ. of Florida, Gainesville.
- Moore, J.E. 1994. Forage quality indices: development and application. p. 967-998. *In* G. C. Fahey, Jr., (ed.) Forage quality, evaluation, and utilization. ASA, CSSA, SSSA, Madison, WI.
- Moore, J.E.; Kunkle, W.E.. Evaluation of equations for estimating voluntary intake of forages and forage-based diets. **J. Anim. Sci. Supplement 1:204**, 1999.
- NRC. 2000. Nutrient Requirements of Beef Cattle (7th Ed.) – Update 2000. National Academy Press, Washington, DC
- Oliveira, J.E.; Medeiros, E.S.; Cardozo-Filho, L.; Madureira, E.H.; Mattoso, L.H.C.; ASSIS, O.B.G.; Development of poly (lactic acid) nanostructured membranes for the controlled delivery of progesterone to livestock animals. Material Science and Engineering C, 2012. **Submitted**
- Oliveira, L.Z.; Arruda, R.P.; Andrade, A.F.C.; Santos, R.M.; Beletti, M.E.; Peres, R.F.G.; Martins, J.P.N.; Hossepian, V.F.M.. Effect of simultaneous thawing of multiple semen straws and sequence of insemination on conception rate at timed artificial insemination in suckled multiparous Nelore cows. **Theriogenology**, 2012, in press.
- Paula-Lópes, F.F.; Chase, C.C.Jr; Al- Katanani, Y.M.; Krininger, C.E.III; Rivera, R.M.; Tekin, S.; Majeewki, A.C.; Ocon, O.M.; Olson, T.A. Hansen, P.J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: Diference between breeds developed in temperature versus hot climates in response of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and liphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v.125, p. 285-294, 2003.
- Perry, G.A.; Welshons, W.V.; Bott, R.C.; Smith, M. F.. Basis of melengestrol acetate action as a progestin. **Domest. Anim. Endocrinol.** v. 28, p.147-161, 2005.
- Pimentel, J.R.. Liberação sustentada de progesterona em micro partículas de PHB-V e PHB-V/PCL produzidas em meio supercrítico. 2010. 139 f. Tese (doutorado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2010.
- Randel, R. D. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. **J. Anim. Sci.**, v.68, p.853-862, 1990.
- Ribeiro, P. H. P. R., Costa Filho, L. C. C.; Rodrigues, L. A.; Alves, L. G. C.; Silva, A. S.; Nogueira, E. Efeitos de diferentes indutores de crescimento folicular na taxa

- de prenhes de vacas Nelores submetidas a protocolos de IATF. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Maringá: 2009.
- Sá Filho, M. F. *et al.* IATF em Novilhas. In: 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, Londrina, 2008.
- Sá Filho, M. F.; Sales, J. N. S.; Crepaldi, G. A. Effect of different ovulation inductors on pregnancy rates of Nelore (*Bos indicus*) heifers synchronized to fixed time artificial insemination. International Symposium on animal Biology of Reproduction, 2008.
- Santos, J. E. P.; Sá Filho, M. F. Nutrição e reprodução em bovinos. In II Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina: 2006. p. 30-54.
- Souza, E.M. *et al.* Influências genéticas e de meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir leiteiro. **R. Soc. Bras. Zootec.**, v. 24, n. 6, p. 926-935, 1995.
- Spitzer, J.C.; Morrison, D.G.; Wettermann, R.P.; Faulkner, L.C.. Reproductive responses and calf birth and weaning weights as affected by body condition at parturition and postpartum weight gain in primiparous beef cows. **J. Anim. Sci.**, v. 73, n. 5, p. 1251-7, 1995.
- Stanczyk, F. Z.. All progestins are not created equal. **Steroids** v. 68, p.879-890, 2003.
- Waldo, D.R. . Effect of forage quality on intake and forage concentrate interactions. **J. Dairy Sci.** v. 69, p.617-631, 1986.
- Wiltbank, J. N.; Roberts,S.; Nix, J.; Rowden, L.. 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.
- Yavas, Y.; Walton, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beef cows: A review. **Theriogenology**, v.54, p.25-55, 2000.

USO DE LA ECG ASOCIADO A PROGRAMAS REPRODUCTIVOS EN GANADO BOVINO

Lucas Cutaia¹³ y Gabriel A. Bó¹²

¹Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC),
Paraje Pozo del Tigre, Gral. Paz (5145), Córdoba, Argentina

²Instituto de Ciencias Básicas, Universidad Nacional de Villa María, Córdoba,
Argentina. ³Syntex SA
e-mail: lcutaia@syntexar.com

Resumen

La Gonadotropina Coriónica Equina (eCG) es una glicoproteína de alto peso molecular producida por las copas endometriales en la yegua entre los 35 y 100 días de gestación. Si se administra a las vacas, la eCG produce estimulación del desarrollo folicular, debido a que tiene la capacidad de unirse a los receptores de FSH y LH de los folículos. Se ha demostrado que el tratamiento con eCG incrementa el desarrollo del folículo dominante y la ovulación de un folículo más grande que resulta en un CL más grande y más funcional, que se cree que resulta en la supervivencia del embrión. En los programas de transferencia de embriones, el tratamiento de las receptoras con 400 UI de eCG en el momento aproximado de comienzo de la onda folicular resultó en un folículo ovulatorio de mayor tamaño y un aumento de tamaño del CL, con mayores concentraciones de progesterona (P4) en el día de la transferencia embrionaria y mayores tasas de preñez. En programas de IATF vacas de carne amamantado, la inclusión de 400 UI de eCG en el momento de la remoción de un dispositivo con P4 resultó en un aumento en las concentraciones plasmáticas de P4 y las tasas de concepción después de la IATF. Asimismo, en los rodeos de leche en pastoreo en Australia y Nueva Zelanda, la eCG aumentó las tasas de preñez a los 7 y 28 días de comenzado la estación de servicio, independientemente de que se hayan utilizado protocolos a base de benzoato de estradiol o GnRH. Sin embargo, en rodeos que producen más leche y manejados en sistemas mixtos, con folículos de mayor tamaño, la eCG aumentó las tasas de preñez en los protocolos a base de benzoato de estradiol pero no en los protocolos a base de GnRH. Recientemente, los efectos de la eCG administrada después de la IA ha sido investigada. Una dosis de 400 UI de eCG administrada 22 días después de la IA en vacas lecheras redujo la pérdida embrionaria. En otros estudios la eCG administrada 14 días después de la IATF aumento las tasas de preñez en *Bos taurus* x *Bos indicus* primíparas y vacas Polled Hereford en anestro postparto. En resumen, los resultados de varios estudios, tanto en vacas productoras de carne y leche demuestran que la adición de eCG a diferentes protocolos de sincronización del estro puede resultar en un aumento de crecimiento del folículo dominante y de la función de CL, y puede aumentar las tasas de concepción y preñez después de la IA o la transferencia de embriones. Los datos recientes también sugieren un efecto beneficioso de la eCG administrada después de la IA en la reducción de las

pérdidas embrionarias. Con la concepción y las tasas de preñez en continuo descenso esta revisión tiene como objetivo presentar datos y explorar estrategias para utilizar los beneficios potenciales de la eCG en la mejora de las tasas de preñez en vacas de leche.

Introducción

Las vacas lecheras son manejadas de manera distinta en el mundo. Los sistemas pastoriles (generalmente en Nueva Zelanda, Australia, algunos países de la Unión Europea y Sudamérica) suelen mantener un patrón de parición estacional. Las vacas que no mantienen un intervalo de parición anual suelen ser descartadas como no preñadas o inducidas al parto antes de término. Otra alternativa es servir a esas vacas en el siguiente periodo de servicio, en rodeos con dos estaciones de servicios, comunes en Australia y también utilizados en Argentina. Las vacas que se encuentran en sistemas estabulados (algunos países de la Unión Europea, Norteamérica, México, Chile y Brasil) y en sistemas mixtos (como los de Argentina), no necesitan un patrón de parición estacional y se trata de mantener un intervalo entre partos cercano a los 12-13 meses.

Teóricamente, mantener un intervalo de parición de 1 año para vacas muy productoras de leche puede resultar perjudicial porque las vacas tendrían que ser secadas cuando la producción de leche es todavía rentable. Sin embargo, mantener un intervalo entre partos de 12-13 meses se ha transformado en una utopía, debido a que en los últimos años se ha observado una constante caída de los índices reproductivos en las vacas lecheras (Lucy, 2001; Wiltbank et al., 2006). Esto está relacionado con un decaimiento en la fertilidad propia de las vacas lecheras de los tambos en todo el mundo y por la escasa eficiencia en la detección de celos (Thatcher et al., 2006).

Una solución inmediata a la disminución de fertilidad en rodeos lecheros incluye el uso de intervención hormonal. Se ha desarrollado una serie de tratamientos hormonales para controlar el momento de la primera IA y las inseminaciones posteriores en vacas no preñadas y para el tratamiento de vacas en anestro. Una de las hormonas que ha tenido mucha discusión en los últimos años es la Gonadotropina Coriónica Equina (eCG). La eCG es una glicoproteína de alto peso molecular producida por las copas endometriales en la yegua entre los 35 y 100 días de gestación (Murphy y Martinuk, 1991). Si se administra a las vacas, la eCG produce estimulación del desarrollo folicular, debido a que tiene la capacidad de unirse a los receptores de FSH y LH de los folículos. Se ha demostrado que el tratamiento con eCG incrementa el desarrollo del folículo dominante y la ovulación de un folículo más grande que resulta en un CL más grande y más funcional, que se cree que resulta en la supervivencia del embrión. Con la concepción y las tasas de preñez en continuo descenso esta revisión tiene como objetivo presentar datos y explorar estrategias para utilizar los beneficios potenciales de la eCG en la mejora de las tasas de preñez en vacas de leche.

Sistemas de sincronización del celo y de la ovulación

Control de la actividad luteal mediante el uso de agentes luteolíticos

Desde su utilización comercial como hormona interviniente en la lisis del cuerpo lúteo, sigue siendo la prostaglandina F_{2α} (PGF) la hormona más utilizada en el mundo para sincronizar el celo en vacas de carne y leche. La respuesta a la administración de la PGF será diferente en los distintos estadios del ciclo estral (Momont y Seguin, 1984). Del día 1 al 5 no se observa respuesta dado que se ha producido la ovulación y el cuerpo lúteo está en desarrollo. En los días 6 y 7, la respuesta es parcial, se está llegando al final del desarrollo del cuerpo lúteo. Entre los días 8 y 17, el cuerpo lúteo está desarrollado y es sensible al efecto luteolítico de la PGF y, por último, entre los días 18 a 21, el cuerpo lúteo ya se encuentra en regresión y el animal entrara en celo aunque no inyectemos la PGF.

En función de los conocimientos de la respuesta luteal a la PGF, se diseñaron diferentes protocolos para agrupar o sincronizar los celos. De esta manera se desarrolló un protocolo de sincronización de celos (*Target Breeding*TM o Reproducción Controlada) basado en un intervalo de 14 días entre las inyecciones de PGF (Ferguson y Galligan, 1983). Este protocolo se basa en tres administraciones de PGF, aplicando la primera de ellas 14 días previos al comienzo del servicio (dosis inicial). La segunda PGF (primera dosis de servicio), determina el comienzo de la detección de celo e IA. Luego de la última administración, se detecta celo e IA durante 3 días y a las 80 horas se realiza una IATF a toda hembra no detectada en celo (Nebel y Jobst, 1998). Actualmente se ha decidido alterar levemente este protocolo, obviando la utilización de la IATF debido a la baja fertilidad que se obtiene y se recomienda, como alternativa para las vacas que no fueron vistas en celo utilizar los protocolos de IATF que se describen más adelante en este artículo (revisado en Bó et al., 2007).

Control de la dinámica folicular y de la ovulación mediante el uso de la GnRH en combinación con PGF

Diferentes hormonas pueden ser utilizadas para controlar la dinámica folicular, de manera que el folículo ovulatorio que se obtenga luego de implementar un tratamiento para controlar el ciclo estral provenga de un folículo joven, es decir originado en una reciente onda de crecimiento folicular. Como fue mencionado, los diferentes esquemas que utilizan a la PGF para sincronizar los celos, no controlan la dinámica folicular. En consecuencia, se recurrió al uso de la GnRH asociada a PGF para

controlar la dinámica folicular, la actividad luteal y generar nuevos protocolos para controlar el ciclo estral.

La utilización de la GnRH para manipular el desarrollo folicular fue reportada originalmente por Macmillan y Thatcher (1991) y se basa en la inducción de un pico de LH y consecuentemente en la ovulación de un folículo dominante. Si la GnRH resulta en ovulación, se formará un cuerpo luteo accesorio y a su vez comenzará una nueva onda de crecimiento folicular 2 ó 3 días después, (Twagiramungu et al., 1995; Martinez et al., 1999). Esto luego derivó en el desarrollo del protocolo llamado Ovsynch (Pursley et al., 1995). El tratamiento consiste en la administración de un análogo de la GnRH (para sincronizar el desarrollo folicular), seguido de una inyección de PGF 7 días después (para inducir la luteólisis), una inyección de GnRH 48 a 56 h después de la PGF (para sincronizar la ovulación) e IATF a las 15 h de la segunda GnRH.

Los porcentajes de preñez obtenidos con el protocolo Ovsynch en vacas lecheras varían entre 30% a 55%. Los resultados de preñez han sido similares a los obtenidos con inseminaciones realizadas a las 12 h de observado el celo (Burke et al., 1996; De la Sota et al., 1998; Pursley et al., 1995, 1997; Stevenson et al., 1999; Thatcher et al., 2001, 2006) y por esta razón es el protocolo más utilizado en USA para la inseminación de vacas en lactancia (Caravielo et al., 2006).

A pesar que el tratamiento Ovsynch en vacas lecheras resultó en tasas comparables a las que se obtenían a celo detectado, se observó que la respuesta al tratamiento estaba ligada principalmente a la efectividad de la primera GnRH en inducir la ovulación del folículo dominante (Vasconcelos et al., 1999). Para evitar la variabilidad en la respuesta se desarrolló un protocolo llamado Presynch en el cual los animales reciben una inyección de PGF 12 días antes de iniciar el protocolo Ovsynch o dos inyecciones cada 14 días, siendo la segunda de éstas administrada 12 días antes del inicio del protocolo (Moreira et al., 2001). En general se ha encontrado una mejoría en la fertilidad de vacas en lactancia de 12% a 14% con este protocolo (Moreira et al., 2001; Thatcher et al., 2006). También se ha alterado el intervalo entre la PGF y la segunda GnRH y actualmente se sugiere administrar la GnRH a las 56 h de la PGF y realizar la IATF 12 a 15 h después.

Tratamientos utilizando dispositivos intravaginales con progesterona

Actualmente, existen varios dispositivos intravaginales con progesterona en el mercado internacional. Desde que se crearon estos dispositivos se han desarrollado protocolos de 7 u 8 días de duración. El tratamiento va a variar en las distintas regiones del mundo de acuerdo a la disponibilidad de los fármacos. Por ejemplo el tratamiento

más utilizado en Sudamérica, Australia y Nueva Zelanda (NZ hasta el año 2007) consiste en administrar 2 mg de EB al momento de la inserción del dispositivo (Día 0), remover el dispositivo en el Día 7 u 8 y administrar PGF. Veinticuatro horas después se administra 1 mg de EB para sincronizar la ovulación y la IATF se realiza a las 54-56 horas pos-remoción. Estos protocolos han sido utilizados por productores lecheros en diversas partes del mundo con porcentajes de preñez que oscilan entre el 35 y 55%, encontrándose muy influenciado por la condición corporal, los días de lactancia y la producción de las vacas.

En las regiones del mundo donde los estrógenos no están autorizados como Norteamérica y Europa (desde Agosto del 2007 Nueva Zelanda) se utilizan los dispositivos con progesterona en asociación con el protocolo Ovsynch para mejorar la fertilidad de las vacas que todavía no han comenzado a ciclar al comienzo del período de servicio (llamadas vacas en anestro anovulatorio). El anestro es un problema común en los sistemas de producción lechera. Aproximadamente el 20 a 40% de las vacas en sistemas de producción pastoril se encuentran en anestro al comienzo de la temporada de servicio (Rhodes et al., 2003). En un estudio de vacas en los Estados Unidos, se encontró que el 28% de las vacas primíparas y el 15% de las multíparas no habían ovulado a los 60 días posparto (Gumen et al., 2003). En el Reino Unido, el 11% de las vacas no había ovulado a los 44 días posparto (Lamming and Darwash, 1998).

En un trabajo realizado por Pursley et al. (2001) los índices de concepción en vacas tratadas con Ovsynch + un dispositivo con progesterona fueron superiores a la de aquellas tratadas con Ovsynch (41% vs. 51%; n=634). Es interesante mencionar, que no hubo diferencias en los índices de concepción entre Ovsynch y el Ovsynch + progesterona en vacas que estaban ciclando. Sin embargo, los dispositivos con progesterona aumentaron notablemente los índices de preñez en vacas que no estaban ciclando (34,7% vs. 55,2%; n=182). Por lo tanto, la inclusión de un dispositivo con progesterona puede aumentar la fertilidad en vacas de leche en lactancia que no están ciclando.

Se realizó un trabajo con el objetivo de evaluar el tratamiento con dispositivos con progesterona en combinación con GnRH para sincronizar vacas en lactancia (Veneranda et al., 2006). Se utilizaron 400 vacas Holando Argentino pertenecientes a Los Lazos SA, en las localidades de Totoras, Sta. Fe y El Fortín, Córdoba. Los animales utilizados tenían una CC promedio de $3,0 \pm 0,25$ (Escala 1-5), con $58,0 \pm 11,6$ días en leche y una producción promedio de $31,1 \pm 6,6$ litros diarios. Las vacas fueron distribuidas al azar y en función de los datos anteriormente descriptos en 4 grupos de tratamiento en un diseño 2x2 factorial. La mitad de las vacas recibieron un dispositivo con progesterona (DIB, 1 g de progesterona, Syntex SA) por 7 días, junto con la aplicación de una dosis de GnRH en el momento de colocado el dispositivo y una

segunda dosis a las 48 h de retirado el dispositivo. Se aplicó una dosis de PGF cuando se sacó el dispositivo y las vacas fueron IATF a las 60 h de retirado el dispositivo. La otra mitad de los animales recibieron un DIB por 8 días combinado con 2 mg de EB en el momento de la inserción. Se aplicó una dosis de PGF en el momento del retirado el dispositivo y 1 mg de EB 24 h más tarde. Todos los animales fueron IATF a las 60 h retirado el DIB. Cada grupo (P4+EB o P4+GnRH) fue subdividido para recibir o no 400 UI de eCG (**Novormón, Syntex, Argentina**) en el momento de retirado el dispositivo. Los diagnósticos de preñez se realizaron por palpación rectal entre los 45 y 50 días pos-IATF. Los porcentajes de preñez fueron comparados por regresión logística. Se obtuvo un mayor porcentaje de preñez en las vacas tratadas con eCG y EB que en las no tratadas con EB (44,9 vs 30,0%, respectivamente) y los tratamientos con GnRH no difirieron significativamente (GnRH 37,0% y GnRH+eCG 30,0%).

A partir de la obtención de estos resultados, realizamos un segundo experimento con el objetivo de determinar si la diferencia numérica encontrada en los tratamientos P4+EB+eCG y P4+GnRH (sin eCG) se mantenía. Como objetivo secundario de este segundo experimento se compararon las tasas de preñez obtenidas con un dispositivo intravaginal DIB y un CIDR (Pfizer, Salud Animal, 1,9 g de progesterona). En este experimento se utilizaron 200 vacas Holstein en lactancia, de características similares a las del experimento anterior. Se utilizó un diseño 2x2 factorial. Inicialmente las vacas se dividieron al azar en dos grupos de tratamiento (EB+eCG o GnRH) y las vacas fueron IATF a las 60 h de retirado el dispositivo y el diagnóstico de preñez se realizó a los 50 días de la IATF por palpación rectal. No se encontraron diferencias significativas en las tasas de preñez ($P=0,4$) entre las vacas en la que se utilizó un DIB (51%) o CIDR (42%), a su vez las tasas de preñez no difirieron ($P=0,18$) entre las vacas tratadas con EB+eCG (52,0%) o GnRH. (41,0%). Sin embargo si sumamos los datos de los dos experimentos las tasas de preñez en las vacas del tratamiento utilizando EB+eCG es significativamente mayor.

Debido a que el tratamiento de pre-sincronización ha mostrado un incremento en la tasa de preñez de los protocolos Ovsynch (Moreira et al. 2001), Se diseñó un experimento para comparar las tasas de preñez en vacas tratadas con un programa pre-synch modificado con los tratamientos evaluados en los trabajos anteriores (P4+EB+eCG y P4- synch) (Veneranda et al. 2008). Se utilizaron 500 vacas del mismo establecimiento que los estudios anteriores. Los animales utilizados estaban entre 30 y 51 d postparto (cuando se le aplicó el tratamiento con PGF al grupo pre-synch), con una producción de leche promedio de 29.5 ± 7.0 Kg diaria (rango de 13.0 a 46.0 Kg) y una CC entre 2.5 y 3 de escala 1-5. Las vacas se agruparon por los días postparto y se asignaron aleatoriamente en 5 grupos de tratamiento. El grupo Pre-synch recibió PGF 28 y 14 días antes de la inserción del dispositivo DIB y 50 μ g de Lecirelina (GnRH) im (Día 0). El Día 7 se removió el dispositivo y se aplicó PGF. El día 9, todas las vacas recibieron un segundo tratamiento con GnRH y fueron IATF 16 h más tarde (60 de

retirado el dispositivo). Los animales del grupo pre-synch+P4 fueron tratados de manera similar excepto que recibieron el dispositivo durante 7 días anteriores a la segunda inyección de PGF, y no tenían el dispositivo cuando se inyectó la primera GnRH. Las vacas en el grupo P4-Synch fueron tratadas como las del grupo pre-synch pero no recibieron las dos dosis de PGF 28 y 14 días antes. Las vacas de los dos últimos grupos recibieron un DIB y 2 mg de EB el Día 0. El Día 8, se removió el dispositivo y se inyectó PGF y 400 UI eCG IM. Las vacas del grupo P4+EB+eCG+EB recibieron 1 mg de EB el día 9, mientras que las del grupo P4+EB+eCG+GnRH recibieron GnRH el día 10. Todas las vacas fueron IATF 60 h de removido el dispositivo. El diagnóstico de preñez se realizó a los 50 días de la IATF por palpación rectal y los datos fueron analizados por regresión logística.

Como muestra la Figura 1, los dos grupos tratados con P4, EB y eCG tuvieron las mayores tasas de preñez y el grupo en el cual el dispositivo fue insertado antes de las segunda PGF (Pre-synch+P4) tuvo la menor tasa de preñez. Las tasas de preñez de los otros grupos fueron intermedias y no tuvieron diferencias con los extremos.

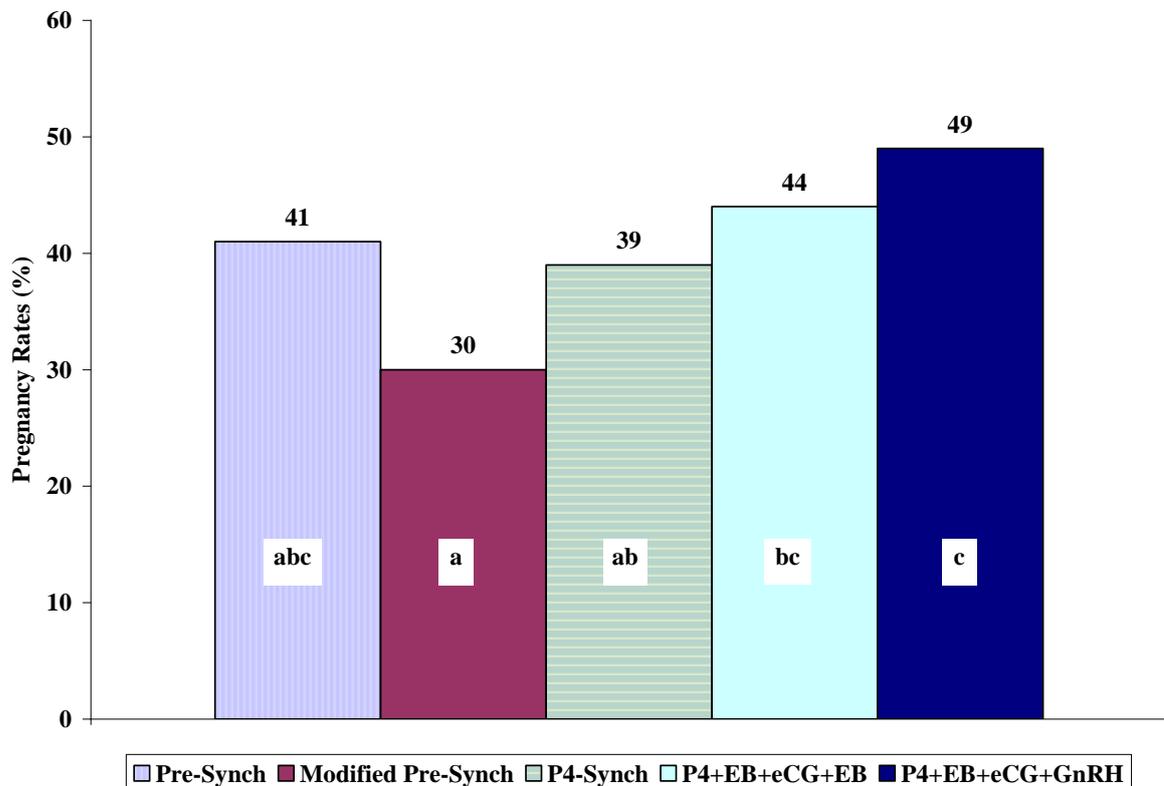


Figura 1. Tasas de preñez de vacas en lactancia tratadas con diferentes protocolos de IATF. Los porcentajes con letras diferentes tienen diferencia significativa ($P < 0.05$)

Los resultados de estos experimentos sugieren que la adición de eCG incrementaría las tasas de preñez con IATF en vacas lecheras en ordeño en sistemas mixtos. Cuando se toman los tres experimentos juntos, las tasas de preñez son significativamente mayores ($P < 0.008$) en el tratamiento P4+EB+eCG (145/298; 48.7%) que en el tratamiento Pre-synch (117/298; 39.3%). A la inversa, eCG no incrementó las tasas de preñez en las vacas que recibieron GnRH en el momento de inserción del dispositivo con progesterona, esto probablemente se deba a las diferentes dinámicas foliculares entre vacas tratadas con EB y las tratadas con GnRH. Es necesario realizar estudios para investigar el intervalo más apropiado entre la administración de GnRH y el tratamiento con eCG en vacas lecheras en lactancia.

Además de los resultados observados en los sistemas mixtos de Argentina, el tratamiento de vacas lecheras con eCG junto con dispositivos con progesterona y EB ha sido también estudiado en un sistema de producción intensivo en Brasil y en sistemas estacionales de Argentina y Nueva Zelanda. El objetivo del estudio realizado en Brasil fue evaluar los efectos de la eCG y cipionato de estradiol (ECP) sobre el pico de la LH y la tasa de concepción en vacas Holstein de alta producción sincronizadas con protocolos para IATF (Souza et al., 2009). Las vacas estaban produciendo 36.2 ± 0.4 Kg/día con 151.6 ± 3.5 días en lactancia. El mismo tratamiento hormonal fue utilizado en 22 tambos (intensivos). El Día 0, todas las vacas recibieron 2 mg de EB (Estrogin, Farmavet, Brasil) y un dispositivo de progesterona (CIDR, Pfizer Animal Health, Brasil). El Día 8, se removieron los CIDR y se inyectó PGF (Lutalyse, Pfizer Animal Health, Brasil). Las vacas fueron aleatoriamente asignadas a 1 de los 4 grupos de tratamientos. Grupo 1: eCG (400 UI; Folligon, Intervet, Brasil) + ECP (1 mg) el Día 8; Grupo 2: eCG el día 8 + GnRH (Fertagyl, Intervet, Brasil) a las 48 h ; Grupo 3: ECP (1 mg) el Día 8 y Grupo 4: GnRH a las 48 h. En la fase I ($n=31$), se realizó ultrasonografía cada 12 hs y se tomaron muestras de sangre cada 4 hs desde las 30 h a las 60 h de removido el CIDR. En la fase II, un estudio a campo ($n=782$) fue realizado con los mismos tratamientos hormonales. Todas las vacas fueron inseminadas 56 a 58 luego de remover el CIDR. Se realizó el diagnóstico de preñez 30 a 40 días después de IATF mediante ultrasonografía. A pesar del uso de diferentes drogas para inducir la ovulación al final de los tratamientos hormonales (EPC vs GnRH), no hubo diferencias en las características del pico preovulatorio de LH entre los grupos experimentales (media 43.5 ± 1.5 h de removido el CIDR). Las tasas de preñez en el Grupo 1 (29.1%), Grupo 3 (30.9%) y Grupo 4 (28.9%) no difirieron. En contraste, las vacas del Grupo 2 tuvieron una mayor tasa de preñez (33.8%) que las del Grupo 4 ($P=0.02$). Además, las diferencias en las tasas de preñez fueron más evidentes entre las vacas con la menor CC (< 2.75); éstas fueron mayores en las vacas tratadas con eCG (44.4%) que en las no tratadas con eCG (6.1%; $P < 0.05$). Por el contrario, las tasas de preñez no difirieron en las vacas con CC > 2.75 y tratadas (32.1%) o no tratadas (33.5%) con eCG. Estos resultados sugieren que la eCG incrementa la tasa de preñez en vacas de alta producción, especialmente en aquellas con baja CC.

Otro experimento fue realizado en un tambo, con partos estacionados en Argentina (Mian, 2007). Se utilizaron vacas (n=81) Holstein y Holstein x Jersey con una CC de 2.7 ± 0.3 (escala 1 a 5), produciendo 21.8 ± 5.1 kg de leche y 132.8 ± 86.2 días en lactancia. Se formaron grupos según días en lactancia y se asignaron aleatoriamente a 1 de los 2 grupos de tratamientos. El Día 0, las vacas recibieron un DIB y 2 mg de EB i.m. El día 8, se removieron los DIB; se inyectó PGF y se subdividieron los grupos para recibir 400 UI eCG o no ser tratadas en ese momento. El Día 9, todas las vacas recibieron 1 mg de EB y fueron IATF 54 a 56 h luego de removido el dispositivo. Con el fin de hacer el diagnóstico de preñez, las vacas se examinaron 35 d después de la IATF con ultrasonografía. La tasa de preñez fue significativamente mayor en las vacas tratadas con eCG (21/46, 45.6%) que en las no tratadas con eCG (8/35, 22.8%; $P < 0.05$).

Finalmente, se diseñó un experimento en Nueva Zelanda para comparar la respuesta reproductiva de vacas lecheras en un sistema pastoril con partos estacionados (Bryan et al., 2010). Las vacas estaban en anestro anovulatorio, diagnosticado por palpación rectal. Se asignaron dos tratamientos. Se realizó el experimento en 6 tambos comerciales. Se les pinto la cola a todas las vacas por 3 semanas y fueron seleccionadas aquellas que no manifestaron comportamiento de celo con ausencia de CL determinada por palpación rectal 7 días antes del estipulado para comenzar con la aplicación (PSM). Todas las vacas recibieron un dispositivo intravaginal con 1.56 g de progesterona (Cue-Mate, Bioniche Animal Health) por 8 d, y 2 mg de EB en ese mismo momento (Día 0) y 1 mg de EB 24 h después de remover el dispositivo (Día 9). Aproximadamente la mitad de las vacas fueron asignadas, aleatoriamente, para recibir 400 UI de eCG (Pregnecol, Bioniche Animal Health) el día de la remoción del dispositivo (Día 8). Todas las vacas fueron observadas y fueron IA 12 h después del celo, las que no manifestaron celo fueron IATF a las 36 h de la dosis de EB (60 hs de removido el dispositivo). Los resultados considerados fueron tasa de concepción en las primeras 48 h, y tasa de preñez a los 7 y 28 días. Las vacas tratadas con eCG fueron las que mejor concibieron en las primeras 48 h (eCG: 48.9%; n = 432 vs No eCG: 43.1%; n = 420; $P = 0.059$); y tuvieron una mayor tasa de preñez a los 7 días de finalizado el tratamiento (eCG: 47.3%; n = 488 vs No eCG: 41.7%; n = 503; $P = 0.073$). El efecto de la eCG fue mayor en vacas con más de 5 años de edad, dado que las mismas tuvieron significativamente más posibilidad de concebir dentro de 48 h ($P = 0.003$; RR 1.52; 95% CI: 1.15 a 2.01) o dentro de 7 días ($P = 0.002$; RR 1.44; 95% CI: 1.42 a 1.82). Además, las vacas mayores a 5 años tratadas con eCG tuvieron significativamente más probabilidad de estar preñadas a las 4 semanas ($P = 0.02$; RR 1.21; 95% CI: 1.03 a 1.43). Se concluyó que agregar 400 UI de eCG el día 8 al régimen estándar de progesterona y EB, incrementa la probabilidad de preñez dentro de 48 h y 7 días, especialmente en vacas con más de 5 años de edad. Este experimento es particularmente importante en tambos con servicio estacionado, donde es esencial que las vacas conciban dentro de los primeros 90 días posparto, para lograr el objetivo de un ternero

anual. Las tasas de anestro en algunos rodeos pueden llegar a ser altas y un incremento del 5% en la tasa de concepción, adicionando eCG, es de mucha importancia.

Tratamientos con eCG en programas Ovsynch en rodeos lecheros estacionales

Como se mencionó anteriormente, en varios países el uso de esteroides de estradiol en combinación con dispositivos de liberación de progesterona ha sido el tratamiento de elección para sincronizar el estro en vacas de carne y leche, especialmente en anestro posparto. Sin embargo, su uso se ha restringido recientemente en países como USA, Nueva Zelanda y la Unión Europea. Esta restricción ha creado un serio dilema y la necesidad de desarrollar tratamientos que no impliquen el uso de esteroides de estradiol.

La opción más obvia fue evaluar el uso de los programas de sincronización con GnRH, con o sin la adición de un dispositivo liberador de progesterona, para el tratamiento del anestro posparto. En un estudio reciente, la proporción de vacas lecheras en anestro que concibió a un programa Ovsynch fue significativamente menor a la obtenida en un programa Ovsynch combinado con la inserción de un dispositivo liberador de progesterona entre la primera inyección de GnRH y en el momento de la PGF (33,9% vs 45,7%, respectivamente; McDougall 2008). Sin embargo, esta diferencia inicial no se mantuvo después que las vacas no preñadas a la primera IA retornaron al celo, ya que no se encontraron diferencias significativas en las tasas de preñez en 21 días y 42 días de comenzado el servicio.

Se realizó un trabajo para evaluar el efecto de la adición de eCG a los programas de sincronización con GnRH en vacas en anestro anovulatorio (Bryan et al., 2009). Vacas de quince establecimientos lecheros de Nueva Zelanda (n = 1991) fueron seleccionadas para su inclusión en base a no haber presentado celo por 7 días antes del comienzo del servicio (PSM) y con diagnóstico de anestro anovulatorio mediante la palpación rectal en el comienzo del experimento. Las vacas fueron incluidas para el tratamiento de acuerdo con el protocolo del ensayo (2 x 2 factorial). En el Día 0, todas las vacas recibieron un dispositivo intravaginal Cue-Mate y una inyección de 100 µg gonadorelina (1 ml Ovurelin, Bomac Laboratories, Nueva Zelanda) y fueron asignadas al azar para que el dispositivo fuera retirado y se inyectaran 500 µg de cloprostenol (Ovuprost, Bomac) en los Días 6 ó 7. Dentro de cada grupo las vacas fueron nuevamente subdivididas para recibir 400 UI de eCG (Pregnecol) o no recibir eCG (control). Todas las vacas fueron inseminadas 12 horas después de la observación del celo y las que no se detectaron en celo, recibieron una segunda inyección de gonadorelina entre 52 y 70 h después de la remoción del dispositivo Cue-Mate y fueron IATF a las 72 horas después de sacar el dispositivo. Los parámetros considerados fueron el porcentaje de vacas preñadas en los primeros 7 y 28 días de la estación servicio y los días a la concepción. No hubo diferencias significativas entre los

programas 6 ó 7 días y no hubo interacción entre la duración del tratamiento y el tratamiento con eCG. Sin embargo, la inclusión de la eCG en ambos grupos aumentó significativamente la tasa de preñez a los 7 (P = 0,046) y 28 días de la estación de servicio (P = 0,008) y disminuyó significativamente la mediana de días a la concepción (P = 0,005). En general, el tratamiento con eCG aumentó la tasa de preñez a los 28 días de servicio del 50,4% a 56,2%. Estos resultados confirman que la adición de eCG en protocolos de sincronización para las vacas en anestro tiene un valor significativo para conseguir más vacas preñadas al inicio de la temporada de servicio. Los datos están indicados en la Figura 2.

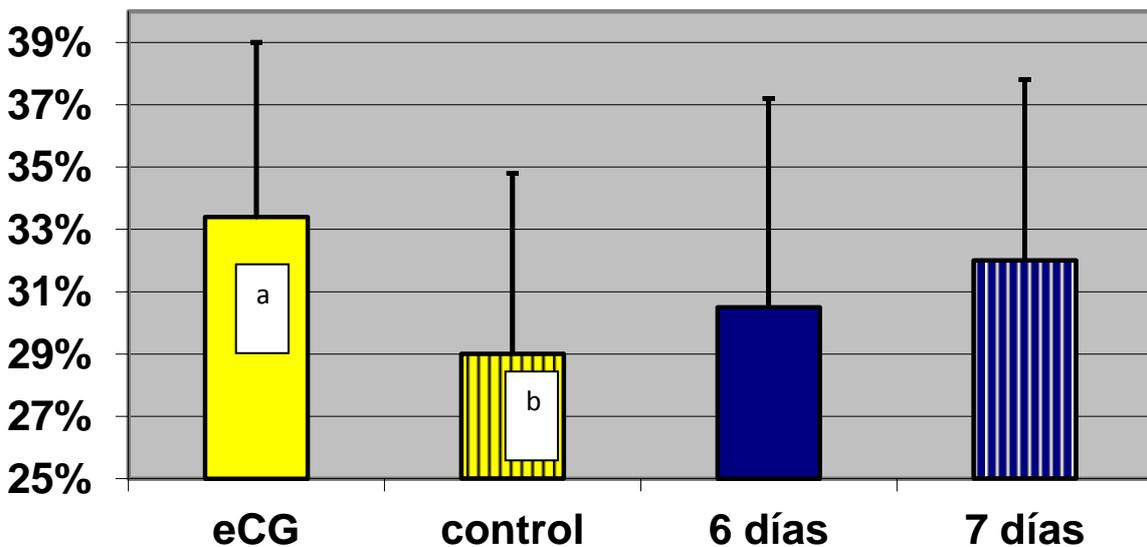


Figura 2. Tasas de concepción en vacas lecheras en anestro tratadas con protocolos Ovsynch de 6 o 7 días con la adición de eCG (eCG) o sin la adición de eCG (control). ab P<0,05.

Más recientemente, se ha utilizado eCG en un rebaño estacional en Australia. Bajo las condiciones de Australia, el protocolo GPG (Ovsynch) ha resultado en tasas de concepción del 25-40%, que se considera bajo por muchos productores y veterinarios. Se ha demostrado que el tamaño del folículo influye en las tasas de preñez y la supervivencia de los embriones (Gumen et al., 2003, Vasconcelos et al., 2001). Bello et al. (2006) demostraron que el tamaño del folículo en el momento de la segunda GnRH en un programa de GPG era un predictor significativo de la probabilidad de preñez 35 días después de la IA. Los mecanismos por los cuales la eCG podría aumentar la fertilidad en un programa de GPG incluyen el aumento del tamaño del folículo ovulatorio y de la capacidad de ovular después de la segunda GnRH. Beggs y Kelly (2010) plantearon la hipótesis que la adición de eCG a un programa estándar de GPG podría mejorar las tasas de preñez de una forma rentable cuando se utiliza para sincronizar todo el rebaño de vacas lecheras al comienzo de la estación de servicios. Todas las vacas que parieron más de 30 días antes del comienzo de la IA se incluyeron

en el estudio (n = 508). Las vacas se dividieron en grupo control (n = 255) y tratamiento (n = 253). Todas las vacas recibieron 100 µg de GnRH en el Día 0, PGF en el Día 7, 100 µg de GnRH el Día 9. Las vacas fueron inseminadas siguiendo la regla AM / PM si se observaban en celo y los que no se observaron en celo fueron IATF por la mañana el Día 10 (12 h después de la segunda GnRH) y fueron inseminadas en ese momento. Las vacas del grupo de tratamiento recibieron 400 UI de eCG (Pregnenol) en el momento de la inyección de PGF en el Día 7. En el momento de la primera inyección de GnRH, las vacas fueron clasificadas, en las que se encontraban ciclando o en anestro sobre la base de la pintura en la cola (no por palpación rectal). Las tasas de preñez fueron determinadas por ultrasonido, tanto entre las 7 y 14 semanas después de la IATF. El tratamiento con eCG tendió a aumentar la tasa de preñez (P=0,11) al primer servicio (28,2% vs 34,8%, n = 508) y este efecto fue significativo (P <0,05) en vacas de más de 5 años de edad (18,7% vs 33,8% n = 140). Sin embargo hubo un aumento estadísticamente significativo de la preñez a los 25 días de haberse comenzado el servicio en un 28% (41,2% a 52,6%) y a las 6 semanas del comienzo del servicio en casi el 25% (47,5% a 58,9%). Este estudio es importante, ya que también demostró un aumento significativo la tasa de preñez a las 6 semanas de haberse comenzado el servicio en un 19% (55,1% a 65,8%, n = 233) debido al uso de eCG en vacas que estaban en ciclando en el momento del tratamiento.

Parece que la eCG tuvo un efecto positivo no sólo sobre la tasa de concepción al primer servicio, pero también en la tasa de retorno de las vacas que no concibieron a la primera inseminación. Esto resultó en un aumento del número de vacas preñadas para el Día 25 de comenzado el servicio. También parece que las vacas más viejas y las vacas que estaban con un menor período post-parto pueden recibir un mayor beneficio por el uso de la eCG, un hallazgo reportado previamente por Bryan et al. (2010). Aunque puede haber beneficios, los resultados de este estudio piloto deben ser interpretados con precaución. Se debe comprobar todavía si la adición de un dispositivo liberador de progesterona en el presente protocolo permite tener un beneficio adicional, especialmente en las vacas que no ciclan o que están en el periodo post-parto temprano.

Aplicación de eCG en programas Ovsynch en rodeos lecheros de parición continua en Argentina

Se realizaron dos experimentos con el objetivo de evaluar el efecto de la adición de eCG en protocolos Ovsynch con dispositivos con progesterona sobre la dinámica folicular y luteal y las tasas de preñez en vacas Holando Argentino en lactancia. En el experimento 1, se utilizaron 40 vacas Holando Argentino con $65,0 \pm 3,6$ días en lactancia, una condición corporal de $2,9 \pm 0,1$ (escala del 1 al 5) y produciendo $32,3 \pm 3,1$ litros de leche. En el Día 0, todas las vacas recibieron un dispositivo Cue-Mate más 0.05 mg de Lecirelina (GnRH, Biosin-OV, Biotay, Argentina). En el Día 6 se dividieron las

vacas en dos grupos, a las cuales se les extrajo el Cue-Mate y aplicó 0.15 mg de D (+) cloprostenol (PGF, Bioprost-D, Biotay) en ese mismo momento (Grupo 6 días) o 24 h después (Grupo 7 días). A su vez, cada grupo fue subdividido (2 x 2 factorial) para recibir o no recibir 400 UI de eCG (Pregnenol) en el momento de la remoción del Cue-Mate. Todas las vacas recibieron una segunda GnRH a las 56 h del retiro del Cue-Mate. Las vacas fueron examinadas diariamente desde el Día 0 al día de la aplicación de la segunda GnRH por ultrasonografía transrectal para determinar la tasa ovulatoria a la primera GnRH. Luego se hizo ultrasonografía cada 8 h para determinar las características del folículo preovulatorio. Se tomaron muestras de sangre con heparina para la determinación de progesterona por RIA (DPC Diagnostics Corp., USA). En Día 0, 32/40 de las vacas se encontraban con un CL. La ovulación a la primera GnRH fue de 75% (30/40), sin diferencias entre los grupos ($P=0,45$). Tampoco hubo diferencias entre las vacas tratadas o no con eCG en las características del folículo ovulatorio ($17,1\pm 0,4$ mm vs $16,2 \pm 0,5$ mm; $P>0,14$) y la fase luteal ($7,6\pm 0,5$ vs $7,1\pm 0,5$ ng/mL de progesterona; $P>0,6$). En el experimento 2, se utilizaron 453 vacas en lactancia del mismo establecimiento de las utilizadas en el experimento 1. Las vacas fueron ubicadas al azar en los mismos grupos de tratamiento. Todas las ITAF fueron realizadas a las 72 h de la remoción del Cue-Mate y la tasa de preñez fue diagnosticada por ultrasonografía a los 30-45 días de la IATF. En este caso las vacas sincronizadas con el tratamiento de 7 días se preñaron más (86/227; 38%) que las sincronizadas por el tratamiento de 6 días (61/226; 27%; $P<0,01$). Sin embargo no hubo diferencias entre las vacas tratadas con eCG (75/227; 33%) y las no tratadas con eCG (72/226; 32%; $P>0,8$). Los resultados de este trabajo no mostraron efectos significativos de la adición de eCG en un protocolo Ovsynch con dispositivos con progesterona en vacas Holando Argentino cíclicas y con una mayor producción de leche que las vacas utilizadas en los rodeos estacionales en Australia y Nueva Zelanda.

Nuevos Tratamientos Para Disminuir la Mortalidad Embrionaria en Vacas de Carne y Leche

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 lactación, 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 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 Disminuir 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 sobrevivencia del embrión y disminuir la mortalidad embrionaria podría ser las administraciones 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 ácido linolénico) 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).

Destete Temporario, Enlatado y eCG en Vacas con Cría

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

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

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

^{a,b} Valores totales en la misma fila que tienden a ser diferentes ($P=0,07$).

^c Valores totales en la misma columna que no difieren ($P=0,3$).

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

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

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

^{a b} Valores totales en la misma fila con diferentes superíndices difieren ($P < 0,05$).

^{c d} Valores totales en la misma columna con diferentes superíndices difieren ($P < 0,05$).

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

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

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

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

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

^a Valores totales en la misma fila no difieren ($P=0,82$).

^{b,c} Valores totales en la misma columna con diferentes superíndices difieren ($P=0,03$).

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

Si bien ensayos previos han mostrado que la eCG asociada a un tratamiento para IATF incrementa la tasa de preñez, en vacas de razas británicas no se ha documentado aún con claridad el mecanismo involucrado. El objetivo de este experimento, fue evaluar el efecto de la eCG al finalizar un tratamiento para IATF, sobre la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (CL) en vacas de carne en anestro postparto. Se utilizaron vacas multíparas Hereford ($n=46$) con 60 a 75 días posparto y una condición corporal (CC) de 3,5±0,1 (Media±ES, escala 1 a 8). Todas las vacas se encontraban en anestro con ausencia de CL determinado por ecografía diaria durante los 10 días previos al

inicio del tratamiento. El diámetro folicular, el peso y la condición corporal fueron considerados para el diseño balanceado de los grupos experimentales. Todas las hembras recibieron un tratamiento para IATF utilizando un dispositivo intravaginal con 0,5 g de progesterona (DIB 0,5, Syntex, Argentina) durante 8 días asociado a una dosis im. de 2 mg de benzoato de estradiol (Benzoato de Estradiol, Syntex) al momento de colocar el dispositivo. Al retirar el dispositivo se administró 500 µg de cloprostenol (Ciclase DL, Syntex) y 0,5 mg de cipionato de estradiol (Cipiosyn, Syntex) por vía im. En este momento un grupo experimental recibió una dosis im. de 400 UI de eCG ($n=23$; **Novormon, Syntex**) mientras que otro grupo no recibió eCG ($n=23$). La inseminación se realizó entre las 52 y 56 hs luego del retiro del dispositivo. Los terneros recibieron una tablilla nasal el día que se colocó el dispositivo a sus madres hasta la IATF. La dinámica folicular, el desarrollo ovulatorio y el tamaño del cuerpo lúteo fueron monitoreados diariamente por ultrasonografía transrectal (Well D, WED 9618, China) desde el retiro del DIB hasta 14 días luego de la IATF. La tasa de ovulación (vacas que ovularon/vacas sincronizadas), fue comparada por Chi cuadrado, y las demás variables mediante ANOVA. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 1. Desarrollo del folículo ovulatorio y área del cuerpo lúteo luego de una dosis de eCG al retirar el DIB en vacas de carne en anestro.

	Tasa de ovulación (%)	Diám. Folic al retiro DIB (mm)	Diám. Folic. a la ovul. (mm)	Tasa de crecim.Folic.* (mm/día)	Interv. a la ovul. (hs)	Area de CL** (cm ²)
Con eCG	65,2% (15/23) ^a	11,5±0,5 ^a	14,5±0,4 ^a	1,4±0,2 ^c	78,4±3,7 ^a	3,4±0,3 ^a
Sin eCG	34,8% (8/23) ^b	10,9±0,6 ^a	12,9±0,6 ^b	0,9±0,2 ^d	81,0±4,4 ^a	2,6±0,2 ^b

Diferentes superíndices para cada columna, a vs. b ($P < 0,05$); c vs. d ($P < 0,1$).

*Desde el retiro del DIB a la ovulación.

**Desde el Día 6 al 14 luego de la IATF.

eCG Como Estrategia Para Minimizar las Pérdidas Embrionarias

La Gonadotrofina Coriónica Equina (eCG) es una glicoproteína 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 serie 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 4. Efecto del tratamiento 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 días 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 5 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 5. 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
<u>Treatment</u>						
Control	28.7 ^a	29/101	23.8 ^a	24/101	17.2 ^a	5/29
eCG	38.7 ^b	36/93	37.6 ^b	35/93	2.7 ^b	1/36

P<0,05

Recientemente se finalizó otro estudio con el objetivo de evaluar el efecto de la aplicación de eCG en el día 18±1 post IA sobre la tasa de concepción en vacas lecheras. Se utilizaron vacas lecheras en producción n=327 de 2 rodeos comerciales ubicados en Lincoln, Bs. As. En el rodeo A (n= 78), las vacas fueron IATF. En el rodeo B (n=249), las vacas fueron inseminadas celo detectado (IACD; n=185) post administración de cloprostenol (0,15 mg, D-cloprostenol, Enzaprost®, Biogénesis-Bagó, Argentina), y las que no fueron IACD fueron IATF posteriormente (n=64). En ambos casos, la IATF se realizó luego de controlar la ovulación con el protocolo tradicional que utiliza dispositivos intravaginales con progesterona (1 g P₄, DIB®, Syntex, Argentina) y benzoato de estradiol (3 mg totales, Bioestrogen®, Biogénesis-Bagó, Argentina). En el día 18±1 post IA, las vacas (n=156) fueron distribuidas al azar para recibir 400 UI de eCG (Novormon®, Syntex, Argentina) o permanecer como controles no tratados (n=171). Se realizó diagnóstico de gestación el día 38±1 post IA por palpación transrectal. Los datos de analizaron por regresión logística múltiple con eliminación manual paso a paso de las variables. El modelo estadístico para tasa de concepción al

día 38 incluyó como variables clasificatorias: rodeo, número de parto, tratamiento con eCG, toro, tipo de inseminación; y como covariables continuas: producción de leche último control y días en leche. Variables con $P < 0,05$ fueron consideradas significativas. Mientras que las vacas tratadas con eCG tuvieron la misma concepción que las controles en el rodeo B, las vacas tratadas en el rodeo A tuvieron mayor concepción (interacción tratamiento con eCG por rodeo, $P = 0,043$, ver gráfico 1). El resto de las variables no tuvo efecto sobre la variable de respuesta. Se pudo concluir que tanto la concepción como el mantenimiento de la preñez son procesos multifactoriales que varían entre rodeos, así como también la respuesta a la eCG post IA. Futuros estudios son necesarios para investigar otros efectos de la eCG sobre la concepción y mantenimiento de la preñez.

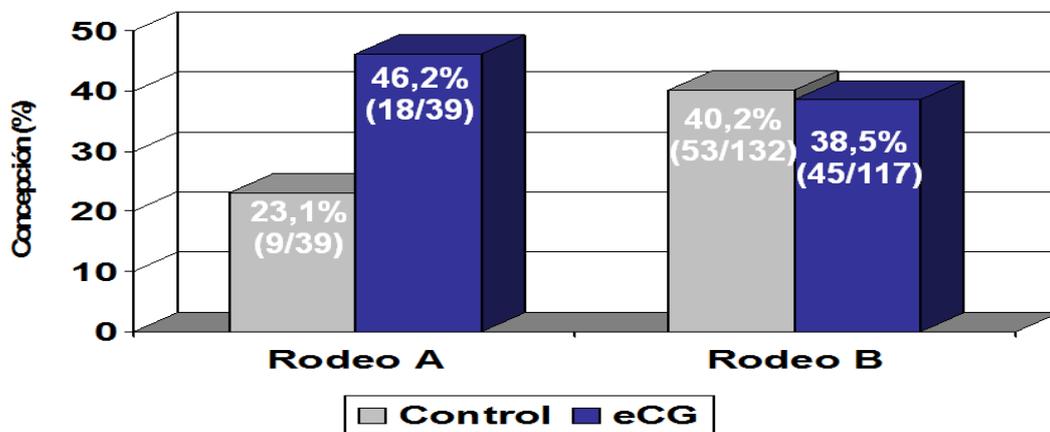


Gráfico 3: Interacción entre Rodeo y Tratamiento con eCG ($P = 0,043$)

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 serie de experimentos diseñados con ese objetivo. Asimismo se encuentran ejecución experimentos orientados a determinar el efecto del tratamiento en novillas y receptoras de embriones.

Conclusiones

Una mayor producción de leche en vacas modernas ha llevado a tasas reducidas de concepción y a una mayor demanda de nuevas herramientas para el manejo de la reproducción. En el futuro, los programas de manejo reproductivo deberán adaptarse a cada establecimiento. La tendencia es que los rodeos sean cada vez más grandes, la

mano de obra menos capacitada y los márgenes de ganancia más pequeños. Por lo tanto la necesidad de capacitación y tecnificación será crítica para tener éxito. La investigación del control hormonal del ciclo estral y, específicamente, los patrones de ondas foliculares ha mejorado la base de conocimiento para el desarrollo de los programas de sincronización y posibilitado una estrecha sincronía entre el celo y la ovulación. Probablemente, la evolución de los programas recomendados continúe mientras aumenta el conocimiento básico y se vislumbran nuevos enfoques. Indudablemente mantenerse informado y bien asesorado es la clave del éxito.

Bibliografía Consultada

- 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, Kamimura S, Silvestre F, Arteché 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
- Beggs DS, Kelly JC. 2010. Pilot Trial - The effect of eCG given as part of an Ovsynch protocol in a whole herd synchrony program on a seasonal calving herd in Victoria. *The Australian Cattle Veterinarian*; 14-26.
- Bello N, Steibel J, Pursley J. 2006. Optimizing ovulation to first GnRH improved outcomes to each hormonal injection of Ovsynch in lactating dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 89:3413-342.
- Bech-Sabat G, Lopez-Gatius F, , Garcia-Ispuerto I, Santolaria JP, Serrano B, Nogareda C, de Sousa.
- Bó GA, Cutaia LE, Souza AH, Baruselli PS. 2007. Systematic Reproductive Management in Dairy Herds. New Zealand Veterinary Association (NZVA) Conference 2007, Dairy Cattle Conference, Christchurch, New Zealand (disponible on line en SciQuest), 155-168.
- Bryan MA, Bo GA, Emslie R, Mapletoft RJ. 2009. Efecto del tratamiento con eCG en vacas lecheras en anestro tratadas con protocolos con GnRH y dispositivos con progesterona por 6 o 7 días. En: VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal, Córdoba, Argentina (Ed. D. Moreno and G.A. Bo) Instituto de Reproducción Animal Córdoba, CD.
- Bryan MA, Bo GA, Heuer C, Emslie FR. 2010. Use of equine chorionic gonadotrophin in synchronized AI of seasonal-breeding, pasture-based, anoestrous dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* 22: 126–131.

- Burke JM, de la Sota RL, Risco CA, Staples CR, Schmitt EJ-P, Thatcher WW. 1996. Evaluation of timed insemination using a gonadotropin-releasing hormone agonist in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 8: 1385-1394.
- Capitaine Funes A, Vater A, Acosta N. 2003. Análisis reproductivo de rodeos lecheros usuarios del Dairy Comp 305. *Taurus* 17: 14-28.
- Caraviello DZ, Weigel KA, Fricke PM, Wiltbank MC, Florent MJ, Cook NB. 2006. Survey of management practices related to the reproductive performance of dairy cattle on large commercial farms in the United States. *J. Dairy Sci* 89: 4723-4735.
- Cavaliere J, Hepworth G, Fitzpatrick LA, Shepard RW, Macmillan KL. 2006. Manipulation and control of the estrous cycle in pasture-based dairy cows. *Theriogenology* 65: 45-64.
- De la Sota RL, Risco C, Moreira F, Thatcher WW. 1998. Efficacy of a timed insemination program in lactating dairy cows during summer heat stress. *Theriogenology* 49: 761-770.
- Eicker S, Stewart S, Rapnicki P. 2000. Dairy Herd Reproductive Records. ABS Technical service Symposium, Madison, WI. USA.
- Ferguson JD, Galligan DR. 1983. Prostaglandin synchronization programs in Dairy Herds. Part I, Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 15: 646-655.
- Fricke PM, Caraviello DZ, Wiegler KA, Welle MC. 2003. Fertility in dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. *J Dairy Sci* 86: 3941-3950.
- Gumen AJ, Guenther M, Wiltbank MC. 2003. Follicular size and response to Ovsynch versus detection of estrus in anovular and ovular lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 86: 3184-3194.
- 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.
- Lamming GE, Darwash AO. 1998. The use of milk progesterone profiles to characterise components of subfertility in milked dairy cows. *Anim Reprod Sci* 52: 175-190.
- Lopez – Gatius, F., Santolaria, P., Yaniz, J.L., Rutllant, J., Lopez- Bejar, M. 2002. Factors affecting pregnancy loss from gestation Day 38 to 90 in 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.
- Lucy MC. 2001. Reproductive Loss in High-Producing Dairy Cattle: Where Will it End? *J Dairy Sci* 84: 1277-1293.

- Lucy MC, McDougall S, Nation DP. 2004. The use of treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture based management systems. *Anim Reprod Sci* 82-83: 495-512.
- Macmillan KL, Henderson HV. 1984. Analyses of the variation in the interval from an injection of prostaglandin F₂ α to estrus as a method of studying patterns of follicle development during diestrus in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 6: 245-254.
- Macmillan KL, Peterson AJ. 1993. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for estrus synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anestrus. *Anim Reprod Sci* 33: 1-25.
- Macmillan KL, Burke CR. 1996. Effects of oestrus cycle control on reproductive efficiency. *Anim Reprod Sci* 42: 307-320.
- Macmillan KL, Taufa VK, Day AM. 1997. Manipulating ovaries follicle wave patterns can partially synchronise returns to service and increases the pregnancy rate to second insemination. *Proc NZ Soc Anim Prod* 57:237.
- Macmillan, K.L., Colson, D.D., Eagles, V.M. 1999. Modifications to improve whole herd synchrony programs in seasonal dairy herds. *Proc Australian Assoc of Cattle Vets*, 121-129.
- McDougall S. 2008. Effects of treatment of 'not-detected in oestrus' cows with gonadotrophin releasing hormone, prostaglandin and progesterone. *Proc. of the Society of Dairy Cattle Vets, New Zealand*, 35-50.
- Momont HW, Seguin BE. 1984. Influence of the day of estrous cycle on response to PGF₂ α products: Implications for AI programs for dairy cattle. *10th International Congress on Animal Reproduction* 3: 336.
- 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., Martinuk, S.D. 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev*;12:27-44.
- Nebel RL, Jobst SM 1998. Evaluation of Systematic Breeding Programs for Lactating Dairy Cows: A Review. *J Dairy Sci* 81: 1169-1174.
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ α and GnRH. *Theriogenology* 44: 915-923.
- Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC. 1997. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronized ovulation. *J Dairy Sci*. 80: 301-306.
- Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, Ottobre JS, Garverich 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.

- Pursley JR, Fricke PM, Garverick HA, Kesler DJ, Ottobre JS, Stevenson JS, Wiltbank MC. 2001. NC-113 Regional Research Project. Improved fertility in noncycling lactating dairy cows treated with exogenous progesterone during Ovsynch. Midwest Branch ADSA 2001 Meeting, Des Moines, IA; 63.
- Roche, J.F., Crowe, M.A., Boland, M.P. 1992. Postpartum anestrous in dairy and beef cows. *Anim Reprod Sci*;28:371–378.
- Rhodes FM, McDougall S, Burke CR, Verkerk GA, Macmillan KL. 2003. Invited review: treatment of cows with an extended postpartum anestrous interval. *J Dairy Sci* 86: 1876–1894.
- 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.
- Souza AH, Viechnieski S, Lima FA, Silva FF, Araujo R, Bó GA, Wiltbank MC, Baruselli PS. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology* 72: 10-21.
- Stevenson JS, Kobayashi Y, Thompson KE. 1999. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combinations of gonadotropin-releasing hormone and prostaglandin F₂α. *J Dairy Sci* 82: 506-515.
- Stevenson JS, Pursley JR, Garverick HA, Fricke PM, Kesler DJ, Ottobre JS, Wiltbank MC. 2006. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. *J Dairy Sci* 89: 2567-2578.
- Thatcher WW, Moreira F, Santos JEP, Mattos RC, Lopez FL, Pancarci SM, Risco CA. 2001. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55: 75-90.
- 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.

- 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.
- Vasconcelos JL, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. 2001 Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 56:307-314.
- Veneranda G, Filippi L, Racca D, Romero G, Balla E, Cutaia L, Bo GA. 2006. Pregnancy rates in dairy cows treated with intravaginal progesterone devices and different fixed-time AI protocols. *Reprod. Fertil Dev* 18:118.
- Veneranda G, Filippi L, Racca D, Cutaia L, Bó GA. 2008. Pregnancy rates in dairy cows treated with intravaginal progesterone devices and GnRH or estradiol benzoate and eCG. *Reprod. Fertil. Dev.* 20: 91.
- Wiltbank M, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gumen A. 2006. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. *Theriogenology* 65: 17-29.
- Wiltbank MC, Gumen A, Sartori R. 2002. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 57: 21-52.

Avaliação de qualidade de sêmen: reconhecendo as limitações e encarando os desafios

Leonardo F. C. Brito

ABS Global, 1525 River Rd, DeForest, WI 53532, USA; Email:

leo.brito@genusplc.com

1. Introdução

Vários testes para avaliação da qualidade do sêmen foram desenvolvidos nas últimas cinco décadas (Rodriguez-Martinez & Barth, 2007). Entretanto, o objetivo de prognosticar a fertilidade de um touro ou de uma partida de sêmen baseado em exames laboratoriais ainda é elusivo. A diversidade de atributos necessários para conferir ao espermatozóide capacidade fertilizante, a constituição heterogênea da população de espermatozoides das amostras e as limitações de avaliação de fertilidade dificultam a possibilidade de prognosticar fertilidade (Amann & Hammerstedt, 1993; Moce & Graham, 2008).

Infelizmente, a percepção errônea de que partidas de sêmen provenientes de centrais de produção idôneas podem ser “classificadas e rankeadas” de acordo com fertilidade baseando-se em exames de laboratório ainda é bastante difundida, o que gera desnecessária frustração entre os profissionais envolvidos com produção de sêmen, veterinários, representantes comerciais e produtores. É extremamente importante entender as limitações dos testes laboratoriais de qualidade de sêmen para se ter expectativas realistas e que se possa investir energia, tempo e dinheiro de maneira inteligente.

O objetivo deste manuscrito é apresentar os fatos que precluem a utilização de exames de avaliação de sêmen como um teste clínico e descrever a real utilidade desses exames no contexto da inseminação artificial na pecuária bovina.

2. Exames laboratoriais e diagnóstico clínico

A validade de exames laboratoriais para diagnóstico clínico depende de dois fatores: definição de caso e execução do exame propriamente dito. Com respeito a definição de caso, o parâmetro avaliado deve não apenas ter uma relação direta com a “condição” ou “doença”, mas também deve-se conhecer a sensibilidade e a especificidade dos resultados para diagnóstico. Quanto a execução do exame propriamente dito, a obtenção de resultados exatos e precisos depende dos métodos e equipamentos utilizados, da proficiência dos profissionais conduzindo o exame, além da adoção de programas de garantia e controle de qualidade no laboratório. Exames laboratoriais para os quais esses dois fatores não são considerados tem limitado valor para diagnóstico clínico.

O diagnóstico de diabetes pode ser usado como exemplo (Figura 1). A definição de caso nesse exemplo é bastante clara, ou seja, o indivíduo com diabetes apresenta deficiência de produção de insulina e a concentração de glicose sanguínea em jejum maior que 126 mg/dL apresenta sensibilidade e especificidade adequadas para

diagnóstico. Além disso, os métodos e equipamentos recomendados para avaliação de glicose são claramente descritos e periodicamente revisados pela Organização Mundial de Saúde (WHO), programas de garantia e controle de qualidade para laboratórios são recomendados pela Organização Internacional para Padronização (ISO) e laboratórios clínicos são geralmente submetidos a acreditação por entidades governamentais ou conselhos médicos para assegurar a adequação dos procedimentos.

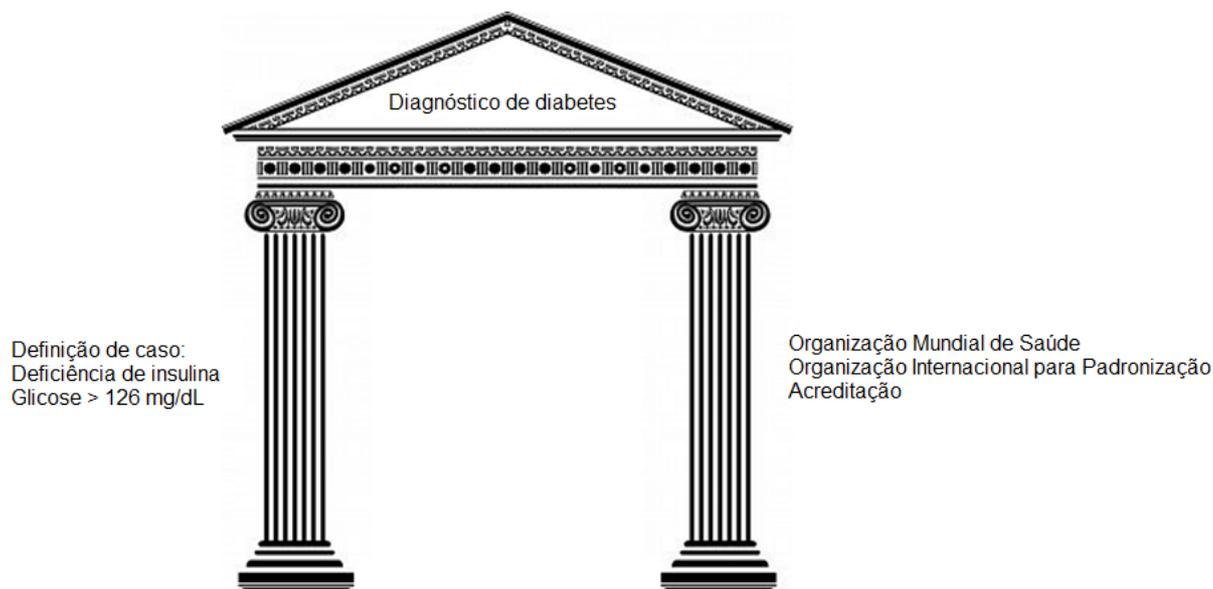


Figura 1. A validade de exames laboratoriais para diagnóstico clínico depende da definição de caso, que inclui a relação do parâmetro avaliado com a condição e a sensibilidade e a especificidade dos resultados para diagnóstico, além da obtenção de resultados acurados e precisos. No exemplo do diagnóstico de diabetes, a definição de caso é clara, uma específica concentração de glicose sanguínea apresenta sensibilidade e especificidade adequadas para diagnóstico e os procedimentos para avaliação de glicose são estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde, Organização Internacional para Padronização e entidades governamentais ou conselhos médicos responsáveis pela acreditação de laboratórios clínicos.

3. Avaliação de sêmen como diagnóstico clínico

3.1. Definição de caso

Existem vários problemas associados com a percepção de que avaliação de sêmen pode ser usada para diagnóstico de fertilidade. A primeira dificuldade é referente a definição de caso. Não existe uma clara definição de caso porque fertilidade pode ser vista como uma condição do tipo positivo/negativo (fertilidade baixa ou alta) ou como uma variável contínua (taxa de prenhez), além do fato de que prenhez pode ser detectada pelo não retorno ao cio, por ultrasonografia ou palpação após inseminação, ou até mesmo pelo nascimento do bezerro. Mais importante, é preciso reconhecer as

limitações de avaliação de dados de fertilidade. Fertilidade pode ser descrita pela seguinte equação:

$$\text{Fertilidade} = \text{Taxa de detecção de cio e IA (\%)} \times \text{Taxa de eficiência do inseminador (\%)} \times \text{Fertilidade da fêmea (\%)} \times \text{Fertilidade do sêmen (\%)};$$

é importante entender que os fatores nessa equação são expressos em percentagem e que fertilidade é o produto da multiplicação, e não adição desses fatores. Dessa forma, a fertilidade máxima jamais será superior ao menor fator incluído nessa equação, o chamado fator limitante.

Como exemplo, consideremos um rebanho em que todos os fatores são excelentes (90%). Ainda assim, a fertilidade esperada seria de 65,6% ($0,9 \times 0,9 \times 0,9 \times 0,9$) e não 90%. A simples redução da taxa de fertilidade das fêmeas para 50% causa uma drástica redução da fertilidade para 36,4% sem nenhuma mudança nas taxas de detecção de cio/IA, eficiência do inseminador e fertilidade do sêmen ($0,9 \times 0,9 \times 0,5 \times 0,9$).

Vários estudos em rebanhos leiteiros indicam que diferenças em fertilidade entre touros comerciais provados são mínimas e responsáveis por apenas aproximadamente 1% da variação da fertilidade do rebanho (Everett & Bean, 1986; Kuhn et al., 2008; Abdel-Azim, 2010). A maior variabilidade encontrada em fertilidade está associada aos efeitos relacionados ao rebanho, tais como como nutrição, manejo, sanidade, meio ambiente, técnica de inseminação e descongelamento do sêmen, consaguinidade e genética (Figura 2). Em um estudo recente avaliando o efeito do uso de protocolos de sincronização de cio e sêmen sexado, o efeito da fêmea e do rebanho nos resultados de fertilidade foram 25 a 31 vezes maiores que o efeito da variação em fertilidade dos touros avaliados (Abdel-Azim, 2010).



Figura 2. Estudos em rebanhos leiteiros indicam que diferenças em fertilidade entre touros são responsáveis por apenas aproximadamente 1% da variação da fertilidade e que a maior variabilidade encontrada em fertilidade está associada com efeitos relacionados ao rebanho.

Os resultados de um estudo conduzido pela ABS para demonstrar o efeito de fatores relacionados ao rebanho estão ilustrados na Figura 3 (dados não publicados). Como pode ser observado, houve grande variação de fertilidade quando sêmen da mesma partida de um mesmo touro foram utilizados em diferentes rebanhos. Outros resultados interessantes foram obtidos pelo grupo Pfizer-Gerar que compila resultados obtidos em rebanhos de carne que utilizam IATF no Brasil. Os dados obtidos por esse grupo (comunicação pessoal) indicam que o número de propriedades com taxas médias de prenhez superior a 50% cresceu de 41% na estação 2009-2010 para 59% na estação de 2010-2012. Uma possível explicação para esses resultados seria uma drástica mudança da população de touros e um súbito aperfeiçoamento dos métodos de produção e controle de qualidade de sêmen congelado. Contudo, a explicação mais provável é que os resultados foram positivamente influenciados pela experiência adquirida ao longo dos anos e uma maior conscientização de que resultados satisfatórios requerem grande atenção aos detalhes que afetam a fertilidade das fêmeas.

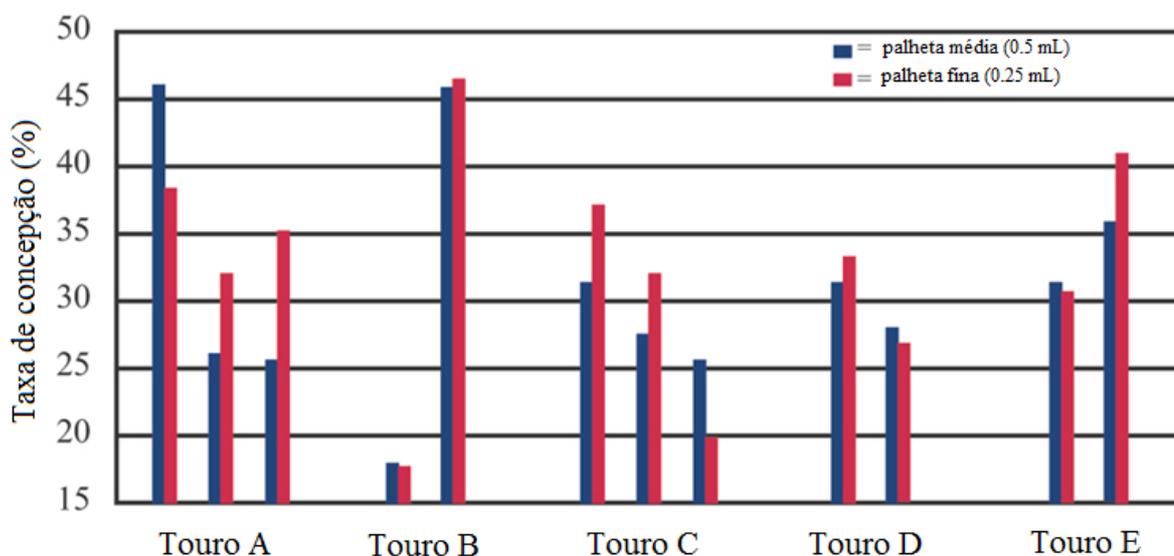


Figura 3. Exemplo da variação da taxa de concepção da mesma partida de um mesmo touro (A-E) em diferentes rebanhos representados por colunas diferentes (isto é, três rebanhos para os touros A e C e dois rebanhos para touros B, D e E). Observe a grande variação de fertilidade entre os rebanhos.

É também importante lembrar que taxa de prenhez é uma variável binomial pois existem apenas dois resultados possíveis, isto é, a fêmea está prenhe ou ela não está. Variação binomial é basicamente a influência do acaso em um ou outro resultado. Por exemplo, com cada lançamento de uma moeda há uma probabilidade de 50:50 de obtenção de “cara” ou “coroa”. Entretanto, a probabilidade de que se obtenha exatamente 50% “cara” em uma série de observações é menor do que a probabilidade de que se obtenha outras combinações; a probabilidade “real” só é observada quando um grande número de observações são conduzidas. A distribuição de resultados de variáveis binomiais obedece leis matemáticas e pode ser descrita usando intervalos de confiança colocados em ambos os lados da média. Por exemplo, um intervalo de

confiança de 95% indica que espera-se resultados entre esse intervalo em 95% dos casos.

O intervalo de confiança de 95% para taxas de prenhez pode ser calculado usando-se a seguinte equação (Amann, 2005):

$$\text{Intervalo de confiança de 95\%} = 1.96 \times \sqrt{(\text{probabilidade de prenhez} \times 1 - \text{probabilidade de prenhez}) / \text{número de inseminações}};$$

dessa forma, em rebanhos de corte utilizando IATF, onde a fertilidade esperada é de aproximadamente 50%, o intervalo de confiança de acordo com o número de inseminações é descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Intervalo de confiança de 95% e taxa de prenhez esperada para um rebanho com probabilidade de prenhez de 50% de acordo com o número de inseminações.

Inseminações	Intervalo de confiança	Prenhez esperada
25	19.6%	30.4 – 69.6%
50	13.9%	36.1 – 63.9%
75	11.3%	38.7 – 61.3%
100	9.8%	40.2 – 59.8%
200	6.9%	43.1 – 56.9%
500	4.4%	45.6 – 54.4%

Portanto, a comparação de resultados entre touros deve considerar não apenas as condições de uso (nutrição, manejo, estação, inseminador, etc), mas também a sobreposição dos intervalos de confiança dos resultados (Amann & DeJarnette, 2012). A Figura 4 ilustra o exemplo de resultados obtidos em um rebanho no qual foi usado sêmen de cinco touros para inseminar 250 fêmeas. Uma variação da taxa de prenhez entre touros de 40 a 60% em muitos casos gera pânico entre o produtor, inseminador, veterinário, e representantes comerciais, todos procurando uma resposta (ou algo ou alguém para culpar) pela percepção de que alguns touros apresentaram resultados insatisfatórios. Entretanto quando consideramos o intervalo de confiança de acordo com o número de inseminações, vemos que na realidade não existe nenhuma diferença significativa entre os touros e que a variação observada está dentro daquela esperada devido ao acaso. Em outras palavras, não existe nenhuma indicação que o ranking de fertilidade será o mesmo em futuras inseminações (quando novamente voltarmos a lançar a moeda) e nenhuma indicação de que algum touro apresenta problema de fertilidade.

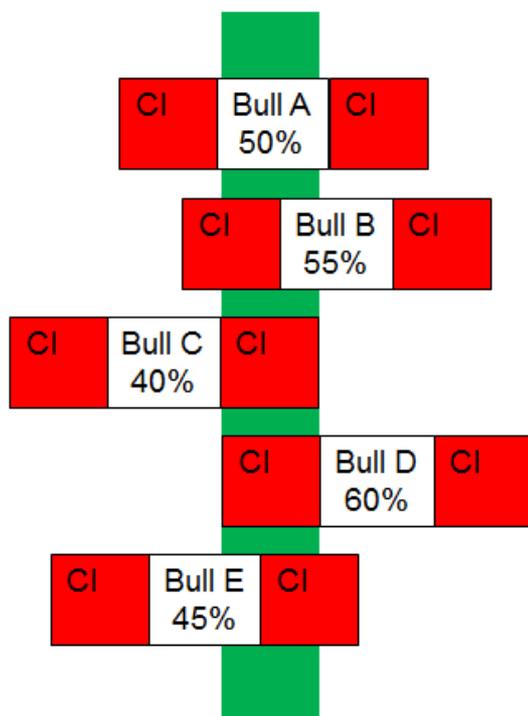


Figura 4. Exemplo da variação esperada da taxa de prenhez em um rebanho no qual a probabilidade de prenhez é de 50% e no qual foi usado sêmen de cinco touros para inseminação de 250 fêmeas. Apesar da aparente diferença de fertilidade entre os touros (40 a 60%) a sobreposição (zona em verde) dos intervalos de confiança (CI; 13.9%) indica que não existe diferença significativa de fertilidade.

Outro problema relacionado a definição de caso está relacionado a associação dos resultados dos exames laboratoriais com a fertilidade. As correlações de motilidade e morfologia espermáticas com fertilidade entre diferentes estudos são inconsistentes (Moce & Graham, 2008) e geralmente são bastante baixas quando se usa sêmen pre-selecionado. Por exemplo, estudos conduzidos pela ABS em rebanhos de leite (dados não publicados) demonstram que a fertilidade obtida com partidas com motilidade entre 30 e 40% foi semelhante a fertilidade obtida com partidas com motilidade superior a 40% (Tabela 2). Em rebanhos de corte que fazem parte da rede ABS Pecplan de IATF, diferenças nas taxas de prenhez entre touros também não parecem estar associadas a diferenças em motilidade e morfologia espermáticas ou número de espermatozóides móveis na dose inseminante (Tabela 3).

Tabela 2. Fertilidade de amostras de sêmen selecionadas de acordo com a motilidade espermática após a descongelação em rebanhos de leite.

	Motilidade 30-40%	Motilidade >40%
Inseminações	285.639	288.048
Motilidade média	33%	46%
Taxa de prenhez	75.5%	75%

Tabela 3. Resultados de exames de sêmen e taxa de prenhez de touros de corte usados em programas de IATF no Brasil. Resultados de avaliação de sêmen são médias obtidas entre janeiro e dezembro de 2010. Taxas de prenhez são médias obtidas entre 2009 e 2011.

	Normal (%)	Motilidade (%)	Espermatoz. móveis (milhões)	Número de inseminações	Taxa de prenhez (%)
Touro A	83	57	11	3.669	45
Touro B	84	54	10	7.914	55
Touro C	84	55	11	1.504	34
Touro D	85	60	11	9.989	56
Touro E	79	56	12	1.057	47

Outro exemplo são os resultados de um recente estudo no Brasil, que demonstrou que a motilidade espermática após teste de termoresistência não teve qualquer associação com fertilidade após a inseminação de 4.920 vacas Nelore (Vianna et al., 2009). Esses autores demonstraram que amostras que não continham nenhum espermatozóide móvel após incubação a 46°C por 30 minutos ou a 38°C por 5 horas produziram taxas de prenhez similares a amostras que apresentavam motilidade superior a 40% após incubação quando usadas para inseminação imediatamente após a descongelação (73 vs 70% e 63 vs 66%, respectivamente).

3.2. Execução de exames de qualidade de sêmen

Embora às vezes vistos como triviais, a obtenção de resultados exatos e precisos de análise de sêmen exige conhecimento dos princípios e peculiaridades de diferentes testes e equipamentos, em conjunto com programas de garantia e controle de qualidade, incluindo educação e avaliação de proficiência dos profissionais realizando exames (Keel, 2002; Brito, 2010; Pacey 2010). Estudos realizados por laboratórios humanos de andrologia demonstram grandes variações nos resultados de avaliação de sêmen entre laboratórios e até mesmo dentro de um mesmo laboratório (Keel et al., 2000; Alvarez et al., 2005). Os resultados de um estudo envolvendo seis laboratórios nos Estados Unidos demonstrou que os mesmos desafios são enfrentados por laboratórios de andrologia veterinária (dados não publicados). Dez partidas foram utilizadas e cinco repetições da mesma partida foram codificadas com números de identificação diferentes; portanto cada laboratório recebeu 50 amostras para avaliação.

Similarmente ao observado em estudos envolvendo laboratórios de andrologia humanos, os resultados de morfologia, motilidade e concentração espermática foram diferentes entre os laboratórios (Figura 5). A distribuição dos resultados relatados por cada laboratório de acordo com a média geral para cada partida são ilustradas na Figura 6. As diferenças na concentração de espermatozóides variaram entre cerca de -20 a +20 x 10⁶ espermatozóides/mL, enquanto que variações muito maiores foram

observados para motilidade (aproximadamente -30 a +30%) e morfologia (aproximadamente -15 a 15%). Além das diferenças entre laboratórios, houve também considerável diferença entre as repetidas análises da mesma partida dentro do mesmo laboratório, como indicam os coeficientes de variação (CV) descritos na Tabela 4.

As diferenças de resultados relatados por diferentes laboratórios coloca a confiabilidade da análise do sêmen em cheque e demonstra o quanto é difícil, senão impossível, para veterinários e produtores interpretarem de forma significativa os resultados da avaliação do sêmen. Este estudo também demonstra claramente a falácia da adoção de valores de referência indicativos da qualidade do sêmen sem abordar as questões relacionadas com a qualidade dos procedimentos de análise propriamente ditos.

Tabela 4. Coeficiente de variação (%) intra-laboratório médio (mínimo-máximo) para avaliação de morfologia, motilidade e concentração espermáticas. Valores são baseados em resultados da avaliação de 10 partidas em cinco repetições.

	Morfologia	Motilidade	Concentração
Lab I	8.0 (3 to 14)	8.6 (4 to 12)	4.6 (2 to 13)
Lab J	7.7 (5 to 11)	19.6 (7 to 42)	17.3 (8 to 25)
Lab K	8.5 (3 to 13)	17.7 (7 to 31)	86.9 (52 to 135)
Lab L	9.5 (3 to 21)	16.9 (9 to 36)	9.4 (3 to 30)
Lab M	8.1 (4 to 10)	14.6 (0 to 25)	24.7 (12 to 56)
Lab N	5.9 (1 to 10)	18.2 (8 to 31)	39.8 (14 to 79)

4. Objetivo de avaliação de sêmen

Quando avaliamos os critérios necessários para se estabelecer um exame clínico válido (Figura 1) e confrontamos estes com a realidade da possibilidade de utilizar exames laboratoriais de qualidade de sêmen para “diagnosticar” (ou prognosticar) fertilidade, podemos perceber claramente que avaliação de sêmen não pode ser usada como teste de diagnóstico clínico (Figura 7). Porque então realizamos avaliação de sêmen? O objetivo da avaliação de sêmen é identificar touros ou partidas com os quais se espera obter fertilidade muito abaixo da média, ou em outras palavras, identificar touros ou partidas que com um bom grau de certeza podem ser classificados(as) com inférteis ou subférteis (Amann & Hammerstedt, 1993; Amann & DeJarnette, 2012).

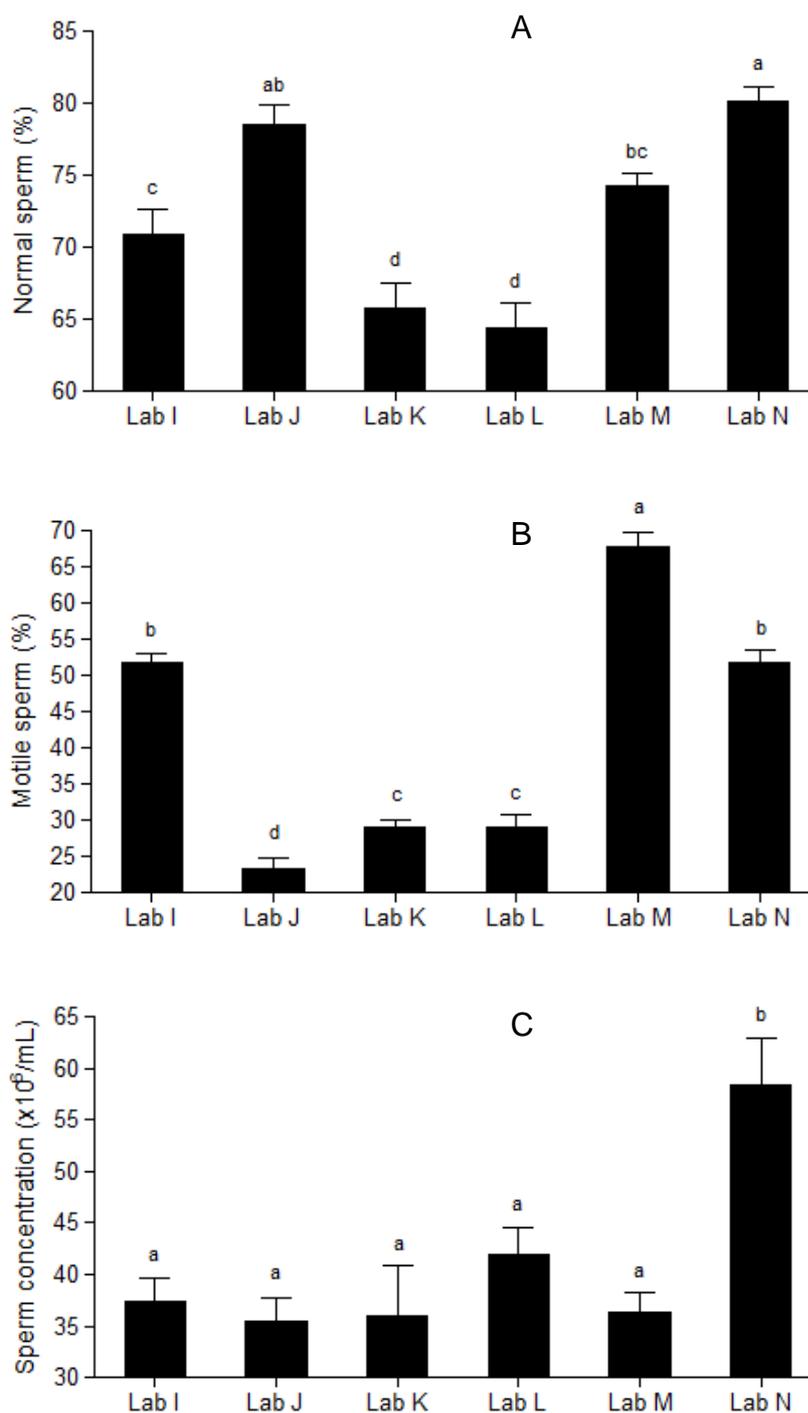


Figura 5. Média (\pm erro padrão) de resultados de morfologia (A), motilidade (B) e concentração (C) determinadas em 10 amostras (5 repetições) em diferentes laboratórios de andrologia veterinária nos Estados Unidos. ^{a,b,c,d}Colunas com sobrescritos diferentes apresentam diferença estatística ($P < 0.05$).

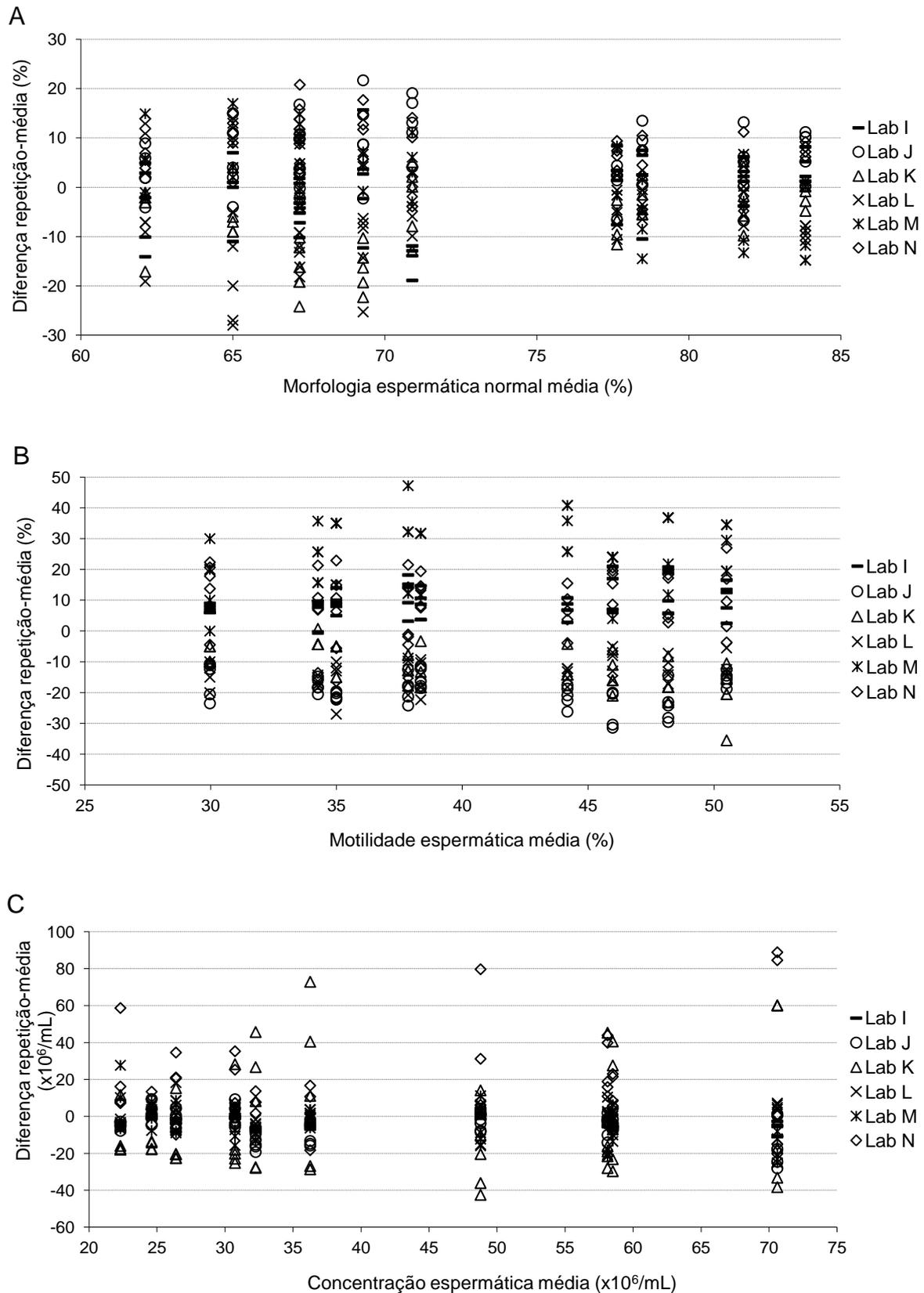


Figura 6. Distribuição de resultados de morfologia (A), motilidade (B) e concentração (C) determinadas em 10 amostras (5 repetições) em diferentes laboratórios de andrologia veterinária nos Estados Unidos.

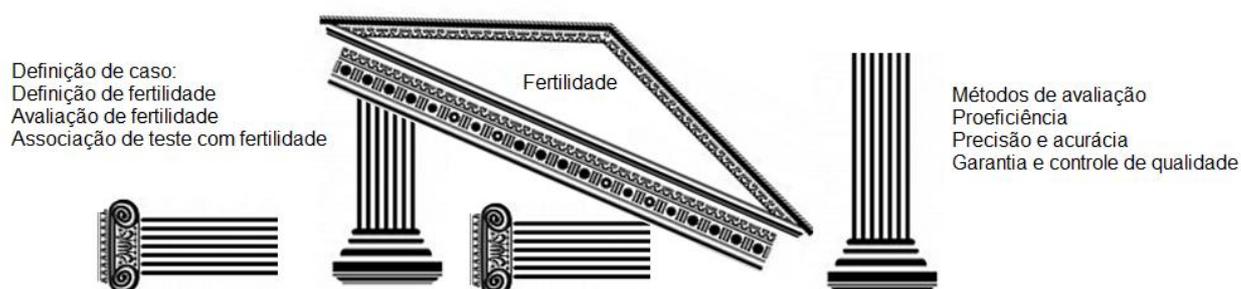


Figura 7. O uso de avaliação de sêmen para diagnóstico clínico de fertilidade não é um procedimento válido porque não existe uma clara definição de caso, a associação dos resultados da avaliação com fertilidade é inconsistente, e a variação de resultados obtidos em diferentes laboratórios é muito grande.

Dessa forma, o valor da avaliação de qualidade do sêmen se encontra justamente no processo de controle de qualidade de centrais de produção. O objetivo principal do controle de qualidade de uma central de produção é assegurar a integridade e qualidade do sêmen vendido comercialmente. Programas de controle de qualidade visam assegurar que o produto liberado para a venda é livre de doenças conhecidas e deve fornecer fertilidade adequada. Isto requer cuidadosa documentação de procedimentos, funcionários bem treinados e meticolosos e estrita observação aos detalhes de protocolos de operação para processamento e avaliação do sêmen. Resultados do programa de controle de qualidade da ABS Global indicam que apenas aproximadamente 60% das partidas produzidas de touros de corte são liberadas para comercialização, enquanto que aproximadamente 25% do total (touros de carne e leite) são consideradas insatisfatórias e descartadas (Figura 8).

O resultado do controle de qualidade posto em prática em centrais de produção pode ser observado através do pequeno desvio da fertilidade observada na maioria dos touros. Por exemplo, de acordo com os dados de abril de 2011, 93, 87, 100, 92 e 87% dos touros Ayrshire, Pardo Suíço, Guernsey, Holândes e Jersey, respectivamente, apresentaram fertilidade apenas 3 pontos percentuais acima ou abaixo da média da população (Amann & DeJarnette, 2012). Além disso, dados da rede ABS Pecplan de IATF para touros de corte indicam que a taxa de prenhez estacional média variou apenas 2 pontos percentuais durante três estações, isto é, 53% na estação 2008-2009 (22.770 AI), 55% na estação 2009-2010 (42.029 IA) e 52.8% (42.394 IA) na estação 2010-2011.

Apesar dos bons resultados obtidos com o uso de sêmen congelado e da baixa variação de fertilidade observada em rebanhos, a National Association of Animal Breeders (NAAB) e Certified Semen Services (CSS) instituíram recentemente um “Programa de Controle de Qualidade Sêmen”. A NAAB e CSS são entidades responsáveis pela auto-regulação da indústria de inseminação artificial na América do Norte. A conformidade com os padrões e diretrizes mínimas recomendadas pela NAAB e CSS são estabelecidas através da assinatura de contratos e é avaliada através de auditorias não-anunciadas anuais. O “Programa de Controle de Qualidade Sêmen” foi lançado em janeiro de 2011 como resultado de um processo de dois anos envolvendo inúmeras discussões, reuniões, teleconferências e consultas (Mitchell, 2012).

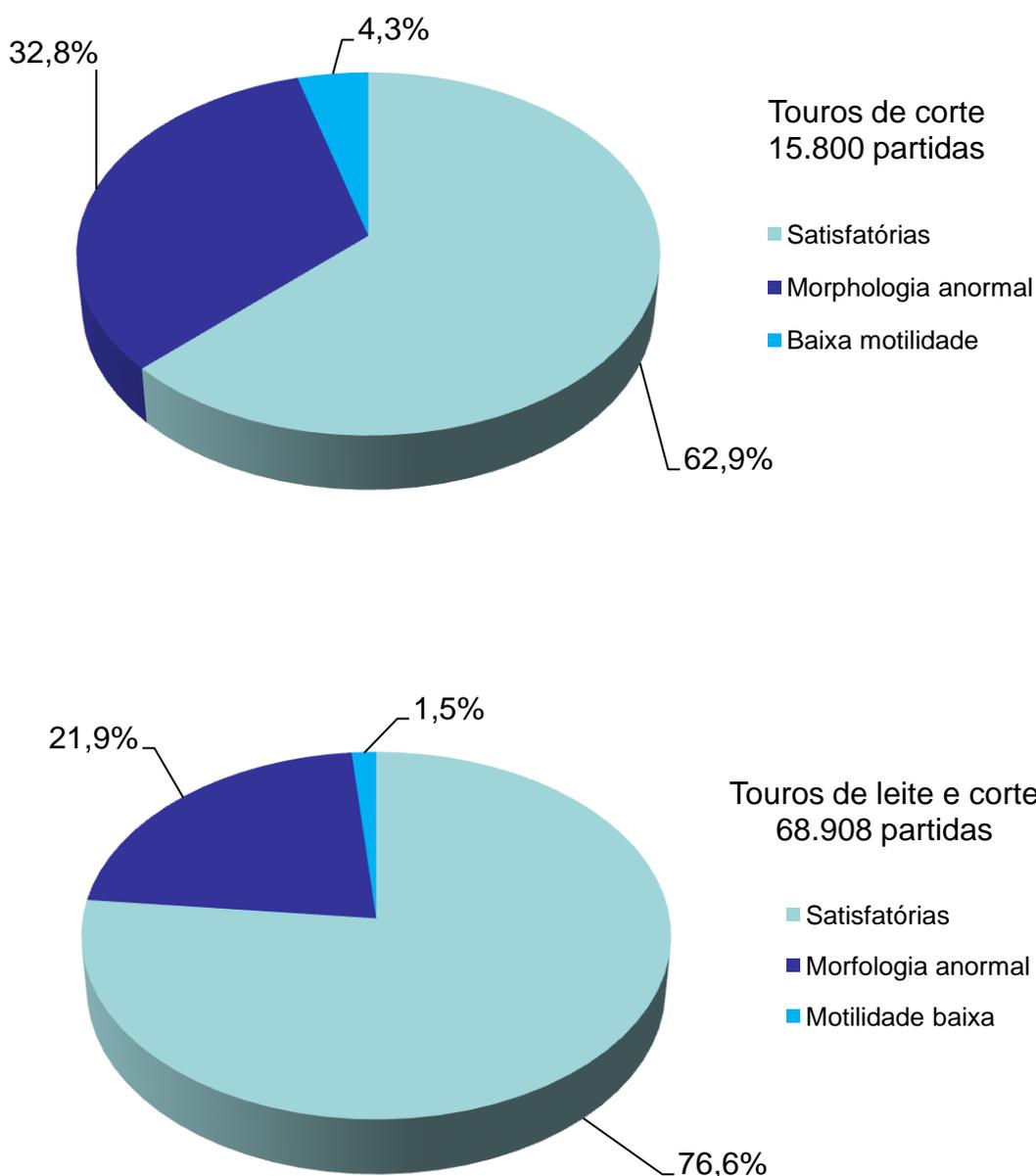


Figura 8. Resultados da produção de sêmen na ABS Global durante um período de cinco anos usando critérios de morfologia espermática e motilidade após descongelamento para controle de qualidade. Apenas 63% das partidas de touros de corte foram consideradas satisfatórias e liberadas para comercialização. No geral, aproximadamente 25% das partidas são descartadas. Na ABS Global a percentagem de partidas descartadas devido a motilidade inadequada é relativamente baixa porque apenas as partidas com morfologia normal são submetidas ao processo de congelamento.

As recomendações iniciais incluem descrição do programa de controle de qualidade, procedimentos para determinação do número de espermatozoides por dose, documentação dos valores pós-descongelamento e desenvolvimento de procedimentos para treinamento e avaliação de competência (Mitchell, 2012). Em 2012 foi também criada uma nova comissão que tratou de desenvolver um documento de orientação para procedimentos de rotina de avaliação de morfologia, motilidade e concentração espermáticas, além de organizar um workshop de análise de sêmen realizado durante a conferência técnica da NAAB (Brito, 2012). Essas iniciativas devem ajudar a assegurar aos consumidores o comprometimento das empresas produtoras de sêmen com a qualidade de seus produtos.

5. Conclusões

Estudos demonstram que a fertilidade do sêmen é responsável por apenas 1% da variação nas taxas de prenhez, indicando que a fertilidade do sêmen raramente é um fator limitante. Dessa forma, produtores devem focar recursos em estratégias para aumentar a taxa de detecção de cios/IA, a eficiência dos inseminadores e a fertilidade das fêmeas, já que esses tem um impacto muito maior sobre as taxas de prenhez.

Não se deve pensar em análise de sêmen como um exame clínico, devido às limitações impostas pela necessidade de definição de caso e as dificuldades envolvidas na execução das avaliações. Análise do sêmen é utilizada como procedimento para controle de qualidade para identificação de amostras com as quais se espera fertilidade muito abaixo da média. Análise de sêmen não é útil para a classificação de amostras de acordo com a fertilidade.

Mais importante, deve sempre ter-se em mente o principal objetivo da utilização de biotécnicas da reprodução, isto é, promover rápido melhoramento genético. Produtores, técnicos e veterinários devem procurar identificar touros que satisfaçam os objetivos genéticos para o rebanho e dar preferência a centrais conhecidas e de renome com elevados padrões de controle de qualidade. Fertilidade deve ser considerada um critério secundário e avaliada através de sumários e não através de estimativas baseadas em exames laboratoriais do sêmen.

6. Bibliografia

- Abdel-Azim G. Effect of synchronization and semen sorting on artificial insemination bull fertility. *J Dairy Sci* 93:420-5, 2010.
- Alvarez C, Castilla JA, Ramirez JP, Vergara F, Yoldi A, Fernandez A, Gaforio JJ. External quality control program for semen analysis: Spanish experience. *J Assist Reprod Genet* 22:379-87, 2005.
- Amann RP. Weaknesses in reports of "fertility" for horses and other species. *Theriogenology*. 63:698-715, 2005.
- Amann RP, DeJarnette JM. Impact of genomic selection of AI dairy sires on their likely utilization and methods to estimate fertility: A paradigm shift. *Theriogenology* 77:795-817, 2012.

- Ammann RP, Hammerstedt RH. In vitro evaluation of sperm quality: an opinion. *J Androl* 14:397-406, 1993.
- Brito LF. Variations in laboratory semen evaluation procedures and testing. *Proc Tech Conf Artif Insem and Reprod*. 2010.
- Brito LF. NAAB/CSS semen quality control program. *Proc Tech Conf Artif Insem and Reprod*. 2012.
- Everett RW, Bean B. Semen fertility--an evaluation system for artificial insemination sires, technicians, herds, and systematic fixed effects. *J Dairy Sci* 69:1630-41, 1986.
- Keel BA, Quinn P, Schmidt Jr. CF, Serafy Jr. NT, Serafy Sr. NT, Schalue TK. Results of the American Association of Bioanalysts national proficiency testing programme in andrology. *Hum Reprod* 15:680-6, 2000.
- Keel BA. Quality control, quality assurance, and proficiency testing in the andrology laboratory. *Arch Androl* 48:417-431, 2002.
- Kuhn MT, Hutchison JL, Norman HD. Modeling nuisance variables for prediction of service sire fertility. *J Dairy Sci* 91:2823-35, 2008.
- Mitchell JR. Developing an NAAB/CSS semen quality control program. *Proc Assoc Appl Anim Androl Conf*. 2012 (www.ivis.org).
- Moce E, Graham JK. In vitro evaluation of sperm quality. *Anim Reprod Sci* 105:104-18, 2008.
- Pacey AA. Quality assurance and quality control in the laboratory andrology. *Asian J Androl* 12: 21-25, 2010.
- Rodriguez-Martinez H, Barth AD. In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl* 64:39-54, 2007.
- Vianna FP, Papa FO, Zahn FS, Melo CM, Dell'Aqua Jr JA. Thermoresistance sperm tests are not predictive of potential fertility for cryopreserved bull semen. *Anim Reprod Sci* 113:279-282, 2009.

EFEITO DO ESTRESSE TÉRMICO NA QUALIDADE DOS GAMETAS ZEBUÍNOS E TAURINOS

Barros, C.M.^{1a}; Castilho, A.C.S.¹; Razza, E.M.¹; Silva, C.F.¹; Pegorer, M.F.²; Satrapa, R.A.¹

¹Departamento de Farmacologia; Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo; ²Veterinário autônomo. ^aE-mail: cmbarros@ibb.unesp.br

INTRODUÇÃO

Os mamíferos apresentam a capacidade de regular e manter a temperatura corporal numa zona de conforto térmico. Quando a temperatura corporal do animal se altera para valores abaixo ou acima da temperatura de conforto, podem ocorrer diversas modificações na resposta fisiológica normal do animal a fim de adaptá-lo as novas condições ambientais.

O estresse térmico (ET) pode causar diversos efeitos deletérios sobre a função reprodutiva dos mamíferos, incluindo mudanças na espermatogênese, com redução quantitativa e qualitativa da produção de espermatozoides nos machos, alterações no desenvolvimento e maturação oocitária, levando a queda da fertilidade nas fêmeas, alterações no desenvolvimento embrionário inicial, no crescimento fetal e na lactação (Hansen *et al.*, 2001; Hansen, 2009).

A capacidade de um embrião responder a mudanças no seu ambiente é limitada durante as primeiras divisões de clivagem, quando grande parte do genoma embrionário é ainda inativo. Esse período de baixa atividade transcricional cria uma janela na qual os embriões são particularmente sensíveis a certas formas de estresse. Uma das alterações no ambiente materno que causam efeitos profundos na sobrevivência embrionária é um aumento na temperatura corpórea em decorrência do calor ou da febre (Paula-Lopes & Hansen, 2002).

Os zebuínos (*Bos indicus*) são predominantes nas regiões tropicais devido a sua maior resistência ao estresse térmico (ET) e resistência aos parasitas, quando comparada às raças européias (*Bos taurus*, Hansen, 2004; Barros *et al.*, 2006).

As alterações adaptativas que permitem aquisição de termotolerância são provavelmente resultado de mudanças na expressão gênica e/ou na atividade de sistemas bioquímicos que comandam as funções celulares frente a alguma agressão como, por exemplo, as altas temperaturas (Edwards *et al.*, 2001).

Neste artigo de revisão abordaremos os efeitos deletérios do estresse térmico na função reprodutiva bovina, destacando tanto estudos *in vivo* quanto *in vitro*.

ESTUDOS *IN VIVO*

Acima de 50% do rebanho bovino mundial se encontra nos trópicos (Wolfenson *et al.*, 2000), onde fatores estressantes como as altas temperaturas e umidades em certos períodos do ano, a sub-alimentação crônica, os riscos de doenças e de parasitas, são

maiores do que em regiões de clima temperado (Hansen, 2004; Barros *et al.*, 2006). Nestas condições ambientais, às raças zebuínas são as que predominam, devido a sua maior adaptação em relação às raças européias.

Nos mamíferos, os processos reprodutivos são sensíveis às alterações por hipertermia, resultando em redução da qualidade e quantidade de espermatozóide nos machos e queda da fertilidade nas fêmeas (Hansen *et al.*, 2001). A infertilidade dos machos ocasionada pelo ET pode ser eliminada por meio da inseminação artificial. Nas fêmeas esta situação é mais complicada (Hansen *et al.*, 2001). Está bem documentado que a exposição de fêmeas de mamíferos ao ET aumenta a mortalidade embrionária (Thatcher & Hansen, 1993).

A maior causa da redução da sobrevivência embrionária induzida pelo ET pode ser originada pelos efeitos adversos das temperaturas elevadas no desenvolvimento dos zigotos e dos embriões (Ealy *et al.*, 1993). Putney *et al.* (1989) observaram que a exposição de novilhas Holandesas Preto e Branco (HPB) ao ET entre o primeiro estro e a inseminação aumentou a proporção de embriões anormais e com desenvolvimento retardado quando comparados a novilhas mantidas em termo-neutralidade.

A fase de pré-implantação embrionária corresponde a um período extremamente dinâmico da embriogênese onde o embrião se desenvolve de uma única célula quiescente sobre o controle genético de transcrição materna, para um grupo de células altamente ativo tanto na função metabólica como na síntese protéica, sobre o seu próprio controle genético. Durante esse período o embrião passa por várias divisões celulares e três eventos importantes ocorrem: a compactação da mórula, a formação do blastocisto, com surgimento da blastocela e a diferenciação em dois tipos celulares (trofoectoderme e massa celular interna), e a eclosão do blastocisto. Essas funções requerem a regulação precisa de várias funções celulares como a homeostasia, metabolismo e expressão gênica (Lane, 2001; Badr *et al.*, 2007).

O desenvolvimento do embrião no período pré-implantação é muito suscetível à interrupção, principalmente pelo ET (Putney *et al.*, 1989; Edwards & Hansen, 1997; Rocha *et al.*, 1998; Zeron *et al.*, 2001). Em rebanhos criados nos Estados Unidos da América, o aumento na temperatura de 29,7 °C em abril para 33,9 °C em julho foi associado a um declínio nas taxas de concepção no primeiro serviço de 25% para 7% (Cavestany *et al.*, 1985).

Durante os períodos sazonais de ET, a fertilidade declina resultando em menores taxas de concepção (Thatcher & Collier, 1986; Wilson *et al.*, 1998a). Na Flórida, as taxas de concepção de vacas em lactação caem de 48% em março para 18% em julho e não se recuperam até novembro (Badinga *et al.*, 1985). Ingraham *et al.* (1976) observaram que as taxas de concepção de vacas leiteiras estão inversamente relacionadas à temperatura ambiente durante a fase folicular. Durante o outono, as taxas de concepção de vacas leiteiras em regiões subtropicais e países de clima quente são menores que no inverno, embora a temperatura ambiente tenha diminuído e as vacas não estejam mais expostas ao ET de verão, indicando a existência de um efeito retardado do ET na fertilidade (Roth *et al.*, 2001). Além disso, a redução nas taxas de prenhez durante o verão pode atingir valores de 20 a 30% quando comparado ao inverno (Cavestany *et al.*, 1985; Badinga *et al.*, 1985; De Rensis *et al.*, 2002).

A dificuldade dos animais, sob ET, em estabelecer prenhez pode ser decorrente de alterações nos processos fisiológicos em vários níveis. As funções dos oócitos (Lenz *et al.*, 1983) e do embrião inicial (Ealy *et al.*, 1993, 1995) são alteradas por temperaturas elevadas. Para Zeron *et al.*, (2001) uma possível explicação para os efeitos da

temperatura ambiente no desenvolvimento embrionário está na modificação das propriedades físicas e bioquímicas das membranas celulares. Esses autores, ao avaliarem o efeito da estação do ano na dinâmica folicular, viabilidade do oócito e possíveis interações com as propriedades físicas e bioquímicas das suas membranas, encontraram diferenças na morfologia de oócitos no inverno e verão, e uma maior porcentagem de ácidos graxos saturados presente nos oócitos durante o verão, enquanto que a porcentagem de ácidos graxos poli-insaturados era maior em oócitos e células da granulosa durante o inverno. Essas alterações podem levar a mudanças nas propriedades bioquímicas das membranas e, conseqüentemente, influenciar na funcionalidade e fertilidade dos oócitos. Contudo, Edwards & Hansen (1997) sugerem que as células do *cumulus* podem fornecer termoprotetores extracelulares ou produzir moléculas regulatórias que causem a ativação de mecanismos de proteção térmica do oócito.

Além disso, o ET pode comprometer o desenvolvimento embrionário por reduzir o fluxo de sangue uterino e aumentar a temperatura uterina (Gwazdauskas *et al.*, 1975; Roman-Ponce *et al.*, 1978), reduzir as concentrações plasmáticas de estradiol (Gwazdauskas *et al.*, 1981; Wilson *et al.*, 1998a, 1998b), e por alterar a secreção de proteínas uterinas (Malayer *et al.*, 1988; Malayer & Hansen, 1990). Estas alterações inibem o desenvolvimento embrionário (Rivera & Hansen, 2001), aumentam a perda do embrião nos estágios iniciais de desenvolvimento, reduzem o sucesso da inseminação artificial e da produção de embriões por superovulação (Gordon *et al.*, 1987; Alfujairi *et al.*, 1993). O ET pode promover o aumento da secreção de prostaglandina pelo endométrio e induzir luteólise prematura em decorrência da dificuldade do embrião gerar sinais bioquímicos que sinalizam a gestação (Putney *et al.*, 1988, 1989).

Adicionalmente, o ET altera o padrão de desenvolvimento folicular em bovinos (Roth *et al.*, 2000), diminui o tamanho do folículo dominante da primeira e segunda ondas foliculares do ciclo estral (Wilson *et al.*, 1998a, 1998b) e deprime a dominância folicular (Wilson *et al.*, 1998b). Conseqüentemente, mais de um folículo dominante poderia se desenvolver no período pré-ovulatório, resultando em dupla ovulação (Kornmatitsuk *et al.*, 2008; Ryan & Boland 1991). Em estudo realizado por Torres Júnior *et al.* (2008), vacas da raça Gir (*Bos indicus*) foram submetidas ao ET e apresentaram efeito retardado sobre a função reprodutiva, manifestando maior incidência de folículos grandes e codominância folicular, reduzindo a duração do ciclo estral, concentração de progesterona (P₄) e capacidade de desenvolvimento do oócito. As alterações no desenvolvimento folicular durante o ET provavelmente afetam outros eventos reprodutivos como a secreção de gonadotrofinas (Gilad *et al.*, 1993), desenvolvimento do corpo lúteo (Wolfenson *et al.*, 1993) e conseqüentemente secreção de progesterona (Breuel *et al.*, 1993).

Os efeitos da alta temperatura ambiente nas funções reprodutivas são exacerbados pelo aumento na produção de calor metabólico associado à lactação (Sartori *et al.*, 2002) e pelo aumento da umidade relativa (Bianca, 1965; West, 2003). Vacas em lactação são mais suscetíveis ao ET do que novilhas (Cavestany *et al.*, 1985; Wilson *et al.*, 1998b; Pires *et al.*, 2001) e uma explicação seria o fato de que o calor metabólico produzido pelas vacas em lactação promove hipertermia durante o verão, enquanto que em novilhas a produção de calor metabólico é menor e, provavelmente, não apresentam hipertermia nas mesmas temperaturas ambientais que as vacas (Wilson *et al.*, 1998b).

Pires *et al.* (2001), trabalhando com animais puros de origem (PO) da raça HPB no estado de Minas Gerais, relataram influência positiva do verão (época das chuvas) nas taxas de prenhez de novilhas (85,4% no verão e 78,3% no inverno). Por outro lado, as taxas de prenhez de vacas em lactação foram 45,7 e 71,2% no verão e no inverno,

respectivamente, demonstrando um efeito negativo do aumento da temperatura (verão) na fertilidade das vacas.

A resistência ao ET está possivelmente relacionada às características genéticas e raciais do animal. Desta forma, raças adaptadas apresentam menores temperaturas corpóreas durante o ET do que raças não adaptadas (Hammond *et al.*, 1996, 1998; Gaughan *et al.*, 1999). A habilidade de raças adaptadas em regular a temperatura corpórea durante o ET é o resultado de menores taxas metabólicas, bem como maior capacidade de perda de calor (Hansen, 2004), contribuindo assim para a maior fertilidade desses animais (Hansen, 1999).

Entre as raças zebuínas e européias, há diferenças quanto à resistência ao ET. O gado zebuíno possui maior capacidade de regular a temperatura corporal em resposta ao ET do que o gado de origem européia (Hansen, 2004). Evidências comprovam que raças adaptadas a climas quentes adquirem genes que protegem suas células contra os efeitos deletérios do ET (Hansen, 2004). A influência do ET sobre as células pode ser observada nas raças HPB e Brahman, onde ocorre uma maior redução na síntese de DNA das células endometriais de vacas HPB do que em vacas Brahman (Malayer & Hansen, 1990). Adicionalmente, a exposição a elevadas temperaturas exerce um efeito menos deletério sobre os linfócitos de raças adaptadas ao calor (Brahman e Senepol) do que sobre os linfócitos de raças não adaptadas (Angus; Kamwanja *et al.*, 1994; Paula-Lopes *et al.*, 2003).

Dikmen *et al.* (2009) demonstraram que a regulação da temperatura corpórea em vacas em lactação pode ser influenciada pela heterose. Neste estudo foi avaliado o efeito do genótipo na capacidade de termorregulação em vacas das raças HPB, Jersey, mestiças (Sueca Vermelha x HPB) e mestiças (Jersey x HPB). Os resultados apontaram que vacas mestiças (Jersey x HPB) apresentaram maior capacidade de termorregulação em relação às outras raças, evidenciando assim, o efeito da heterose sobre a termorregulação. Além disso, Pegorer *et al.* (2007) observaram que, durante o verão, a inseminação artificial de vacas HPB com touros da raça Gir resultou em taxas de prenhez mais elevadas do que a IA com touros HPB. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Prayaga (2003), o qual demonstrou que o cruzamento entre raças zebuínas e taurinas apresenta melhor adaptabilidade as condições ambientais do que o cruzamento apenas entre raças taurinas. Desta forma, é provável que a capacidade de termorregulação possa ser melhorada através de cruzamentos adequados e pela exploração da heterose.

ESTUDOS *IN VITRO*

Trabalhos *in vitro* demonstram que a exposição do oócito ou do embrião ao ET tem influência no seu desenvolvimento subsequente. Oócitos de vacas HPB, aspirados durante o verão, apresentaram menor capacidade de desenvolvimento até a fase de blastocisto após a fertilização *in vitro*, comparado a oócitos obtidos durante o inverno (Rocha *et al.*, 1998; Al-Katanani & Hansen 2002). Além disso, a exposição do complexo *cumulus*-oócito (COCs) de bovinos a elevadas temperaturas nas primeiras 12 horas de maturação *in vitro* compromete a arquitetura do citoesqueleto, reduzem a maturação nuclear do oócito (Roth & Hansen, 2005), alteram a síntese de novas proteínas (Edwards & Hansen, 1996, 1997), promove o aumento de radicais livres (Lawrence *et al.*, 2004) e induzem o oócito à apoptose (Roth & Hansen, 2004). Estes

efeitos deletérios diminuem a capacidade do oócito se desenvolver a blastocisto após a fertilização *in vitro* (Edwards *et al.*, 1997).

Edwards & Hansen (1996) observaram que a exposição de oócitos ao ET reduziu seu desenvolvimento até a fase de blastocisto (30% vs 10% para oócitos cultivados a 39 e 41 °C, respectivamente). Resultados semelhantes foram relatados em outro experimento realizado por Edwards & Hansen (1997, 35% vs 18% para oócitos cultivados a 39 e 41 °C, respectivamente). Além disso, Rivera & Hansen (2001) verificaram que o ET a 41 °C, aplicado durante a fertilização e nos estágios de uma ou duas células, prejudica o desenvolvimento embrionário.

Experimentos realizados *in vitro*, nos quais embriões bovinos foram expostos a um padrão de temperatura ambiente semelhante àquele experimentado por vacas leiteiras em fase de lactação na Flórida, submetidas ao ET (EUA; temperatura variando de 38,5 a 40,5 °C, durante 8 dias de cultivo *in vitro*; Rivera & Hansen, 2001) ou na região sudeste de Queensland (Austrália, temperatura variando de 39,5 a 41,0 °C, durante as primeiras 48h de cultivo *in vitro*; Sugiyama *et al.* 2007), mostraram desenvolvimento reduzido até a fase de blastocisto. Desta forma, estes estudos demonstram que as altas temperaturas em determinadas épocas do ano podem influenciar negativamente na produção embrionária.

Vários estudos demonstram que embriões *Bos indicus* e *Bos taurus* adaptados (Romosinuano) são menos afetados por elevadas temperaturas do que embriões *Bos taurus* não adaptados (HPB e Angus, Block *et al.*, 2002; Barros *et al.*, 2006). Paula-Lopes *et al.* (2001) observaram que embriões de raça resistente ao calor (Brahman) se desenvolveram melhor após o ET do que embriões de raças sensíveis ao calor (HPB e Angus). De forma similar, Barros *et al.* (2006) e Eberhardt *et al.* (2009) observaram que embriões da raça Nelore foram mais resistentes ao ET que embriões mestiços (oócito taurino x sêmen zebuínio) desenvolvidos *in vitro*; e Hernández-Céron *et al.* (2004) mostraram que embriões Brahman e Romosinuano são mais resistentes ao ET que embriões da raça Angus.

Embriões produzidos através da fertilização de oócitos provenientes de vacas da raça Brahman com sêmen de touro da raça Angus são mais resistentes ao ETC que embriões produzidos pela fertilização de oócitos provenientes de vacas da raça Holandesa com sêmen de touros Angus (Block *et al.*, 2002). Entretanto, não houve diferença com relação à resistência ao ETC para embriões Holandês x Brahman e Holandês x Angus (Block *et al.*, 2002). Estes resultados indicam que a contribuição do oócito é mais importante do que a do espermatozóide na capacidade dos embriões Brahman resistirem aos efeitos do estresse calórico. De forma similar, Saito *et al.* (2006) e Satrapa *et al.* (2011a) verificaram que o ET (41 °C por 12h, 96 horas após a inseminação - hpi) diminuiu significativamente as taxas de blastocisto e de blastocisto eclodido, tanto para oócitos HPB fertilizados com sêmen Gir quanto sêmen HPB, ou seja, o uso de sêmen da raça Gir (*Bos indicus*) não tornou os embriões mais termotolerantes.

Por outro lado, Eberhardt *et al.* (2009) observaram que oócitos de vacas HPB, fertilizados com sêmen Nelore (n=2), são mais resistentes ao ET do que oócitos HPB fertilizados com sêmen Angus, indicando que, além do oócito, a raça do touro também pode influenciar a resistência do embrião ao ET. O fato de Eberhardt *et al.* (2009) terem utilizado apenas dois touros para cada raça, pode ter influenciado os resultados, ou seja, o efeito do touro em si pode ter sido preponderante em relação a influência da raça (*Bos indicus* vs *Bos taurus*) na resistência ao ET. De fato, vários estudos mostram que a

produção *in vitro* de embriões pode variar de 0 a 36% de acordo com o touro utilizado (Lacandra *et al.*, 1993; Lazzari & Galli, 1993; Parrish *et al.*, 1986). Palma & Sinowatz (2004) testaram 63 touros na produção de embriões *in vitro* e observaram que houve variações de touro para touro nas taxas de clivagem (36,3 a 93,4%) e de blastocisto (6,9 a 51,2%). Estes dados são indicativos de que há diferenças entre touros quanto a sua capacidade de fertilização.

Efeitos dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) no desenvolvimento embrionário

A família de fatores de crescimento semelhante à insulina é formada pelos fatores de crescimento IGF-I e II. Ambos são polipeptídeos relacionados à pró-insulina e apresentam receptores específicos na superfície celular. O IGF circula no plasma ligado as proteínas de ligação ao IGF (do inglês IGF-binding proteins - IGFBP), que têm como função levar o IGF às suas células alvos (Kane *et al.*, 1997). O transporte e a função dos IGFs são modulados pelas interações de pelo menos seis IGFbps. Os membros da família IGF desempenham papel importante na função ovarina e desenvolvimento embrionário.

Tanto os IGFs I e II, como seus receptores (IGFR-I e II), são expressos em oócitos e durante todo o desenvolvimento de embriões bovinos e ovinos produzidos *in vitro* (Nuttinck *et al.*, 2004; Lonergan *et al.*, 2000; Winger *et al.*, 1997), sugerindo a importância deste fator de crescimento na função oocitária e embrionária, principalmente por estimular a proliferação celular (Herrler *et al.*, 1998; Lighten *et al.*, 1998). Além disso, a expressão das IGFbps (1 a 6) foi demonstrada em oócitos (Lonergan *et al.*, 2000; Satrapa *et al.*, 2011b) e embriões de ratos e bovinos (Winger *et al.*, 1997; Heyner *et al.*, 1993). Sabe-se que a redução das proteínas ligantes de IGF (IGFBPs) tem sido associada a aumento da atividade proteolítica da proteína sérica A associada à prenhez (PAPP-A), responsável pela degradação de IGFbps, levando ao aumento da biodisponibilidade de IGF livre (Monget *et al.*, 2003).

Os efeitos benéficos do IGF-I no desenvolvimento embrionário, tanto na presença quanto na ausência de estresse, têm sido demonstrados em várias espécies. A adição de IGF-I ao meio de cultura proporcionou um aumento na taxa de produção de mórulas e blastocistos (Moreira *et al.*, 2002; Herrler *et al.*, 1998; Block *et al.*, 2003; Sirisathien *et al.*, 2003, Satrapa *et al.*, 2011a) e no número de células no estágio de blastocisto (Moreira *et al.*, 2002; Sirisathien *et al.*, 2003), bem como reduziu a incidência de apoptose embrionária em bovinos (Lonergan *et al.*, 1996; Moreira, *et al.* 2002; Jousan & Hansen, 2004; Bonilla *et al.*, 2011).

A qualidade do embrião é sensivelmente afetada pelos fatores de crescimento à que estão submetidos os oócitos durante a fase de crescimento folicular (Sirard *et al.*, 2006). A suplementação do meio CIV com IGF-I tornou blastocistos mais resistentes à temperatura elevada, aumentando a taxa de prenhez após a transferência de embriões para vacas Holandesas expostas ao estresse térmico *in vivo* (Block *et al.*, 2003). A exposição de vacas produtoras de leite ao estresse térmico *in vivo* diminui o consumo de matéria seca, reduzindo os níveis circulantes de glicose, insulina e IGF-I. Essa redução de IGF-I compromete o crescimento folicular e a qualidade oocitária (De Rensis & Scaramuzzi, 2003).

Ao comparar a expressão do sistema IGF em oócitos e blastocistos oriundos de vacas Nelore e HPB, Satrapa *et al.* (2011b) observaram que as expressões de IGF-I e II, IGFR-I e II e IGFBP-2 e 4 foram maiores em oócitos provenientes de vacas HPB quando comparados aos de vacas Nelore. Porém, a expressão da PAPP-A (responsável pela degradação de IGFBPs) foi significativamente maior em Nelore do que em HPB. Além disso, o IGF-I foi mais expresso em blastocistos submetidos ao ET, tanto em Nelore quanto HPB, sendo este aumento mais evidente na raça Nelore. Embora não tenha sido investigada a expressão protéica, estes resultados indicam que a maior biodisponibilidade de IGF em oócitos e blastocistos de vacas da raça Nelore, pode contribuir para a maior tolerância desta raça ao ET, quando comparada à HPB.

Expressão de alguns genes relacionados ao desenvolvimento embrionário inicial

As alterações adaptativas que permitem aquisição de termotolerância são provavelmente resultado de mudanças na expressão gênica e/ou na atividade de sistemas bioquímicos que comandam as funções celulares frente a alguma agressão como, por exemplo, as altas temperaturas (Edwards *et al.*, 2001).

A resposta ao ET e a aquisição da capacidade de termotolerância pelas células submetidas a algum tipo de estresse envolve a síntese de moléculas citoprotetoras, como as proteínas de choque térmico (heat shock protein - HSP). Nos mamíferos, a resposta ao estresse inclui alteração de expressão gênica sob a regulação do fator de transcrição de choque térmico (HSF; Collier *et al.*, 2008) com uma rápida indução de transcrição de HSPs em uma grande variedade de células e tecidos (Luft & Dix, 1999). O HSF1 é essencial para a resposta ao choque térmico e também é necessário para o processo de desenvolvimento (Åkerfelt *et al.*, 2007). A ativação de HSF1 é um processo que envolve diversos passos. Primeiro, ocorre a trimerização da molécula, seguido de translocação para o núcleo e posterior ligação a domínios específicos do DNA com ativação da transcrição dos genes de HSPs (Åkerfelt *et al.*, 2007). HSF1 é fundamental para a manutenção da integridade celular durante o estresse, visto que células de ratos knock-out para o gene HSF1 perderam a habilidade de desenvolver termotolerância (Zhang *et al.*, 2002).

A produção *in vitro* de embriões está associada a mudanças na expressão gênica e também baixa taxa de sobrevivência embrionária pós-transferência, resultando em altas taxas de abortos. Por isso, mais importante do que conseguir grandes quantidades de embriões *in vitro*, é conseguir embriões com qualidade para gerarem gestações a termo, com bezerros saudáveis (Hansen *et al.*, 2010). El-Sayed *et al.* (2006) identificaram um grupo de genes relacionados com a sobrevivência embrionária ao compararem embriões produzidos *in vitro* que, quando transferidos para receptoras, geraram uma gestação ou foram reabsorvidos. Seis genes apresentaram maior expressão gênica nos embriões que geraram uma gestação quando comparados aos embriões reabsorvidos, sugerindo que estes genes podem ter um papel fundamental no desenvolvimento inicial e na implantação dos embriões. Dentre estes genes, pode-se citar o interferon- τ (IFN-tau), CDX-2, PLAC8 e COX-2.

A formação do blastocisto depende da diferenciação das células em duas linhagens, massa celular interna (MCI) e trofotoderma, que caracterizam as duas primeiras linhagens de células no embrião de mamíferos. O trofotoderma forma um epitélio de transporte que vai regular o transporte de íons e água, levando ao acúmulo de

líquido e a formação da blastocele (Strumpf *et al.*, 2005). Interferon- τ (IFN- τ) é secretado exclusivamente pelas células do trofotoderma. É o agente primário responsável pelo reconhecimento materno da gestação em bovinos (Thatcher *et al.*, 1995). Sua função é inibir a secreção uterina de prostaglandina F 2α (PGF 2α), substância luteolítica que leva a degradação do corpo lúteo e queda dos níveis de progesterona (Thatcher *et al.*, 2001).

Uma grande proporção das perdas embrionárias coincide com o período em que o conceito inibe a secreção uterina de PGF 2α . Por isso, é possível que muitas perdas ocorram porque certos embriões não têm a habilidade de secretar IFN- τ e assim não suprimem a secreção de PGF 2α (Thatcher *et al.*, 2001). Além disso, ele também afeta a expressão de diversos genes no endométrio, numa célula específica e num momento específico do desenvolvimento embrionário, que vão ser responsáveis pela receptividade uterina à implantação e ao desenvolvimento do conceito (Bazer *et al.*, 2008). Diferenças na quantidade de secreção de IFN- τ entre embriões bovinos produzidos *in vivo*, *in vitro* e clonados pode ser responsável pelas diferenças nas taxas de prenhez após transferência destes embriões para receptoras (Stojkovic *et al.*, 1999). Yao *et al.* (2009) demonstraram que mRNA de IFN- τ foi primeiro expresso em embriões bovinos produzidos *in vitro* no estágio de 16 células (dia 4 pós inseminação), mantendo a expressão nos estágios de mórula e blastocisto.

O embrião em desenvolvimento produz prostaglandinas (PGs) que apresentam diversas funções como, por exemplo, modular o local da implantação embrionária no endométrio. A proteína de COX2 (Prostaglandina G/H sintase 2), responsável pela síntese de PG, foi encontrada nas células da TE de embriões e altos níveis de expressão de COX2 foi detectada em blastocistos bovinos que resultaram em gestação e nascimento a termo (El-Sayed *et al.*, 2006). Maior expressão da COX2 na janela de implantação embrionária sugere um papel importante das PGs liberadas pelo embrião na mediação das interações com o útero materno (El-Sayed *et al.*, 2006). Durante a implantação de embriões ovinos, as células trofoblásticas se tornam adesivas e a sua capacidade de invasão está diretamente relacionada com os níveis de expressão de COX2 que, portanto, deve ter um papel importante na implantação embrionária (Charpigny *et al.*, 1997).

O CDX-2, um fator de transcrição, é um gene expresso especificamente pelo trofotoderma, sendo necessário para sua formação e integridade e, portanto, importante para o desenvolvimento normal do embrião (Strumpf *et al.*, 2005; Bell *et al.*, 2008). Em ratos, já está bem estabelecido que o CDX-2 é importante para a implantação e desenvolvimento da placenta (Chawengsaksophak *et al.*, 2004). Embriões CDX-2 nulo falham em implantar e morrem no estágio peri-implantacional, sugerindo defeito no desenvolvimento do trofotoderma. Esta falha na implantação é devido a perda da integridade do epitélio do trofotoderma e/ou aumento da apoptose no trofotoderma (Chawengsaksophak *et al.*, 2004).

Poucos trabalhos analisaram a expressão de CDX-2 em embriões bovinos. Num destes trabalhos, foi verificado que o gene CDX-2 encontra-se aumentado em embriões bovinos produzidos *in vitro* que, quando transferidos, originaram gestação, quando comparados com aqueles embriões que sofreram reabsorção uterina ao serem transferidos (El-Sayed *et al.*, 2006). Embriões bovinos produzidos por transferência nuclear apresentam expressão de CDX-2 alterada e em quantidade inferior quando comparado com embriões produzidos *in vivo*. Talvez isto explique o fato dos embriões produzidos por transferência nuclear apresentarem maior taxa de perda embrionária quando comparado com os produzidos *in vivo* (Hall *et al.*, 2005).

O gene PLAC8 é substancialmente expresso no trofotoderma dos embriões no estágio de pré-implantação, e continua sendo expresso nas células trofoblásticas gigantes e na camada de espongiotrofoblastos nas fases posteriores do desenvolvimento embrionário. Estudos em bovinos mostraram que o PLAC8 é altamente expresso no endométrio de vacas gestantes quando comparado com vacas não gestantes, sugerindo seu potencial papel no desenvolvimento placentário (Galaviz-Hernandez *et al.*, 2003). A expressão de PLAC8 foi 26 vezes maior nos blastocistos bovinos que resultaram em gestação quando comparado com aqueles que sofreram reabsorção (El-Sayed *et al.*, 2006).

Ao investigar a expressão dos genes COX2, CDX-2, IFN- τ , HSF1, HSP70 e PLAC8 em embriões Jersey e Nelore produzidos *in vitro*, submetidos ou não ao ET, Silva *et al.* (2011) observaram que o estresse térmico (96 hpi, 41 °C, 6h) reduziu significativamente a produção de blastocisto na raça Jersey, mas não na raça Nelore. Além disso, detectaram maior expressão dos genes PLAC8 e CDX2 nos embriões da raça Nelore, cultivados a 38,5 °C, quando comparados aos da raça Jersey; relataram redução na expressão dos genes CDX-2, COX2 (apenas na Jersey), HSF1 (apenas na Nelore) e PLAC8, o que poderia comprometer a implantação e a manutenção da gestação. Estes resultados corroboram os achados de Sartorelli *et al.* (2006) que, ao transferirem para receptoras mestiças embriões das raças Nelore e Angus, submetidos ou não a ET *in vitro* (96 hpi, 41 °C, 12h), observaram diminuição na taxa de gestação dos embriões Angus (7%; 1/14) quando comparados aos Nelore (29%; 11/38).

Em suma, vários experimentos *in vivo* e *in vitro* evidenciam a maior resistência dos embriões de raças zebuínas aos efeitos deletérios do estresse calórico, quando comparados aos de raças taurinas. Na medida em que compreendermos os mecanismos celulares que tornam os zebuínos mais termotolerantes, maiores serão as oportunidades de desenvolvermos estratégias que minimizem os efeitos nocivos do estresse térmico em raças mais sensíveis ao calor.

Agradecimentos:

Os autores são gratos à FAPESP pela concessão de auxílio financeiro e pelas bolsas de mestrado e doutorado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÅKERFELT, M., TROUILLET, D., MEZGER, V., SISTONEN, L. Heat shock factors at a crossroad between stress and development. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1113, p. 15-27, 2007.
- ALBRIGHT, J.L., ARAVE, C.W. The behavior of cattle. **Wallingford: Cab International**, p:1-18, 1997.
- ALFUJAIRI, M.M., ALIBRAHIM, R.M., ELNOUTY, F.D. Seasonal variations in superovulatory responses of Holstein cows treated with pregnant mare serum gonadotrophin in Saudi Arabia. **J. Reprod. Fertil.**, v.11, p.75, 1993(abstract).
- AL-KATANANI, Y.M., HANSEN, P.J. Induced thermotolerance in bovine two-cell embryo and the role of heat shock protein 70 in embryonic development. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 62, p. 174-180, 2002.

- BADINGA, L., COLLIER, R.J., THATCHER, W.W., WILCOX, C.J. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. **J. Dairy. Sci.**, v.68, p.78-85, 1985.
- BADR, H., BONGIONI, G., ABDOON, A.S.S., KANDIL, O., PUGLISI, R. Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. **Zygote**, v.15, p. 355-367, 2007.
- BARROS, C.M., PEGORER, M.F., VASCONCELOS, J.L.M., EBERHARDT, B.G., MONTEIRO, F.M. Importance of sperm genotype (*indicus* vs. *taurus*) for fertility and embryonic development at elevated temperatures. **Theriogenology**, v.65, p.210-219, 2006.
- BAZER, F.W., BURGHARDT, R.C., JOHNSON, G.A., SPENCER, T.E., Wu, G. Interferons and progesterone for establishment and maintenance of pregnancy: interactions among novel cell signaling pathway. **Reprod Bio**, v.8, p.179-211, 2008.
- BELL, C.E., CALDER, M.D., WATSON, A.J. Genomic RNA profiling and the programme controlling preimplantation mammalian development. **Mol. Hum. Reprod.**, v.14, p.691-701, 2008.
- BIANCA, W. Reviews of the progress of dairy science. Section A: physiology. Cattle in a hot environment. **J. Dairy. Res.**, v.32, p.291-345, 1965.
- BLOCK, J., CHASE, JR. C.C., HANSEN, P.J. Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal versus paternal contribution. **Mol. Reprod. Dev.**, v.63, p.32-37, 2002.
- BLOCK, J., DROST, M., MONSON, R.L., RUTLEDGE, J.J., RIVERA, R.M., PAULA-LOPES, F.F., et al. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in vitro-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. **J. Anim. Sci.**, v. 81, p. 1590-1602, 2003.
- BONILLA A.Q.S., L.J. OLIVEIRA, M. OZAWA, E.M. NEWSOM, M.C. LUCY, P.J. HANSEN. Developmental changes in thermoprotective actions of insulin-like growth factor-1 on the preimplantation bovine embryo. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.332, p. 70-179, 2011.
- BREUEL, K.K., LEWIS, P.E., SCHRICK, F.N., LISHMAN, A.W., INSKEEP, E.K., BUTCHER, R.L. Factors Affecting Fertility in the Postpartum Cow: Role of the Oocyte and Follicle in Conception Rate. **Biol. Reprod.**, v.48, p.655-61, 1993.
- CAVESTANY, D., EL-WISHY, A.B., FOOTE, R.H. Effect of season and high environmental temperature on fertility of holstein cattle. **J. Dairy. Sci.**, v.68, p.1471-8, 1985.
- CHARPIGNY, G., REINAUD, P., TAMBY, J.P., CREMINON, C., GUILLOMONT, M. Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. **Biol. Reprod.**, v. 57, p. 1032-1040, 1997.
- CHAWENSAKSOPHAK, K., GRAAFF, W., ROSSANT, J., DESCHAMPS, J., BECK, F. Cdx2 is essential for axial elongation in mouse development. **Develop. Bio**, v.101, p. 7641-7645, 2004.

- COLLIER, R.J., COLLIER, J.L., RHOADS, R.P., BAUMGARD, L.H. Invited review: Genes involved in the bovine heat stress response. **J. Dairy Sci.**, v.91, p.445-454, 2008.
- DE RENSIS, F., MARCONI, P., CAPELLI, T., GATTI, F., FACCIOLONGO, F., FRANZINI, S. Fertility in postpartum dairy cows in winter or summer following estrous synchronization and fixed time A.I. after the induction of an LH surge with Gonadotropin releasing hormone (GnRH) or human chorionic gonadotropin (hCG). **Theriogenology**, v.58, p.1675-87, 2002.
- DE RENSIS, F., SCARAMUZZI, R.J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow--a review. **Theriogenology**, v.60, p.1139,51, 2003.
- DIKMEN, S., MARTINS, L., PONTES, E., HANSEN, P.J. Genotype effects on body temperature in dairy cows under grazing conditions in a hot climate including evidence for heterosis. **Int. J. Biometeorol**, v.53, p.327-31, 2009.
- EALY, A.D., DROST, M., HANSEN, P.J. Developmental changes in embryonic resistance to adverse effects of maternal heat stress in cows. **J. Dairy Sci.**, v. 76, p. 2899-2905, 1993.
- EALY, A.D., HOWELL, J.L., MONTERROSO, V.H., ARÉCHIGA, C.F., HANSEN, P.J. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. **J. Anim. Sci.**, v.73, p.1401-7, 1995.
- EBERHARDT, B.G., SATRAPA, R.A, CAPINZAIKI, C.R.L., TRINCA L.A, BARROS, C. M. Influence of the breed of bull (*Bos taurus indicus* vs. *Bos taurus taurus*) and the breed of cow (*Bos Taurus indicus*, *Bos taurus taurus* and crossbred) on the resistance of bovine embryos to heat. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 114, p. 54-61, 2009.
- EDWARDS, J.L., EALY, A.D., MONTERROSO, V.H., HANSEN, P.J. Ontogeny of temperature-regulated heat shock protein 70 synthesis in preimplantation bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.48, p.25-33, 1997.
- EDWARDS, J.L., HANSEN, P.J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 46, p. 138-145, 1997.
- EDWARDS, J.L., HANSEN, P.J. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. **Biol. Reprod.**, v.55, p.341-6, 1996.
- EDWARDS, J.L., KING, W.A, KAWARSKY, S.J., EAL Y, A.D.. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP 70 and glutathione. **Theriogenology**, v. 55, p. 209-23, 2001.
- EL-SAYED, A., HOELKER, M., RINGS, F., SALILEW, D., JENNEN, D., THOLEN, E., SIRARD, M.A., SCHELLANDER, K., TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. **Physiol Genomics**, v. 28, p.84-96, 2006.
- GALAVIZ-HERNANDEZ, C., STAGG, C., DE RIDDER, G., TANAKA, T.S., KO, M.S.H., SCHLESSINGER, D., NAGARAJA, R. Plac8 and Plac9, novel placental-enriched genes identified through microarray analysis. **Gene**, v. 309, p.81-89, 2003.

- GAUGHAN, J.B., MADER, T.L., HOLT, S.M., JOSEY, M.J., ROWAN, K.J. Heat tolerance of Boran and Tuli crossbred steers. **J. Anim. Sci.**, v.77, p.2398-2405, 1999.
- GILAD, E., MEIDAN, R., BERMAN, A., GRABER, Y., WOLFENSON, D. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.99, p.315-21, 1993.
- GORDON, I., BOLAND, M.P., MCGOVERN, H., LYNN, G. Effect of season on superovulatory responses and embryo quality in Holstein cattle in Saudi Arabia. **Theriogenology.**, v.27, p.231, 1987(abstract).
- GWAZDAUSKAS, F.C., THATCHER, W.W., KIDDY, C.A., PAAPE, M.J., WILCOX, C.J. Hormonal pattern during heat stress following the salt induced luteal regression in heifers. **Theriogenology.**, v.16, p.271-85, 1981.
- GWAZDAUSKAS, F.C., WILCOX, C.J., THATCHER, W.W. Environmental and management factors affecting conception rate in a subtropical climate. **J. Dairy Sci.**, v.58, p.88-92, 1975.
- HALL, V.J., RUDDOCK, N.T., FRENCH, A.J. Expression profiling of genes crucial for placental and preimplantation development in bovine *in vivo*, *in vitro*, and nuclear transfer blastocysts. **Mol. Reprod. and Develop.**, v. 72, p. 16-24, 2005.
- HAMMOND, A.C., CHASE, JR. C.C., BOWERS, E.J., OLSON, T.A., RANDEL, R.D. Heat tolerance in Tuli-, Senepol-, and Brahman-sired F1 Angus heifers in Florida. **J. Anim. Sci.**, v.76, p.1568-77, 1998.
- HAMMOND, A.C., OLSON, T.A., CHASE, JR. C.C., BOWERS, E.J., RANDEL, R.D., MURPHY, C.N., VOGT, D.W., TEWOLDE, A. Heat tolerance in two tropically adapted *Bos taurus* breeds, Senepol and Romosinuano, compared with Brahman, Angus, and Hereford cattle in Florida. **J. Anim. Sci.**, v.74, p.295-303, 1996.
- HANSEN, P.J., BLOCK, J., LOUREIRO, B., BONILLA, L., HENDRICKS, K.E.M. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of in vitro-produced embryos for post-transfer survival in cattle. **Reprod. Fert. and Develop.**, v. 22, p. 59-66, 2010.
- HANSEN, P.J. DROST, M., RIVERA, R.M., PAULA-LOPES, F.F., AL-KATANANI, Y.M., KRININGER III, C.E., CHASE JR, C.C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v. 55, p. 91-103, 2001.
- HANSEN, P.J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 364, p. 3341-3350, 2009.
- HANSEN, P.J. Exploration of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevate temperatures to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. **Theriogenology**, v.68, p.242-249, 2007.
- HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 349-360, 2004.
- HANSEN, P.J. Possible roles for heat shock protein 70 and glutathione in protection of the mamalian preimplantation embryo from heat shock. **Ann. Rev. Biomed. Sci.**, v. 1, p. 5-29, 1999.

- HANSEN, P.J., DROST, M., RIVERA, R.M., PAULA-LOPES, F.F., AL-KATANANI, Y.M., KRININGER, III C.E., CHASE, JR. C.C. Adverse impact of heat stress on embryo production: causes and strategies for mitigation. **Theriogenology**, v.55, p.91-103, 2001.
- HERNÁNDEZ-CERÓN, J., CHASE JR, C.C., HANSEN, P.J. Differences in heat tolerance between preimplantation embryos from Brahman, Romosinuano and Angus breeds. **J. Dairy Sci.**, v. 71, p. 53-58,. 2004.
- HERRLER, A., KRUSCHE, C.A., BEIER, H.M. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biol. Reprod.**, v.59, p.1302-10, 1998.
- HEYNER, S., SHI, C., GARSIDE, W.T., SMITH, R.M. Functions of the IGFs in early mammalian development. **Mol. Reprod. Dev.**, v.35, p.421-6, 1993.
- INGRAHAM, R.H., STANLEY, R.W., WAGNER, W. Relationship of temperature and humidity to conception rate of Holstein cows in Hawaii. **J. Dairy. Sci.**, v.59, p.2086-90, 1976.
- JOUSAN, F.D., HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. **Biol. Reprod.**, v.71, p.1665-1650, 2004.
- KAMWANJA, L.A., CHASE, JR. C.C., GUTIERREZ, J.A., GUERRIERO, JR. V., OLSON, T.A., HAMMOND, A.C., HANSEN, P.J. Responses of bovine lymphocytes to heat shock as modified by breed and antioxidant status. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.438-44, 1994.
- KANE, M.T., MORGAN, P.M., COONAN, C. Peptide growth factors and preimplantation development. **Hum. Reprod. Update.**, v.3, p.137-57, 1997.
- KORNMATITSUK, B., CHANTARAPRATEEP, P., KORNMATITSUK, S., KINDAHL, H. Different Types of postpartum luteal activity affected by the exposure of heat stress and subsequent reproductive performance in holstein lactating cows. **Reprod. Dom. Anim.**, v.43, p.515-9, 2008.
- KRININGER, C.E., STEPHENS, S.H., HANSEN, P.J. Developmental changes in inhibitory effects of arsenic and heat shock on growth of preimplantation bovine embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.63, p. 335-340, 2002.
- KRININGER, III C.E., BLOCK, J., AL-KATANANI, Y.M., RIVERA, R.M., CHASE, JR. C.C., HANSEN, P.J. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. **Anim. Reprod. Sci.**, v.78, p.13-24, 2003.
- LACANDRA, G.M., DELL'AGUILA, M.E., FUSCO, S., SCIORCI, R.L., PERRONE, P., MINOIA, P.. *In vitro* fertility test of bull semen. In: The 13th **International Congress on Animal Reproduction**, Sydney, p.656-8, 1993.
- LANE, M. Mechanisms for managing cellular and homeostatic stress *in vitro*. **Theriogenology**, v. 55, p. 225-36, 2001.
- LAWRENCE, J.L., PAYTON, R.R., GODKIN, J.D., SAXTON, A.M., SCHRICK, F.N., EDWARDS, J.L. Retinol improves development of bovine oocytes compromised by heat stress during maturation. **J. Dairy. Sci.**, v.87, p.2449-54, 2004.

- LAZZARI, G., GALLI, C. Bull effect on the development of *in vitro* matured and fertilized bovine oocytes cultured into ligated oviduct of the sheep. In: **The 9th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association**, Lyon; p.224, 1993[abstract].
- LENZ, R.W., BALL, G.D., LEIBFRIED, R.L.A.X., FIRST, N.L. *In vitro* maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent processes. **Biol. Reprod.**, v.29, p.173-9, 1983.
- LIGHTEN, A.D., MOORE, G.E., WINSTON, R.M.L., HARDY, K. Routine addition of human insulin-like growth factor-1 ligand could benefit clinical *in vitro* fertilization culture. **Human Reprod.**, v. 13, p. 3144–50, 1998.
- LONERGAN, P., CAROLAN, C., VAN LANGENDONCKT, A., DONNAY, I., KHATIR, H., MERMILLO, P. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v.54, p.1420-9, 1996.
- LONERGAN, P., GUTIÉRREZ-ADÁN, A., PINTADO, B., FAIR, T., WARD, F., FUENTE, J.D., BOLAND, M. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v.57, p.146-52, 2000.
- LUFT, J.C., DIX, D.J. Hsp70 expression and function during embryogenesis. **Cell Stress & Chaperones**, v.4, p. 162-170, 1999.
- MAKAREVICH, A.V., MARKKULA, M. Apoptosis and cell proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during *in vitro* maturation and culture. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 386–92, 2002.
- MALAYER, J.R., HANSEN, P.J. Differences between Brahman and Holstein cows in heat shock-induced alterations of protein synthesis and secretion by oviducts and uterine endometrium. **J. Anim. Sci.**, v.68, p.266-80, 1990.
- MALAYER, J.R., HANSEN, P.J., BUHI, W.C. Secretion of proteins by cultured bovine oviducts collected from estrus through early diestrus. **J. Exp. Zool.**, v.248, p.345-53, 1988.
- MATSUZUKA, T., OZAWA, M., NAKAMURA, A., USHITANI, A., HIRABAYASHI, M., KANAI, Y. Effects of heat stress on the redox status in the oviduct and early embryonic development in mice. **J. Reprod. Dev. Res.**, v. 51, p. 281-287, 2005.
- MONGET, P., MAZERBOURG, S., DELPUECH, T., MAUREL, M.C., MANIÈRE, S., ZAPF, J., LALMANACH, G., OXVIG, C., OVERGAARD, M.T. Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation. **Biol. Reprod.**, v.68, p.77-86, 2003.
- MOREIRA, F., PAULA-LOPES, F.F., HANSEN, P.J., BADINGA, L., THATCHER, W.W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of *in vitro* derived bovine embryos. **Theriogenology**, v.57, p.895-907, 2002.
- NUTTINCK, F., CHARPIGNY, G., MERMILLOD, P., LOOSFELT, H., MEDURI, G., FRERET, S., GRIMARD, B., HEYMAN, Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus-

- oocyte complexes during oocyte maturation. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.27, p.179-95, 2004.
- PALMA, G.A., SINOWATZ, F. Male and female effects on the *in vitro* production of bovine embryos. **Anat. Histol. Embryol.**, v.33, p.257-62, 2004.
- PARRISH, J.J., SUSKO-PARRISH, J.L., LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L., CRITSER, E.S., EYESTONE, W.H., FIRST, N.L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v.25, p.591-600, 1986.
- PAULA-LOPES, F.F., CHASE JR, C.C., AL-KATANANI, Y.M., KRININGER III, C.E., RIVERA, R.M., TEKIN, S., MAJEWSKI, A.C., OCON, O.M., OLSON, T.A., HANSEN, P.J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, v. 125, p. 285-294, 2003.
- PAULA-LOPES, F.F., CHASE, JR. C.C., AL-KATANANI, Y.M., KRININGER, I.C.E., RIVERA, R.M., TEKIN, S., MAJEWSKI, I.A.C., OCON, O.M., OLSON, T.A., HANSEN, P.J. Breed differences in resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock. **Theriogenology**, v.55, p.436 2001. [Abstract]
- PAULA-LOPES, F.F., HANSEN, P.J. Heat-shock induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally-regulated phenomenon. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 1169-1177, 2002.
- PEGORER, M.F., VASCONCELOS, J.L., TRINCA, L.A., HANSEN, P.J., BARROS, C.M. Influence of sire and sire breed (Gyr versus Holstein) on establishment of pregnancy and embryonic loss in lactating Holstein cows during summer heat stress. **Theriogenology**, v.67, p.692-7, 2007.
- PIRES, M.F.A., SARTUNINO, H.M., CAMPOS, A.T., TEODORO, R.L. Taxa de gestação em fêmeas da raça holandesa confinadas em *Free Stall*, no verão e inverno. **Reunião anual SBZ**, 38, 2001, Piracicaba. Anais. Piracicaba 2001.
- PRAYAGA, K.C. Evaluation of beef cattle genotypes and estimation of direct and maternal genetic effects in a tropical environment. 2. Adaptive and temperament traits. **Australian Journal of Agricultural Research**, v.54, p.1027-38, 2003.
- PUTNEY, D.J., DROST, M., THATCHER, W.W. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. **Theriogenology**, v.31, p.765-78, 1989.
- PUTNEY, D.J., MALAYER, J.R., GROSS, T.S., THATCHER, W.W., HANSEN, P.J., DROST, M. heat stress-induced alterations in the synthesis and secretion of proteins and prostaglandins by cultured bovine conceptuses and uterine endometrium. **Biol. Reprod.**, v. 39, p. 717-728, 1988.
- RIVERA, R.M., HANSEN, P.J. development of cultured bovine embryos after exposure to increased temperatures in the physiological range. **Reproduction**, v. 121, p. 107-115, 2001.
- ROCHA, A., RANDEL, R.D., BROUSSARD, J.R., LIM, J.M., BLAIR, R.M., ROUSSEL, J.D., GODKE, R.A., HANSEL, W. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos Taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v. 49, p. 657-665, 1998.

- ROMAN-PONCE, H., THATCHER, W.W., CATON, D., BARRON, D.H., WILCOX, C.J. Thermal stress effects on uterine blood flow in dairy cows. **J. Anim. Sci.**, v. 46, p. 175-180, 1978.
- ROTH, Z., HANSEN, P.J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v.129, p.235-44, 2005.
- ROTH, Z., HANSEN, P.J. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. **Biol. Reprod.**, v.71, p.1898-906, 2004.
- ROTH, Z., MEIDAN, R., BRAW-TAL, R., WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. **J. Reprod. Fertil.**, v.120, p.83-90, 2000.
- ROTH, Z., MEIDAN, R., SHAHAM-ALBALANCY, A., BRAW-TAL, R., WOLFENSON, D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. **J. Reprod. Fertil.**, v. 121, p. 745-751, 2001.
- RYAN, D.P., BOLAND, M.P. Frequency of twin births among Holstein Friesian cows in a warm dry climate. **Theriogenology.**, v.36, p.1-10, 1991.
- SAITO, D.Y. Estudo da influência da raça do touro (*Bos indicus* x *Bos taurus*) na resistência de embriões bovinos ao estresse térmico calórico *in vitro*, no estágio inicial de desenvolvimento. **Instituto de Biociências**. Botucatu: UNESP, p.42, 2006.
- SANTIAGO, A.A. O Zebu na Índia, Brasil e no mundo. **Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola**, p.706, 1985.
- SARTORELLI, E.S., SATRAPA, R.A., BARCELOS, A.C.Z., POTIENS, J.R., BARROS, C.M. Influência do estresse térmico na taxa de apoptose de embriões bovinos (*indicus* vs. *taurus*) produzidos *in vitro* e na capacidade dos mesmos originarem gestações. **Acta Sci. Vet.**, v. 34, p. 476, 2006.
- SARTORI, R., SARTOR BERGFELT, R., MERTENS, A.S., GUENTHER, J.N., PARRISH, J.J., WILTBANK, M.C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **J. Dairy Sci.**, v. 85, p. 2803-2812, 2002.
- SATRAPA, R. A., SIMOES, R. A. L., CASTILHO, A. C. S., NABAN, T., SILVA, C. F., RAZZA, E. M., PEGORER, M., PUELKER, R. Z., BURATINI JR, J., BARROS, C. M. Expressão gênica de IGF I e II, seus receptores (IGFR-I e II), suas proteínas ligantes (IGFBP 2 e 4) e PAPP-A em oócitos imaturos bovinos (zebuínos vs taurinos). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38. p.766, 2010.
- SATRAPA, R.A., NABHAN, T., SILVA, C.F., SIMAMES, R.A.L., RAZZA, E.M., PUELKER, R.Z., TRINCA, L.A., BARROS, C.M. Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of *in vitro* produced bovine embryos. **Theriogenology.** , v.76, p.1162 - 1167, 2011a.
- SATRAPA, R.A., ANTONY, A. C. S., SIMOES, R. A. L., RAZZA, E. M., SILVA, C. F., NABAN, T., PEGORER, M., PUELKER, R. Z., BURATINI JR, J., BARROS, C. M. Perfil da expressão gênica dos membros do sistema IGF em blastocistos

- bovinos produzidos *in vitro*: comparação entre as raças Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, p.808, 2011b.
- SAWAI, K., KAGEYAMA, S., MORIYASU, S., HIRAYAMA, H., MINAMIHASHI, A., ONOE, S. Analysis of mRNA transcripts for insulin-like growth factor receptors and binding proteins in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. **Cloning Stem Cells**, v.7, p.189-98, 2005.
- SILVA, C.F.; CASTILHO, A.C.S.; SATRAPA, R.A.; PUELKER, R.Z.; RAZZA, E.M.; EDUARDO, H.P.; BURATINI JR., J.; BARROS, C.M. Effect of heat stress on expression of some genes related with competence and implantation in Nellore bovine ivp embryos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38. p.766, 2010.
- SIRARD, M.A., RICHARD, F., BLONDIN, P., ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p.126-36, 2006.
- SIRISATHIEN, S., HERNANDEZ-FONSECA, H.J., BRACKETT, B.G. Influences of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I on bovine blastocyst development *in vitro*. **Anim. Reprod. Sci.**, v.77, p.21-32, 2003.
- STOJKOVIC, M., WOLF, E., ZAKHARTCHENKO, V.J., RIEDL, J., REICHENBACH, H.D. WENINGERKIND, H., BREM, G. Secretion of interferon-tau by bovine embryos in long-term culture: comparison of *in vivo* derived, *in vitro* produced, nuclear transfer and demi-embryos. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 55, p.151-162, 1999.
- STRUMPF, D., MAO, C.A., YAMANAKA, Y., RALSTON, A., CHAWENGSAKSOPHAK, K., BECK, F., ROSSANT, J. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of the ectoderm in mouse blastocyst. **Development**, v. 132, p. 2093-2102, 2005.
- SUGIYAMA, S., MCGOWAN, M., PHILLIPS, N., KAFI, M., YOUNG, M. Effects of increased ambient temperature during IVM and/or IVF on the *in vitro* development of bovine zygotes. **Reprod. Domest. Anim.**, v.42, p.271-4, 2007.
- THATCHER, W.W., COLLIER, R.J. Effects of climate on bovine reproduction. In: Morrow, D.A (Ed) Current therapy in **Theriogenology**, Philadelphia W.B Saunders CO v.2, p.301-9, 1986.
- THATCHER, W.W., GUZELOGLU, A., MATTOS, R., BINELLI, M., HANSEN, T.R., PRU, J.K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v.56, p. 1435-1450, 2001.
- THATCHER, W.W., HANSEN, P.J. Environment and reproduction. **Reprod. Domestic. Anim.**. Amsterdam: Elsevier World Animals Science Series, v. 9, p. 433-57, 1993.
- THATCHER, W.W., MEYER, M.D., DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. **J. Reprod. Fertil. Suppl.**, v. 49, p. 15-28, 1995.
- TORRES-JUNIOR, J.R. de S., PIRES, M. de F.A., de SÁ, W.F., FERREIRA, A. de M., VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A., RAMOS, A.A., BARUSELLI, P.S. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 155-166, 2008.
- WEST, J.W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 86, p. 2131-2144, 2003.

- WILSON, S.J., KIRBY, C.J., KOENIGSFELD, A.T., KEISLER, D.H., LUCY, M.C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. **J. Dairy. Sci.**, v.81, p.2132-8, 1998a.
- WILSON, S.J., MARION, R.S., SPAIN, J.N., SPIERS, D.E., KEISLER, D.H., LUCY, M.C. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 1. Lactating Cows. **J. Dairy. Sci.**, v.81, p.2124-31, 1998b.
- WINGER, Q.A., de los RIOS, P., HAN, V.K., ARMSTRONG, D.T., HILL, D.J., WATSON, A.J. Bovine oviductal and embryonic insulin-like growth factor binding proteins: possible regulators of “embryotrophic” insulin-like growth factor circuits. **Biol. Reprod.**, v.56, p.1415-23, 1997.
- WOLFENSON, D., LUFT, O., BERMAN, A., MEIDAN, R. Effects of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandin F₂ production in bovine luteal cells. **Anim. Reprod. Sci.**, v.32, p.27-40, 1993.
- WOLFENSON, D., ROTH, Z., MEIDAN, R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. **Anim. Reprod. Sci.**, v.60-61, p.535-547, 2000.
- YAO, N., WAN, P.C., HAO, Z.D., GAO, F.F., YANG, L., CUI, M.S., WU, Y., LIU, J.H., LIU, S., CHEN, H., ZENG, S.M. Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures. **Reprod. Dom. Anim**, v.44, p.132-139, 2009.
- 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. **J. Reprod. Fertil.**, v.121, p.447-54, 2001.
- ZHANG, Y., HUANG, L., ZHANG, J., MOSKOPHIDIS, D., MIVECHI, N.F. Targeted disruption of hsf1 leads to lack of thermotolerance and defines tissue-specific regulation for stress-inducible hsp molecular chaperones. **J. Cell. Biochem.**, v. 86, p. 376-393, 2002.

ACTUALIZACIÓN SOBRE LA SUPEROVULACIÓN EN BOVINOS

G.A. Bó¹², A. Tríbulo¹ y Reuben J. Mapletoft²³

¹ Instituto de Reproducción Animal Córdoba (IRAC), Paraje Pozo del Tigre - Estación General Paz - CP: 5145, Córdoba, Argentina,

² Instituto de Ciencias Básicas, Carrera de Veterinaria, Universidad Nacional de Villa María, Villa del Rosario, Córdoba, Argentina

³ Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, SK, Canada.

e-mail: gabrielbo@iracbiogen.com.ar

Resumen. Los protocolos de superovulación han mejorado mucho desde los primeros días en la transferencia de embriones bovinos cuando las gonadotrofinas purificadas no estaban disponibles, la dinámica de la onda folicular era un fenómeno fisiológico desconocido y las prostaglandinas no estaban disponibles. Aunque los protocolos superestimulatorios en el ganado son iniciados normalmente durante la mitad del ciclo, el control de la emergencia de la onda folicular y de la ovulación ha tenido un gran impacto en la aplicación en el campo de la transferencia de embriones. Sin embargo, el tratamiento más común para la sincronización de la emergencia de la onda folicular implica el uso de estradiol, el cual no está permitido su uso en muchas partes del mundo. Por lo tanto, la necesidad de tratamientos alternativos ha conducido a investigaciones recientes. Un enfoque que se ha mostrado prometedor es iniciar los tratamientos con FSH en el momento del inicio de la emergencia de una nueva onda folicular seguida de una ovulación inducida con GnRH. Alternativamente, se ha demostrado que es posible ignorar el momento de la onda folicular, y extender el protocolo de tratamiento, para inducir folículos subordinados. Por último, la corta vida media de la FSH hipofisaria necesita dos tratamientos diarios los cuales demandan mucho tiempo, estrés y esta sujeto a error. Protocolos de tratamiento recientes han permitido la superovulación con dos inyecciones de FSH cada 48 horas, lo que reduce la necesidad de manejo de los animales durante los tratamientos con superovulatorios.

Palabras clave: bovino, transferencia de embriones, superovulación, gonadotrofinas, onda folicular

Introducción

Los tratamientos superovulatorios tradicionales consistían de una sola administración de gonadotrofina coriónica equina (eCG) o dos inyecciones diarias de extractos pituitarios de FSH por 4 o 5 días (Mapletoft *et al.*, 2002). La gonadotrofina coriónica equina es una glicoproteína compleja con una larga vida media (más de 40 horas) lo que representa una ventaja práctica, ya que una sola aplicación inducirá superestimulación ovárica (Murphy and Martinuk, 1991). Sin embargo, esto se traduce en un mayor número de folículos de gran tamaño en el momento de la colecta de ovocitos/embriones lo que afecta la eficiencia de la colecta y la calidad de los embriones cuando se superestimulan vacas *Bos taurus* (González *et al.*, 1994). En contraste, la vida

media de la FSH es muy corta (aproximadamente 5 horas) en la vaca (Laster, 1972), necesitando frecuentes aplicaciones para inducir superestimulación (Monniaux *et al.*, 1983). Dos tratamientos diarios con FSH han resultado en mayor respuesta superovulatoria que una sola aplicación diaria (Looney *et al.*, 1981; Monniaux *et al.*, 1983, Walsh *et al.*, 1993).

La variabilidad en la respuesta superovulatoria, el tiempo y esfuerzo requerido para los tratamientos y la detección de celo han sido los principales factores limitantes que afectan el uso de la tecnología de transferencia de embriones en programas de mejoramiento genético. Aunque el reciente desarrollo de protocolos en el control de la emergencia de la onda folicular y de la ovulación no han eliminado la variabilidad en la respuesta superovulatoria, estos han tenido un impacto positivo sobre la aplicación permitiendo el inicio de los tratamientos en cualquier momento del ciclo (Bó *et al.*, 2002; 2006; Mapletoft *et al.*, 2002). Además, los protocolos que sincronizan la ovulación han permitido la inseminación artificial (IA) de vacas donantes a tiempo fijo, evitando así la necesidad de detectar celo (Baruselli *et al.*, 2006; Bó *et al.*, 2006). Así, los tratamientos son ahora más “amigables” y más fáciles de implementar en el campo y no dependen de la eficiencia de la detección de celo. Como el tratamiento más comúnmente utilizado para la sincronización de la emergencia de la onda folicular para la superestimulación (es decir, estradiol) no puede ser utilizado en muchos países (Lane *et al.*, 2008), tratamientos alternativos están siendo investigados. De manera similar, la inducción de la superovulación con FSH hipofisaria sin la necesidad dos tratamientos diarios es también sujeta a estudios recientes. Esta revisión tiene por objeto seguir la evolución de los protocolos de tratamientos superovulatorios y ofrecer algunas alternativas en la superestimulación de vacas donantes, independientemente del momento del ciclo estral y en la simplificación de los protocolos de tratamiento sin comprometer la producción de embriones transferibles.

Superestimulación: Enfoque tradicional

En los primeros años de la superestimulación, el tratamiento con eCG se hizo coincidir con la regresión natural del CL, es decir aproximadamente a partir del Día 16 del ciclo. Con la introducción de la prostaglandina F_{2α} (PGF) fue posible iniciar tratamientos con gonadotrofinas en diferentes momentos del ciclo estral. Después muchos profesionales pasaron a iniciar los tratamientos con gonadotrofinas durante la mitad del ciclo (es decir 8 a 12 días después del estro). Aunque esto se basó inicialmente en una cuestión empírica y algunos datos experimentales (Lindsell *et al.*, 1986), ahora se sabe que este abarca el momento de la aparición de la segunda onda folicular en el ganado bovino (Pierson y Ginther, 1987; Ginther *et al.*, 1989). La respuesta superovulatoria es mayor cuando los tratamientos con gonadotrofinas son iniciados precisamente en el momento de la emergencia de la onda folicular en lugar de 1 o 2 días después (Nasser *et al.*, 1993), por lo que es necesario sincronizar el momento de la emergencia de la onda folicular en un grupo de animales (Bó *et al.*, 1995).

Con respecto al momento y protocolo de aplicación de la FSH y la PGF, muchos profesionales prefieren dosis decrecientes de FSH y tratar con PGF en el tercer día del protocolo de tratamiento, mientras que otros prefieren tratar con PGF en el cuarto día, y muchos no tratan con FSH en el día después de la administración de PGF. De todos modos, la mayoría de los protocolos de tratamiento de superestimulación han logrado inducir superovulación en la mayoría de las circunstancias (revisado en Mapletoft *et al.*,

2002). Otros incorporan un dispositivo con progesterona dentro del protocolo para asegurarse de que las donantes no entren en celo (Bó *et al.*, 2006). En todos los casos, las inseminaciones son normalmente realizadas 12 y 24 horas después del inicio del celo (Mapletoft *et al.*, 2002). Aunque el inicio de los tratamientos superestimuladores durante la mitad del ciclo ha servido en la industria de la transferencia de embriones, los protocolos de tratamiento convencionales requieren que el personal esté dedicado a la detección del estro y que todas las donantes demuestren celo más o menos al mismo tiempo para comenzar los tratamientos superestimuladores en un momento oportuno, es decir en la mitad del ciclo.

Manipulación de la onda folicular para superestimulación

Estradiol y progesterona

La capacidad de inducir la emergencia de la onda folicular permite iniciar las superestimulación sin tener en cuenta el momento del ciclo estral y eliminar la necesidad de detectar celo o de esperar 8 a 12 días para iniciar los tratamientos con gonadotrofinas (Mapletoft *et al.*, 2002). En la década de los '90, reportamos sobre el uso de progestágenos y estradiol para inducir la sincronización de la emergencia de una nueva onda folicular (Bó *et al.*, 1995) y este enfoque para la superovulación en la vaca ha sido revisada ampliamente (Bó *et al.*, 2002; Mapletoft *et al.*, 2002). Esto ha sido utilizado por profesionales alrededor del mundo y ha sido incorporado recientemente dentro de los protocolos que permiten la IA a tiempo fijo de las donantes (Bó *et al.*, 2006; Baruselli *et al.*, 2006).

El protocolo más común para sincronizar la emergencia de la onda folicular para la superestimulación incluye la administración de 5 o 2,5 mg de estradiol-17 β o 2,5 mg de benzoato de estradiol más 100 o 50 mg de progesterona por vía intramuscular en el momento de la inserción de un dispositivo intravaginal con progesterona (revisado en Bó *et al.*, 2002; 2006; Mapletoft *et al.*, 2002). El tratamiento con estradiol suprime la liberación de FSH e induce atresia folicular. Una vez que el estradiol es metabolizado, surge la FSH y emerge una nueva onda folicular, aproximadamente 4 días después (Bó *et al.*, 1995). Los tratamientos con gonadotrofinas son iniciados 4 días después del tratamiento.

IA a tiempo fijo en donantes

Barros y otros colegas han desarrollado un protocolo superestimulador en ganado *Bos indicus* que lo denominan como protocolo P-36 (Barros y Nogueira, 2005). En este protocolo, el dispositivo con progestágeno permanece por hasta 36 horas después de la administración de PGF (por lo tanto, el protocolo fue llamado P-36) y la ovulación es inducida por la administración de pLH (Lutropin, Bioniche Animal Health) o GnRH 12 horas después de retirado el dispositivo (es decir, 48 horas después de la PGF). Puesto que la ovulación ocurre entre 24 y 36 horas después de la administración de pLH (Nogueira y Barros, 2003), la IA a tiempo fijo se realiza 12 a 24 horas después de la pLH, eliminando la necesidad de detectar el estro.

En una serie de experimentos en donde el tiempo de las ovulaciones fueron monitoreadas por ultrasonografía en donantes *Bos taurus*, demostramos que la sincronización de la ovulación podría ser incorporado en un protocolo de IA a tiempo fijo sin detección de celo y sin comprometer los resultados. Básicamente, el tiempo de remoción del dispositivo con progesterona fue demorado para prevenir ovulaciones tempranas y permitir el desarrollo de los folículos mas pequeños de crecer mas y desarrollar receptores de LH, seguido de la inducción de la ovulación con GnRH o pLH. En este protocolo, la emergencia de la onda folicular es sincronizada con estradiol y un dispositivo con progesterona en el Día 0 y los tratamientos con FSH son iniciados en el Día 4. En el Día 6, se inyecta PGF AM-PM y en la mañana del Día 7, el dispositivo con progesterona es removido (Protocolo P-24). En el Día 8 AM (12 horas después), se inyecta GnRH o pLH y las inseminaciones se realizan 12 y 24 horas después. Desde una perspectiva práctica, la IA a tiempo fijo en donantes ha demostrado ser muy útil para los profesionales que trabajan en la transferencia de embriones (Larkin *et al.*, 2006).

Estudios en vacas lecheras de alta producción (*Bos taurus*) en Brasil han indicado que es preferible permitir un período adicional de 12 horas antes de retirar el dispositivo con progesterona (es decir, el Día 7 PM; P-36) seguido por GnRH 24 horas después (es decir, el Día 8 PM) con IA a tiempo fijo 12 y 24 horas más tarde (Bó *et al.* 2006). En razas *Bos indicus*, se encontró que es preferible remover el dispositivo con progesterona en el Día 7 PM (P-36), seguido por GnRH 12 horas después (es decir, el Día 8 AM; Baruselli *et al.*, 2006). Aunque las donantes son normalmente inseminadas dos veces, 12 y 24 horas después de la administración de GnRH o pLH, es posible utilizar una sola inseminación 16 horas después de la pLH, pero la calidad seminal es clave para obtener buenos resultados con una sola IA (Baruselli *et al.*, 2006).

Enfoques alternativos para la sincronización de la onda folicular y superestimulación

Ablación folicular

Una alternativa al estradiol es eliminar el efecto supresivo del folículo dominante mediante ablación folicular guiada por ultrasonografía (Bungartz y Niemann, 1994; Bergfelt *et al.*, 1997). Estudios iniciales involucran la ablación de todos los folículos ≥ 5 mm (Bergfelt *et al.*, 1997), pero posteriormente demostraron que es necesario ablacionar solamente los dos folículos más grandes (Baracaldo *et al.*, 2000) para estar seguros de que el folículo dominante fue eliminado. Los tratamientos superestimulatorios deben ser iniciados 1.5 a 2 días después, en el momento de la emergencia de la onda folicular. Aunque la ablación folicular ha demostrado ser altamente efectiva (revisado en Bó *et al.*, 2006), el equipamiento de ultrasonido y personal entrenado son requeridos siendo esto más apropiado para centros de producción de embriones, donde todas las donantes están alojadas en un mismo lugar. En este caso una opción practica es hacer la aspiración de los folículos y utilizar los ovocitos para la producción *in vitro* de embriones y dos días después de la aspiración comenzar con los tratamientos con FSH para obtener embriones *in vivo* y poder congelarlos.

GnRH o pLH

Se ha demostrado que la administración de GnRH inducirá la ovulación de un folículo dominante desarrollado (Macmillan y Thatcher, 1991). Sin embargo, la emergencia de la onda folicular ocurre solo cuando la GnRH induce ovulación (Martinez *et al.*, 1999) y las tasas de ovulación después del tratamiento con GnRH en diferentes momentos del ciclo estral en vacas ha sido reportado con un rango de 44,3% al 60% (Colazo *et al.*, 2009). Por lo tanto, el intervalo desde el tratamiento con GnRH y la emergencia de la onda puede ser inconsistente para la superestimulación. En efecto, Deyo *et al.*, (2001) reportó una producción de embriones insatisfactoria después de la sincronización de la emergencia de la onda folicular con GnRH. Sin embargo, resultados recientes (Hinshaw, pers. comm.; Steel y Hasler, 2009) y una investigación con 411 donantes lecheras (Wock *et al.*, 2008) han revelado resultados prometedores. Básicamente, un dispositivo con progesterona es insertado en cualquier momento del ciclo estral y la GnRH es administrada 2 o 3 días después comenzando los tratamientos superestimulatorios 1,5 a 2,5 días después.

Superestimulación en la primera onda folicular después de la sincronización de la ovulación con GnRH

La emergencia de la primera onda folicular ocurre constantemente en el día de la ovulación (o el día después de iniciado el celo) en el ganado bovino (Ginther *et al.*, 1989). Nasser *et al.* (1993) han demostrado que la superestimulación se puede iniciar en el momento de la emergencia de la primera onda folicular, y los folículos en la primera onda folicular son tan sensibles a los tratamientos con gonadotrofinas como los folículos de la segunda onda (Adams *et al.*, 1994). Sin embargo, un dispositivo con progesterona debe estar en su lugar durante el tratamiento con FSH en la primera onda para asegurar la calidad embrionaria (Nasser *et al.*, 2011).

Un enfoque alternativo resulta en combinar el uso de GnRH y un dispositivo con progesterona (revisado por Bó *et al.*, 2010). En este protocolo, un folículo persistente es inducido por el uso estratégico de PGF y un dispositivo con progesterona (Small *et al.*, 2009) y GnRH o pLH es usada para inducir la ovulación, momento en el cual son iniciados los tratamientos con gonadotrofinas. El protocolo más fácil y eficaz de utilizar consiste en la inserción de un dispositivo con progesterona y la administración de PGF en cualquier momento del ciclo estral (Día 0). El dispositivo con progesterona permanece en su lugar hasta el final de los tratamientos con FSH. La GnRH es administrada en el Día 7 AM y los tratamientos con FSH son iniciados 36 horas después (es decir, Día 8 PM), en el momento esperado de la ovulación. El dispositivo con progesterona es removido y la PGF administrada en el Día 12 AM, y mediante la adición de una segunda inyección de GnRH 24 horas después para sincronizar la ovulación, se realiza la IA a tiempo fijo 12 y 24 horas más tarde. Este protocolo resultó en 90% de vacas *Bos taurus* y *Bos taurus* x *Bos indicus* ovulando con la primera inyección de GnRH, la cual sincronizó la emergencia de la onda folicular. Este protocolo puede ser utilizado en cualquier momento del ciclo estral, sin detección de celo y sin la disminución en la producción de embriones.

Efecto del prolongamiento del protocolo de tratamiento superovulatorio sobre la respuesta ovárica y el número de embriones transferibles

Durante una onda folicular normal, los folículos subordinados regresan por las concentraciones bajas de FSH, causados por las secreciones de estradiol e inhibina del folículo dominante (Adams *et al.*, 1992; 1993). Folículos pequeños requieren FSH para continuar con su crecimiento y recientes estudios indican que folículos tan pequeños como de 1 mm de diámetro comenzarán a crecer bajo la influencia de la FSH (revisado en Adams *et al.*, 2008). Quizá todo lo que se necesite para la superovulación es la presencia de folículos de 3 a 4 mm de diámetro en el momento que sea iniciado el protocolo tradicional de superestimulación durante 4 ó 5 días. Asumiendo una tasa de crecimiento de 1 a 2 mm por día, esto debería tomar 2-3 días, o sea, sumar 2-3 días al protocolo de superestimulación. Bajo estas circunstancias, la presencia del folículo dominante puede no tener ningún efecto en la respuesta superovulatoria, la FSH exógena reemplaza a aquella que está siendo inhibida por las sustancias que secreta el folículo dominante. De hecho, Bó *et al.*, (2008) superovuló con éxito donantes en cualquier momento del ciclo estral, sin tener en cuenta la presencia de un folículo dominante. Dosis pequeñas de FSH fueron administradas dos veces diarias comenzando 2 días antes del día esperado de la emergencia de la onda folicular y el protocolo de tratamiento regular con FSH comienza 2 días después. Alternativamente, los 2 días de pretratamiento con FSH podría ser reemplazado con una inyección de 500 UI de eCG. Caccia *et al.*, (2000) reportaron que la administración de 500 UI de eCG 2 días antes de iniciado los tratamientos con FSH tendieron a incrementar la respuesta superovulatoria en vacas donantes para carne y el pretratamiento de donantes con pobre respuesta con 500 UI de eCG resultaron en un incremento de la producción de embriones mayor que en aqueelas sin eCG (Bo *et al.*, 2008). Se planteó la hipótesis que el pretratamiento con eCG dio lugar a folículos adicionales reclutados en la onda.

Otro estudio fue diseñado para evaluar la hipótesis de que un incremento en el alargamiento de exposición de los folículos ovulatorios a FSH durante la superestimulación ovárica incrementará el número de ovulaciones y embriones viables en vacas donantes (García Guerra *et al.*, 2012). Veinticuatro vacas de carne fueron inicialmente sujetas a ablación folicular en estados aleatorios del ciclo estral para determinar el número de folículos en la emergencia de la onda; las vacas con números comparables de folículos fueron asignadas al azar en grupos por réplica. Se realizó ablación folicular a todos los folículos ≥ 5 mm y se colocó un dispositivo intravaginal con progesterona (PRID, Vetoquinol). El grupo Control (n=12) fue tratado con FSH durante 4 días mientras que las vacas en el grupo prolongado (n=12) tuvieron un tratamiento con FSH por 7 días. El tratamiento con FSH fue iniciado 1,5 días después de la ablación (Día 0) con una dosis total de 400 mg de NIH-FSH-P1 (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Belleville ON, Canada). La dosis total de FSH fue distribuida equitativamente en 8 inyecciones (Control) y en 14 inyecciones (Prolongado) por vía IM con intervalos de 12 horas. Se administraron 2 aplicaciones de prostaglandina F2a (con un intervalo de 12 horas) con la quinta y sexta FSH (Control) o con onceava (11) y doceava (12) FSH (Prolongado) y el PRID fue removido 12 horas después de la última PGF. Ambos grupos recibieron 12,5 mg de pLH IM (Lutropin-V) 24 horas después de la remoción del PRID y fueron IATF 12 y 24 horas después. Se realizó una tercera inseminación 12 horas más tarde a todas las vacas que tenían 2 o más folículos ≥ 9 mm (12/12 y 9/12 en los grupos Control y Prolongado respectivamente; P=0,22). Todas las vacas fueron sujetas a ultrasonografía transrectal cada dos días y en el momento de la colecta de los embriones. Los ovocitos/embriones fueron colectados por método no

quirúrgico 7 días después de la pLH y fueron evaluados siguiendo las recomendaciones de la IETS. No se encontraron diferencias significativas en el número total de ovocitos/embriones, pero hubo más ovulaciones, cuerpo lúteo (CL) y ovocitos fertilizados en el grupo Prolongado ($P < 0,05$). En resumen, la prolongación del tratamiento superestimulador dio lugar a un aumento del número de ovulaciones sin una disminución de los ovocitos o embriones. Los datos sugieren que el tratamiento superestimulador tradicional de 4 días proporciona tiempo inadecuado para maximizar la respuesta superovulatoria. Esta alternativa debería ser tenida en cuenta para donantes que responden poco a la superestimulación.

Tabla 1. Respuesta Superovulatoria (promedio \pm EE) de vacas tratadas con un tratamiento tradicional de 4 días (Control) ó un protocolo de tratamiento de 7 días (Prolongado).

	Control	Prolongado
Número de ovulaciones (12 a 36 h después de pLH)	18,3 \pm 2,9 ^b	30,9 \pm 3,9 ^a
CL	20,8 \pm 2,2 ^b	27,2 \pm 2,1 ^a
Folículos anovulatorios (≥ 9 mm)	3,6 \pm 1,0	3,6 \pm 1,2
Total ovocitos/embriones	11,3 \pm 2,0	13,8 \pm 2,3
Ovocitos fertilizados (%)	5,6 \pm 1,5 ^b	8,0 \pm 2,0 ^a
Embriones transferibles (%)	4,2 \pm 1,5 ^b	6,3 \pm 1,6 ^a
Embriones congelables (%)	4,0 \pm 1,4 ^b	6,0 \pm 1,6 ^a

^{a,b} Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Uso de eCG para estimular la etapa final de crecimiento folicular en un protocolo de superestimulación

La necesidad de FSH y LH en diferentes momentos durante la superestimulación ha sido objeto de debate. Estudios básicos en el desarrollo folicular han demostrado que la FSH es necesaria para el reclutamiento y crecimiento folicular (Adams *et al.*, 1992; 1993), hasta que el folículo dominante alcanza un diámetro de 8,5 mm en ganado *Bos taurus* (Ginther *et al.*, 1996) y 6,2 mm en ganado *Bos indicus* (Gimenes *et al.*, 2008, Sartorelli *et al.* 2005). Después de la selección, los folículos dominantes adquieren receptores de LH y se transforman en LH dependientes (revisado en Mihm y Evans, 2008). Por lo tanto, los folículos en el ganado superestimulado pueden beneficiarse de la inclusión de LH en el final del protocolo de tratamiento superestimulador. Gonadotropina coriónica equina es una gonadotropina con actividad FSH y LH (Steward *et al.*, 1976; Litch *et al.*, 1979; Murphy y Martinuk, 1991) y podría proporcionar un estímulo constante a los receptores de LH de los folículos en crecimiento cerca del final de un tratamiento convencional con FSH.

Barros *et al.* (2008) llevó a cabo un experimento en el cual vacas Nelore fueron superestimuladas con FSH durante 3 días; las últimas dos inyecciones de FSH (en el cuarto día) fueron reemplazadas por dos inyecciones de 200 UI de eCG. Este tratamiento incrementó significativamente el número de ovocitos/embriones y aumento numéricamente el número de embriones transferibles sobre las controles. Aunque Sartori *et al.*, (2009) no encontró ningún efecto beneficioso en vaquillonas Nelore, más embriones transferibles fueron producidos en vacas Red Sindhi (Mattos *et al.*, 2011).

Para investigar más a fondo esta alternativa, se realizó un experimento en ganado Brangus (Reano *et al.*, 2009). Se utilizaron 38 vacas y 25 vaquillonas que fueron asignadas al azar en tres grupos para ser superestimuladas con dos inyecciones diarias de FSH durante 4 días o recibir una sola aplicación de 400 UI de eCG después de las primeras 4 inyecciones de FSH (es decir, en el Día 6, cuando se administra la PGF; sin tratamiento en e Día 7) o recibir dos inyecciones de 200 UI de eCG en el Día 7 (después de 6 inyecciones de FSH en los Días 4, 5 y 6). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo Control y aquellas que recibieron una sola dosis de 400 UI de eCG en el tercer día (es decir, Día 6) que sugiere que podría ser posible reducir el número de tratamientos requeridos para inducir la superestimulación. Sin embargo, aún más importante, tratamientos con dos dosis de 20 UI de eCG en el Día 7 resultaron en un aumento en el número de embriones transferibles.

Superestimulación con una sola inyección subcutánea de FSH

La necesidad de inyectar dos veces por día requiere permanente atención por parte del personal de campo y aumenta la posibilidad de cometer fallas debido al mal manejo y errores en el tratamiento. Además, dos tratamientos por día puede causar estrés en las donantes con una disminución en la respuesta superovulatoria (Bó *et al.*, 1994), y/o alterar el pico preovulatorio de LH (Stoebel y Moberg, 1982). Protocolos simplificados de superestimulación podrían reducir los costos de manejo y mejorar la respuesta, particularmente en animales indóciles.

Una sola inyección subcutánea del total de la dosis de FSH ha demostrado resultar en una respuesta superovulatoria equivalente a tratamientos con dos aplicaciones diarias durante 4 días (Bó *et al.*, 1994). Sin embargo, la respuesta parece depender de la condición corporal; ocurre consistentemente una mayor respuesta superovulatoria cuando la inyección subcutánea se realiza detrás de la escápula que cuando se administra en la región del cuello. De hecho, cualquier factor que aumentó la velocidad de absorción de FSH (por ejemplo, inyección intramuscular o inyección en la región del cuello en vacas flacas) resultó en una baja respuesta superovulatoria (Bo *et al.*, 1994). Los resultados fueron inconsistentes en vacas Holstein debido a una menor cantidad de grasa subcutánea, pero esto se superó parcialmente mediante el fraccionamiento de la dosis total de FSH por lo que el 75% fue administrado por vía subcutánea detrás de la escápula en el inicio del tratamiento y el 25% fue administrado en el momento de la inyección de PGF 48 horas después (Lovie *et al.*, 1994). Como resultado este enfoque no fue utilizado ampliamente, especialmente en animales con poca grasa subcutánea.

Superestimulación utilizando una o dos inyecciones intramusculares de FSH en hialuronato

Superestimulación con una sola inyección intramuscular

Una alternativa para inducir una consistente respuesta superovulatoria con una sola aplicación de FSH sería combinar extracto de pituitaria con agentes que resulten en una lenta y sostenida liberación de la hormona durante varios días. Estos agentes son denominados comúnmente polímeros, y son biodegradables y no reactivos en el tejido, facilitando su uso en animales (Sutherland, 1991). Diversos reportes de una sola aplicación de FSH diluidos en diferentes polímeros han aparecido en la literatura, pero todos han tenido limitaciones (revisado por Bó *et al.*, 2010).

Nosotros hemos realizado 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 con Hialuronato de Sodio (SRF, Bioniche Animal Health; Tribulo *et al.*, 2011). 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 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 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 $\text{PGF}_{2\alpha}$, para ser nuevamente tratadas entre 13 y 20 días después (30 a 40 días de intervalo entre colectas). En la Tabla 2 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 2. Respuesta superovulatoria (media \pm 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 transferibles
Control	175	12,1 \pm 0,6	8,5 \pm 0,5	6,4 \pm 0,4
Dosis simple	178	11,6 \pm 0,7	8,3 \pm 0,5	6,5 \pm 0,5
Valor P		0,107	0,2346	0,5117

Las medias no difieren ($P > 0.1$)

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 utilizó 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 consideró que la concentración de SRF (20 mg/ml de hialuronato de sodio) utilizada en estos experimentos 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 (10 mg/ml, MAP 5, Bioniche Animal Health) 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 con 10 mg/ml de hialuronato de sodio fue similar a la de las vacas tratadas con 20 mg/ml de hialuronato 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 10 mg/ml de hialuronato, 48 horas después de iniciar el tratamiento, podría estimular los folículos para continuar su crecimiento a un tamaño ovulatorio, como ocurrió en el grupo 20 mg/ml de hialuronato. En un estudio preliminar con 50 vacas para carne, dos inyecciones intramusculares de FSH en 10 mg/mL de hialuronato cada 48 horas (tratamiento Split; 75% en el Día 4 y 25% en el Día 6) indujo una respuesta superovulatoria y la producción de ovocitos/embriones no fue diferente de dos aplicaciones diarias durante 4 días. Especulamos que una preparación más diluida de hialuronato puede ser eficaz en un

tratamiento Split. Se diseñó un experimento para comparar dos aplicaciones intramusculares de FSH (tratamiento Split) con dos aplicaciones intramusculares diarias de FSH durante 4 días en solución salina (Tribulo et al., 2012). Veintinueve donantes para carne fueron asignadas al azar en uno de los tres grupos de tratamiento (Control, 5 mg/mL hialuronato ó 10 mg/mL hialuronato) para ser superestimuladas tres veces en un diseño cross-over. La dilución del polvo de FSH liofilizado se realizó utilizando 20 mL de solución salina para las vacas del Grupo Control (Grupo 1) ó 10 mL de hialuronato (5 mg/mL, MAP-5 50 MG; 10 mg/mL, MAP-5; Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canada) para las vacas en los Grupos 2 y 3, respectivamente. Todas las vacas recibieron una dosis total de 300 mg NIH-FSH-P1 (Folltropin-V; Bioniche Animal Health) por medio de inyecciones intramusculares; en los Grupos 2 y 3, se inyectaron 200 mg de FSH en el Día 4 y 100 mg de FSH en el Día 6. Aunque el número de CL favoreció a los Grupos con dos aplicaciones de FSH (Grupos 2 y 3), el número de ovocitos/embriones, ovocitos fertilizados y el número de embriones transferibles no difirió entre los grupos de tratamiento. Los resultados se resumen en la Tabla 3. Los datos confirman que dos aplicaciones intramusculares de FSH (tratamiento Split) diluida en cualquiera de las soluciones de hialuronato (5 mg/mL ó 10 mg/mL) resultó en un número comparable de embriones transferibles con el tratamiento tradicional de dos aplicaciones diarias. Dos vacas del Grupo Control y una vaca en cada uno de los Grupos con dos aplicaciones de FSH tenían 2 o menos CL en el momento de la colecta de embriones ($P>0,05$).

Tabla 3. Respuesta superovulatoria (Media \pm EE) en vacas para carne tratadas con 300 mg NIH-FSH-P1 Folltropin-V en dos aplicaciones diarias durante cuatro días (Control) ó en dos aplicaciones intramusculares diluidas en 5 mg/mL ó 10 mg/mL de hialuronato cada 48 horas.

Grupos		CL	Ovocitos- embriones	Ovocitos fertilizados	Embriones transferibles	Vacas con "0" ET
Control	9	12,0 \pm 1,3 ^a	10,2 \pm 1,8	6,7 \pm 1,3	4,0 \pm 0,8	7
5 mg/mL	9	15,3 \pm 1,1 ^b	14,3 \pm 2,1	9,3 \pm 1,9	6,1 \pm 1,3	4
10 mg/ML	9	15,1 \pm 1,0 ^b	14,4 \pm 2,0	8,9 \pm 1,4	5,0 \pm 0,9	7
Valor P		0,0071	0,0236	0,3222	0,2439	0,5292

^{a,b} Letras distintas indican diferencias significativas ($P<0.05$).

Nuevos tratamientos para mejorar la cantidad de ovocitos en donantes Bos taurus

En el centro IRAC-BIOGEN llevamos adelante una serie de experimentos con el objetivo de aumentar el número de folículos con el consecuente aumento en el número de ovocitos aspirados.

El experimento 1 se realizó con el objetivo de comprobar la hipótesis de que la sincronización de la onda folicular con benzoato de estradiol (EB) y progesterona (P4) mejora la cantidad y calidad de los ovocitos. Para ello, se utilizaron vacas Brangus (n=10) y vacas Angus (n=10) distribuidas aleatoriamente en dos grupos de tratamientos las cuales recibieron ambos tratamientos en un diseño cross-over. En el Día 0, las donantes del grupo 1 recibieron 2,5 mg de EB (Zoovet, Argentina) y 50 mg P4 (Syntex, Argentina), mientras que las donantes del grupo 2 (Control) no recibieron ningún tratamiento hormonal. En el Día 6, se realizó la aspiración folicular guiada por ultrasonografía y los COCs fueron clasificados basados en la apariencia del citoplasma y la cantidad de células del cumulus (Chaubal et al., 2006).

Los procedimientos utilizados fueron los mismos para todos los experimentos. Los ovocitos fueron recuperados por aspiración transvaginal, tal como se describe anteriormente. En pocas palabras, las vacas fueron ubicadas en la casilla de operar, luego se realizó una anestesia peridural (Lidocaina al 2%). Se utilizó un ecógrafo Chison D600Vet (Chison Medical Imaging Co.) equipada con un transductor de 5 MHz. Los folículos fueron clasificados en tres categorías según su tamaño (pequeño: 2-5 mm; medio: 6-10 mm; grande > 10 mm). Se utilizó una aguja Terumo 18G la cual estaba oculta en una guía de polietileno. Una vez fijado el ovario en la guía la aguja avanzó hasta la pared vaginal para luego ingresar en el folículo y de esta manera aspirar el ovocito. La aguja a su vez esta conectada con un sistema de silicona el cual conduce a los ovocitos a un tubo Falcon cónico de 50 ml, para ello se necesita de una bomba de vacío (WTA) con una presión de 60-70 mmHG, generando un flujo de 10-15 ml /min. Los ovocitos caen al tubo en donde ya existe un volume de 5 ml con PBS y heparina (10 UI/ml). Inmediatamente de la aspiración, el tubo es lavado y su contenido se coloca en una placa de petri para la búsqueda de los ovocitos en el laboratorio.

Los resultados del experimento 1 se describen en la Tabla 3. Se encontraron diferencias significativas en el número total de folículos, número total de ovocitos y ovocitos viable en las vacas que recibieron EB más P4 para sincronizar la onda folicular.

Tabla 4. Media de número total de folículos aspirados, total de ovocitos y ovocitos viable en vacas de carne tratadas o no con EB + P4

Grupo	n	Total Folículos	Total ovocitos	Ovocitos viables
1- EB+P4	20	12.9 ± 1.1 ^b	7.9 ± 1.3 ^b	5.2 ± 0.9 ^b
2 - Control	20	7.3 ± 0.7 ^a	3.2 ± 0.5 ^a	2.1 ± 0.4 ^a

^{a,b} Letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05).

El experimento 2 se realizó con el objetivo de comparar el efecto de 1) controlar la aparición de una nueva onda folicular con la eliminación del folículo dominante (DFR) por aspiración folicular guiada por ultrasonido o la aplicación de EB + P4, y 2) el tratamiento con eCG o FSH, que superestímule el crecimiento del folículo, el número y calidad de los ovocitos obtenidos por aspiración folicular. Se utilizaron vacas Brangus (n=10) y Angus (n=10) distribuidas aleatoriamente en cuatro grupos de tratamiento (2 x

2 factorial) las cuales recibieron todos los tratamientos en un diseño cross-over. En el Día 0, las donantes del grupo 1 y 2 recibieron 2,5 mg de EB y 50 mg P4, mientras que las donantes del grupo 3 y 4 fueron sometidas a DFR (se aspiraron todos los folículos \geq 8 mm de diámetro) el Día 3. En el Día 4, todas las donantes recibieron 150 ug D (+) Cloprostenol (PGF, Ciclar, Zoovet, Argentina), además, las donantes del grupo 1 y 3 recibieron 800 UI de eCG (Novormón, Syntex), mientras que las donantes del grupo 2 y 4 recibieron 160 mg de Folltropin-V (Bioniche, Canadá) divididas en dos aplicaciones diarias durante 2 días (es decir, Día 4 y 5). El Día 7 se realizó la aspiración folicular. Los datos fueron analizados por ANOVA.

No se encontraron diferencias significativas en el tratamiento para la sincronización de la onda folicular (DFR vs EB + P4) en el número total de folículos aspirados (14.8 ± 1.2 vs 14.5 ± 1.4), ovocitos recuperados (8.3 ± 0.9 vs 7.8 ± 1.0) y ovocitos viables (5.3 ± 0.8 vs 4.8 ± 0.8). Sin embargo, el número total de folículos aspirados, ovocitos recuperados y ovocitos viables fue mayor ($P < 0.05$) en las vacas tratadas con FSH que las vacas que recibieron eCG (Tabla 5).

Tabla 5. Número promedio de folículos aspirados, recuperados y viables de vacas donantes superestimuladas con eCG o FSH.

Grupo	N	Total Folículos	Total ovocitos	Ovocitos viables
FSH	24	18.2 ± 1.1^b	9.7 ± 1.0^b	6.8 ± 0.8^b
eCG	24	11.2 ± 1.0^a	6.3 ± 0.8^a	3.3 ± 0.5^a

^{a,b} Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Observaciones finales y conclusiones

Protocolos diseñados para controlar la emergencia de la onda folicular ofrecen la conveniencia de iniciar los tratamientos superestimuladores de forma rápida y en un momento deseado, sin la necesidad de detectar celo. El estradiol ha demostrado ser más útil para estos propósitos en el campo pero está siendo retirado del mercado en los países de Europa y Norteamérica, dejando sólo a la ablación folicular como un método confiable para sincronizar la emergencia de la onda folicular para la superestimulación. La aspiración folicular es una alternativa interesante para combinar la producción *in vitro* e *in vivo* de embriones pero es más complicada de utilizar a campo cuando solo se quieren producir embriones *in vitro*. A pesar que la sincronía de la emergencia de la onda tras la administración de GnRH o pLH ha sido demasiado variable para la superestimulación, varios informes recientes sugieren que la GnRH se puede utilizar junto con un dispositivo con progesterona para sincronizar la emergencia de la onda folicular. Una alternativa es iniciar los tratamientos con FSH en el momento de la emergencia de la primera onda folicular seguida de una ovulación inducida por GnRH, con la inclusión de un dispositivo con progesterona. Los resultados de estudios preliminares sugieren que otra alternativa para la superestimulación de donantes puede ser la de ignorar el estadio de la onda folicular y provocar que folículos subordinados

entren a la onda por un alargamiento del protocolo de tratamiento con gonadotrofinas. La respuesta superovulatoria y la producción de ovocitos/embriones se puede incrementar por la incorporación de eCG en los últimos días del protocolo de superestimulación. Por último, dos aplicaciones intramusculares cada 48 horas de FSH en hialuronato de sodio induce de forma confiable una satisfactoria respuesta superovulatoria, lo que simplifica el protocolo reduciendo el estrés de los tratamientos y el manejo de los animales.

References

- Adams, G.P., Matteri, R.L., Kastelic, J.P., Ko, J.C.H., and Ginther, O.J. (1992). Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J. Reprod. Fertil.* **94**, 177-188.
- Adams, G.P., Kot, K., Smith, C.A., and Ginther, O.J. (1993). Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* **30**, 259-271.
- Adams, G.P., Nasser, L.F., Bó, G.A., Garcia, A., Del Campo M.R., and Mapletoft, R.J. (1994). Superovulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. *Theriogenology* **42**, 1103-1113.
- Adams, G.P., Jaiswal, R., Singh, J., and Mahli, P. (2008). Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* **69**, 72-80.
- Baracaldo, M.I., Martinez, M., Adams, G.P., and Mapletoft, R.J. (2000). Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology* **53**, 1239-50.
- Barros, C.M. and Nogueira, M.F.G. (2005). Superovulation in zebu cattle: Protocol P-36. *Embryo Transfer Newsletter* **23**, 5-9.
- Barros, C.M., Barcelos, A.C.Z., Gouvea, L.M., Meneghel, M., Barcelos, D.S., Barcelos, L.N., and Trinca, L.A. (2008). Improvement of a superovulatory protocol in Nelore cows: replacing the last two doses of pFSH by eCG. *Reprod. Fertil. Dev.* **20**, 152. (abstract)
- Baruselli, P.S., Sá Filho, M., Martins, 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.
- Bergfelt, D.R., Bó, G.A., Mapletoft, R.J., and Adams, G.P. (1997). Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* **49**, 1-12.
- 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, G.A., Adams, G.P., Pierson, R.A., and Mapletoft, R.J. (1995). Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology* **43**, 31-40.
- Bó, G.A., Baruselli, P.S., Moreno, D., Cutaia, L., Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H., and Mapletoft, R.J. (2002). The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology* **57**, 53-72.

- 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, G.A., Carballo Guerrero, D., and Adams, G.P. (2008). Alternative approaches to setting up donor cows for superstimulation. *Theriogenology* **69**, 81-87.
- Bó, G.A., Carballo Guerrero, D., Tríbulo, A., Tríbulo, H., Tríbulo, R., Rogan, D., and Mapletoft, R. J. (2010). New approaches to superovulation in the cow. *Reprod. Fertil. Dev.* **22**, 106-112.
- Bungartz, L., and Niemann, H. (1994). Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. *J. Reprod. Fertil.* **101**, 583-591.
- Caccia, M., Tríbulo, R., Tríbulo, H., and Bó, G.A. (2000). Effect of eCG pretreatment on superovulatory response in CIDR-B treated beef cattle. *Theriogenology* **53**, 495. (abstract).
- Chaubal, S.A, Molina, J.A., Ohlrichs, C.L., Ferre L.B., Faber, D.C., Bols P.E.J., Riesen J.W., Tian X., and Yang, X. (2006). Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. *Theriogenology* **65**, 1631-48.
- Colazo, M.G., Gordon, M.B., Rajamahendran, R., Mapletoft, R.J., and Ambrose, D.J. (2009). Pregnancy rates to timed artificial insemination in dairy cows treated with gonadotropin-releasing hormone or porcine luteinizing hormone. *Theriogenology* **72**, 262-270.
- 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)
- García Guerra, A., Tribulo A, Yapura J., Singh J., Mapletoft R.J. 2012. Lengthening the superstimulatory treatment protocol increases ovarian response and number of transferable embryos in beef cows. *Theriogenology* **78**, 353-360
- Gimenes, L.U., Sa´ 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., and Baruselli, P.S. (2008). Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology* **69**, 852-858.
- 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 waves. *J. Reprod. Fertil.* **87**, 223-230.
- Ginther, O.J., Wiltbank, M.C., Fricke, P.M., Gibbons, J.R., and Kot, K. (1996). Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol. Reprod.* **55**, 1187-1194.
- González, A., Wang, H., Carruthers, T., Murphy, B.D., and Mapletoft, R.J. (1994). Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology* **41**, 1631-1642.
- Lane, E.A., Austin, E.J., and Crowe, M.A. (2008). Estrus synchronisation in cattle- Current options following the EU regulations restricting use of estrogenic compounds in food-producing animals: A review. *Anim. Reprod. Sci.* **109**, 1-16.
- Larkin, S.W., Chesta, P.M., Looney, C.R., Bó, G.A., and Forrest, D.W. (2006). Distribution of ovulation and subsequent embryo production using Lutropin and

- estradiol-17 β for timed AI of superstimulated beef females. *Reprod. Fertil. Dev.* **18**, 289. (abstract)
- Laster, D.B. (1972). Disappearance of and uptake of I²⁵¹ FSH in the rat, rabbit, ewe and cow. *J. Reprod. Fertil.* **30**, 407-415.
- Lindsell, C.E., Murphy, B.D., and Mapletoft, R.J. (1986). Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. *Theriogenology* **26**, 209-219.
- 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.
- 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 superovulation in 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 Folltropin in Holstein cows. *Theriogenology* **41**, 241. (abstract)
- Macmillan, K.L., and Thatcher, W.W. (1991). Effect of an agonist of gonadotropin-releasing hormone on ovarian follicles in cattle. *Biol. Reprod.* **45**, 883-889.
- Mapletoft, R.J., Bennett-Steward, K., and Adams, G.P. (2002). Recent advances in the superovulation of cattle. *Reprod. Nut. Dev.* **42**, 601-611.
- Martinez, M.F., Adams, G.P., Bergfelt, D., Kastelic, J.P., and Mapletoft, R.J. (1999). Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in heifers. *Anim. Reprod. Sci.* **57**, 23-33.
- Mattos, M.C.C., Bastos, M.R., Guardieiro, M.M., Carvalho, J.O., Franco, M.M., Mourão, G.B., Barros, C.M., and Sartori, R. (2011). Improvement of embryo production by the replacement of the last two doses of porcine follicle-stimulating hormone with equine chorionic gonadotropin in Sindhi donors. *Anim. Reprod. Sci.* **125**, 119-123.
- Mihm, M., and Evans, A.C. (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 Suppl 2**, 48-56.
- Monniaux, D., Chupin, D., and Saumande, J. (1983). Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* **19**, 55-81.
- Murphy, B.D., and Martinuk, D. (1991). Equine chorionic gonadotropin. *Endocrine Rev.* **12**, 27-44.
- Nasser, L., Adams, G.P., Bó, G.A., and Mapletoft, R.J. (1993). Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. *Theriogenology* **40**, 713-724.
- Nasser, L.F., Sá Filho, M.F., Reis, E.L., Rezende, C.R., Mapletoft, R.J., Bó, G.A., and Baruselli, P.S. (2011). Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* **76**, 320-327.

- Nogueira, M.F.G., and Barros, C.M. (2003). Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P-36 protocol. *Acta Sci. Vet.* **31**, 509. (abstract)
- Pierson, R.A., and Ginther, O.J. (1987). Follicular populations during the estrous cycle in heifers. I. Influence of day. *Anim. Repro. Sci.* **14**, 165-176.
- Pursley, J.R., Mee, M.O., and Wiltbank, M.C. (1995). Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. *Theriogenology* **44**, 915-23.
- Reano, I., Carballo, D., Tribulo, A., Tribulo, P., Balla, E., and Bó, G.A. (2009). Efecto de la adición de eCG a los tratamientos superovulatorios con Follitropin-V en la producción de embriones de donantes de embriones. In 'Proceedings VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal - IRAC 2009', **1**, 54 (abstract).
- Sartorelli, E.S., Carvalho, L.M., Bergfelt, D.R., Ginther, O.J., and Barros, C.M. (2005). Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology* **63**, 2382-2394.
- Sartori, R., Guardieiro, M.M., Barros, C.M., Bastos, M.R., Machado, G.M., Leme, L.O., and Rumpf, R. (2009). Lack of improvement on embryo production by the replacement of the last two doses of pFSH by eCG in superovulated Nelore heifers. *Reprod. Fertil. Dev.* **21**, 245. (abstract)
- 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.
- Steel, R.G., and Hasler, J.F. (2009). Comparison of three different protocols for superstimulation of dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.* **21**, 246. (abstract)
- Steward, F., Allen, W.R., and Moor, R.M. (1976). Pregnant mare serum gonadotropin: Ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. *J. Endocrin.* **71**, 471-482.
- 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**, 92-96.
- Sutherland, W. (1991). Novel material from biological sources. In: "Biomaterials". (Ed. D. Byrom). pp. 307-333 (Stockton Press, New York).
- Tríbulo, A., Rogan D., Tribulo, H., Tribulo, R., Alasino, R. V., Beltramo, D., Bianco, I., Mapletoft, R. J., and Bó, G. A. (2011a). Superstimulation in beef cattle with a single intramuscular injection of Follitropin-V. *Anim. Reprod. Sci.* **129**, 7-13
- Tríbulo, A., Rogan, D., Tribulo, H., Tribulo, R., Mapletoft, R. J., and Bó, G. A. (2011b). Superovulation of beef cattle with a split-single intramuscular administration of Follitropin-V in two different concentrations of hyaluronan. *Theriogenology* **77**, 1679-1685.
- 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.
- Wock, J.M., Lyle, L.M., and Hockett, M.E. (2008). Effect of gonadotropin-releasing hormone compared with estradiol 17 β at the beginning of a superstimulation protocol on superovulatory response and embryo quality. *Reprod. Fertil. Dev.* **20**, 228. (abstract)

Fatores que interferem na população folicular e produção de oócitos em bovinos

Marcelo M Seneda & Luciana S R Marinho

Graças à maior precisão na manipulação dos gametas durante o processo *in vitro*, os índices de produção embrionária mostram-se cada vez mais promissores. Desde a última década, o Brasil se apresenta como líder mundial da tecnologia de produção *in vitro* de embriões, beneficiando diretamente os produtores de leite e carne de diferentes escalas (micro, pequenos, médios e grandes) por meio do incremento do melhoramento genético proporcionado pelo uso do embrião para gerar prenhez. Pelo último levantamento da IETS (2012), o Brasil produziu quase 270.000 embriões *in vitro*, uma porcentagem próxima de 80 % da produção mundial.

Para uma melhor compreensão dos eventos relativos à produção *in vitro* de embriões, a fisiologia ovariana tem sido intensamente estudada e o desenvolvimento folicular tem sido manipulado na esperança de se produzir o maior número possível de oócitos competentes. As informações obtidas até o momento têm proporcionado métodos bastante eficientes para a obtenção de grande número de embriões viáveis.

Vários fatores podem interferir na população folicular e consequente obtenção de oócitos, primeira etapa da produção *in vitro* de embriões. A seguir apresentaremos os principais aspectos sobre este tópico.

A contagem de folículos antrais (CFA, ≥ 3 mm de diâmetro) apresenta grande variação entre animais, podendo ser menor do que 5 em alguns animais e maior do que 50 em outros, considerando-se os dois ovários.

A variação individual da quantidade de folículos se reflete em grande variabilidade entre doadoras na produção de embriões, tanto nos procedimentos *in vivo* como *in vitro*. Em programas de superovulação, apenas 30% das vacas produzem 70% dos embriões, e 25% das vacas tratadas não produzem embrião algum. Da mesma forma, algumas fêmeas são altamente eficientes na PIVE, e outras produzem resultados bastante insatisfatórios.

Enquanto a população folicular é altamente variável entre indivíduos, existe uma grande repetibilidade do número de folículos antrais em um mesmo indivíduo. Esta contagem de folículos antrais tende a ser constante nas diferentes ondas foliculares de um mesmo animal, de forma que uma única avaliação ultrassonográfica, se realizada no início da onda, pode ser bastante útil identificar fêmeas com baixo, intermediário ou alto número de folículos ovarianos. Em vacas Nelore, a variação individual na produção de oócitos também demonstrou estar associada à produção de embriões e às taxas de prenhez. Doadoras que produzem grande número de oócitos também produzem mais embriões e mais prenhez do que as doadoras que produzem poucos oócitos (Pontes et al., 2011).

Tratando-se da variação individual, um aspecto interessante diz respeito à raça. As fêmeas da raça Nelore, zebuínas e suas cruzas, normalmente têm maior número de folículos recrutados por onda em comparação com as raças europeias (Seneda et al., 2002). Esta característica certamente favoreceu o rápido crescimento da PIVE no Brasil, uma vez que os animais zebuínos representam aproximadamente 80% do rebanho brasileiro. No entanto, apesar do potencial similar entre os indivíduos da mesma raça, parâmetros como recrutamento e desenvolvimento folicular podem variar amplamente,

mesmo entre pares de gêmeos monozigóticos (Machado et al., 2003). Não está completamente esclarecida a justificativa para esta maior produção oocitária em fêmeas *indicus*, visto que a população folicular pré-antral entre *taurus* e *indicus* tem sido reportada como numericamente semelhante.

A quantidade de folículos antrais e a consequente produção de oócitos também sofrem alterações conforme o peso, a idade e as variações fisiológicas de cada animal. Animais senis produzem oócitos menos competentes, com menor quantidade de camadas de células do *cumulus oophorus*, que comumente resultam em baixa eficiência na produção embrionária. De forma semelhante, animais muito jovens podem ter os folículos aspirados com uso de equipamento adequado, mas frequentemente os resultados obtidos com a produção de embriões não são satisfatórios devido à baixa competência de desenvolvimento destes oócitos.

A condição corporal das fêmeas também exerce efeito sobre a qualidade dos oócitos, de forma que doadoras que sofreram privação alimentar produzem oócitos com menor capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto. O efeito da subnutrição na produção embrionária pode ser revertido, no entanto as fêmeas podem demorar mais de oito semanas para apresentar oócitos com capacidade satisfatória de desenvolvimento embrionário.

Alguns trabalhos afirmam que a competência de desenvolvimento dos oócitos subordinados pode estar comprometida durante a fase de dominância. Todavia, resultados de campo não mostram diferença significativa na qualidade oocitária durante as diferentes fases do ciclo estral, e atualmente a aspiração folicular tem sido realizada em momentos aleatórios da dinâmica folicular. Por outro lado, a taxa de recuperação é maior quando se aspiram folículos pequenos, que podem ser encontrados em maior número no início de cada onda folicular.

De forma semelhante, a fase reprodutiva pode exercer efeito na produção de oócitos e embriões. Em fêmeas leiteiras, as não gestantes frequentemente apresentam mais oócitos melhor produção embrionária do que as gestantes. Considerando-se as fêmeas lactantes, as gestantes proporcionam melhores resultados do que as lactantes vazias na produção de embriões após sessões de OPU/PIV.

A obtenção de quantidade apropriada e boa qualidade de oócitos para PIVE estão diretamente relacionadas a uma metodologia adequada. A resolução do ultrassom e o treinamento da equipe são fundamentais para a obtenção de bons resultados. Um veterinário experiente é capaz de aspirar 8 a 12 vacas por hora, com alto rendimento de obtenção de oócitos. O menor tempo também é benéfico para as etapas laboratoriais, pois um intervalo mais curto entre a primeira e a última vaca aspirada permitirá maior padronização dos procedimentos. Além do menor tempo, a habilidade se reflete em causar mínimos danos ao estroma ovariano, permitindo maior longevidade reprodutiva à doadora.

O intervalo entre sessões de OPU influencia tanto na qualidade como na quantidade de oócitos. A OPU deve ser efetuada com intervalo mínimo de 15 dias, preferencialmente 30, permitindo assim que a doadora retorne ao ciclo naturalmente e de forma a não afetar o funcionamento ovariano.

Os protocolos pré-aspiração estão praticamente restritos à vacas *taurus* e/ou animais com baixa produção de oócitos. A administração de FSH exógeno pode ser eficaz em aumentar o percentual de folículos médios e grandes, mas nem sempre os oócitos são proporcionalmente competentes. A combinação do FSH com LH parece ser

EMPREGO DO SÊMEN SEXADO NA IATF, NA SUPEROVULAÇÃO E NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Pietro S. Baruselli¹, Júlia G. Soares¹, José N. S. Sales¹, Gabriel A. Crepaldi¹, Claudiney M. Martins¹, Alexandre H. Souza¹, Kedson A. L. Neves¹, Manoel F. Sá Filho¹

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

Resumo

O uso de sêmen sexado em bovinos de corte e de leite possibilita aumentar a produção de bezerros de gêneros específicos, aumentando a velocidade do ganho genético e a produção de carne ou leite. O sêmen sexado tem sido utilizado em diversas biotecnologias de aplicação comercial: inseminação artificial (IA) após a detecção de estro, inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e produção de embriões *in vivo* (SOV) e *in vitro* (PIV). Atualmente, é possível obter taxas de concepção aceitáveis (ao redor de 80% das obtidas com o sêmen convencional) após inseminação com sêmen sexado em novilhas observadas em cio. Ainda, com a adequação do momento da inseminação em relação ao início do estro e/ou a ovulação é possível aumentar a taxa de concepção com sêmen sexado. 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). Em programas de IATF, a taxa de concepção após o uso de sêmen sexado tem sido satisfatória, desde que o momento da IATF seja ajustado para 10 horas antes da ovulação. Em vacas superestimuladas, o sêmen sexado reduz a produção de embriões viáveis. No entanto, o atraso de 6 horas nas inseminações também é uma alternativa para aumentar o número de embriões em doadoras zebuínas e taurinas. Atualmente, a técnica de PIV tem sido empregada para otimizar o uso do sêmen sexado. Com uma dose de sêmen sexado é possível fertilizar aproximadamente 100 oócitos. Entretanto, é importante salientar que, para o emprego de todas essas biotecnologias, 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 IA e de produção de embriões. Dessa forma, objetivo desta revisão é discutir os principais conceitos relacionados ao uso do sêmen sexado em programas de IATF e TE, abordando algumas estratégias para aumentar a eficiência da sua utilização.

2) Introdução

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 veem sendo desenvolvidas com o objetivo de se prever 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 espermatozoides que carregam o cromossomo Y dos espermatozoides que carregam o cromossomo X é possível devido às diferenças no conteúdo do DNA dessas células espermáticas (X possui cerca de 4% mais material genético que o Y), sendo realizada por citometria de fluxo. Atualmente, este é o método mais eficiente de separação dos espermatozoides X e Y em larga escala. Algumas biotecnologias disponíveis em escala comercial são: utilização de sêmen sexado na inseminação artificial (IA) com detecção de estro, inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a transferência de embriões em tempo fixo (TETF) por meio da superovulação (SOV) e da produção de embriões *in vitro* (PIV).

Apesar do aumento do uso de sêmen sexado, a prenhez por IA (P/IA) ainda é menor do que quando se utiliza sêmen convencional (DEJARNETTE et al., 2008). Independente destes resultados reduzidos, uma concentração adequada de espermatozoides no momento da IA; intervalos mais longos da indução da ovulação até a IA (ou seja, mais próximo do momento esperado da ovulação); IA no corno uterino ipsilateral à ovulação esperada; o tamanho do folículo do qual ocorre a ovulação; ocorrência de estro da remoção da fonte de progesterona (P4) até a IATF e a identificação e uso de touros com fertilidade comprovada produzindo espermatozoides resistentes ao processo de sexagem têm aumentado a probabilidade de prenhez em fêmeas inseminadas com sêmen sexado (SCHENK et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010; SALES et al., 2011), otimizando desta forma, o uso de sêmen sexado em programas de IATF e TE.

A técnica de transferência de embriões (TE) tem sido amplamente aplicada em todo o mundo. Por meio desta ferramenta é possível aumentar o número de descendentes obtidos de doadoras de alto valor genético, propagando genética desejável de maneira segura (BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2006). O controle da proporção de sexos permite maior velocidade no progresso genético e maior produtividade (RATH et al., 2009). Além disso, a com o emprego da TETF, que sincroniza a ovulação de forma semelhante à IATF, ao invés da inseminação artificial, a receptora recebe um embrião produzido *in vitro* (PIV) ou *in vivo* (SOV) com sêmen sexado sete dias após a ovulação.

A PIV tem se apresentado como uma ferramenta importante para melhorar a aplicação do sêmen sexado na produção de embriões em escala comercial. Uma única dose de sêmen sexado é capaz de fertilizar aproximadamente 100 oócitos (equivalente a aspiração de quatro fêmeas; média de 25 oócitos por doadora), que, por sua vez, resulta na produção de cerca de 30 embriões. Considerando uma taxa de concepção ao redor de 40%, a transferência de 30 embriões produzidos com uma dose de sêmen sexado resultaria em 12 gestações.

Dessa forma, objetivo deste artigo é discutir as principais aplicações atuais do sêmen sexado em programas de IATF e TE e abordar algumas estratégias para melhorar o uso desse sêmen em programas comerciais.

3) Histórico do sêmen sexado

A definição do sexo anteriormente à concepção permite que a indústria pecuária produza melhor proporção entre machos e fêmeas, para obter vantagens sobre a influência do sexo na produção de carne e de leite, proporcionando práticas economicamente flexíveis de manejo ao produtor (RATH; JOHNSON, 2008). Com o advento das biotecnologias da reprodução, a sexagem do espermatozoide apresenta elevada perspectiva de utilização, porém, alguns entraves na eficiência do processo podem gerar comprometimento nos resultados (GARNER; SEIDEL Jr., 2008).

Na primeira metade do século XX, os avanços nas ciências biológicas, especialmente em genética, resultaram em numerosas descobertas, incluindo a identificação dos cromossomos sexuais. Os gametas contêm metade dos cromossomos das células somáticas. Assim, dos 60 cromossomos presentes na célula somática de bovinos, o espermatozoide (haplóide) possui 29 cromossomos autossômicos, mais o cromossomo-X (fêmeas) ou o cromossomo-Y (machos) (GARNER; SEIDEL Jr., 2008).

A separação dos espermatozoides contendo o cromossomo X daqueles contendo o cromossomo Y é possível por meio da detecção de diferenças fenotípicas entre essas células (MOTA, 2004), baseadas em: sensibilidade ao pH (EMMENS, 1960; SHETTLES, 1970), carga elétrica da superfície da membrana (KNAACK et al., 1973; KANEKO et al., 1984), morfologia do núcleo e cabeça (SHETTLES, 1960, 1961; VAN MUNTER et al., 1999), antígenos de superfície (KOO et al., 1973; ALI, 1987; HENDRIKSEN, 1999; BLECHER et al., 1999), velocidade de migração (ERICSSON et al., 1973; SARKAR, 1984), diferenças no conteúdo de DNA e densidade (MEISTRICH, 1982, *apud* WINDSOR et al., 1993).

Na década de 80, iniciaram-se tentativas para a seleção do sexo pela identificação das diferenças na quantidade de cromatina entre os espermatozoides contendo cromossomo X ou Y por citometria de fluxo em mamíferos (JOHNSON; PINKEL, 1986; JOHNSON et al., 1987). A aplicação recente de determinadas metodologias celulares levou ao desenvolvimento de um sistema de citometria de fluxo capaz de diferenciar e separar espermatozoides vivos com cromossomos X e Y, em quantidades adequadas para a realização da IA (GARNER; SEIDEL Jr., 2008).

A sexagem de espermatozoides pela citometria de fluxo tem sido aplicada a uma variedade de espécies mamíferas, incluindo carneiros (CATT et al., 1996; CRAN et al., 1997; HOLLINGSHEAD et al., 2004; HOLLINGSHEAD et al., 2001), coelhos (JOHNSON et al., 1989), porcos (JOHNSON et al., 1991; ABEYDEERA et al., 1998; MARTINEZ et al., 2001ab; MAXWELL et al., 2004), cavalos (BUCHANAN et al., 2000; LINDSEY et al., 2002), alces (SCHENK; DEGROOFT, 2003), gatos (POPE et al., 2008), golfinhos (O'BRIEN; ROBECK, 2006), humanos (FUGGER, 1999), primatas não-humanos (O'BRIEN et al., 2002; O'BRIEN et al., 2005; O'BRIEN et al., 2003) e cães (MEYERS et al., 2008).

Nos bovinos, o espermatozoide com cromossomo X contém aproximadamente 4% mais DNA que o espermatozoide com cromossomo Y. Apesar de ser uma diferença pequena, é possível medir o conteúdo de DNA de cada um dos espermatozoides, com precisão suficiente para distinção entre os espermatozoides que contêm o cromossomo X e Y (SEIDEL, 2007). Além disso, existem diferenças entre as raças de bovinos quanto quantidade DNA presente no cromossomo Y (Figura 1, GARNER et al., 2006).

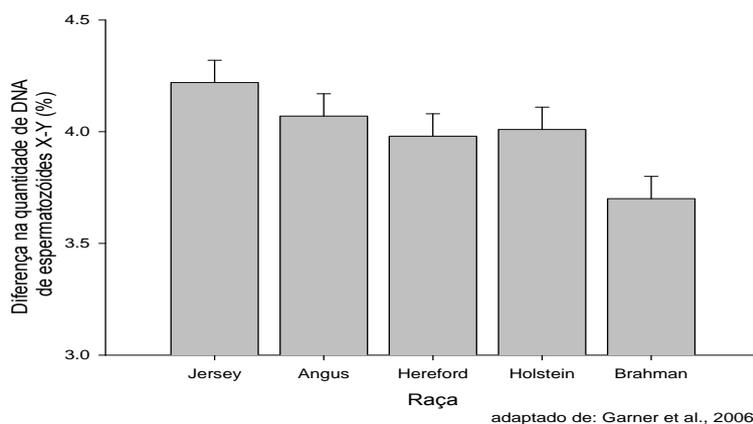


Figura 1. Diferença na quantidade de material genético (DNA) entre o cromossomo X e Y conforme a raça de bovinos

O conteúdo de DNA do espermatozoide é determinado pelo uso de sondas fluorescentes. O corante *Hoechst* 33342 foi escolhido por ser o menos tóxico entre os corantes de DNA com potencial de penetração na membrana plasmática de células vivas (JOHNSON et al., 1987). Sua ação é ligar-se, seletivamente, a regiões ricas em DNA, permitindo a detecção de pequenas diferenças em seu conteúdo (KLINC; RATH, 2006). Assim, o espermatozoide com cromossomo X recebe cerca de 4% mais corante vinculado ao seu DNA, do que o espermatozoide com cromossomo Y. Tal corante fluoresce quando exposto a um específico comprimento de onda de luz emitida pelo raio laser. A fluorescência é detectada e analisada pelo aparelho, fornecendo medida da quantidade de DNA da célula analisada (GARNER, 2006).

A eficácia da sexagem dos espermatozoides não depende somente das relativas diferenças na quantidade de DNA, mas também da capacidade de orientação precisa desses gametas pelo citômetro de fluxo (GARNER, 2006).

Para tanto, o processo de sexagem se inicia com a separação do fluxo em gotas, por um cristal piezoelétrico que vibra, formando cerca de 70.000 a 80.000 gotas por segundo. Cerca de um terço dessas gotículas contém um espermatozoide, cerca de dois terços estão vazias e algumas gotas contêm dois ou mais espermatozoides. A gotícula que contém o espermatozoide com o cromossomo X recebe uma carga elétrica positiva. A gotícula que contém o espermatozoide com o cromossomo Y recebe uma carga negativa. Se a gota não contém nenhum espermatozoide, espermatozoides danificados, ou espermatozoides indistinguíveis em relação ao conteúdo de DNA, nenhuma carga é acrescentada (SEIDEL, 2007).

As gotículas passam pelo aparelho a uma velocidade de cerca de 80 km por hora, e são submetidas a campos elétricos com direcionamento positivo e negativo. Dessa forma, as gotículas positivamente carregadas e contendo o espermatozoide com cromossomo X, avançam em direção ao campo negativo e as gotículas com os espermatozoides com cromossomo Y, negativamente carregados, avançam em direção ao campo positivo. Aquelas com nenhuma carga seguem em uma terceira direção. Deste

modo, três fluxos de gotículas são produzidos e direcionados para diferentes tubos. Ao final do processamento, em média, obtém-se 20% de espermatozoides com cromossomo X, 20% de espermatozoides com cromossomo Y e 60% danificados ou não sexados por alguma razão (SEIDEL, 2007).

A acurácia do processo de sexagem é de, aproximadamente, 90%, podendo variar entre 87% e 95% dependendo do operador, velocidade e variações individuais do ejaculado (MOCÉ et al., 2006; FREITAS, 2007).

O método de sexagem pelo citômetro de fluxo apresenta limitações, pois os espermatozoides são sexados um de cada vez, tornando o processo lento e caro (GARNER, 2006). Atualmente, a produção de uma palheta de sêmen sexado bovino demora cerca de 9 minutos, que se traduz em aproximadamente sete palhetas por hora na concentração de 2×10^6 espermatozoides por dose (GARNER; SEIDEL, 2008). A velocidade de separação dos espermatozoides 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 2×10^6 spz/palheta. Sendo assim, o número comercialmente estabelecido de espermatozoides por dose de sêmen sexado é de $2,1 \times 10^6$ células/dose. Esta quantidade é muito mais baixa do que aquela presente no sêmen convencional ($\sim 20 \times 10^6$ células/dose). Muitos estudos foram realizados para estabelecer a melhor concentração por palheta considerando os aspectos comerciais. Foram verificadas semelhantes taxas de concepção quando vacas e novilhas foram inseminadas com sêmen sexado com dose de 2,1 ou $3,5 \times 10^6$ espermatozoides. No entanto, não só em novilhas, mas também em vacas, há aumento na taxa de concepção quando a IA é realizada com sêmen convencional (15×10^6 espermatozoides/dose), como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Taxas de concepção em novilhas e vacas Holandesas após IA com sêmen sexado ($2,1$ ou $3,5 \times 10^6$) ou convencional (15×10^6).

	Sêmen sexado (dose)		Sêmen convencional (dose)
	2.1×10^6	3.5×10^6	15×10^6
Novilhas (%)	43,9 ^a (2.752/6.268)	45,7 ^a (2.864/6.268)	60,7 ^b (3.805/6.268)
Vacas (%)	23,0 ^a (1.257/5.466)	25,4 ^a (1.388/5.466)	31,5 ^b (1.722/5.466)

Diferentes letras sobrescritas (^a, ^b) na linha indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0.01$).

Adaptado de Dejarnette et al. 2010.

Dejarnette et al. (2011) compararam os efeitos da dose de espermatozoides ($2,1$ vs. 10×10^6 sperm/dose) e do tipo de sêmen (convencional vs. sexado) sobre as taxas de concepção de novilhas Holandesas ($n = 9.172$). Os autores observaram que houve aumento da taxa de concepção conforme aumento na concentração de espermatozoides

por dose (Tabela 2). Em outro estudo com três diferentes raças (Holandesas, Jersey e Dinamarquesa Vermelha), Borchersen e Peacock (2009) observaram redução de 12% para Holandesas, de 7% para Jersey, e 5% para Dinamarquesa Vermelha na taxa de concepção utilizando sêmen sexado.

Tabela 2. Taxas de concepção de novilhas Holandesas de acordo com o tipo de sêmen (sexado vs. convencional) e a dose (2.1×10^6 vs. 10×10^6 espermatozoides/dose).

	Dose de sêmen	
	2.1×10^6	10×10^6
Sêmen sexado (%)	38 ^a (881/2.319)	44 ^c (1.003/2.279)
Sêmen convencional (%)	55 ^b (1.255/2.282)	60 ^d (1.375/2.292)

Diferentes letras sobrescritas (^a, ^b, ^c e ^d) na linha indicam diferença estatisticamente significativa ($P < 0.01$).

Adaptado de Dejarnette et al. (2011).

Além da baixa longevidade dos espermatozoides sexados (MOCÉ et al., 2006), o processo de sexagem promove danos às células, deixando-as mais sensíveis ao processo de criopreservação (HOLLINSHEAD et al., 2003). Esses danos ao sêmen ocorrem devido ao estresse químico e físico aos quais os espermatozoides são expostos durante a sexagem (SEIDEL, 2003). A avaliação da viabilidade espermática revelou que alguns danos mecânicos provocados nos espermatozoides levam a menor capacidade de fecundação após a IA (*in vivo*) ou fecundação *in vitro* (GARNER, 2006; SEIDEL e GARNER, 2002), com menores taxas de desenvolvimento embrionário (SARTORI et al., 2004). Além disso, este processo pode levar à redução da vida útil do sêmen sexado comparado ao convencional (LU and SEIDEL, 2004; MAXWELL et al., 2004; PEIPPO et al., 2009), podendo causar mudanças na membrana do espermatozoide (MAXWELL et al., 1998), pré-capacitação e um número reduzido de espermatozoides viáveis na IA (VAZQUEZ et al., 2003; SCHENK et al., 2009). O teste de termo resistência demonstrou que o declínio da motilidade no sêmen sexado foi mais rápido quando comparado ao convencional (RATH et al., 2003). Adicionalmente, existe um efeito associado ao sêmen de determinados touros com a dose inseminante (DEJARNETTE et al., 2008). O espermatozoide de alguns touros pode tolerar o estresse do processo de sexagem de forma mais eficiente (SEIDEL e SCHENK, 2008).

Apesar desses entraves, verifica-se aumento da comercialização do sêmen sexado para a IA em todo o mundo (SEIDEL Jr. et al., 1996; SEIDEL Jr. et al., 1997). Desde que surgiu a possibilidade do emprego de protocolos de sincronização sem necessidade de detecção do estro, diretrizes para o uso do sêmen sexado em associação aos protocolos de IATF estão sendo desenvolvidas (BARUSELLI et al., 2007; SOUZA et al., 2008; SÁ FILHO et al., 2010; SALES et al., 2010), permitindo a aplicação desta biotecnologia em escala comercial, além do seu emprego em programas de produção de embriões *in vivo* (SOV) e *in vitro* (PIV).

4) Sêmen sexado em programas reprodutivos

4.1) Sêmen sexado na IA após a detecção de cio

Avanços no processo de sexagem de espermatozoides por citometria de fluxo permitiram sua incorporação no manejo reprodutivo comercial. Apesar do aumento do uso de sêmen sexado, a prenhez por IA (P/IA) ainda é menor do que quando se utiliza sêmen convencional (DEJARNETTE et al., 2008). Independente destes resultados, a concentração adequada de espermatozoides no momento da IA; intervalos mais longos da indução da ovulação até a IA (ou seja, mais próximo do momento esperado da ovulação); IA no corno uterino ipsilateral à ovulação esperada; o tamanho do folículo do qual ocorre a ovulação; ocorrência de estro da remoção da fonte de progesterona (P4) até a IATF e a identificação e uso de touros com fertilidade comprovada produzindo espermatozoides resistentes ao processo de sexagem têm aumentado a probabilidade de prenhez em fêmeas inseminadas com sêmen sexado (SCHENK et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010; SALES et al., 2011), otimizando desta forma, o uso de sêmen sexado em programas de IA e TE.

Em experimento com novilhas e vacas, Seidel Jr. (2007) encontraram menores taxas de concepção com sêmen sexado em vacas do que em novilhas. Em diversos experimentos, a inseminação de novilhas com sêmen sexado resultou em taxas de prenhez de 60% a 90% do que foi alcançado com sêmen convencional congelado (GARNER, 2006; RATH et al., 2008; GARNER; SEIDEL Jr., 2008; SEIDEL Jr.; SCHENK, 2008; SCHENK et al., 2009).

Adicionalmente, outro possível fator que poderia aumentar a taxa de prenhez utilizando sêmen sexado seria o local de deposição no útero (corno vs. corpo uterino; SEIDEL et al., 1997, 1999; KURYKIN et al., 2007). 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 PGF2 α (primeira dose de PGF2 α 14 dias antes da segunda dose) com sêmen sexado (2.2×10^6 sptz/palheta). O lado da ovulação foi determinado por exame ultrassonográfico. As taxas de prenhez foram similares entre os diferentes locais de deposição do sêmen sexado no trato uterino de novilhas de leite. Porém, a maioria dos estudos realizou a IA com metade da dose de sêmen em cada corno (SENGER et al., 1988; GRAVES et al., 1991). Portanto, IA com a dose cheia/inteira no corno uterino ipsilateral à ovulação esperada poderia ser uma alternativa para aumentar a P/IA.

A viabilidade do sêmen fresco, após processo de sexagem, também foi estudada. Inseminações realizadas dentro de 12h do processo de sexagem levaram a taxas de concepção de 50% (SEIDEL Jr. et al., 1996). Porém, a fertilidade diminuiu consideravelmente, devido aos processos de sexagem, refrigeração e transporte dos espermatozoides, quando as inseminações foram realizadas com 17h ou mais após a sexagem (SEIDEL Jr. et al., 1997).

Outro fator abordado foi o atraso no momento da IA com sêmen sexado. O momento adequado para IA em relação ao início do estro ou à ovulação, em vacas inseminadas com sêmen convencional tem sido estudado por diversos grupos (RANKIN et al., 1992; PURSLEY et al., 1998; DRANSFIELD et al., 1998; ROELOFS et al., 2006; HOCKEY et al., 2009). Estudos demonstram que o atraso na IA (mais de 12h após o início do estro) tende a resultar em melhores taxas de fecundação, porém diminui

a qualidade embrionária quando comparada com inseminações realizadas próximas ao início do estro (SAACKE, 2008; DALTON et al., 2001). Portanto, a identificação do melhor momento para a realização da IATF utilizando sêmen sexado pode representar aumento da fertilidade e, assim, a ampla utilização deste procedimento em rebanhos de leite e corte (SALES et al., 2011).

Melhores resultados têm sido relatados quando a IATF com sêmen sexado foi realizada mais tarde do que o horário tradicional (SCHENK et al., 2009; SALES et al., 2010). Além disso, evidências mostram que a inseminação com sêmen sexado deve ser realizada mais próxima do momento da ovulação, uma vez que o processo de sexagem gera uma reduzida meia-vida no trato reprodutivo da fêmea e possível pré-capacitação do espermatozoide (MAXWELL 2004, VAZQUEZ et al., 2009; PEIPPO et al., 2009).

Além disso, o tamanho do folículo no qual ocorreu ovulação e a ocorrência de estro da retirada de uma fonte de progesterona (P4) até a IATF tem sido relatados como fatores que influenciam a P/IA (PERRY et al., 2005; 2007; SÁ FILHO et al., 2010a; 2011a). Desta forma, o conhecimento do diâmetro do folículo dominante (FD) no momento da IATF e a ocorrência de estro poderiam ser ferramentas importantes para identificar fêmeas com maior probabilidade de prenhez, e, portanto, otimizando a utilização de sêmen sexado em protocolos de sincronização para IATF.

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 distócitos e natimortos tanto em vacas quanto em novilhas, principalmente nessa última categoria devido a maior incidência de nascimentos de fêmeas (NORMAN et al., 2010).

A reduzida quantidade de espermatozoides 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 espermatozoides 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 esta 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 espermatozoides 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 espermatozoides 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].

A utilização do sistema de radiotelemetria (Heat Watch[®]) para a detecção do cio e aplicação de sêmen sexado em programas de inseminação artificial também foi avaliada. 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).

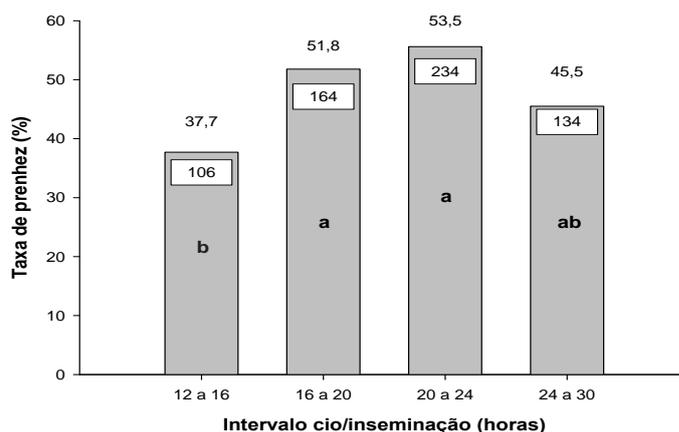


Figura 2. Taxa de concepção de novilhas Jersey de acordo com o intervalo entre início do cio e inseminação utilizando sêmen sexado (a ≠ b; P < 0,05).

4.2) Efeito touro na eficiência de programas reprodutivos utilizando sêmen sexado

Um fator importante a ser considerado no momento da IA com sêmen sexado é a variação na fertilidade dos touros. Enquanto o processo de sexagem diminui significativamente a fertilidade de alguns touros, a sexagem espermática não afeta a fertilidade de outros touros (BORCHERSEN et al., 2009).

Em estudo realizado recentemente, Sales et al. (2010) 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). Outros estudos têm descrito que as taxas de concepção variam entre os touros (DEJARNETTE et al., 2008; BORCHERSEN et al., 2009; SEIDEL et al., 1997).

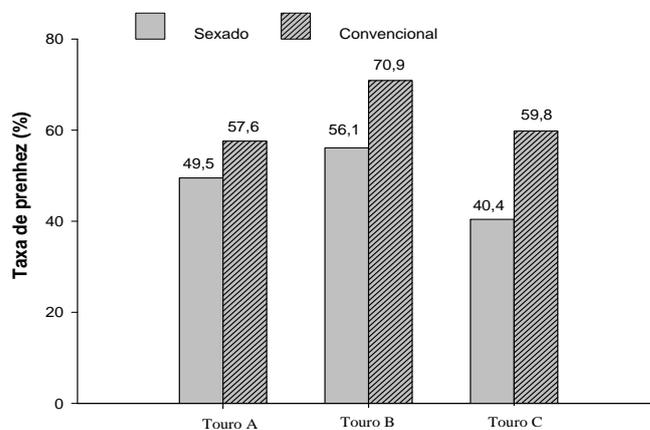


Figura 3. Taxa de concepção de novilhas Jersey submetidas à inseminação artificial de acordo com o touro (A, n=216; B, n= 333 e C, n=200) e o tipo de sêmen (sexado ou não sexado). Verificou-se efeito de touro ($P = 0,008$) e de sêmen ($P = 0,001$).

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 e PEACOCK, 2009).

Em outro estudo, Sales et al. (2011) sincronizaram novilhas Jersey e utilizaram sêmen sexado de três touros diferentes para inseminação. A taxa de concepção foi diferente entre os touros utilizados no experimento, indicando a existência de discrepância individual entre os touros na produção de sêmen para sexagem (Figura 4).

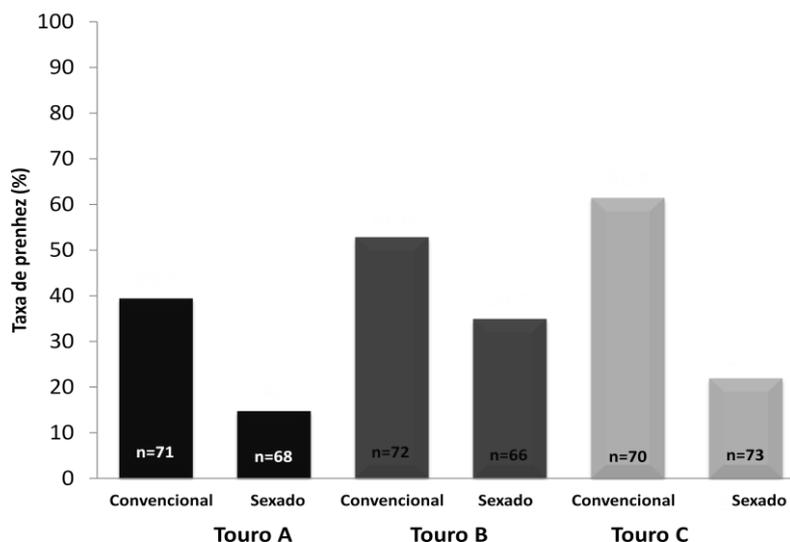


Figura 4. Taxa de prenhez de novilhas Jersey submetidas a IATF de acordo com o touro e o tipo de sêmen utilizado (convencional ou sexado). Foi verificado efeito no touro ($P = 0.001$) e no tipo de sêmen ($P = 0.001$).

Um estudo (UNDERWOOD et al., 2010) verificou o potencial de fertilização do sêmen sexado transportado resfriado ou congelado para o centro de sexagem, e mostrou um efeito touro sobre a taxa de prenhez após IA [Touro 1: sêmen convencional (controle) de 63,0% , previamente congelado (PC) 8,6%; previamente refrigerado (PR) de 10,0%. Touro 2: Controle de 45,5%, 0% PC, PR 4,8%, $P = 0,001$].

Assim, a diferença individual entre touros é um aspecto importante a ser considerado na aplicação do uso de sêmen sexado nas propriedades, permitindo a seleção de touros para maior desempenho após a sexagem. Além disso, é essencial enfatizar que este efeito touro é um dos obstáculos mais importantes para a utilização de sêmen sexado em larga escala.

4.3) Sêmen sexado na IATF

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, Sá Filho 2012).

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 (40×10^6 esptz/dose) ou com sêmen sexado (2.1×10^6 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 [C54h = 48,4% (n=95) e C60h=55,1% (n=98); S54h=37,4% (n=99) e S60h=46,4% (n=97)]. 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.

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).

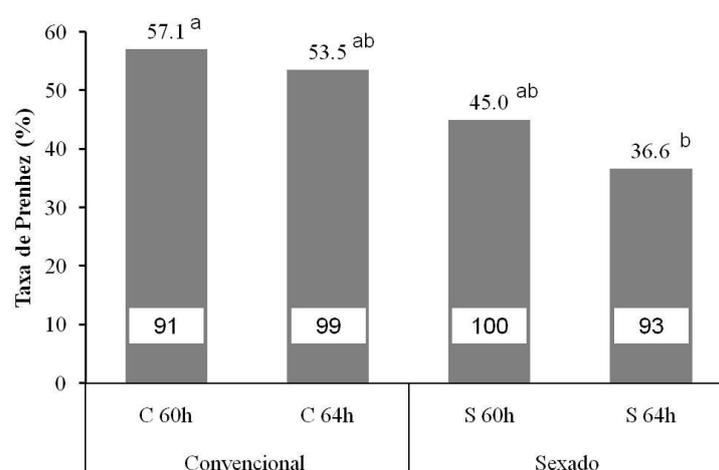


Figura 5. Efeito do momento da IA (60h ou 64h após a retirada do implante de progestágeno) e do tipo de sêmen (convencional ou sexado) na taxa de concepção após IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) no pós-parto.

Em função dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, Sales et al. (2011) 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 ultrassonográficos foram realizados de 12/12 horas em todos os animais para determinar o momento da ovulação. As ovulações ocorreram em média $71,8 \pm 7,8$ horas após a retirada do dispositivo. Observou-se maior taxa de prenhez nas vacas inseminadas próximas à ovulação ($P < 0,01$). Os resultados estão apresentados na figura 6.

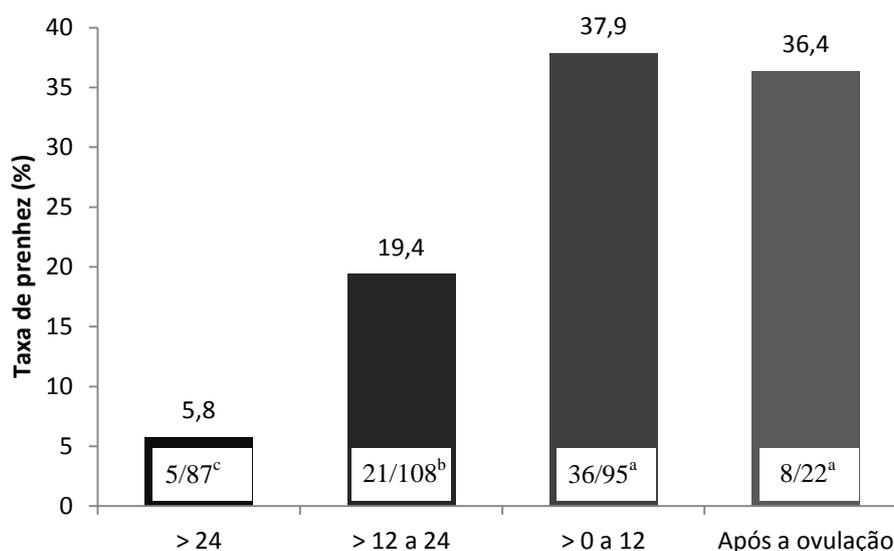


Figura 6. Risco de prenhez de acordo com o intervalo entre a IATF e a ovulação em vacas de corte lactantes inseminadas com sêmen sexado.

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., 2011). 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).

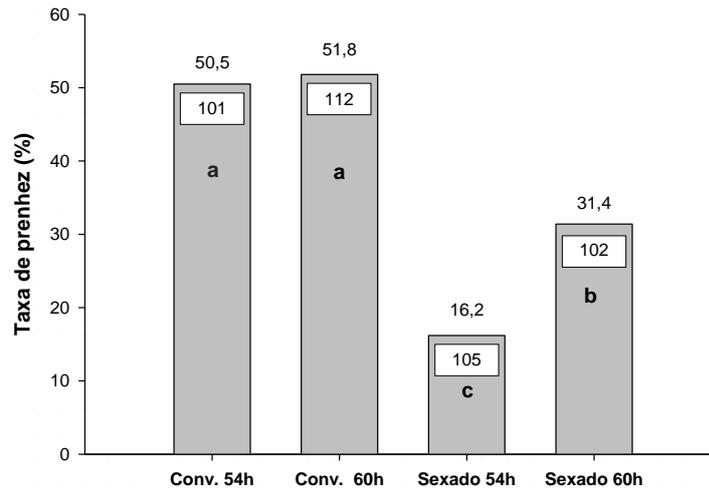


Figura 7. Efeito do momento da IA (54h ou 60h após a retirada do dispositivo de progesterona; 16 a 18 h ou 10 a 12 h antes da ovulação) e do tipo de sêmen (sexado e convencional) na taxa de concepção após IATF em novilhas Jersey.

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).

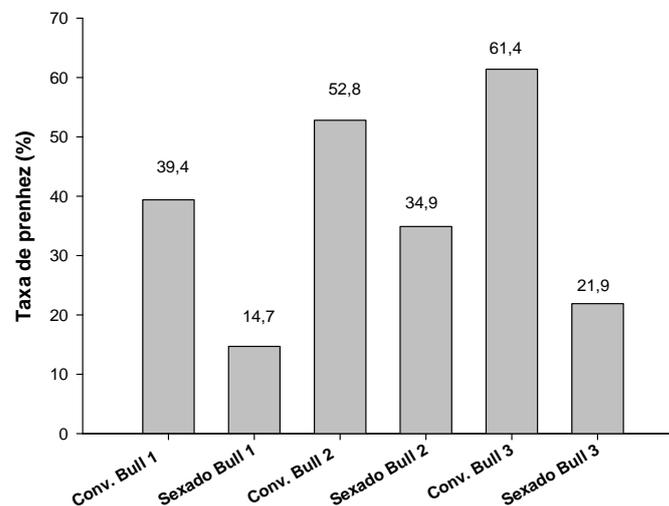


Figura 8. Taxa de concepção de Novilhas Jersey inseminadas em tempo fixo de acordo com o touro e o tipo de sêmen (sexado ou convencional). Verificou-se efeito de touro ($P = 0,001$) e de sêmen ($P = 0,001$).

Após a determinação do melhor momento para a realização da IATF com sêmen sexado, outros estudos foram realizados com o objetivo de verificar o efeito do

diâmetro folicular no momento da IATF e a expressão de estro na taxa de concepção. Estudos anteriores demonstraram que fêmeas com folículo de maior diâmetro no momento da IATF (SÁ FILHO et al., 2010b) e vacas que expressaram estro antes da IATF apresentam melhores índices de concepção com sêmen convencional (SÁ FILHO et al., 2011).

Quando essa metodologia (diâmetro do folículo na IATF) foi empregada utilizando sêmen sexado, observou-se interação ($P=0,02$) entre o tipo do sêmen e o tamanho do folículo dominante [Convencional $\geq 8\text{mm}$ = 58,9% (126/214); Convencional $< 8\text{mm}$ = 49,5% (101/204); Sexado $\geq 8\text{mm}$ = 56,8% (134/236) e Sexado $< 8\text{mm}$ = 31,2% (59/189); Figura 9]. Nesse estudo, verificou-se que a diferença entre os tipos de sêmen (convencional e sexado) na probabilidade de prenhez aos 30 diminui a medida em que o diâmetro dos folículos na IATF aumenta ($P=0,001$; Figura 10). No estudo em que se avaliou a expressão do estro em protocolos de IATF com semen sexado, verificou-se que não houve interação entre o tipo do sêmen e a ocorrência de estro entre a retirada do dispositivo de progesterona e a IATF ($P=0,87$; Figura 11). Porém, verificou-se diferença estatística entre semen convencional e sexado ($P=0,05$) e entre a ocorrência de estro ou não ($P=0,003$) na taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF (SÁ FILHO et al., 2011).

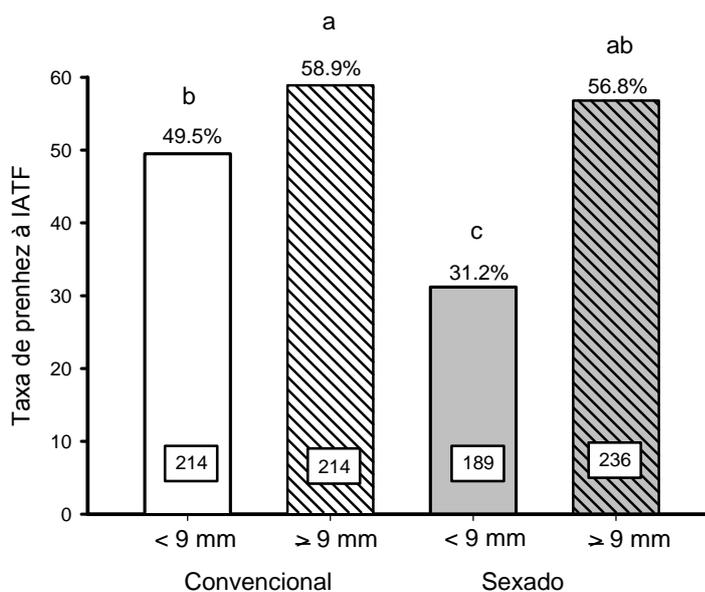


Figura 9. Taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* de acordo com o tipo de sêmen (convencional ou sexado) e o diâmetro do FD ($< 9\text{mm}$ or $\geq 9\text{mm}$) na IATF. Verificou-se interação entre o tipo de sêmen o diâmetro do FD na IATF ($P = 0,02$).^{a,b,c} Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$).

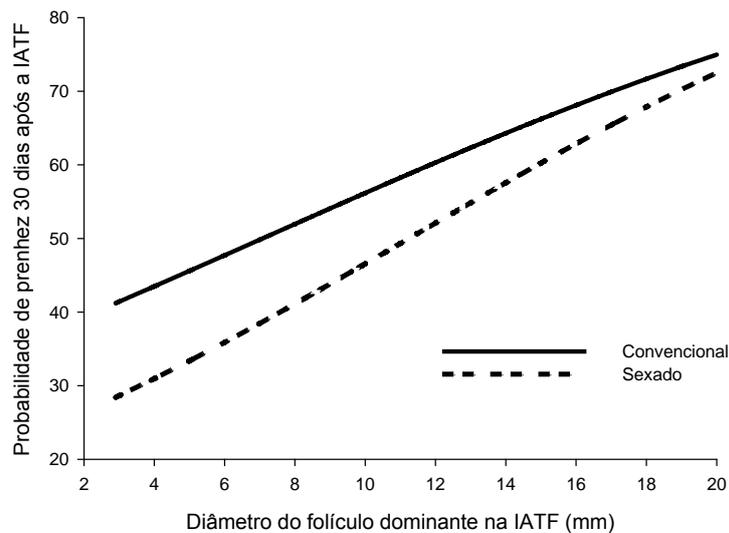


Figura 10. Probabilidade de prenhez 30 dias após a IATF em vacas *Bos indicus* (n = 1344) de acordo com o tipo de semen [Convencional (n = 673) e Sexado (n = 671) e o diâmetro do FD na IATF [Convencional = $\exp(-0,6018 + 0,0850 \cdot \text{Diâmetro do FD na IATF}) / 1 + \exp(-0,6018 + 0,0850 \cdot \text{Diâmetro do FD na IATF})$; $P < 0,0001$) e Sexado = $\exp(-1,2449 + 0,1107 \cdot \text{Diâmetro do FD na IATF}) / 1 + \exp(-1,2449 + 0,1107 \cdot \text{Diâmetro do FD na IATF})$; $P < 0,0001$].

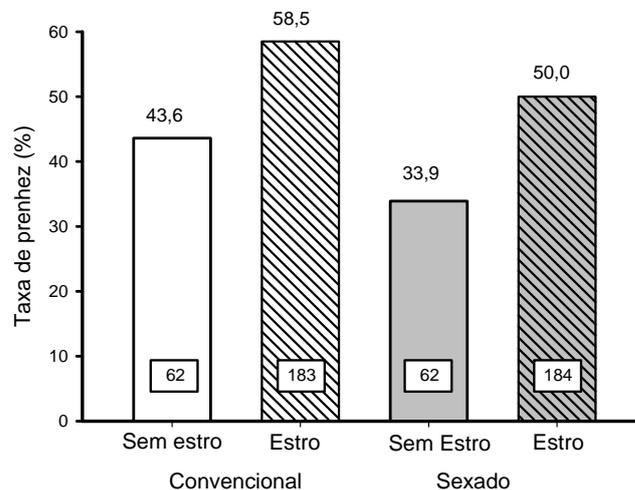


Figura 11. Taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* de acordo com o tipo de semen (convencional ou sexado) e a ocorrência de estro (presença ou não de estro) entre a retirada do dispositivo de progesterona e a IATF. Não houve interação entre o tipo de semen e a ocorrência de estro ($P=0,87$).

Como citado anteriormente, outro possível fator que poderia influenciar a taxa de concepção utilizando sêmen sexado seria o local de deposição no útero. Em um estudo recente Sales et al. (2011) compararam a taxa de concepção de vacas Nelore lactantes recebendo IATF no corpo (n=100) ou no corno (n=100) do útero. Nesse experimento, as vacas foram inseminadas 60-64h após a retirada do dispositivo, sendo que somente fêmeas apresentando diâmetro folicular >8mm foram incluídas na análise. Nas inseminações realizadas no corno uterino, o sêmen foi depositado no corno ipsilateral ao maior folículo presente no momento da IATF. As taxas de concepção foram similares entre os diferentes locais de deposição do sêmen sexado no trato uterino de vacas Nelore lactantes (corpo uterino = 54% e corno uterino = 50%; P>0,05).

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)., permitindo concluir que é possível reduzir o número de manejos sem afetar a eficiência do protocolo de sincronização da ovulação em vacas inseminadas com sêmen sexado. Porém, vale ressaltar que esse protocolo ainda não está sendo recomendado e que novos estudos devem ser conduzidos para sua aplicação comercial. Recentemente, verificou-se que a IATF com sêmen sexado, após o uso de protocolo de três manejos utilizando BE como indutor de ovulação, pode ser realizada tanto às 42 (32,6%; 61/187) com às 50 horas (33,0%; 60/182; P>0,05) da retirada do dispositivo de P4 (MONTEIRO et al., 2012). Além disso, um estudo realizado para avaliar a associação de estradiol com GnRH na sincronização da ovulação e na concepção de vacas Nelore (*Bos indicus*) verificou que tal associação não proporciona maior sincronização da ovulação e também não potencializa a concepção (39,1; 45/115) de vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes submetidas à IATF com sêmen sexado, podendo se utilizar benzoato (34,2; 39/114) ou cipionato (45,2; 52/115) de estradiol como indutores únicos. A Tabela 3 resume os principais estudos com sêmen sexado, indicando a taxa de prenhez e a proporção de prenhez entre sêmen convencional e sexado.

Tabela 3. Taxa de prenhez de fêmeas inseminadas com sêmen convencional ou sexado e a proporção de prenhez obtida com sêmen sexado com base no convencional (sexado/convencional).

Raça	Categoria	Taxa de prenhez baseada no tipo de sêmen utilizado na IA		Proporção (%)	Referência
		Convencional (%) (n/n)	Sexado (%) (n/n)		
<i>IATF</i>					
Corte	Cows	54.2 (232/428)	45.4 (193/425)	83.7	Sá Filho et al. (31) (Exp 1)
Corte	Cows	54.7 (134/245)	45.9 (113/246)	83.9	Sá Filho et al. (31) (Exp 2)
Corte	Cows	51.8 (100/193)	41.8 (82/196)	80.7	Sales et al. (8)
Corte	Cows	55.3 (105/190)	40.9 (79/193)	74.0	Sales et al. (8)
Leite	Cows	27.1 (44/162)	13.0 (21/161)	48.0	Souza et al. 2006 dados não publicados
<i>IA com detecção de estro</i>					
Corte	Novilhas	67.6 (96/142)	53.7 (130/242)	79.4	Seidel and Schenk (2008) (Exp.1)
Corte	Novilhas	67.0 (85/126)	52.6 (129/245)	78.5	Seidel and Schenk (2008) (Exp.2)
Leite	Novilhas	60.0 (1375/2292)	38.0 (881/2319)	63.3	DeJarnette et al. (2011)
Leite	Vacas e Novilhas	37.7 (160/426)	22.9 (51/223)	60.7	Mellado et al. (2010)
Leite	Novilhas	56.0 (30082/53718)	45.0 (17893/39763)	80.3	DeJarnette et al. (2009)
Leite	Vacas e Novilhas	37.4 (34/91)	28.8 (38/132)	77.0	Bodmer et al. (2005)
Leite	Cows	46.0 (69/149)	21.0 (33/157)	45.6	Andersson et al. (2006)
Leite	Novilhas	60.0 (74/124)	46.7 (114/244)	77.8	Seidel and Schenk (2008) (Exp.4)
Leite	Novilhas	62.0 (163/263)	42.1 (225/534)	67.9	Seidel and Schenk (2008) (Exp.5)
Geral		55.9% (32753/58549)	44.3% (19982/45080)	79.2	

4.4) Sêmen sexado na SOV

A superovulação é uma técnica que estimula o crescimento de diversos folículos antrais que se desenvolvem até o estágio pré-ovulatório, com subsequente múltiplas ovulações (REICHENBACH et al., 2002). Ao final do tratamento superovulatório, para que ocorra a fertilização, são realizadas inseminações artificiais (CABODEVILA; TORQUATI, 2001). O objetivo da SOV é obter o máximo de embriões viáveis com alta probabilidade de ocorrência de prenhez (MAPLETOFT et al., 2002).

Dentre as biotecnologias disponíveis, a transferência de embriões (TE) tem sido amplamente aplicada em todo o mundo. Por meio desta ferramenta é possível aumentar o número de descendentes obtidos de doadoras de alto padrão zootécnico, propagando genética desejável de maneira eficiente (BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2006). Aliado à esta tecnologia, o uso de sêmen sexado em bovinocultura de corte e leite é de suma importância (GARNER et al., 2006). O controle da proporção de sexos permite maior velocidade no progresso genético, maior produtividade e redução no impacto ambiental devido a eliminação de animais do sexo indesejado (RATH et al., 2009).

A produção de embriões pode ser realizada através da SOV ou PIV. Diversos tratamentos hormonais para induzir ovulações múltiplas em bovinos têm sido estudados (GORDON 1996; BARROS e NOGUEIRA, 2001). Entre os agentes superovulatórios testados, destacam-se o hormônio folículo estimulante (FSH) e a gonadotrofina coriônica equina (eCG). A utilização do FSH como agente indutor de superestimulação do crescimento folicular tem sido extensamente estudada. Verificam-se diferentes concentrações e vias de administração dos produtos disponíveis no mercado (PAGE et al., 1989; TRIBULO et al., 1993; DONALDSON, 1995).

O controle do momento da ovulação, juntamente com protocolos de SOV, pode ser realizado por meio do atraso na remoção de dispositivos de liberação de progesterona/progestágeno e posterior administração de hormônio luteinizante (pLH) ou GnRH para indução da ovulação (NOGUERIA et al., 2002; BARUSELLI et al., 2006). Nestes protocolos, recomenda-se a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus* superestimuladas 12 e 24 após a administração de pLH, quando o sêmen convencional é utilizado (BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2006). No entanto, esses protocolos foram desenvolvidos com o emprego de sêmen convencional. Sendo assim, não se pode assumir que a produção de embriões com sêmen sexado seja semelhante.

Diversos fatores, como a meia-vida reduzida dos espermatozoides sexados no trato reprodutivo da fêmea, menor número de espermatozoides por palheta, possível pré-capacitação induzida pelo processo de sexagem e o local de deposição do sêmen podem afetar a fertilidade e a produção de embriões após a IATF com sêmen sexado (LU and SEIDEL, 2004; MAXWELL et al., 2004; SARTORI et al., 2004; SCHENK et al., 2006; DEJARNETTE et al., 2008; PEIPPO et al., 2009; LARSON et al., 2010).

Com o intuito de avaliar a produção de embriões em vaca Nelore (*Bos indicus*) 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 IATFs com sêmen sexado ($4,2 \times 10^6$ esptz/IA) e convencional (40×10^6 esptz/IA) foram realizadas 12 e 24 horas após a administração do indutor da ovulação (GnRH). Os resultados estão apresentados na figura 12.

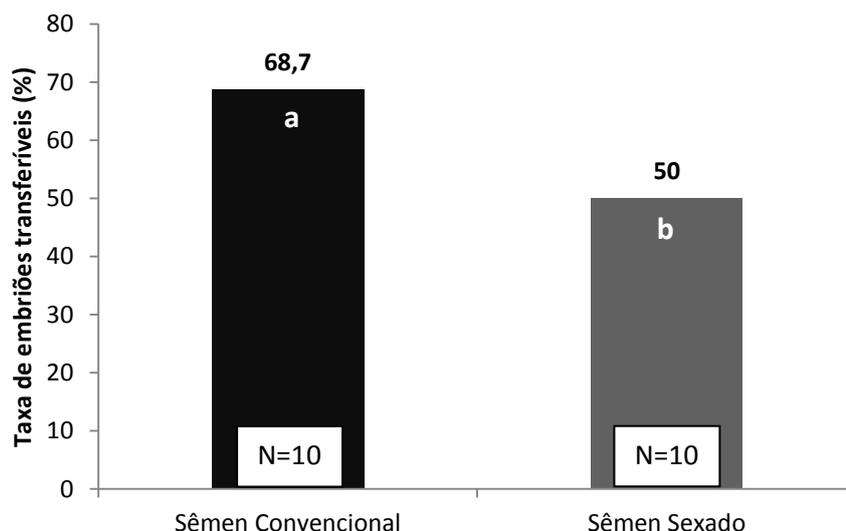


Figura 12. Produção de embriões de vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado ou convencional, Cassilândia, MS, 2007.

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 devido a acurácia de 90% na determinação do sexo (Figura 13).

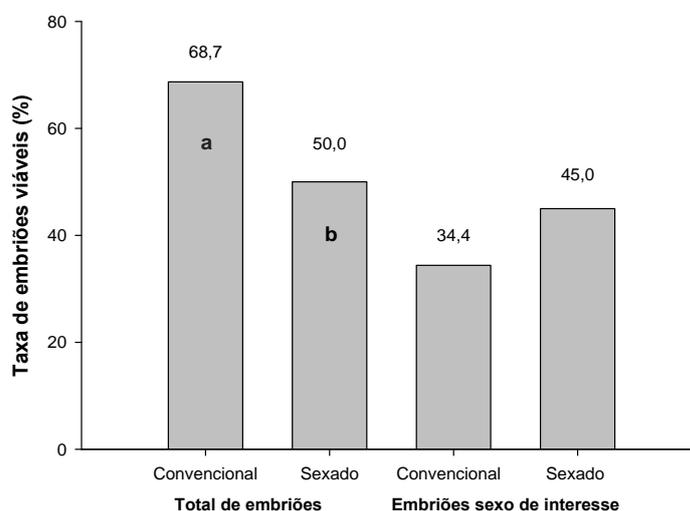


Figura 13. Estimativa de produção de embriões transferíveis (macho ou fêmea) com o emprego de sêmen convencional e sexado em doadoras Nelore superovuladas e inseminadas em tempo fixo (estimativa de 90% de acurácia na sexagem).

Nesse experimento, parte dos embriões produzidos foi transferida à fresco em receptoras sincronizadas (Figura 14). 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 ultrassonografia, confirmou-se 90,0% de fêmeas para o sêmen sexado e 52,7% para o sêmen convencional.

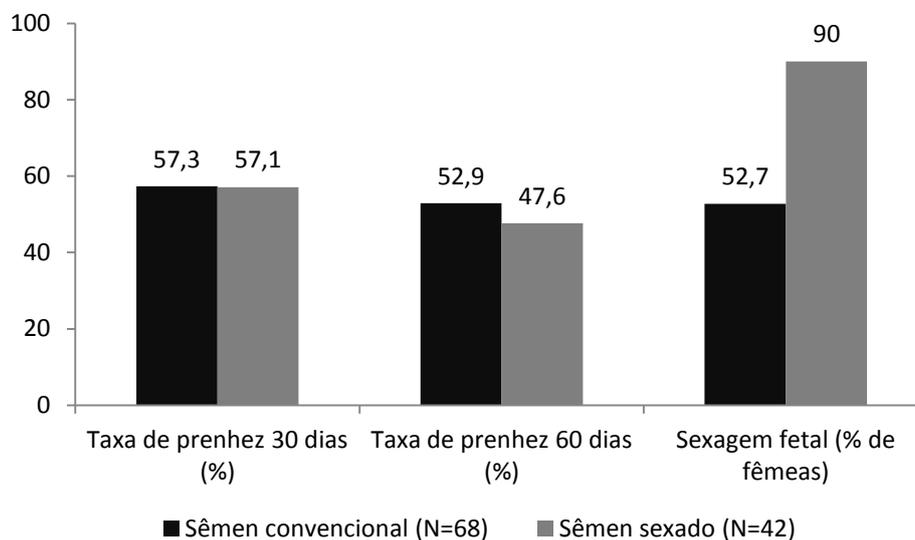


Figura 14. Taxa de prenhez aos 30 e 60 dias após a transferência de embriões provenientes de inseminação com sêmen convencional e sexado e porcentagem de fêmeas na sexagem fetal.

Diversos estudos têm sido realizados avaliando o uso de sêmen sexado na IA ou IATF (SEIDEL, et al., 2008; DEJARNETTE et al., 2008; BORCHERSEN et al., 2009; SCHENK et al., 2009; SALES et al., 2010), porém, poucos trabalhos têm relatado a produção de embriões provenientes de sêmen sexado em protocolos de superovulação. Nestes trabalhos, o número de embriões transferíveis recuperados de doadoras inseminadas com sêmen sexado tem sido menor que àqueles obtidos de doadoras inseminadas com sêmen convencional (PEIPPO et al., 2009; LARSON et al., 2010; SARTORI et al., 2004; SCHENK et al., 2006).

Em estudo recente, Peippo et al. (2009) verificaram que animais inseminados com sêmen convencional produziram 65,5% e 64,5% de embriões transferíveis em novilhas e vacas holandesas, respectivamente. Porém, os grupos inseminados com sêmen sexado obtiveram 53,9% e 21,1% de embriões transferíveis em novilhas e vacas, respectivamente. A proporção de embriões transferíveis do sexo desejado dobrou quando as inseminações foram realizadas com espermatozoides sexados comparado às inseminações com sêmen convencional (96,4% vs. 41,1% em novilhas e 81,1% vs. 39,8% em vacas). Sartori et al. (2004) realizaram inseminações com sêmen sexado e convencional em novilhas da raça Holandesa superovuladas em diferentes momentos, conforme os grupos: S20-1X (IA 12h, com 20 milhões esptz sexados); S10-2X (IA 12 e 24h, com 10 milhões esptz sexados cada) e U10-2X (IA 12 e 24h, com 10 milhões esptz não-sexados cada). O percentual de embriões viáveis foi semelhante entre os grupos S20-1X e S10-2X (63,5% e 61,9%), porém menor que no grupo U10-2X (90,9%).

Em vacas e novilhas de corte, Schenck et al. (2006) verificaram que o grupo inseminado com sêmen convencional apresentou maior porcentagem de embriões (69%), quando comparado aos grupos que receberam sêmen sexado com 10×10^6 esptz/dose (49%) e com 2×10^6 esptz/dose (40%). Em novilhas de leite, o número de embriões transferíveis foi menor no grupo que recebeu sêmen sexado na dose de 2×10^6 esptz/dose comparado com o grupo que recebeu sêmen convencional na dose de 40×10^6 esptz/dose. Porém, o grupo que recebeu sêmen sexado na dose de 10×10^6 esptz/dose apresentou número similar de embriões transferíveis comparado ao grupo que recebeu sêmen convencional na dose de 40×10^6 esptz/dose. Quando doadoras foram inseminadas com sêmen sexado 12 e 24h após a detecção do estro, o número de embriões transferíveis foi maior quando comparado com as doadoras que receberam apenas uma dose de sêmen sexado (SCHENK et al., 2006). Esses dados são indicativos de que duas inseminações com sêmen sexado foram mais eficazes.

Larson et al. (2010) verificaram que quatro inseminações com sêmen sexado ($2,1 \times 10^6$ esptz por palheta de 0,25mL) em doadoras superestimuladas produziram número total de embriões por colheita similar entre os tratamentos convencional e sexado ($10,9 \pm 1,8$ vs. $10,5 \pm 1,6$), mas o número de embriões Grau 1 foi maior para o convencional ($4,3 \pm 0,8$ vs. $2,3 \pm 0,7$). Entretanto, o número médio de oócitos não fecundados foi maior para o sexado ($5,6 \pm 1,0$ vs. $3,0 \pm 1,2$).

O alto percentual de oócitos não fecundados provenientes de doadoras inseminadas com sêmen sexado é fator recorrente. Verificou-se que a proporção de oócitos não fecundados com sêmen sexado foi de 21,1% para novilhas e de 56,0% para vacas. No entanto, com sêmen convencional foi de 10,6% para novilhas e de 14,4% para vacas. Consequentemente, vacas inseminadas com sêmen sexado produziram menores proporções de embriões transferíveis e maiores proporções de oócitos não fecundados que vacas inseminadas com sêmen convencional (PEIPPO et al., 2009).

Recentemente, um estudo delineou dois experimentos para avaliar o efeito de diferentes momentos da inseminação (12 e 24 h ou 18 e 30 h após a indução da ovulação) e diferentes tipos de sêmen [sexado ($4,2 \times 10^6$ esptz/IA) ou convencional (40×10^6 esptz/IA)] na produção de embriões em doadoras Nelore (*Bos indicus*) e Holandesa (*Bos taurus*) superestimuladas (SOARES et al., 2011). Foi verificado que a inseminação deve ser realizada próxima das ovulações sincronizadas para aumentar a produção de embriões provenientes de sêmen sexado em doadoras de leite e de corte superovuladas (Figuras 15 e 16).

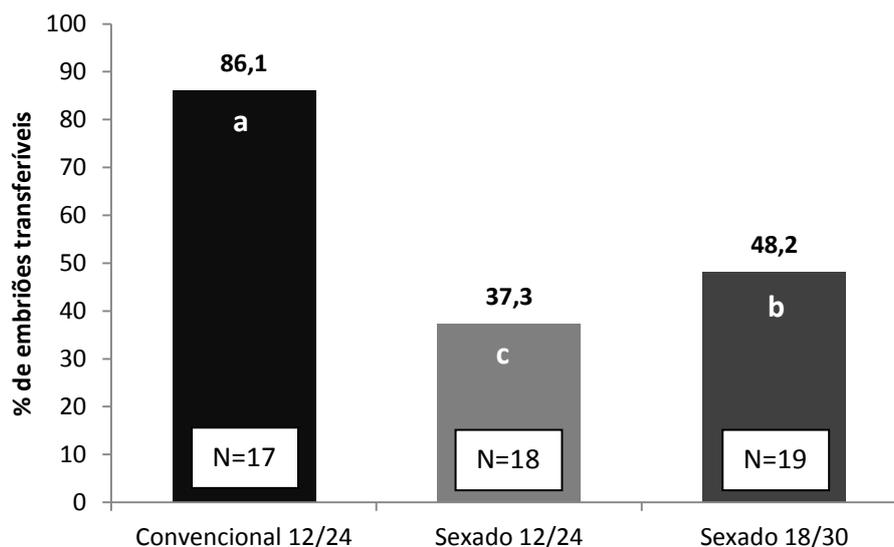


Figura 15. Produção de embriões de vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado e convencional de acordo com o momento da IATF.

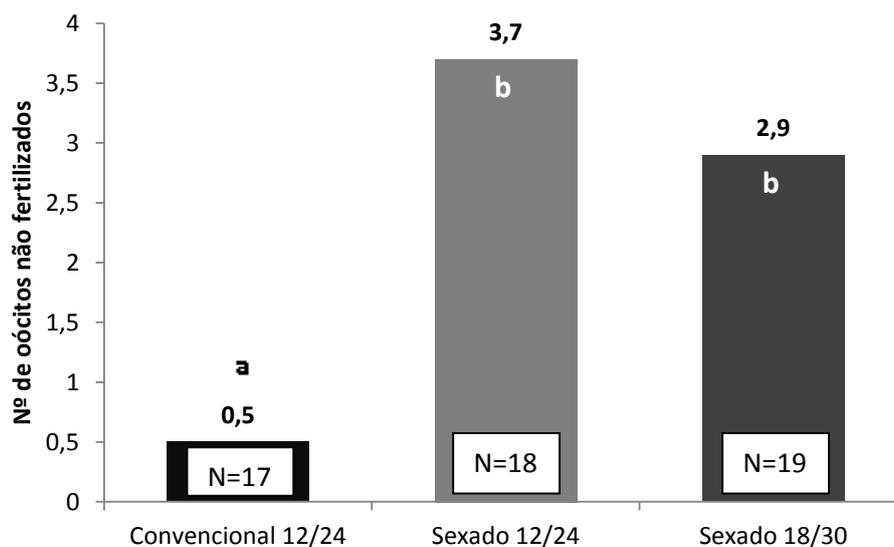


Figura 16. Número de óocitos não fertilizados de vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado e convencional de acordo com o momento da IATF.

O atraso da IATF de 12/24 horas para 18/30 horas após a administração de LH aumentou o número de embriões produzidos em vacas Nelore superestimuladas e inseminadas com sêmen sexado. No entanto, os resultados ainda são inferiores aos obtidos com a utilização de sêmen convencional. Ainda, o número de óocitos não fertilizados foi maior nos grupos com sêmen sexado comparado ao convencional (Figuras 17 e 18). 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 ou com GnRH, tanto em *Bos indicus* como em *Bos taurus*.

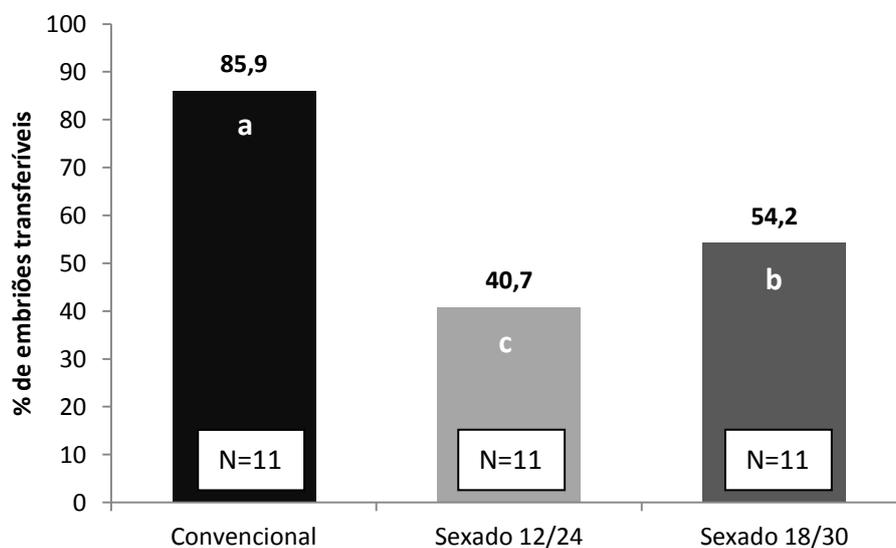


Figura 17. Produção de embriões de vacas holandesas (*Bos taurus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado e convencional de acordo com o momento da IATF.

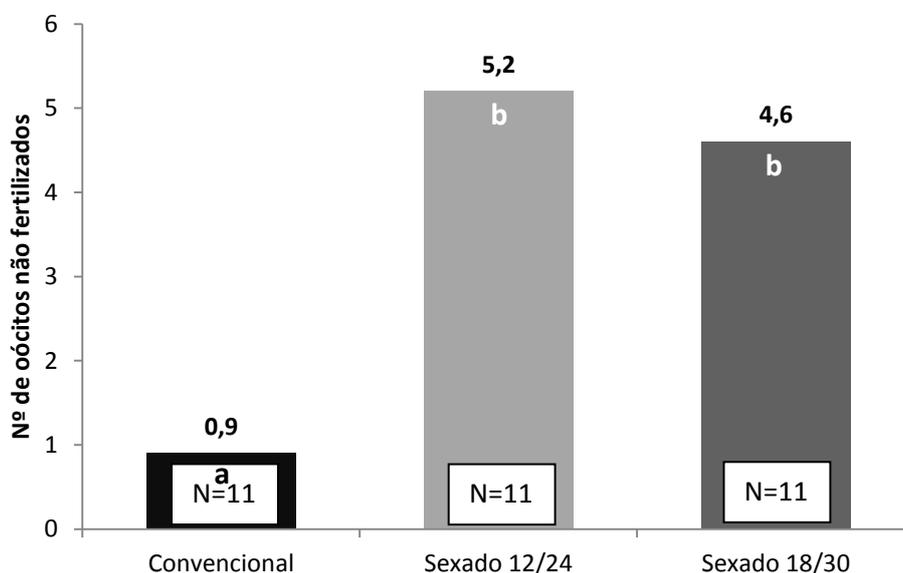


Figura 18. Número de óocitos não fertilizados de vacas holandesas (*Bos taurus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado e convencional de acordo com o momento da IATF.

4.5) Sêmen sexado na PIV

A punção folicular com aspiração (*ovum pick up* – OPU) é utilizada na recuperação repetitiva de oócitos imaturos em animais vivos, proporcionando fonte eficiente de oócitos para produção de embriões *in vitro*, com fins de pesquisa e de aplicação comercial. (BOLS, 1997). Contudo, existem vários fatores que influenciam a coleta de ovócitos, os quais são fundamentais para a maximização da taxa de recuperação (HORNE et al, 1996). A maioria dos estudos utiliza ovócitos bovinos obtidos de ovários provenientes de abatedouros. Os oócitos que apresentam camada de células do *cumulus* compacta possuem maior capacidade de maturação *in vitro* (COSTA, 1994; MALARD, 2000). A combinação entre pressão de aspiração e diâmetro da agulha é essencial para a coleta de ovócitos de qualidade (HASHIMOTO et al, 1999).

Como citado anteriormente, a PIV é uma ferramenta que otimiza o uso do sêmen sexado para a produção comercial de embriões. Na inseminação artificial, quando uma palheta de sêmen sexado é utilizada, aproximadamente 2 milhões de espermatozoides são depositados na fêmea para inseminar um oócito *in vivo*. Verifica-se grande contraste com a produção *in vitro* (PIV), na qual 1000 espermatozoides podem ser utilizados para fertilizar um oócito (YANG et al., 1993). Sendo assim, a PIV é considerada uma alternativa para maximizar a utilização do sêmen sexado (XU et al., 2009). Na atualidade, a PIV tem sido muito utilizada pelas indústrias de laticínios e de carne (YANG et al., 1993; BRACKETT et al., 1989; XU et al., 1987) em combinação com outras técnicas de reprodução assistida.

Em 1981 foi relatado o nascimento do primeiro bezerro pela técnica de PIV (BRACKETT et al., 1982). Os primeiros bezerros de PIV com semen sexado nasceram em 1993 (CRAN et al., 1993). A taxa de blastocisto utilizando sêmen sexado na PIV aumentou de 20% no final da década de 1990 para mais de 30% em relatos recentes (XU et al., 2006; LU et al., 1999; LU et al., 2004; ZHANG et al., 2003). Em 2005, Wilson et al. (2005) relataram a transferência de embriões de bovinos provenientes de PIV com sêmen sexado (um embrião por receptora), com 16% de prenhez em vacas e 34% em novilhas. Além disso, foi verificada taxa de prenhez de 41% após a “transferência única” de 3627 embriões provenientes de sêmen sexado (XU et al., 2006). Esta taxa foi semelhante à obtida com embriões provenientes de PIV com sêmen convencional (42%), porém inferior à obtida com os embriões produzidos *in vivo* (53%). Pela primeira vez foi relatada a transferência de embriões vitrificados, com mais de 95 % de taxa de sobrevivência com taxa de prenhez de 40% (XU et al., 2006).

Existem relatos de 90% de nascimentos do sexo desejado, demonstrando a acurácia do emprego do sêmen sexado na PIV (CRAN et al., 1995). Porém, embriões bovinos provenientes de sêmen sexado apresentaram alterações na expressão paterna de mRNA (MORTON et al., 2007) e menor desenvolvimento *in vitro* que embriões provenientes de sêmen convencional (LU et al., 1999). Em virtude destes resultados, estudos devem ser realizados para aperfeiçoar a técnica e para expandir sua utilização (GARNER; SEIDEL, 2008).

A influência da época do ano e do uso de sêmen sexado na produção embrionária *in vitro* de oócitos obtidos através de aspiração folicular *in vivo* guiada por ultrassom (OPU) foi avaliada em vacas Holandesas (SANCHES et al., 2012). O número total de embriões produzidos por sessão de OPU (verão $3,3 \pm 0,1$; inverno $3,9 \pm 0,2$; $P=0,004$) e a taxa de embriões por oócito viável (verão $23,8 \pm 0,4\%$; inverno $28,9 \pm 1,0\%$;

$P < 0,0001$) foram reduzidos quando as OPU foram realizadas durante os meses do verão. Com relação ao tipo de sêmen utilizado, houve redução do número de embriões produzidos por sessão de OPU ($P < 0,0001$) e na taxa de embriões por oócitos viáveis ($P < 0,0001$) quando se utilizou sêmen sexado ($3,3 \pm 0,1$ e $23,7 \pm 0,6\%$) quando comparado ao uso de sêmen convencional ($4,5 \pm 0,2$ e $35,1 \pm 1,5\%$). Portanto, o atual estudo indica que existe queda na produção *in vitro* de embriões de vacas Holandesas durante o verão, além de menor produção embrionária quando o sêmen sexado é utilizado.

A transferência de embriões é uma técnica promissora no aumento da fertilidade em vacas de leite durante o verão e em vacas repetidoras de cio (Rodrigues et al., 2004). Um estudo realizado por Stewart et al. (2011) comparou diferentes estratégias reprodutivas em vacas de leite durante o verão (IA com sêmen convencional, TE com embrião fresco ou TE com embrião vitrificado). Foram utilizadas 722 vacas oriundas de duas fazendas comerciais na região centro-norte do estado do Texas no período de junho a outubro de 2009 (verão-outono do hemisfério norte). A TE com embriões frescos produzidos *in vitro* (45,5%) aumentou a fertilidade de vacas leiteiras durante o verão quando comparada à de vacas inseminadas com sêmen convencional (24,8%) e àquelas que receberam um embrião produzido *in vitro* e vitrificado (31,6%). Dessa forma, neste estudo verificou-se melhora na fertilidade de vacas leiteiras durante o verão utilizando transferência de embriões produzidos com sêmen sexado

A variação individual de cada touro e o estresse provocado ao espermatozoide pelos processos de congelamento e sexagem são fatores que podem afetar o sucesso da PIV. Em função disso, um fator de relevância recorrente na utilização do sêmen sexado é a variação individual dos touros. Blondin et al. (2009) avaliaram os parâmetros do sêmen bovino e as melhores condições na PIV para produzir o maior percentual de blastocistos. Para tanto, foram analisados pelo CASA e por citometria de fluxo quatro tipos de sêmen: fresco e congelado convencional; fresco e congelado sexado. O sêmen sexado resultou em menor taxa de blastocistos que o convencional ($P < 0,05$), porém alguns touros tiveram melhor desempenho na PIV. Os autores verificaram que o CASA e a citometria de fluxo são excelentes métodos de diagnóstico para monitorar os parâmetros do sêmen que podem ser utilizados para aperfeiçoar as condições da PIV e obter melhores taxas de blastocisto.

Dados do laboratório comercial da empresa Sexing durante os anos de 2007-2008 totalizaram 6188 oócitos recuperados entre os meses de Setembro (2007) e Março (2008), nos quais 4647 oócitos considerados como viáveis foram submetidos à PIV com sêmen convencional e 1541 com sêmen sexado (Campos Filho, Comunicação pessoal). As taxas de produção de embriões foram de 27,90 e 26,10%; no ano de 2007; e 31,82 e 30,82% no ano de 2008 para o sêmen convencional e sexado, respectivamente. A média geral de produção foi de 34,9% para o convencional e 32,4% para o sexado ($P > 0,05$). Os dados obtidos demonstram que a produção *in vitro* de embriões com sêmen sexado apresenta taxa de produção de embriões semelhante à produzida com sêmen convencional.

Em função dos problemas causados pelo processo de sexagem, um estudo avaliou a qualidade estrutural e funcional do sêmen após sexagem por citometria de fluxo (CARVALHO et al., 2010). Foi utilizado sêmen congelado não sexado (NS), sexado para X (SX) e sexado para Y (SY) de quatro touros. Com base na avaliação espermática, o sêmen NS teve melhor ($P < 0,05$) qualidade de espermatozoides sexados, incluindo maior motilidade e maiores percentuais de células com uma membrana intacta e acrossomo ($58,0 \pm 3,0$, $58,2 \pm 3,0$ e $60,9 \pm 3,3$) do que SX ($29,6 \pm 1,3$, $36,0 \pm 2,9$ e $37,1 \pm 3,3$), e SY ($26,2 \pm 2,1$, $36,4 \pm 2,9$ e $37,5 \pm 3,3$). Não houve diferença ($P > 0,05$)

entre os grupos para as taxas de fertilização e clivagem. Da mesma forma, a taxa de blastocisto no dia 8 (Dia 0 = dia da inseminação) não diferiu entre os grupos ($22,2 \pm 3,2$, $18,1 \pm 3,3$ e $14,8 \pm 2,9$ para NS, SX e SY, respectivamente). Quanto a cinética de desenvolvimento do embrião, todos os grupos tiveram estádios de desenvolvimento semelhantes dos dias 6 a 9. Embora o processo de sexagem tenha afetado algumas características estruturais do espermatozóide bovino, não afetou significativamente a fertilização ou o desenvolvimento embrionário, ou seja, sua capacidade para produzir embriões *in vitro* (CARVALHO et al., 2010). Adicionalmente, as taxas de PIV com sêmen sexado podem ser melhoradas com a rigorosa seleção de touros.

5) Conclusões

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, o atraso de 6 horas nas inseminações (IATF 18 e 30 horas após o indutor de ovulações), é uma alternativa para aumentar o número e embriões viáveis do sexo desejado. A otimização do uso de sêmen sexado pode ser feita por meio da sua utilização na PIV, onde o baixo custo de produção de embriões fertilizados com sêmen sexado é um dos fatores que estimula o uso da TETF, mostrando índices de produção *in vitro* semelhante aos obtidos com sêmen convencional. 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

Ao Dr. Evanil Pires de Campos Filho da Sexing Brasil por todo o apoio às pesquisas realizadas em colaboração desde 2006.

REFERÊNCIAS

Abeydeera, L. R.; Johnson, L. A.; Welch, G. R.; Wang, W. H.; Boquest, A. C.; Cantley, T. C. Birth of piglets preselected for gender following *in vitro* fertilization of *in vitro* matured pig oocytes by X and Y chromosome bearing sperm sorted by high speed flow cytometry. **Theriogenology**, v. 50, p. 981–8, 1998.

- Ali, J. I. Separation of bovine X from Y chromosome bearing spermatozoa using monoclonal H-Y antibodies. **Dissertations Abstracts International**, v. 47, p. 2689, 1987.
- Andersson M.; Taponen, J.; Kommeri, M.; Dahlbom, M. Pregnancy Rates in Lactating Holstein–Friesian Cows after Artificial Insemination with Sexed Sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41(2), p. 95-7, 2006.
- Barceló-Fimbres, M.; Campos-Chillón, L.F.; Seidel Jr, G.E. *In Vitro* Fertilization using Non-sexed and Sexed Bovine Sperm: Sperm Concentration, Sorter Pressure, and Bull Effects. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 495–502, 2011.
- Barros, C. M.; Nogueira, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1483–96, 2001.
- 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. Scientiae Veterinariae**, v. 36SUP, p. s443-s448, 2008.
- 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, v.1, p.113-132, 2006.*
- Baruselli PS, Souza AH, Martins CM, Gimenes LU, Sales JNS, Ayres H, Arruda RP. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 31, p.374-381, 2007.
- Baruselli, P. S.; 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.
- Blecher, S. R.; Howie, R.; LI, S.; Detmar, J.; Blahut, L. M. A new approach to immunological sexing of sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1309-21, 1999.
- Blondin, P.; Beaulieu, M.; Fournier, V.; Morin N.; Crawford L.; Madan, P.; King, W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, v. 71, p. 30–38, 2009.
- 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.
- Bodmer, M.; Janett, F.; Hässig, M.; Daas, N.D., 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(7), p. 1647-55, 2005.

- Bols, P. E. J. Transvaginal ovum pickup in the cow: technical and biological modifications. **Thesis (PhD)** University of Gent, Belgica, 1997.
- Borchersen, S.; Peacock, M. Danish A.I. field data with sexed semen. **Theriogenology**, v. 71(1), p. 59-63, 2009.
- Brackett, B.G.; Bousquet, D.; Boice, M.L.; Donawick, W.J.; Evans, J.F.; Dressel, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology Reproduction**, v. 27, p. 147–58, 1982.
- Brackett, B.G.; Younis, A.I.; Fayrer-Hosken, R.A. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone. **Fertility and Sterility**, v. 52, p. 319–24, 1989.
- Buchanan, B. R.; Seidel Jr, G. E.; Mccue, P. M.; Schenk, J. L.; Herickhoff, L. A.; Squires, E. L. Insemination of mares with low numbers of either sexed or unsexed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1333–44, 2000.
- Cabodevila, J.; Torquatri, S. Superovulação de Fêmeas bovinas. In: PALMA, G.A. **Biotechnologia de la Reproducción** 1ª edição INTA, Argentina, p. 79-108, 2001.
- Carvalho, J.O.; Sartori, R.; Machado, G.M.; Mourão, G.B.; Dode, M.A.N. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 74, p. 1521–1530, 2010.
- Catt, S. L.; Catt, J. W.; Gomez, M. C.; Maxwell, W. M. C.; Evans, G. Birth of a male lamb derived from an *in vitro* matured oocyte fertilized by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. **Veterinary Record**, v. 139, p. 494–5, 1996.
- Costa, E. P. Aspectos morfológicos (citológicos e ultraestruturais) e desenvolvimento de ovócitos de bovinos *in vitro*. **Tese**. Belo Horizonte: UFMG, 1994.
- Cran, D.G.; Johnson, L.A.; Miller, N.G.; Cochrane, D.; Polge C. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and *in vitro* fertilization. **Veterinary Record**, v. 132, p.40–1, 1993.
- Cran, D. G.; Johnson, L. A.; Polge, C. Sex preselection in cattle: a field trial. **Veterinary Record**, p. 495–6, 1995.
- Cran, D. G.; Mckelveywac, King, M. E.; Dolman, D. F.; Mcevoy, T. G.; Broadbent, P. J. Production of lambs by low dose intrauterine insemination with flow cytometrically sorted and unsorted sperm. **Theriogenology**, v. 47, p. 267, 1997.
- Dalton, J. C.; Nadir, S.; Bame, J. H.; Noftsinger, M.; Nebel, R. L.; Saacke, R. G. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2413-8, 2001.

- Dejarnette, J.M.; Leach, M.A.; Nebel, R.L.; Marshall, C.E.; McCleary, C.R.; Moreno, J.F. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? **Journal of Dairy Science**. 2011;94(7):3477-83.
- Dejarnette, J.M.; McCleary, C.R.; Leach, M.A.; Moreno, J.F.; Nebel, R.L.; Marshall, C.E. Effects of 2.1 and 3.5×10⁶ sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. **Journal of Dairy Science**. 2010;93(9):4079-85.
- Dejarnette, J.M.; Nebel, R.L.; Marshall, C.E.; Moreno, J.F.; McCleary, C.R.; Lenz, R.W. Effect of Sex-Sorted Sperm Dosage on Conception Rates in Holstein Heifers and Lactating Cows. **Journal Dairy Science**; 91:1778-1785, 2008.
- Dejarnette, J.M.; Nebel, R.L.; Marshall, C.E. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. **Theriogenology**. 2009;71(1):49-58.
- Donaldson, L.E. A comparison of FSH products. In: International Workshops of embryo transfer, biotechnology and advanced technologies, 1, Montevideo, **Anais**, Universidad de la Republica, v.1, p. 1-8, 1995
- Donaldson, L. E. Effect of insemination regimen on embryo production in superovulated cows. **Veterinary Record**, v. 117, p.35–7, 1985.
- Dransfield, M. 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. 1874-82, 1998.
- Emmens, C. W. Insemination pH and sex ratio in rabbits. **J. Hered.**, v. 51, p. 156-157, 1960.
- Ericksson, R.J.; Langevin, C.N.; Nishino, M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. **Nature**, London, v. 246, p. 241-4, 1973.
- Freitas, C. P. **Variações Metodológicas na Congelação de Sêmen Bovino Sexado** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), 2007.
- Fugger, E. F. Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-chromosome bearing sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1345–440, 1999.
- Garner, D. L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v.65, p.943-957, 2006.
- Garner, D. L.; Seidel Jr., G. E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 886-895, 2008.
- Gordon, I. Controlled reproduction in cattle and buffaloes. Cambridge: CAB International, p. 492 1996

- Graves, W.M.; Dowlen, H.H.; Kiess, G.A.; Riley, T.L. Evaluation of uterine body and bilateral uterine horn insemination techniques. **Journal of dairy science**. 1991;74:3454-6.
- Hashimoto, S.; Takakura, R.; Kishi, M.; Sudo, T.; Minami, N.; Yamada, M. Ultrasoundguided follicle aspiration: the collection of bovine cumulusoocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. **Theriogenology**, v. 51, p. 757765, 1999.
- Hendriksen, P. J. M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? **Theriogenology**, v. 52, p.1295-1307, 1999.
- Hockey, C. D.; Morton, J. M.; Norman, S. T.; MCGowan, M. R. Improved prediction of ovulation time may increase pregnancy rates to artificial insemination in lactating dairy cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 239-248, 2009.
- Hollingshead, F. K.; Evans, G.; Evans, K. M.; Catt, S. L.; Maxwell, W. M. C.; O'Brien, J. K. Birth of lambs of a pre-determined sex after *in vitro* production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, p. 557-68, 2004.
- Hollinshead, F. K.; Gillian, L.; O'Brien, J. K.; Evans, G.; Maxwell, W. M. C. *In vitro* and *in vivo* assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, p. 351-359, 2003.
- Hollinshead, F. K.; O'Brien, J. K.; HE, L.; Maxwell, W. M. C.; Evans. G. Pregnancies after insemination of ewes with sorted, cryopreserved ram spermatozoa. **Reproductive Biology**, v. 32, p. 20, 2001.
- Horne, R.; Bishop, C. J.; Reeves, G.; Wood, C.; Kovacs, T. Aspiration of oocytes for *in vitro* fertilization. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 2, p. 7785, 1996.
- Johnson, L. A. Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring of following surgical insemination of flow sorted X and Y-bearing sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v.26, p.309, 1991.
- Johnson, L. A.; Flook, J. P.; Hawk, H. W. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 199-203, 1989.
- Johnson, L. A.; Flook, J. P.; Look, M. V. Flow cytometry of X and E chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with HOECHST 33343. **Gamete Research**, v. 17, p.203-12, 1987.
- Johnson, L. A.; Flook, J. P.; Look, M. V. Flow cytometry of X and E chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with HOECHST 33343. **Gamete Research**, v. 17, p.203-12, 1987.

- Johnson, L. A.; Pinkel, D. Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. **Cytometry**, v. 7, p. 268-73, 1986.
- Kaneco, S.; Oshio, S.; Kogayashi, T.; Lizuka, R.; Mohri, H. Human X- and Y- bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 124, p. 950-955, 1984.
- Klinc, P.; Rath, D. Application of flowcytometrically sexed spermatozoa in different farm animal species: a review. **Archives of Tierzycht, Dummerstorf**, v. 49, p. 41-54, 2006.
- Knaack, J.; Nehring, H.; Lorenz, G. New result of experimental Sex control in cattle. **Tierzycht**, v. 7, n. 4, p. 156-9, 1973
- Koo, G. C.; Stackpole, C. W.; Boyse, E. A.; Hammerling, U.; Lardis, M. P. Topographical, localization of the H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectronic microscopy. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 70, p. 1502-5, 1973.
- Kubota, C.; Yang, X.; Dinnyes, A.; Todoroki, J.; Yamakuchi, H.; Mizoshita, K. *In vitro* and in vivo survival of frozen-thawed bovine oocytes after IVF, nuclear transfer, and parthenogenetic activation. **Molecular Reproduction and Development** 1998;51:281-6.
- 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.
- Larson, J. E.; Lamb, G. C.; Funnell, B. J.; Bird, S.; Martins, A.; Rodgers, J. C. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 73, p. 698-703, 2010.
- Lindsey, A. C.; Schenk, J. L.; Graham, J. K.; Bruemmer, J. E.; Squires, E. L. Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, p. 121-7, 2002.
- 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**, 62:819-830, 2004.
- Lu, K. H.; Cran, D. G.; Seidel Jr., G. E. *In vitro* fertilization with flow cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 52, 1393-405, 1999.
- Malard, P. F. Coleta, maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de ovócitos de bezerras da raça Nelore de 2 a 3 meses de idade. 47 p. **Dissertação** (Mestrado)Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2000.

- Mapletoft, R. J.; Steward, K. B.; Adams, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 601-611, 2002.
- Martinez, E. A.; GIL, M. A.; Rieke, A.; Mccauley, T. C.; Cantley, T. C.; Vazquez, J. M. Successful non-surgical deep intrauterine insemination in gilts and sows during metaoestrus. Sixth international conference on pig reproduction. **Proceedings...**p. 133, 2001.
- Martinez, E. A.; Vazquez, J. M.; Roca, J.; Lucas, X.; Gill, M. A.; Parrilla, I. Successful non-surgical intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. **Reproduction**, v. 122, p. 289-96, 2001.
- Maxwell, W. M. C.; Evans, G.; Hollinshead, F. K.; Bathgate, R.; DEGRAAF, S. P.; Eriksson, B. M. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 79-85, 2004.
- Maxwell, W. M. C.; Long, C. R.; Johnson, L. A.; Dobrinsky, J. R.; Welch, G. R. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, p. 433-440, 1998.
- Mellado, M.; Coronel, F.; Estrada, A.; Ríos, F.G. Fertility in Holstein × Gyr cows in a subtropical environment after insemination with Gyr sex-sorted semen. **Tropical Animal Health and Production**. 2010;42(7):1493-6.
- Meyers, M. A.; Burns, G.; Arn, D.; Schenk, J. L. Birth of canine offspring following insemination of a bitch with flow-sorted spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 213, 2008.
- Mocé. E.; Graham, J. K.; Schenk, J. L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 66, p. 929-936, 2006.
- Mocé. E.; Graham, J. K.; Schenk, J. L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 66, p. 929-936, 2006.
- Monteiro, B.M.; Giroto, R.W.; Sala, R.V.; Campos Filho, E.P.; Sá Filho, M.F.; Baruselli, P.S. Adequação do momento da IATF com sêmen sexado no protocolo de três manejos em vacas Nelore. **Anais da XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, p.352., 2012)
- Morton, K. M.; Herrmann, D.; Sieg, B.; Struckmann, C.; Maxwell W. M. C.; Rath, D. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization *in vitro* using flow-cytometrically sex-sorted sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 931-40, 2007.
- Mota, A. V. **Sexagem de espermatozoides em mamíferos domésticos**. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP-Botucatu/SP, 2004.

- 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. 1625–34, 2002.
- Norman H. D.; Hutchison, J. L., Miller, R. H. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. **Journal Dairy Science**. 93:3880–3890, 2010.
- O'Brien, J. K.; Crichton, E. G.; Evans, K. M.; Evans, G.; Schenk, J. L.; Stojanov, T. Sex ratio modification using sperm sorting and assisted reproductive technology-a population management strategy. 2nd international symposium on assisted reproductive technology for conservation and genetic management of wildlife. **Proceedings...** p. 224–31, 2002.
- O'Brien, J. K.; Hollingshead, F. K. I.; Evans, K. M.; Evans, G.; Maxwell, W. M. C. Flow cytometric sorting of frozen-thawed spermatozoa in sheep and non-human primates. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, p. 367–75, 2003.
- O'Brien, J. K.; Robeck, T. R. Development of sperm sexing and associated assisted reproductive technology for sex preselection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 319–29, 2006.
- O'Brien, J. K.; Stojanov, T.; Crichton, E. G.; Evans, K. M.; Leigh, D.; Maxwell, W. M. C. Flow cytometric sorting of fresh and frozen-thawed spermatozoa in the lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). **American Journal of Primatology**, v. 66, p. 297–315, 2005.
- Page, R.D.; Jordan, J.E.; Johnson, S.K. Superovulation of Holstein heifers under heat stress with FSH-p or Folltropin. **Theriogenology**, v.31, p.236, 1989.
- Peippo, J.; Vartia, K.; Kananen-Anttila, K.; Rˆaty, M.; Korhonen, K.; Hurme, T.; Myllymˆaki, H.; Sairanen, A.; Mˆaki-Tanila, A. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted sˆemen. **Animal Reproduction Science**, v. 111, p. 80–92, 2009.
- Peippo, J.; Vartia, K.; Kananen-Anttila, K.; RˆAty, M.; Korhonen, K.; Hurme, T.; Myllymˆaki, H.; Sairanen, A.; Mˆaki-Tanila, A. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted sˆemen. **Animal Reproduction Science**, v. 111, p. 80–92, 2009.
- Perry, G. A.; Smith, M. F.; Lucy, M. C.; Green, J. A.; Parks, T. E.; Macneil, M. D.; Roberts, A. J.; Geary, T. W. [Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success](#). **Proc Natl Acad Sci**, v. 102(14), p.5268-73. 2005.

- Perry, G. A.; Smith, M. F.; Roberts, A. J.; Macneil, M. D.; Geary, T. W. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 85, p. 684–689, 2007:
- Pierson, R.A.; Adams, G.P. Remote assessment of ovarian response and follicular status using visual analysis of ultrasound images. **Theriogenology**, v. 51, p.47–57. 1999;
- Pope, C. E.; Crichton, E. B.; Gomez, M. C.; Dumas, C.; Dresser, B. Birth of domestic cat kittens of predetermined sex after transfer of embryos produced by *in vitro* fertilization of oocytes with flow sorted spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 213–4, 2008.
- Pursley, R. J.; Silcox, R. W.; Wiltbank, M. C. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2139-44, 1998.
- Rankin, T. A.; Smith, W. R.; Shanks, R. D.; Lodge, J. R. Timing of insemination in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2840-45, 1992.
- Rath, D.; Moench-Tegeder, G.; Taylor, U.; Johnson, L.A. [Improved quality of sex-sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application](#). **Theriogenology**, v. 71(1), p. 22-9, 2009.
- Rath, D.; Johnson, L. A. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 338-346, 2008.
- Rath, D.; Sieg, B.; Leigh, J.; Klinc, P.; Besseling, M.; Krüger, C.; Wolken, A.; Frenzel, A.; Westermann, P.; Probst, S.; Großfeld, R.; Hadel, K. G.; Ehling, C. Current perspectives of sperm sorting in domestic farm animals. 19th Meeting Association Europeenne de Transfert Embryonnaire. **Proceedings...** p. 125–128, 2003.
- 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: Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 1ªed. São Paulo, Ed. Varela, p.153-160, 2002.
- Roelofs, J. B.; Graat, E. A. M.; Mullaart, E.; Soede, N. M.; Voskamp-Harkema, W.; Kemp, B. Effect of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 66, p. 2173-81, 2006.
- Sá Filho, M.F.; Giroto, R.; Abe, E.K.; Penteado, L.; Campos Filho, E.P.; Moreno, J.F. Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. **Journal of Animal Science**. v. 90(6), p. 1816-23, 2012.
- Sá Filho, M. F.; Penteado, L.; Reis, E. L.; Souza Reis, T.; Galvão, K. N.; Baruselli, P. S. Timed artificial insemination improves the reproductive performance of suckled beef cows subjected to breeding season. **Theriogenology**. 2012;submitted.

- Sá Filho, M. F.; Ayres, H.; Ferreira, R. M.; Nichi, M.; Fosado, M.; Campos Filho, E. P.; Baruselli, P. S. Strategies to improve pregnancy per insemination using sexed semen in dairy heifers detected in estrus **Theriogenology**.74: 1636 – 1642, 2010a.
- Sá Filho, M. F.; Baldrighi, J. M.; Penteadó, 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, 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. **Animal Reproduction Science**,120: 23 – 30, 2010b.
- Sá Filho, M. F.; Sales, J. N. S.; Giroto, R.; Penteadó, L.; Campos Filho, E. P.; Baruselli, P. S. Otimização do uso de sêmen sexado e redução de manejos em programas de IATF em vacas Nelore lactantes. **Acta Scientiae Veterinariae**, p. 370, 2010d.
- Sá Filho, M. F.; Santos, J. E. P.; Ferreira, R. M.; Sales, J. N. S.; Baruselli, P. S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, 2011.
- Saacke, R. G. Insemination factors related to timed AI in cattle. **Theriogenology**, v. 70, p. 479–484, 2008.
- Sales, J.N.S.; Neves, K.A.L.; Souza, A.H.; Crepaldi, G.A.; Sala, R.V.; Fosado, M, et al. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology**. 76(3):427-35, 2011;.
- Sales, J.N.S.; Carvalho, J.B.P.; Crepaldi, G.A.; Maio, J.R.G.; Carvalho, C.A.B.; Barulelli, P.S. Rate and timing of ovulation in Nelore cows treated with estradiol Cypionate or Benzoate to induce ovulation on FTAI protocols. **Reproduction in Domestic Animals**. 2008;43:181.
- Sales, J.N.S.; Crepaldi, G.A.; Fosado, M.; Campos Filho, E.P.; Baruselli, P.S. Timing of insemination with sexed or nonsexed semen on pregnancy rates of Jersey heifers detected in heat by radiotelemetry. **Reproduction fertility and development**. 2010;22:178-.
- Sales, J.N.S.; Crepaldi, G.A.; Fosado, M.; Campos Filho, E.P.; Baruselli, P.S. 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. **Reproduction Fertility and Development**, 22: 178-178, 2010.

- Sales, J.N.S.; Neves, K.A.L.; Souza, A.H.; Crepaldi, G.A.; Sala, R.V.; Fosado, M.; Campos Filho, E.P.; DE Faria, M.; SÁ Filho, M.F.; Baruselli, P.S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex sorted semen. **Theriogenology**, 2011.
- Sanches, B. V.; Basso, A. C.; Pontes, J. H. F.; Sá Filho, M. F.; Mendanha, M. F.; Ferreira, R. M.; Sala, R. V; Baruselli, P. S. In vitro embryo production of Holstein cows presents distinct performance according to the season of the year and the type of sperm utilized. Proceedings of the 26th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), Foz do Iguaçu, PR, Brazil. Abstracts. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p. 547, 2012.
- Sarkar, S. Motility, expression of surface antigen, and X and Y human sperm separation *in vitro* fertilization medium. **Fertility and Sterility**, v. 42, n. 6, p. 899-905, 1984.
- Sartori, R.; Souza, A. H.; Guenther, J. N.; Caraviello, D. Z.; Geiger, L. N.; Schenk, J. L.; Wiltbank, M. C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v.1, p. 86-90, 2004.
- Sartori, R.; Souza, A. H.; Guenther, J. N.; Caraviello, D. Z.; Geiger, L. N.; Schenk, J. L.; Wiltbank, M. C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v.1, p. 86-90, 2004.
- Schenk, J. L.; Cran, D. G.; Everett, R. W.; Seidel Jr., G. E. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. **Theriogenology**, v. 71, p. 717–728, 2009.
- Schenk, J. L.; Cran, D. G.; Everett, R. W.; Seidel Jr., G. E. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. **Theriogenology**, v. 71, p. 717–728, 2009.
- Schenk, J. L.; Degrofft, D. L. Insemination of cow elk with sexed frozen sperm. **Theriogenology**, v. 39, p. 514, 2003.
- Schenk, J. L.; Suh, T. K.; Seidel Jr., G. E. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 299–307, 2006.
- Schenk, J. L.; Suh, T. K.; Seidel Jr., G. E. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 299–307, 2006.
- Seidel Jr, G. E.; Garner, D. L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 124, p. 711–4, 2002.
- Seidel Jr, G. E.; Allen, C. H.; Johnson, L. A.; Holland, M. D.; Brink, Z.; Welch, G. R. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed sperm. **Theriogenology**, v. 48, p. 1255–64, 1997.

- Seidel Jr GE, Schenk JL, Herickhoff LA, Doyle SP, Brink Z, Green RD, et al. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology** 1999;52:1407–20.
- Seidel Jr, G. E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v. 68, p. 443–6, 2007.
- Seidel Jr, G.E.; Johnson, L. A.; Allen, C. A.; Welch, G. R.; Holland, M. D.; Brink, Z. Artificial insemination with X- and Y-bearing bovine sperm. Seidel Jr, G. E.; Allen, C. H.; Johnson, L. A.; Holland, M. D.; Brink, Z.; Welch, G. R. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed sperm. **Theriogenology**, v. 48, p. 1255–64, 1997.
- Seidel JR., E. G. Sexing mammalian sperm-interwiing of commerce, technology, and biology. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 145-56, 2003.
- Seidel Jr., G. E.; Schenk, J. L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 129–138, 2008.
- Senger, P. L.; Becker, W. C.; Davidge, S. T.; Hillers, J. K.; Reeves, J. J. Influence of cornual insemination on conception in dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 66(11), p.3010-16, 1988.
- Shettles, L. B. Factors influencing sex ratios. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 8, p. 643, 1970.
- Shettles,L. B. Human spermatozoa shape in relation to sex ratio. **Fertility and Sterility**, v. 12, p. 502-8, 1961.
- Shettles, L. B. Nuclear struture of human spermatozoa. **Nature**, v.8, p.643, 1960.
- Soares, J.G.; Martins, C.M.; Carvalho, N.A.T.; Nicacio, A.C.; Abreu-Silva, A.L.; Campos Filho, E.P.; et al. Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with *Bos indicus* and *Bos taurus* superovulated donors. **Animal Reproduction Science**. 2011;127(3-4):148-53.
- Souza, A.H.; Sales, J.N.S.; Crepaldi, G.A.; Teixeira, A.A.; Baruselli, P.S. 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. **Animal Reproduction** 6:224, Jan/Mar 2008 [Resumo].
- Souza, A.H.; Martins, C.M.; Torres-JR, J.R.; Ayres, H.; Baruselli, P.S. Efeito do eCG e do cipionato de estradiol em protocolos para inseminação artificial em tempo fixo em vacas Holandesas de alta produção.**Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.404, 2006 [Resumo].
- Souza, A.H.; Sales, J.N.S.; Crepaldi, G.A.; Teixeira, A.A.; Baruselli, P.S. 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. **Animal Reproduction**, v..6, n.1, p224, Jan/Mar 2008 [Resumo].

- Stewart et al. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during Summer using fresh or vitrified embryos produced *in vitro* with sex-sorted semen. **Journal Dairy Science**, v. 94, n.7, 2011.
- Tribulo, H.; Jofre, F.; Carcedo, J.; Alonso, A.; Tribulo, R.; Bó, G.A. Superovulation in *Bos indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. **Theriogenology**, v. 39, p. 331, 1993.
- Underwood, S.L.; Bathgate, R.; Ebsworth, M.; Maxwell, W.M.C.; Evans, G. Pregnancy loss in heifers after artificial insemination with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed dairy bull sperm. **Animal Reproduction Science**. v. 118(1), p.7-12. 2010.
- Van Munster, E. B.; Stap, J.; Hoebe, R. A.; Te Meerman, G.J.; Aten, J. A. Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-bearing spermatozoa: Potentials and limitations. **Theriogenology**, v. 52, p. 1281-93, 1999.
- Vazquez, J. M.; Martinez, E. A.; Parrilla, I.; Roca, J.; GIL, M. A.; Vazquez, J. L. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59, p. 1605–1614, 2003.
- Wilson, R.D.; Weigel, K.A.; Fricke, P.M.; Rutledge, J.J.; Leibfried-Rutledge, M.L.; Matthews, D.L.; et al. *In vitro* production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows. **Journal of Dairy Science** v. 88, p. 776–82, 2005.
- Windsor, D. P.; Evans, G.; White, I. G. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome bearing sperm: A review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 155-71, 1993.
- Xu, K.P.; Greve, T.; Callesen, H.; Hyttel, P. Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p. 501–4, 1987.
- Xu, J.; Guo, Z.; SU, L.; Nedambale, T.L.; Zhang, J.; Schenk, J.; et al. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized *in vitro* with sex-sorted sperm. **Journal of Dairy Science**, v.89, p. 2510–8, 2006.
- Xu, J.; Chaubal, S.A.; DU, F. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. **Theriogenology**, v. 71, p. 39–47, 2009.
- Yang, X.; Jiang, S.; Foote, R.H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. **Molecular Reproduction and Development**, v. 34, p. 94–100, 1993.
- Zhang, M.; Lu, K.H.; Seidel Jr, G.E. Development of bovine embryos after *in vitro* fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. **Theriogenology**, v. 60, p.1657–63, 2003.

mais eficiente em aumentar o número de oócitos de boa qualidade recuperados em sessões de OPU (Blondim et al., 2002), embora o uso de LH proporcione expansão do *cumulus*, tornando muito mais difícil o procedimento de busca e seleção dos oócitos após a aspiração folicular. Os protocolos hormonais, portanto, são utilizados principalmente em raças europeias, já que as fêmeas zebuínas possuem, naturalmente, maior número de folículos recrutados por onda.

Pesquisas recentes mostram que o ambiente uterino pode exercer grande influência na população folicular da reserva ovariana dos fetos, podendo prejudicar a produção oocitária da fêmea adulta. Bezerras nascidas de fêmeas que sofreram restrição alimentar durante o primeiro trimestre de gestação apresentaram redução de 60% na CFA quando comparadas às fêmeas nascidas de mães alimentadas com dieta controle (Evans et al., 2010). Desta forma, o potencial reprodutivo de uma doadora, quanto à população folicular, já deve ser considerado desde a condição corporal da fêmea responsável pela gestação, seja a própria mãe ou a receptora.

O aumento da compreensão dos padrões de desenvolvimento folicular nas últimas décadas tem permitido a manipulação da dinâmica ovariana e a obtenção de bons índices relacionados à produção de embriões. Entretanto, existem animais com bom potencial para a OPU/PIVE, que apresentam naturalmente grande quantidade de oócitos e conseqüentemente bom número de embriões e de prenhez. Por outro lado, alguns animais possuem menor disponibilidade de oócitos e podem não ser indicados para a OPU/PIVE, mas podem produzir números aceitáveis de embriões por MOET.

Referências

- Armstrong DT, Irvine BJ, Earl CR, McLean D, Seamark RF. Gonadotropins stimulations regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo productions from calf oocytes. **Theriogenology** 42, 1227-1236, 1994.
- Evans AC, Mossa F, Fair T, Lonergan P, Butler ST, Zielak-Steciwo AE, Smith GW, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JL, Ireland JJ. Causes and consequences of the variation in the number of ovarian follicles in cattle. **Soc Reprod Fertil Suppl.** 67, 421-9, 2010.
- Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard M. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction** 66, 38-43, 2002.
- Machado SA, Reichenbach HD, Wepert M, Matos LF, Wolf E, Gonçalves PBD. Variability in ovum pick up and *in vitro* embryo production results of monozygotic twin cows. **Acta Scientiae Veterinariae** 31, 443, 2003 (Abstract).
- Pontes JHF, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KCP, Seneda MM. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology** 75, 1640-6, 2011.
- Seneda MM, Esper CR, Andrade ER, Garcia JM, Oliveira JA. Shorter interval between FSH administration and follicle aspiration increases efficiency of oocyte recovery. **Theriogenology** 57, 684, 2002 (Abstract).

Perspectivas para as técnicas de PIV, clonagem e transgenia

Vilceu Bordignon

Department of Animal Science, McGill University
21111, Lakeshore Road, Ste-Anne-de-Bellevue, QC, Canada, H9X 3V9
E-mail: vilceu.bordignon@mcgill.ca

Introdução

As últimas décadas foram marcadas por avanços significativos no entendimento dos processos moleculares e celulares que regulam o desenvolvimento e as funções fisiológicas, assim como os mecanismos de morte celular e doenças. Com base nesse avanço dos conhecimentos foi possível desenvolver e/ou aprimorar diferentes tecnologias que passaram de instrumentos de suporte a pesquisas em laboratório para aplicações clínicas em animais e humanos. Um bom exemplo deste tipo de tecnologia é a produção de embriões in vitro (PIV), que em apenas algumas décadas evoluiu de um uso restrito em pesquisa para uma ampla utilização em clínicas de reprodução assistida em humanos e mais recentemente para uso extensivo em medicina veterinária e produção animal. Por outro lado, outras tecnologias, como a clonagem e a transgenia, que apesar do grande potencial para aplicação em diferentes áreas, tais que saúde e produção animal, tem seu uso ainda bastante restrito, devido a limitações na eficiência, custos e regulamentação. Neste artigo, com base na literatura disponível, serão abordados aspectos relacionados a evolução, aplicações, limitações e perspectivas para o aumento da eficiência e uso das tecnologias de PIV, clonagem e transgenia em bovinos e outros animais domésticos.

Produção de embriões in vitro - PIV

A produção de embriões in vitro, que inclui a maturação e fertilização do oócito e o cultivo do embrião em laboratório, foi inicialmente desenvolvida e utilizada para dar suporte a pesquisas em diferentes áreas tais que gametogênese, fertilização, desenvolvimento, biologia e morte celular, criopreservação, entre muitas outras. A confirmação de que a fertilização in vitro poderia ser aplicada com sucesso em humanos [1] resultou na rápida difusão desta tecnologia para o uso no tratamento de infertilidade em clínicas de reprodução assistida, sendo que atualmente mais de 4 milhões de crianças já foram geradas por fertilização in vitro através do mundo. Como reconhecimento da importância desta tecnologia para uso no tratamento da infertilidade em humanos, o Dr. Robert Edwards foi contemplado com o prêmio Nobel de medicina e fisiologia em 2010 pelo desenvolvimento da fertilização in vitro (http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2010/#).

Em animais, a PIV é principalmente usada em bovinos. O primeiro relato do nascimento de um bovino gerado por fertilização in vitro foi publicado por Brackett e colaboradores [2], mas a expansão e utilização comercial da PIV bovina ocorreu principalmente nas últimas 2 décadas. Nesse período, o uso da PIV em bovinos passou do uso restrito em centrais, onde era principalmente aplicada para produzir embriões de vacas que já não produziam embriões pelos métodos tradicionais de superovulação [3;4], para aplicações em programas de seleção e melhoramento em

condições de campo [5;6]. De acordo com dados publicados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, de um total de 1.183.000 embriões bovinos produzidos no mundo em 2010 cerca de 38% (451.000) foram gerados por PIV [7]. O fato de que a proporção de embriões PIV que foram transferidos em 2000 era de apenas 7.1% [8] confirma que a grande expansão da PIV bovina ocorreu durante os últimos 10 anos. Dentre os fatores que contribuíram para a rápida expansão na PIV bovina estão a adaptação e o refinamento dos métodos guiados por ultrassonografia para coleta transvaginal de oócitos, a melhoria em vários aspectos relacionados ao transporte, maturação, fertilização e cultivo *in vitro*, a disponibilidade de sêmen sexado, o aumento do uso da PIV em raças zebuínas (principalmente no Brasil), as quais produzem maior número de oócitos por aspiração [6], e mais recentemente, ao desenvolvimento de métodos para criopreservação de embriões PIV.

A principal vantagem da PIV em relação a produção *in vivo* (superovulação) é no aumento do número de embriões produzidos num menor período tempo [4;9]. Outras vantagens incluem a possibilidade de uso em fêmeas pré-púberes, gestantes (primeiro terço da gestação) e não-cíclicas, além do melhor aproveitamento do sêmen de alto custo e sexado. Apesar da recente grande expansão, vários aspectos necessitam ser aprimorados para tornar a PIV bovina ainda mais eficiente, com menor variação de resultados e menos onerosa. As principais limitações da PIV incluem: o baixo desenvolvimento dos embriões até blastocisto, a menor resistência dos embriões PIV a criopreservação, as perdas embrionárias e fetais após a transferência, os problemas de parto e pré e pós-natais, e a ocorrência de alterações congênitas [5;10-12]. Tentativas para entender a causa ou propor melhorias para esses e outros aspectos da PIV têm sido o foco de investigação de muitos grupos de pesquisadores através do mundo. Apesar disso, a rapidez com que progressos tem sido alcançados não tem correspondido as expectativas da indústria da PIV. Por exemplo, inúmeros estudos foram conduzidos na tentativa de aumentar a taxa de desenvolvimento dos embriões até blastocisto. No entanto, a proporção de oócitos fertilizados *in vitro* que se desenvolvem até blastocisto tem girado em torno de 30 a 40% e essa proporção pouco foi aumentada nas últimas décadas [13;14]. Se a taxa de desenvolvimento a blastocisto pudesse ser aumentada para 50 a 60%, os benefícios para a indústria da PIV seriam muito grandes e os custos por embrião/animal produzido poderiam ser drasticamente reduzidos.

Embora as causas da baixa eficiência no desenvolvimento ainda não estejam bem elucidadas, não resta dúvida que as causas são multifatoriais e dependentes de interações entre o potencial e a viabilidade dos oócitos com os fatores externos do ambiente e as condições em que a maturação, fertilização e cultivo são conduzidos [13;15;16]. Existe consenso que o oócito é o principal determinante do potencial de desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Além da capacidade para completar a maturação meiótica, o oócito é responsável pela regulação da fertilização, coordenação das primeiras divisões mitóticas, remodelação dos genomas paterno e materno, e modelamento do início da atividade e do funcionamento do genoma do embrião no início do desenvolvimento [17;18]. A produção ou seleção de oócitos com maior competência para estas funções resultaria no aumento da taxa de blastocistos produzidos *in vitro*. Entretanto, indicadores morfológicos não invasivos, tais que a avaliação microscópica do oócito e células do cumulus, não permitem acurácia na seleção dos oócitos mais competentes. Vários estudos mostraram que a aquisição da competência dos oócitos bovinos ocorre de maneira gradual durante o crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório [19-21]. O fato de que os oócitos para PIV em

bovinos são na maioria dos casos recuperados de folículos em diferentes estágios de crescimento ou mesmo de folículos que já estão em processo de atresia, mas raramente de folículos completamente desenvolvidos, explica em grande parte a baixa proporção de oócitos com competência para o desenvolvimento.

Como alternativas para tentar melhorar a competência dos oócitos e consequente produção de blastocistos, tratamentos tem sido testados tanto *in vivo*, antes da coleta dos oócitos, quanto *in vitro*, durante a maturação. Os estudos *in vivo* mostraram que oócitos recuperados de folículos mais desenvolvidos, de animais que foram tratados com gonadotrofinas, podem aumentar a taxa de blastocistos para mais de 2 vezes [14;22;23]. A que se considerar, que estes tratamentos hormonais incorrem num aumento de custos (hormônios), trabalho e dificultam o processo (necessidade de múltiplas injeções), mas podem representar uma alternativa principalmente para os casos de doadoras que produzam oócitos menos competentes ou em menor quantidade. Com relação ao estudos *in vitro*, trabalhos recentes mostraram que tratamentos capazes de aumentar os níveis de AMPc, modular as interações entre o oócito e as células do cumulus e melhorar a sincronização da maturação nuclear e citoplásmica dos oócitos também podem aumentar em mais de 2 vezes a taxa de desenvolvimento embrionário [24]. Embora a eficiência deste método de maturação, descrito como protocolo de simulação fisiológica para maturação *in vitro*, deva ser testada em maior escala, os resultados das pesquisas nessa área parecem bastante promissores [25].

Apesar de que as condições de maturação dos oócitos também influenciem a qualidade do embrião produzido, o potencial dos blastocistos produzidos por PIV para estabelecer e manter a gestação ou para suportar o congelamento e descongelamento, parece ser principalmente influenciado pelas condições de cultivo [21;26]. Mesmo que um grande número de estudos tenha sido publicado na busca das condições ideais de cultivo, as diferenças que ainda existem na taxa de prenhez e nascimentos entre embriões PIV e produzidos *in vivo*, confirmam que as condições atuais ainda não são as ideais.

A seleção dos embriões com maior capacidade para iniciar e manter a gestação e resultar no nascimento de um animal saudável representa outro componente fundamental para a indústria da PIV. Por exemplo, caso fosse possível selecionar para transferência somente os blastocistos com maior potencial de desenvolvimento, um número muito menor de receptoras seria necessário para obter os mesmos resultados. Estudos demonstraram que marcadores moleculares tanto nas células do cumulus [27] quanto de células retiradas dos embriões em desenvolvimento [28;29] podem servir como bons indicadores da capacidade de desenvolvimento pós-implantação dos embriões. Esses marcadores tem grande potencial para, por exemplo, uso na pesquisa para estabelecer métodos mais apropriados para maturação e fertilização dos oócitos e cultivo dos embriões. Entretanto, o uso desses indicadores para a seleção de embriões mais competentes na indústria da PIV bovina é, pelo menos na situação atual, pouco viável por questões de custos e complexidade. Por outro lado, um estudo recente mostrou que a seleção morfológica dos embriões a diferentes fases do desenvolvimento *in vitro* associada a um teste não-invasivo de consumo de oxigênio no estágio de blastocisto, permitiu maior eficácia na seleção de embriões bovinos com maior potencial de desenvolvimento quando comparado a simples avaliação morfológica dos blastocistos [30]. Se confirmada a eficiência em maior escala, esse método pode ser mais facilmente adotado nos laboratórios de PIV bovinos.

Clonagem

A clonagem por transferência nuclear (CTN) consiste na substituição da cromatina de um oócito (citoplasma receptor) pelo núcleo de uma célula retirada do animal a ser clonado. A CTN foi inicialmente desenvolvida e testada em células embrionárias pouco diferenciadas. Os primeiros clones de animais domésticos (ovinos, bovinos e suínos) foram produzidos na década de 80 a partir de células retiradas de embriões (blastômeros). Apesar de algumas empresas terem se dedicado ao uso comercial da CTN para produzir clones a partir de células embrionária, principalmente em bovinos, foi com o nascimento da ovelha Dolly em 1996 [31], primeiro clone produzido a partir de uma célula somática diferenciada retirada de um animal adulto, que CTN teve maior expansão. A rápida expansão no uso da CTN se deve ao fato que esta tecnologia pode ser aplicada para diversos fins como por exemplo: produzir cópias de animais de elevado valor zootécnico, preservar animais em vias de extinção e criar animais transgênicos. Atualmente, a CTN já foi utilizada para produzir clones em mais de 20 espécies diferentes de animais, incluindo animais domésticos, selvagens ou em vias de extinção [32;33]. Apesar disso, se comparada a outras tecnologias reprodutivas, o uso da CTN segue extremamente limitado por várias razões que incluem o custo elevado, mas principalmente devido a baixa eficiência e a não aprovação para uso em animais de consumo na maioria dos países.

Um grande número de estudos foram publicados mostrando que a baixa eficiência da CTN está associada a problemas que ocorrem desde o início do desenvolvimento dos embriões clonados até após o nascimento ou até durante o crescimento dos animais produzidos. Alterações descritas em embriões clonados incluem fragmentação de DNA, falhas no cito esqueleto, formação do fuso mitótico e clivagem, problemas de diferenciação celular e anomalias cromossômicas. Apesar disso, a taxa de desenvolvimento até blastocisto de embriões produzidos por CTN é, por exemplo em bovinos, similar a taxa obtida por PIV. Entretanto, a taxa de nascimentos após a transferência de embriões produzidos por CTN é extremamente inferior a taxa obtida com embriões PIV, pois em geral, menos de 5% dos embriões transferidos resultam no nascimento de um clone viável. Foi demonstrado em diferentes espécies que a maioria das perdas dos embriões transferidos ocorre durante o primeiro terço da gestação, mas perdas frequentes são observadas durante todo o período de gestação. Evidências sugerem que anomalias e insuficiência placentária (tamanho irregular, menor vascularização, menor número de placentomas, edema e hidroalantoide) representam um importante componente responsável pelas perdas fetais. Embora necessitem ser melhor investigados, os problemas de placenta tem sido atribuídos às falhas na expressão de genes que regulam a formação, crescimento e função da placenta, e também devido a possível existência de imunoincompatibilidades entre os embriões produzidos por CTN e o útero das fêmeas receptoras. Além de estar associada à perda de gestações, os problemas de placentação também podem afetar o crescimento e a viabilidade dos animais clonados. Por exemplo, clones de bovinos e ovinos tendem a ser maiores e mais pesados que animais controles, enquanto clones de suínos tendem a ser menores. Os problemas de placenta e crescimento fetal parecem estar associados a alterações na programação do *imprinting* genômico [34].

Problemas perinatais também são frequentemente observados em animais produzidos por CTN. Embora uma grande proporção dos clones nascidos consiga sobreviver, natimortos e perdas nos primeiros dias após o nascimento são frequentes.

Além disso, cuidados especiais são muitas vezes necessários com os clones recém-nascidos por várias razões. Os problemas perinatais mais comumente observados em animais clonados incluem: debilidade, hipóxia, disfunções respiratórias, hipoglicemia, anemia, defeitos cardíacos e circulatórios, deficiências imunológicas, congestão e fibrose hepática, problemas renais, ascites, problemas articulares ou até mesmo disfunções sistêmicas e malformações. Estes e outros problemas são responsáveis pela maior mortalidade peri-natal em clones se comparado a animais controles.

As causas dos problemas observados em animais clonados ainda não estão bem compreendidas, mas certamente dependem de vários fatores e condições. De acordo com os muitos estudos já publicados sobre esse tema, os problemas da CTN podem ser decorrentes da célula doadora de núcleo, qualidade dos oócitos receptores, incompatibilidade entre as fases do ciclo celular das células doadoras e oócitos receptores, deficiente reprogramação nuclear e consequente falhas na programação do desenvolvimento e funcionamento celular, incompatibilidade entre o embrião transferido e a receptora, e a deficiência nos protocolos usados para maturação dos oócitos, micro manipulação, ativação dos oócitos e cultivo dos embriões, entre outros [35].

Existem resultados confirmando que diferentes combinações entre as fases do ciclo celular da célula doadora e o oócito receptor podem afetar a viabilidade e desenvolvimento dos embriões produzidos por CTN. Por exemplo, incompatibilidades entre as fases do ciclo celular podem causar lesões e fragmentações no DNA e também comprometer a ploidia e segregação cromossômica [36]. Por outro lado, a coordenação do ciclo celular pode interferir na remodelagem e reprogramação nuclear. Embora o uso de oócitos pré-ativados tenda a favorecer a compatibilidade com o núcleo transferido para evitar danos a integridade do DNA, o uso de oócitos não ativados favoreça a reprogramação nuclear. Evidências do efeito positivo da fase do oócito receptor na reprogramação nuclear incluem a descondensação nuclear, troca de proteínas nucleares, como laminas, histonas, fatores de transcrição e outras proteínas que se ligam ao DNA, e a modificação da atividade transcricional. Com base nessas informações foi proposto que oócitos pré-ativados são mais recomendados quando a CTN é realizada com células pouco diferenciadas (ex. blastômeros). Por outro lado, oócitos não ativados (em metáfase 2) são recomendados para CTN a partir de células mais diferenciadas (ex. células retiradas de animais adultos) [32;36;37].

O estágio de diferenciação celular é sem dúvida um dos mais importantes componentes para o sucesso da CTN. Apesar de que muitos clones já foram produzidos a partir de células diferenciadas, várias pesquisas confirmaram que quanto mais diferenciada estiver a célula doadora menor será o sucesso da CTN [38;39]. Portanto, a incompleta reprogramação nuclear parece ser o principal limitante da CTN. Existem estimativas que mais de 10.000 genes devem silenciados e outros tantos ativados durante o processo de reprogramação nuclear em embriões produzidos por CTN [40]. Este processo envolve importantes modificações na estrutura da cromatina (modificações epigenéticas), incluindo metilação do DNA, alterações nas regiões amino-terminal das histonas centrais, trocas de sub-tipos de histonas e outras proteínas que se ligam ao DNA, remodelamento dos fatores ativadores e repressores da transcrição, e o reparo das lesões e manutenção da integridade do DNA [41]. Embora ainda não se tenha confirmação de que a reprogramação nuclear ocorre de maneira completa em embriões produzidos por CTN, o fato de que clones

fenotipicamente normais, saudáveis e produtivos são produzidos sugere que, pelo menos em alguns casos, a reprogramação ocorra de maneira normal. O fato de que pouco ainda se sabe sobre os mecanismos que controlam a reprogramação dificulta o estabelecimento de condições e protocolos para melhorar a eficiência da CTN.

Diferentes pesquisas tem sido conduzidas na tentativa de facilitar e melhorar a reprogramação nuclear em embriões produzidos por CTN. Entre as alternativas testadas estão o tratamento das células doadoras antes da transferência nuclear com agentes que alteram a epigenética, inibidores de proteases, inibidores de fosforilação, e permeabilização celular e exposição a extratos de citoplasma de oócitos, entre outros. Em muitos casos, benefícios foram observados tanto na reprogramação de marcas epigenéticas, expressão de genes, ou até com a melhora no desenvolvimento embrionário. Embora o efeito sobre a eficiência na produção de clones nem sempre tenha sido testada ou confirmada, esses estudos sugerem que o tratamento das células doadoras podem favorecer a reprogramação nuclear nos embriões produzidos por CTN. Diferentes tratamentos também tem sido testados para favorecer a reprogramação nuclear nos embriões após a transferência nuclear. Por exemplo, tratamentos dos embriões com inibidores de enzimas deacetilases durante 10 a 20 horas após a transferência nuclear mostraram-se bastante eficazes para aumentar não somente a taxa de blastocistos, mas também a eficiência na produção de clones em diferentes espécies [42;43]. Embora os mecanismos necessitem ser melhor investigados, é possível que o tratamento com inibidores de enzimas deacetilase favoreçam o acesso ao núcleo transferido dos fatores de reprogramação presentes no citoplasma dos oócitos. Apesar de promissores, as consequências desses tratamentos sobre a saúde e produção dos animais clonados precisam ser melhor investigados.

Mesmo que a eficiência da CTN continue baixa, o fato que a maioria dos animais clonados é capaz de crescer, reproduzir e produzir normalmente indica que esta tecnologia pode ser aplicada em animais de produção, especialmente para replicação de animais de elevado valor zootécnico. Além disso, análises biológicas e bioquímicas realizados em produtos de animais clonados (leite e carne) mostraram que não existem diferenças quando comparados a produtos de animais controles (<http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AnimalCloning/UCM124756.pdf>). Esses resultados sugerem que produtos derivados de animais clonados não oferecem maiores riscos se utilizados para consumo humano. Apesar disso, a maioria dos países não permite o uso de produtos derivados de animais clonados para consumo humano. A continuidade das pesquisas na área de reprogramação celular permitirá melhorar a eficiência da CTN, reduzir os custos para produzir um animal clonado e facilitar o acesso a esta tecnologia para aplicação em diferentes áreas além da produção animal.

Transgênese

A possibilidade de manipular o genoma de células e organismos com uso de técnicas de engenharia genética se transformou num importante instrumento de pesquisa em biologia para o estudo de doenças e processos fisiopatológicos complexos. Por exemplo, através da manipulação específica de genes alvo, tanto inserção quanto deleção, é possível de se criar modelos animais para investigar a função e regulação de genes nos diferentes tecidos ou para estudar a patogenia e testar

novas terapias para enfermidades como a fibrose cística. Além disso, animais transgênicos com características específicas podem ser criados com o intuito de aumento de produção, resistência a enfermidades, facilitar a adaptação a ambientes adversos, ou ainda para produzir novos e/ou melhores produtos terapêuticos. Os primeiros animais manipulados geneticamente foram produzidos na década de 80, inicialmente camundongos [44], seguido por outras espécies como coelhos, ovinos e suínos [45]. Os primeiros resultados mostrando que camundongos transgênicos que expressavam o gene do hormônio do crescimento humano possuíam maior crescimento (2 a 4 vezes superior comparado com animais controles) e desenvolvimento muscular [46] estimularam pesquisas similares para aplicações no aumento de produção e rendimento dos animais domésticos. Entretanto, as experiências com animais domésticos transgênicos para hormônio de crescimento, principalmente suínos, não produziram os resultados esperados, possivelmente em função da falta de controle na regulação da expressão do gene transferido [47;48]. As principais áreas de interesse para aplicação prática da transgenia em animais de produção tem sido para modificar o crescimento e rendimento da carcaça, alterar a composição do leite, criar resistência a enfermidades, e para secretar produtos terapêuticos [49;50].

A injeção intra-pronuclear de DNA foi a tecnologia inicialmente utilizada para produzir animais transgênicos. Apesar da eficiência desta tecnologia ser razoável para produzir camundongos transgênicos, os resultados obtidos em animais domésticos são muito inferiores e faz-se necessário injetar e transferir centenas de embriões para produzir um animal transgênico. Portanto o custo para produzir um bovino transgênico por injeção intra-pronuclear é extremamente alto. Além disso, a injeção intra-pronuclear tem outras limitações, pois não permite controlar o número de cópias e o local inserção do gene exógeno. A inserção ao acaso pode, por exemplo, resultar na falta de expressão, caso o gene se insira numa região inativa do genoma, ou ainda na alteração de alguma função no animal, caso o gene se insira numa região codificadora ou interfira na expressão de algum gene [48;51].

Animais transgênicos também podem ser produzidos por transferência de DNA mediado por espermatozóide. Esta técnica foi usada com bastante sucesso em suínos para produzir animais que expressam genes para proteínas fluorescentes [52]. Devido a simplicidade, esta técnica poderia ser facilmente aplicada para produzir transgênicos em diferentes espécies. Entretanto, esta técnica possui as mesmas limitações relacionadas à falta de controle na integração e regulação do gene transferido. Além disso, a eficiência ainda não foi bem testada e confirmada.

Vetores virais, tais que lentivirus e vírus adeno-associados, representam outra alternativa para produção de animais transgênicos. Vetores lentivirais demonstraram alta eficiência para produzir transgênicos em diferentes espécies (camundongos, ratos, suínos, bovinos) quando testados em oócitos, embriões ou em células usadas para clonagem. A capacidade para infectar e inserir o gene em diferentes tipos de células independentemente de estarem ou não se multiplicando é a principal razão da alta eficiência dos lentivetores [51;53;54]. Entretanto, lentivetores possuem importantes limitações que incluem a pequena capacidade em relação ao tamanho do gene exógeno (< de 10 kb), a falta de controle do local e número de integrações no genoma e o maior risco de interferência (mutação ou ativação) em genes endógenos.

O desenvolvimento da técnica de recombinação homóloga foi fundamental para melhorar a eficiência e precisão da transgênese e contornar os principais problemas de falta de controle no local de integração e no número de cópias inseridas, já que esta técnica permite a manipulação do genoma de maneira precisa e em sequências gênicas específicas [55]. Entretanto, a recombinação homóloga só pode ser realizada em células em cultivo e portanto só foi possível de ser utilizada em camundongos devido a disponibilidade de células tronco embrionárias, as quais podiam ser geneticamente manipuladas *in vitro* e após usadas para produzir camundongos quimeras. Assim, o potencial dessa técnica não pode ser explorado nas espécies domésticas devido a indisponibilidade de células tronco totipotentes. Foi a partir da confirmação que células somáticas poderiam ser usadas para produzir clones que se iniciou um novo capítulo na produção de transgênicos em outras espécies, principalmente animais de produção. De fato, com o uso da CTN é possível confirmar a inserção e expressão do gene transferido durante o cultivo das células em laboratório antes de utilizá-las para produzir um animal clonado. Dessa maneira todas as células do animal, inclusive as germinais, terão o mesmo número de cópias e localização do gene exógeno. Entretanto, a recombinação homóloga é muito menos eficiente e difícil de ser realizada em células somáticas se comparada a células tronco embrionárias, o que dificulta a aplicação em animais domésticos.

A descoberta do mecanismo de regulação gênica por RNA de interferência (RNAi) [56] e a adaptação deste mecanismo para manipular genes tanto em células em cultivo quanto em animais [57-59] proporcionou uma nova alternativa para a geração de transgênicos. Ao contrário da recombinação homóloga, que é principalmente usada para suprimir genes (*knockout*), a tecnologia de RNAi serve principalmente para reduzir a função (*knockdown*) de genes específicos. Existe grande interesse e potencial no uso desta tecnologia para criação de modelos animais para pesquisas, resistentes a enfermidades, principalmente virais, ou ainda para gerar animais mais produtivos e rentáveis. Por exemplo, esta tecnologia tem sido testada para reduzir a expressão do gene miostatina, um regulador negativo do crescimento muscular, para produzir animais com maior massa muscular e rendimento de carcaça [60-62]. Outros estudos estão testando o uso do RNAi para suprimir a proteína príon na tentativa de gerar animais resistentes a encefalopatias espongiformes transmissíveis [63-65]. Um grande número de estudos tem sido conduzidos para avaliar a eficiência dessa tecnologia na geração de animais resistentes a enfermidades tais que febre aftosa [66], síndrome respiratória e reprodutiva dos suínos [67], e também na prevenção e cura de enfermidades em humanos [68].

A recente evolução no uso de enzimas nucleases, tais que *zinc-finger* (ZFNs) e *transcription activator-like effector* (TALENs), para manipular o genoma de forma precisa e específica está sendo proposto como um dos principais avanços para melhorar a eficiência e precisão na criação de animais transgênicos ou para produzir modificações gênicas específicas em animais [69;70]. As nucleases do tipo *zinc-finger* tem sido mais amplamente testadas e utilizadas até o momento. As ZFNs são criadas como pares de proteínas fusionadas. Cada ZFN é composta de 3 a 6 domínios *zinc-finger* que se ligam a uma sequência específica do DNA (cada domínio se liga especificamente a 3 pares de base) e um domínio não-específico de clivagem de DNA (a endonuclease FokI). Cada par de ZFNs é concebido para reconhecer e se ligar a 18-36 pares de bases da sequência alvo em direções opostas. Quando o par das ZFNs se liga ao DNA em direções opostas ocorre a dimerização dos domínios da nuclease FokI que resultará na clivagem da cadeia dupla no DNA alvo. Essa técnica tem sido

usada tanto para alterar genes, devido as mutações ou deleções que resultam, quanto para inserir novas sequências num local específico ou até mesmo para alterar ou corrigir sequências específicas no genoma [71]. Animais geneticamente modificados em diferentes espécies foram recentemente criados com uso ZFNs, quer através da manipulação de embriões ou células somáticas cultivadas seguido por SCNT. Por exemplo, a injeção direta em embriões de DNA ou mRNA que codifica para ZFNs foi utilizada para produzir animais *knockouts* em ratos e camundongos com uma eficiência muito elevada, a qual não era anteriormente possível com outros métodos [72;73]. Em outros estudos, ZFNs foram usadas em células em cultivo para produzir suínos e bovinos *knockouts* por CTN [74-76]. Devido à especificidade e alta eficácia, o uso de ZFNs tornou mais fácil e rápido produzir animais com geneticamente modificados bastante precisas, o que até pouco tempo somente era possível de realizar em camundongos.

Referências

- [1] Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet* 1978; 2: 366.
- [2] Brackett RG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 1982; 27: 147-158.
- [3] Hasler JF, Henderson WB, Hurtgen PJ, Jin ZQ, McCauley AD, Mower SA, Neely B, Shuey LS, Stokes JA. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology* 1995; 43: 141-152.
- [4] Bousquet D, Twagiramungu H, Morin N, Brisson C, Carboneau G, Durocher J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 1999; 51: 59-70.
- [5] van Wagendonk-de Leeuw AM. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 2006; 65: 914-925.
- [6] Pontes JH, Silva KC, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GM, Sanches BV, Porcionato JP, Vieira PH, Faifer FS, Sterza FA, Schenk JL, Seneda MM. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 2010; 74: 1349-1355.
- [7] Stroud B. The year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Transf Newslett* 2011; 29: 14-23.
- [8] Thibier M. The animal embryo transfer industry in figures: A report from the IETS Data Retrieval Committee. *Embryo Transf Newslett* 2001; 19: 16-21.
- [9] Pontes JH, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. 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: 690-697.

- [10] Hansen PJ. Realizing the promise of IVF in cattle--an overview. *Theriogenology* 2006; 65: 119-125.
- [11] Galli C, Duchi R, Crotti G, Turini P, Ponderato N, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology* 2003; 59: 599-616.
- [12] Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology* 2006; 65: 178-191.
- [13] Hansen PJ, Block J, Loureiro B, Bonilla L, Hendricks KE. Effects of gamete source and culture conditions on the competence of in vitro-produced embryos for post-transfer survival in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 59-66.
- [14] Lonergan P, Fair T. In vitro-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* 2008; 69: 17-22.
- [15] Zuccotti M, Merico V, Cecconi S, Redi CA, Garagna S. What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? *Hum Reprod Update* 2011; 17: 525-540.
- [16] Block J, Hansen PJ, Loureiro B, Bonilla L. Improving post-transfer survival of bovine embryos produced in vitro: actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating factor-2 and hyaluronan. *Theriogenology* 2011; 76: 1602-1609.
- [17] Li L, Zheng P, Dean J. Maternal control of early mouse development. *Development* 2010; 137: 859-870.
- [18] Fair T. Mammalian oocyte development: checkpoints for competence. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 13-20.
- [19] Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 2003; 78: 203-216.
- [20] Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Bies-Tran R, Callesen H, Mermillod P. Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine. *Theriogenology* 2005; 63: 841-859.
- [21] Rizos D, Ward F, Duffy P, Boland MP, Lonergan P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Mol Reprod Dev* 2002; 61: 234-248.
- [22] Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 2002; 66: 38-43.
- [23] Nivet AL, Bunel A, Labrecque R, Belanger J, Vigneault C, Blondin P, Sirard MA. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction* 2012; 143: 165-171.
- [24] Albus FK, Sasseville M, Lane M, Armstrong DT, Thompson JG, Gilchrist RB. Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes. *Hum Reprod* 2010; 25: 2999-3011.

- [25] Smitz JE, Thompson JG, Gilchrist RB. The promise of in vitro maturation in assisted reproduction and fertility preservation. *Semin Reprod Med* 2011; 29: 24-37.
- [26] Lonergan P, Fair T, Corcoran D, Evans AC. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology* 2006; 65: 137-152.
- [27] Hamel M, Dufort I, Robert C, Leveille MC, Leader A, Sirard MA. Genomic assessment of follicular marker genes as pregnancy predictors for human IVF. *Mol Hum Reprod* 2010; 16: 87-96.
- [28] El-Sayed A, Hoelker M, Rings F, Salilew D, Jennen D, Tholen E, Sirard MA, Schellander K, Tesfaye D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiol Genomics* 2006; 28: 84-96.
- [29] Ghanem N, Salilew-Wondim D, Gad A, Tesfaye D, Phatsara C, Tholen E, Looft C, Schellander K, Hoelker M. Bovine blastocysts with developmental competence to term share similar expression of developmentally important genes although derived from different culture environments. *Reproduction* 2011; 142: 551-564.
- [30] Sugimura S, Akai T, Hashiyada Y, Somfai T, Inaba Y, Hirayama M, Yamanouchi T, Matsuda H, Kobayashi S, Aikawa Y, Ohtake M, Kobayashi E, Konishi K, Imai K. Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle. *PLoS ONE* 2012; 7: e36627.
- [31] Wilmut I, Schnleke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 385: 810-813.
- [32] Oback B. Climbing Mount Efficiency--small steps, not giant leaps towards higher cloning success in farm animals. *Reprod Domest Anim* 2008; 43 Suppl 2: 407-416.
- [33] Mastromonaco GF, King WA. Cloning in companion animal, non-domestic and endangered species: can the technology become a practical reality? *Reprod Fertil Dev* 2007; 19: 748-761.
- [34] Farin CE, Farmer WT, Farin PW. Pregnancy recognition and abnormal offspring syndrome in cattle. *Reprod Fertil Dev* 2010; 22: 75-87.
- [35] Bordignon V. Animal Systems - Animal Cloning: State of the Art and Applications. In: Murray M-Y (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, vol. 4, Second ed. Elsevier; 2011: 441-456.
- [36] Campbell KHS. Nuclear equivalence, nuclear transfer, and the cell cycle. *Cloning* 1999; 1: 3-15.
- [37] Bordignon V, Smith LC. Telophase-stage host ooplasts support complete reprogramming of roscovitine-treated somatic cell nuclei in cattle. *Cloning Stem Cells* 2006; 8: 305-317.

- [38] Heyman Y, Chavatte-Palmer P, Lebourhis D, Camous S, Vignon X, Renard JP. Frequency and occurrence of late-gestation losses from cattle cloned embryos. *Biol Reprod* 2002; 66: 6-13.
- [39] Blelloch R, Wang Z, Meissner A, Pollard S, Smith A, Jaenisch R. Reprogramming efficiency following somatic cell nuclear transfer is influenced by the differentiation and methylation state of the donor nucleus. *Stem Cells* 2006; 24: 2007-2013.
- [40] Niemann H, Tian XC, King WA, Lee RS. Epigenetic reprogramming in embryonic and foetal development upon somatic cell nuclear transfer cloning. *Reproduction* 2008; 135: 151-163.
- [41] Fulka H. Changes in global histone acetylation pattern in somatic cell nuclei after their transfer into oocytes at different stages of maturation. *Mol Reprod Dev* 2008; 75: 556-564.
- [42] Thuan NV, Kishigami S, Wakayama T. How to improve the success rate of mouse cloning technology. *J Reprod Dev* 2010; 56: 20-30.
- [43] Whitworth KM, Prather RS. Somatic cell nuclear transfer efficiency: How can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming? *Mol Reprod Dev* 2010.
- [44] Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1980; 77: 7380-7384.
- [45] Hammer RE, Pursel VG, Rexroad Jr CE, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palmiter RD, Brinster RL. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature* 1985; 315: 680-683.
- [46] Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE, Trumbauer ME, Rosenfeld MG, Birnberg NC, Evans RM. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature* 1982; 300: 611-615.
- [47] Pursel VG, Rexroad CE, Jr. Status of research with transgenic farm animals. *J Anim Sci* 1993; 71 Suppl 3: 10-19.
- [48] Wall RJ. Transgenic livestock: Progress and prospects for the future. *Theriogenology* 1996; 45: 57-68.
- [49] Wheeler MB. Agricultural applications for transgenic livestock. *Trends Biotechnol* 2007; 25: 204-210.
- [50] Piedrahita JA, Olby N. Perspectives on transgenic livestock in agriculture and biomedicine: an update. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23: 56-63.
- [51] Clark J, Whitelaw B. A future for transgenic livestock. *Nat Rev Genet* 2003; 4: 825-833.
- [52] Webster NL, Forni M, Bacci ML, Giovannoni R, Razzini R, Fantinati P, Zannoni A, Fusetti L, Dalpra L, Bianco MR, Papa M, Seren E, Sandrin MS, Mc

Kenzie IF, Lavitrano M. Multi-transgenic pigs expressing three fluorescent proteins produced with high efficiency by sperm mediated gene transfer. *Mol Reprod Dev* 2005; 72: 68-76.

[53] Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J* 2012; 443: 603-618.

[54] Pfeifer A. Lentiviral transgenesis. *Transgenic Res* 2004; 13: 513-522.

[55] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 1989; 244: 1288-1292.

[56] Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811.

[57] Davidson BL, McCray PB, Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 329-340.

[58] Singer O, Verma IM. Applications of lentiviral vectors for shRNA delivery and transgenesis. *Curr Gene Ther* 2008; 8: 483-488.

[59] Xia XG, Zhou H, Xu Z. Transgenic RNAi: Accelerating and expanding reverse genetics in mammals. *Transgenic Res* 2006; 15: 271-275.

[60] Acosta J, Carpio Y, Borroto I, Gonzalez O, Estrada MP. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. *J Biotechnol* 2005; 119: 324-331.

[61] Tang D, Zhu H, Wu J, Chen H, Zhang Y, Zhao X, Chen X, Du W, Wang D, Lin X. Silencing myostatin gene by RNAi in sheep embryos. *J Biotechnol* 2012; 158: 69-74.

[62] Tessanne K, Golding MC, Long CR, Peoples MD, Hannon G, Westhusin ME. Production of transgenic calves expressing an shRNA targeting myostatin. *Mol Reprod Dev* 2012; 79: 176-185.

[63] Golding MC, Long CR, Carmell MA, Hannon GJ, Westhusin ME. Suppression of prion protein in livestock by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 5285-5290.

[64] White MD, Farmer M, Mirabile I, Brandner S, Collinge J, Mallucci GR. Single treatment with RNAi against prion protein rescues early neuronal dysfunction and prolongs survival in mice with prion disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 10238-10243.

[65] Wongsrikeao P, Sutou S, Kunishi M, Dong YJ, Bai X, Otoi T. Combination of the somatic cell nuclear transfer method and RNAi technology for the production of a prion gene-knockdown calf using plasmid vectors harboring the U6 or tRNA promoter. *Prion* 2011; 5: 39-46.

[66] Xu YF, Shen HY, Zhao MQ, Chen LJ, Li YG, Liao M, Jia JT, Lv YR, Yi L, Chen JD. Adenovirus-vectored shRNAs targeted to the highly conserved regions of VP1 and 2B in tandem inhibits replication of foot-and-mouth disease virus both in vitro and in vivo. *J Virol Methods* 2012; 181: 51-58.

- [67] Zhou F, Liang S, Chen AH, Singh CO, Bhaskar R, Niu YS, Miao YG. A transgenic Marc-145 cell line of piggyBac transposon-derived targeting shRNA interference against porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Res Commun* 2012; 36: 99-105.
- [68] Burnett JC, Rossi JJ, Tiemann K. Current progress of siRNA/shRNA therapeutics in clinical trials. *Biotechnol J* 2011; 6: 1130-1146.
- [69] Whyte JJ, Prather RS. Cell Biology Symposium: Zinc finger nucleases to create custom-designed modifications in the swine (*Sus scrofa*) genome. *J Anim Sci* 2012; 90: 1111-1117.
- [70] Remy S, Tesson L, Menoret S, Usal C, Scharenberg AM, Anegon I. Zinc-finger nucleases: a powerful tool for genetic engineering of animals. *Transgenic Res* 2010; 19: 363-371.
- [71] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, Zhang HS, Gregory PD. Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* 2010; 11: 636-646.
- [72] Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM, Jenkins SS, Wood A, Cui X, Meng X, Vincent A, Lam S, Michalkiewicz M, Schilling R, Foeckler J, Kalloway S, Weiler H, Menoret S, Anegon I, Davis GD, Zhang L, Rebar EJ, Gregory PD, Urnov FD, Jacob HJ, Buelow R. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 2009; 325: 433.
- [73] Carbery ID, Ji D, Harrington A, Brown V, Weinstein EJ, Liaw L, Cui X. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases. *Genetics* 2010; 186: 451-459.
- [74] Hauschild J, Petersen B, Santiago Y, Queisser AL, Carnwath JW, Lucas-Hahn A, Zhang L, Meng X, Gregory PD, Schwinzer R, Cost GJ, Niemann H. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 12013-12017.
- [75] Yang D, Yang H, Li W, Zhao B, Ouyang Z, Liu Z, Zhao Y, Fan N, Song J, Tian J, Li F, Zhang J, Chang L, Pei D, Chen YE, Lai L. Generation of PPAR γ mono-allelic knockout pigs via zinc-finger nucleases and nuclear transfer cloning. *Cell Res* 2011; 21: 979-982.
- [76] Yu S, Luo J, Song Z, Ding F, Dai Y, Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res* 2011; 21: 1638-1640.

DINÂMICA FOLICULAR DE NOVILHAS *BOS INDICUS* TRATADAS COM IMPLANTE AURICULAR DE NORGESTOMET OU COM DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE PROGESTERONA



5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

Sá Filho, M. F.¹; Gimenes, L. U.¹; Ayres, H.¹; Carvalho, J. B. P.²; Carvalho, N. A. T.¹; Baruselli, P. S.¹
¹ Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, São Paulo – SP; ² Instituto de Zootecnia, Pindamonhangaba – SP.
 barusell@usp.br

OBJETIVO

Estudar a dinâmica folicular de novilhas Nelore submetidas a protocolos de sincronização da ovulação para IATF utilizando Crestar[®] e CIDR.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Utilizaram-se 48 novilhas cíclicas pré-sincronizadas com duas doses de PGF_{2α} (Dia-24 e Dia-12) e subdivididas em quatro grupos de acordo com a fonte de Progesterona (P4): Crestar[®] ou CIDR e com a administração ou não de PGF_{2α} no início do tratamento (Dia 0; Fatorial 2 x 2). Avaliou-se por ultrassonografia a dinâmica folicular de 24/24 horas do Dia 0 ao Dia 8 e de 12/12 horas do Dia 9 ao Dia 12.

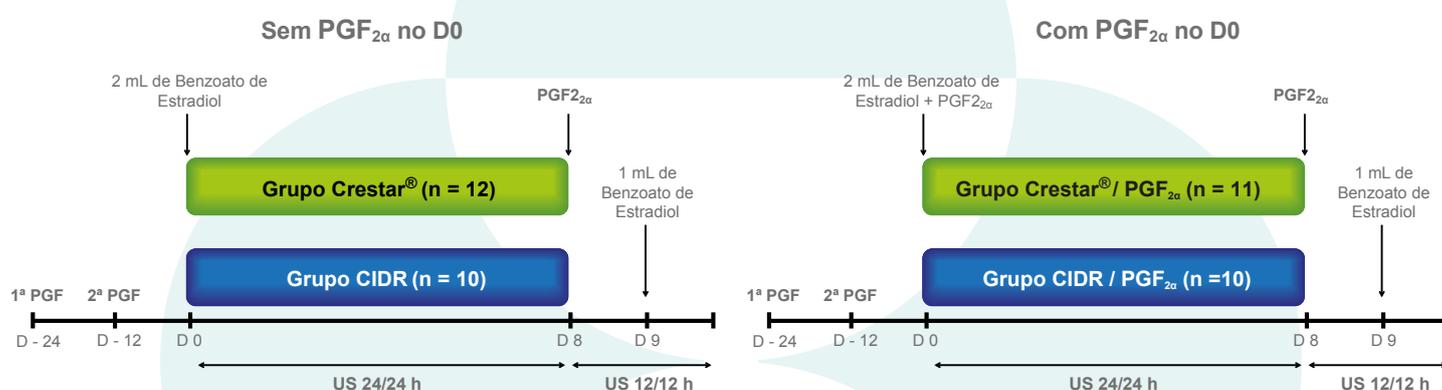


Figura 1. Delineamento experimental de novilhas da raça Nelore tratadas com implante de progesterona (Crestar vs CIDR), com ou sem PGF_{2α} (D0).

RESULTADOS

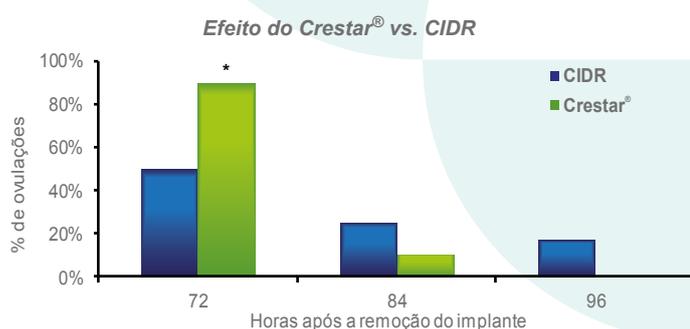


Gráfico 1. Dispersão das ovulações de novilhas *Bos indicus* tratadas com Crestar[®] ou CIDR[®] (p < 0,05)

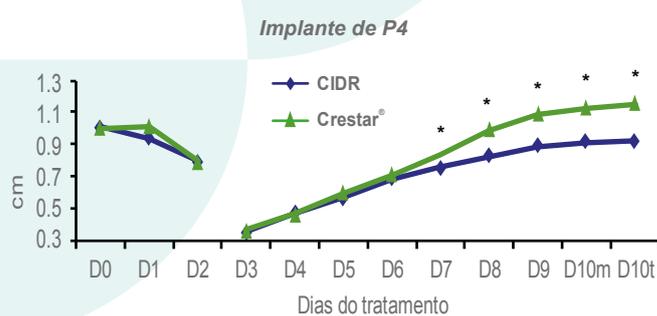


Gráfico 2. Dinâmica folicular de novilhas *Bos indicus* tratadas com Crestar[®] ou CIDR[®] (p < 0,05)

CONCLUSÃO

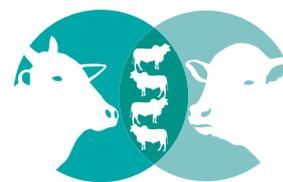
O tratamento com implante de norgestomet (Crestar[®]) promoveu incremento na taxa de crescimento folicular, no diâmetro do folículo dominante, na taxa de ovulação e na sincronia das ovulações, quando comparado ao dispositivo intravaginal de progesterona em novilhas *Bos indicus*.

REFERÊNCIA: Sá Filho, M. F.; Gimenes, L. U.; Ayres, H.; Carvalho, J. B. P.; 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.

APOIO FINANCEIRO:



COMPARAÇÃO DA EFICÁCIA DA hCG E DO GnRH NO TRATAMENTO DE CISTO FOLICULAR EM DOADORAS DA RAÇA NELORE



Teixeira, L.¹; Ávila, F.M.¹; Elias, N.Q.¹; Vieira, L.M.²; Sales, J.N.S.^{2,3}; Baruselli, P.S.²

¹Sincroniza Gerenciamento Pecuario. ²Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, São Paulo-SP, Brasil. ³Centro de Ciências Veterinárias, Campus II-UFPB, Areia, PB, Brasil.

leovetle@hotmail.com

5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

OBJETIVO

Avaliar o efeito de dois indutores de ovulação (GnRH - Fertagyl® / hCG - Chorulon®) sobre o retorno da ciclicidade de doadoras Nelore com a presença de cisto folicular.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas 100 doadoras de oócitos da raça Nelore com presença de cisto folicular (presença de uma ou mais estruturas foliculares no ovário de diâmetro ≥ 20mm na ausência de corpo lúteo). Os animais que apresentavam essa patologia foram divididos em dois grupos experimentais: Grupo GnRH - Fertagyl® (n=49) e Grupo hCG - Chorulon® (n=49). Exames ultrassonográficos foram realizados entre D15 e D25 e entre D36 e D46 para avaliação ovariana (presença de CL ou cisto folicular).

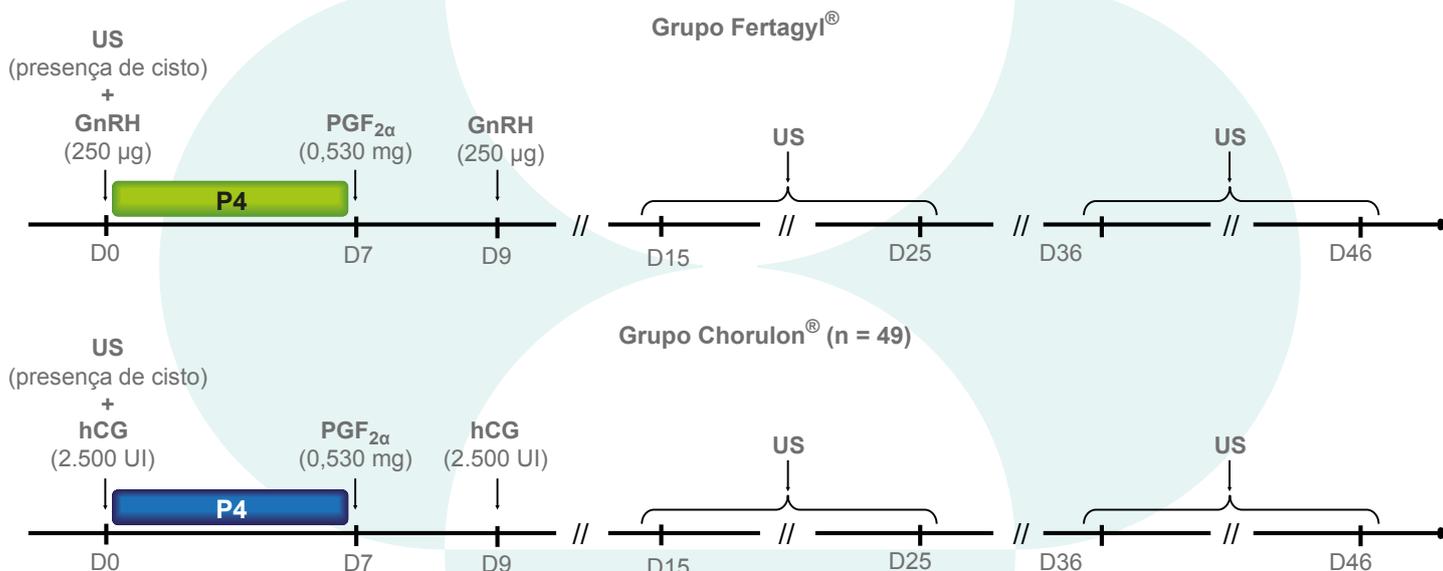
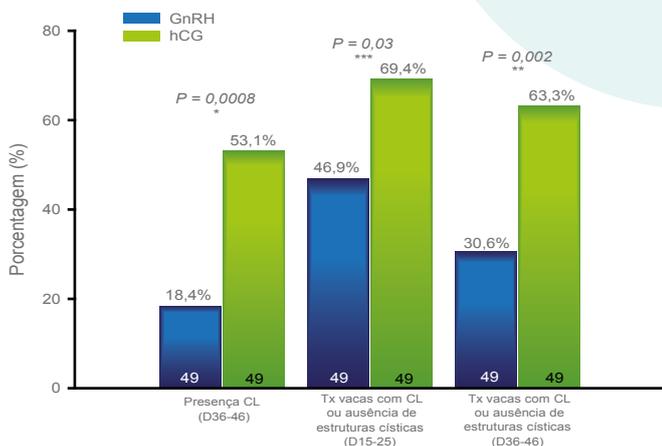


Figura. Delineamento experimental de doadoras de oócitos da raça Nelore com cisto folicular tratadas com Dispositivo Intravaginal Bovino e GnRH ou hCG.

RESULTADOS



CONCLUSÃO

Conclui-se que o uso de hCG (Chorulon®) em doadoras de oócitos da raça Nelore é mais eficiente que o GnRH (Fertagyl®) para o tratamento de cistos foliculares.

REFERÊNCIA: Teixeira, L.; Ávila, F.M.; N.Q. Elias; Vieira, L.M.; Sales, J.N.S.; Baruselli, P.S. hCG é mais eficaz que o GnRH no tratamento de cisto folicular em doadoras Nelore. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões – SBTE, Foz do Iguaçu – PR. Anais... p. 413, 2012.

Gráfico. Porcentagem de animais que apresentaram CL entre os dias 36 e 46, taxa de vacas com CL ou ausência de estruturas císticas entre os dias 15 e 25 e entre os dias 36 e 46 em doadoras Nelore com cisto tratadas com GnRH ou hCG. Sendo os tratamentos diferentes quando P < 0,05.

APOIO FINANCEIRO:



INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO COM 48 OU 54 HORAS APÓS A RETIRADA DO IMPLANTE DE NORGESTOMET NOVO OU PREVIAMENTE USADO (CRESTAR®) EM NOVILHAS NELORE



Sá Filho, M.F.1; Baruselli, P.S.1
1Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brasil.
baruselli@usp.br

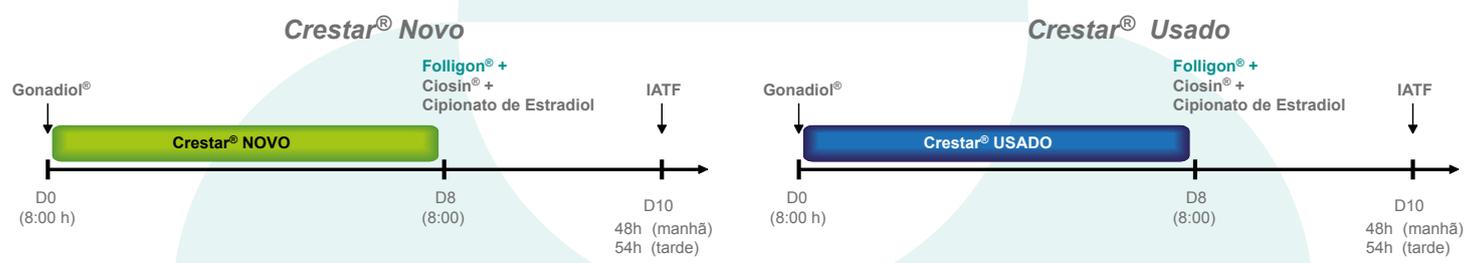
5º Simpósio Internacional de
Reprodução Animal Aplicada

OBJETIVO

Determinar o melhor momento para realizar a IATF utilizando Crestar novo ou previamente utilizado por 9 dias.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas 416 novilhas Nelores de uma fazenda no estado do Mato Grosso do Sul. As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em um dos quatro tratamentos esquemáticos abaixo em um arranjo fatorial 2 x 2. As inseminações foram efetuadas utilizando-se sêmen congelado convencional de 2 touros. O diagnóstico de gestação foi realizado após 30 dias da IATF.



RESULTADOS

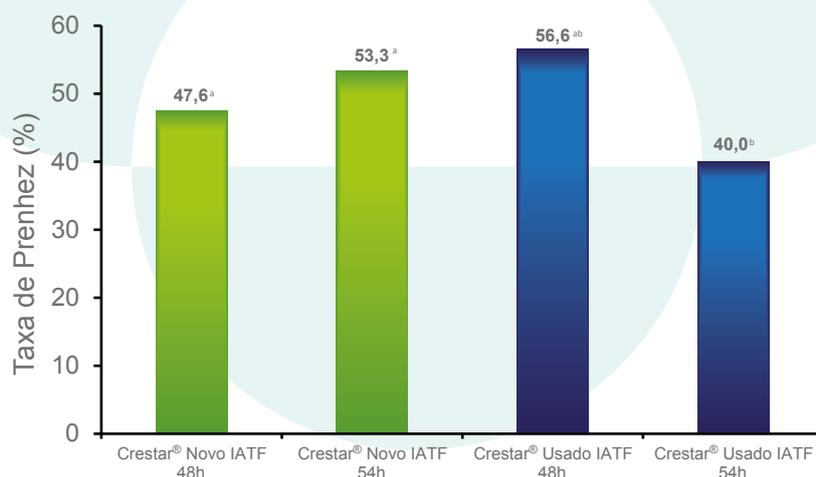


Gráfico. Taxa de prenhez conforme a utilização do Crestar® e o momento de inseminação em novilhas Nelore.

CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que em novilhas Nelore, o Crestar® usado previamente tem alta eficiência no protocolo de inseminação artificial por tempo fixo quando a IATF é efetuada 48 h após a remoção do implante. Quando se utiliza Crestar® novo, não há diferença na taxa de prenhez quando a IATF é efetuada 48 ou 54 h após a retirada do implante.

REFERÊNCIA: Sá Filho, M.F.; Baruselli, P.S., 2010 Dados ainda não publicados.

APOIO FINANCEIRO:



EFEITO DO TRATAMENTO COM DIFERENTES INDUTORES DA OVULAÇÃO (CIPIONATO E BENZOATO DE ESTRADIOL) E DO MOMENTO DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL NA TAXA DE PREENHEZ DE VACAS NELORE (*BOS INDICUS*) INSEMINADAS EM TEMPO FIXO



5º Simpósio Internacional de
Reprodução Animal Aplicada

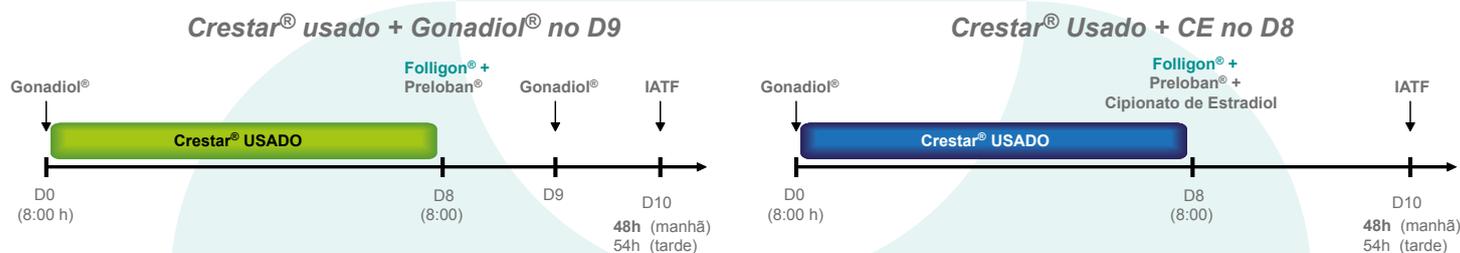
Castro Júnior, J.D.¹; Sales, J.N.S.²; Crepaldi, G.A.²; Ayres, H.²; Ferreira, R.M.²; Baruselli, P.S.²
¹Veterinário Autônomo. ²Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, CEP 05508-000, São Paulo-SP, Brasil.
barusell@usp.br

OBJETIVO

Determinar o melhor momento para realizar a IATF utilizando Crestar[®] previamente utilizado por 9 dias

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas 365 vacas Nelores com pós-parto médio de 60 dias. As fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em um dos quatro tratamentos abaixo em um arranjo fatorial 2 x 2. As IA foram efetuadas utilizando-se sêmen convencional congelado de 2 touros. O diagnóstico de gestação foi realizado após 30 dias da IA.



RESULTADOS

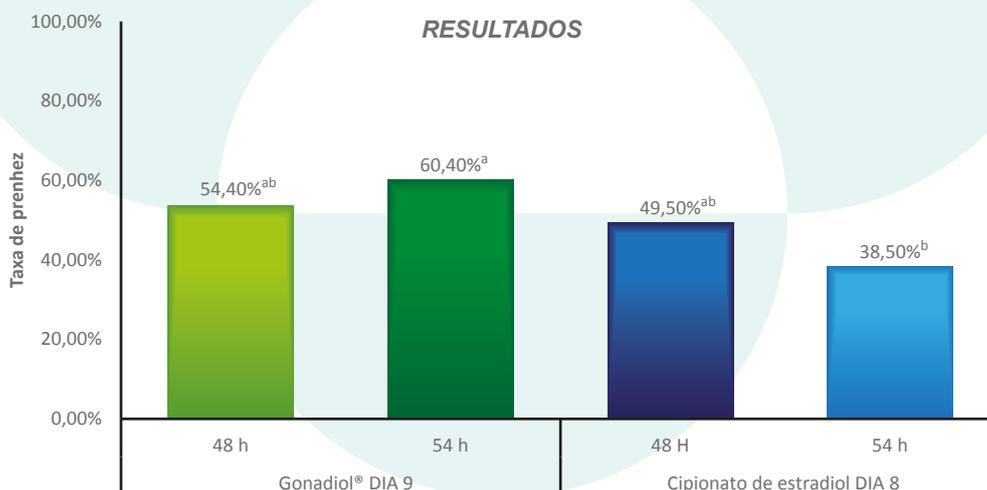


Gráfico. Taxa de prenhez conforme a utilização do Crestar e o momento de inseminação de vacas Nelore lactantes (interação estradiol x momento de IA P = 0.09)

CONCLUSÃO

O grupo tratado com Cipionato de estradiol (CE) na retirada do implante auricular de norgestomet (D8) obteve menor taxa de prenhez à IATF que o Grupo Gonadiol[®] (D9). Verificou-se que os animais tratados com Cipionato de estradiol e inseminados 48 horas após a retirada do implante (3 manejos) apresentaram resultados semelhantes aos obtidos pelos grupos tratados com Gonadiol[®] (4 manejos).

REFERÊNCIA: Castro Júnior, J.D.; Sales, J.N.S.; Crepaldi, G.A.; Ayres, H.; Ferreira, R.M.; Baruselli, P.S. Effect of different ovulation inducers (estradiol cypionate or benzoate) and different moments of timed-artificial insemination (48 and 54 hours after norgestomet ear implant removal) on pregnancy rate in Nelore (*Bos indicus*) cows fixed-time inseminated. *Acta Scientiae Veterinariae* 36, 617, 2008

APOIO FINANCEIRO:



REDUÇÃO DA DOSE DE PROSTAGLANDINA (CIOSIN®) NO PROTOCOLO DE IATF DE NOVILHAS CÍCLICAS E VACAS NELORE LACTANTES



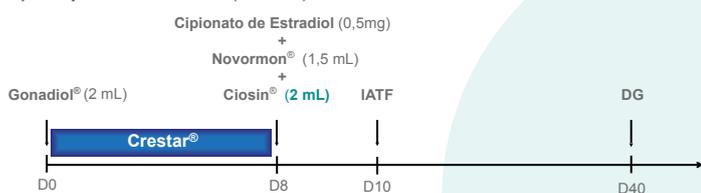
Silva, R.C.P.¹; Marques, M.O.¹; Ribeiro Jr., M.¹; Sala, R.V.²; Sá Filho, M.F.²; Baruselli, P.S.²
¹Geraembryo, Cornélio Procopio, PR, BRASIL; ²VRA, FMVZ/USP, SÃO PAULO, SP, BRASIL.
 barusell@usp.br

5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

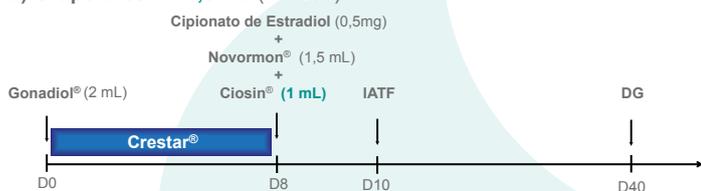
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1 - Novilhas Nelore ciclando

1) Grupo Ciosin® 2mL (n = 153)



2) Grupo Ciosin® 1,0 mL (n = 153)



Experimento 2 - Vacas Nelore paridas

1) Grupo Ciosin® 1,5 mL (n = 314)



2) Grupo Ciosin® 1,0 mL (n = 312)



Figura 1. Delineamento experimental.

RESULTADOS

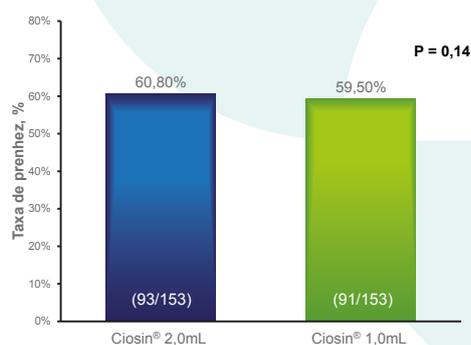


Gráfico 1. Taxa de prenhez conforme a dose utilizada de cloprostenol sódico (Ciosin®) em programas de IATF com Crestar® em novilhas Nelore.

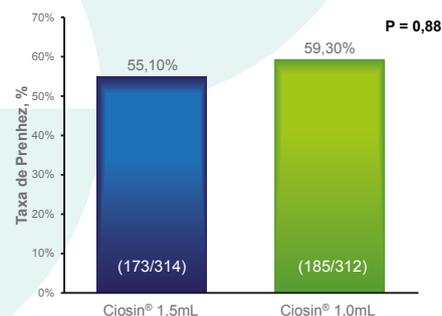


Gráfico 2. Taxa de prenhez conforme a dose utilizada de cloprostenol sódico (Ciosin®) em programas de IATF com DIB® em vacas Nelore.

CONCLUSÃO

É possível reduzir a dose de Ciosin® para 1mL (265 µg) nos protocolos de IATF em novilhas Nelore e vacas Nelore paridas sem qualquer prejuízo na taxa de prenhez.

REFERÊNCIA: Silva, R.C.P.; Marques, M.O.; Ribeiro Júnior, M.; Sala, R.V.; Sá Filho, M.F.; Baruselli, P.S. É possível reduzir a dose de Ciosin® no protocolo de IATF de novilhas cíclicas e vacas Nelore lactantes. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões – SBTE, Foz do Iguaçu – PR. Anais... p. 382, 2012.

APOIO FINANCEIRO:



SINCRONIZAÇÃO E RESSINCRONIZAÇÃO UTILIZANDO IMPLANTE AURICULAR COM NORGESTOMET (CRESTAR®) EM NOVILHAS NELORE INSEMINADAS EM TEMPO FIXO



5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

Sá Filho, M. F.¹; Oliveira, R. A. L.¹; Sala, R. V.¹; Macedo, G. G.¹; Giroto, R. W.²; Penteado, L.³; Baruselli, P. S.¹
¹ Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, São Paulo – SP; ² RG Genética Avançada, Água Boa, MT; ³ Brasil; Firmasa – IATF, Campo Grande, MS, Brasil

OBJETIVO

O objetivo geral foi desenvolver um protocolo de ressinchronização para IATF de fêmeas zebuínas previamente ao diagnóstico de gestação, ou seja, 22 dias após a primeira IATF. O objetivo específico foi comparar o uso de Fertagyl® (GnRH) ou Gonadiol® (Benzoato de estradiol) no início do tratamento de ressinchronização.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

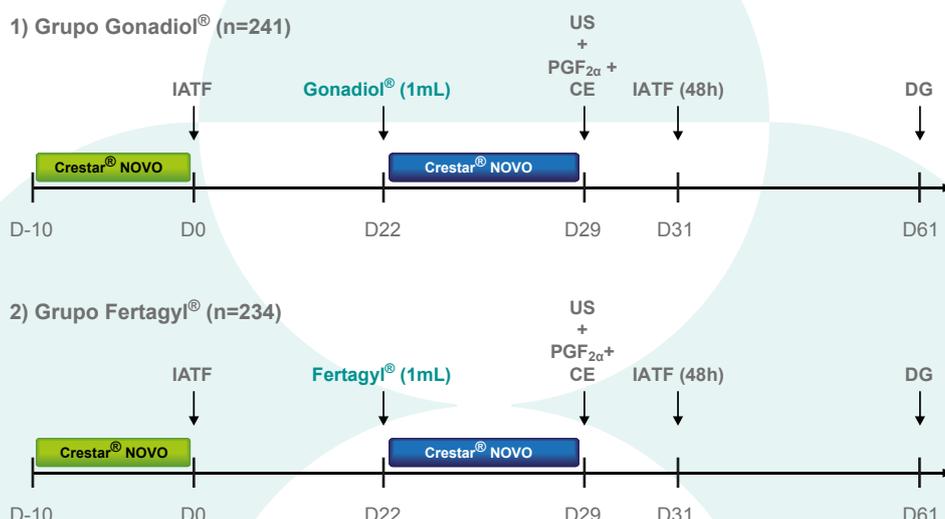


Figura . Delineamento experimental de novilhas da raça Nelore (N = 475) submetidas a ressinchronização da ovulação.

RESULTADOS

	Fertagyl®	Gonadiol®	Valor de P
Número	234	241	----
Idade (meses)	26.5±1.6	26.4±1.4	0.98
ECC	3.24±0.2	3.25±0.2	0.53
Prenhez IATF (%)	41.4% (97/234)	41.9% (101/241)	0.97
Prenhez Ressinchronização (%)	37.2% (51/137)	49.2% (69/140)	0.04
Prenhez IATF + Ressinchronização	63.24% (148/234)	70.53% (170/241)	---

Tabela . Taxa de prenhez a primeira IATF e ressinchronização em novilhas Nelore

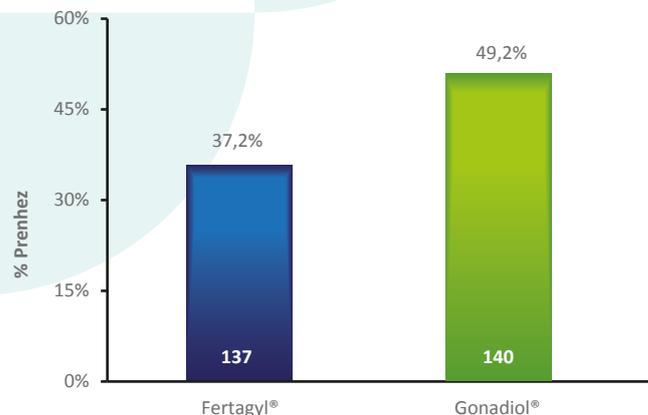


Gráfico. Taxa de prenhez após ressinchronização em novilhas Nelore

CONCLUSÃO

É possível ressinchronizar novilhas 22 dias após a primeira IATF utilizando 1 mg Gonadiol® (Benzoato de estradiol) ou Fertagyl® (GnRH) no início do protocolo com norgestomet, porém o Gonadiol® apresentou melhor resultado.

REFERÊNCIA: Sá Filho, M.F.; Oliveira, R.A.L.; Sala, R.V.; Macedo G.G.; Giroto, R.W.; Penteado, L.; Baruselli, P.S. Sincronização e ressinchronização utilizando implante auricular com norgestomet em novilhas Nelore inseminadas em tempo fixo. XXV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões – SBTE, Cumbuco – CE. Anais... p. 385, 2011.

APOIO FINANCEIRO:



MELHORIA DA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA ATRAVÉS DA IATF DE VACAS NELORE PRIMÍPARAS DURANTE A ESTAÇÃO DE MONTA



Marques, M.O.¹; Ribeiro Júnior, M.¹; Silva R.C.P.¹; Sá Filho, M.F.²; Baruselli, P.S.²
¹GERAEMBRYO, Comêlio Procópio, PR, Brasil; ²VRA, FMVZ/USP, São Paulo, SP, Brasil.

5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada

OBJETIVO

Avaliar se o uso da IATF com ou sem ressincronização possibilita aumentar a taxa de prenhez em vacas Nelore primíparas.

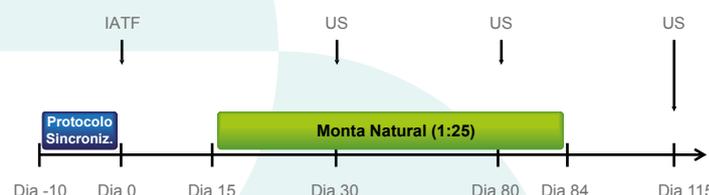
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram utilizadas 473 vacas Nelore primíparas de uma fazenda no estado do Mato Grosso do Sul. Os animais foram divididos homogeneamente em três grupos de manejo.

Monta natural + Mamada controlada (n=159)



IATF + Monta natural (n=154)



IATF + Ressincronização + Monta natural (n=160)



PROTOCOLO DE IATF – SINCRONIZAÇÃO e RESSINCRONIZAÇÃO

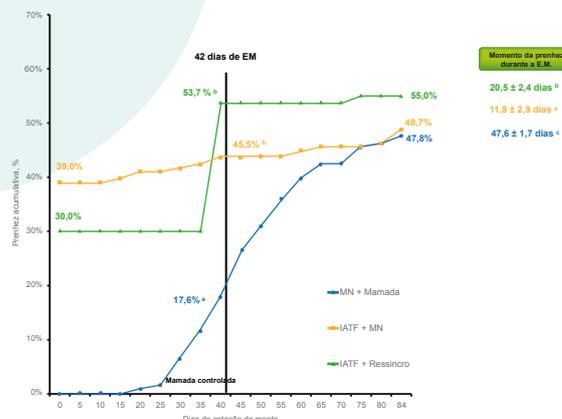


RESULTADOS

No início do experimento, as médias de dias pós-parto (DPP) e de ECC para as primíparas dos grupos Monta Natural + Mamada, IATF + Monta Natural e IATF + Ressincronização foram, respectivamente, $67,3 \pm 12,7$, $67,0 \pm 12,9$, $66,0 \pm 12,4$ dias e $2,82 \pm 0,3$, $2,73 \pm 0,3$ e $2,80 \pm 0,3$ de ECC ($P < 0,05$).

	M.N. + Mamada	IATF + M.N.	IATF + Ressinc.	P
Taxa de Prenhez no Dia 42	17,6% ^b (28/159)	45,5% ^a (67/154)	53,7% ^a (86/160)	<0,001
Taxa de Prenhez Final E.R.	47,8% (76/159)	48,7% (75/154)	55,0% (88/160)	0,21
Momento da prenhez (dias)	47,6 ± 1,7 ^c	11,9 ± 2,9 ^a	20,5 ± 2,4 ^b	0,0001

P < 0,05 indica que os grupos diferem estatisticamente.



CONCLUSÃO

O uso da IATF no início da estação reprodutiva aumenta a proporção de primíparas prenhes na primeira metade da estação de monta, antecipando o momento médio de prenhez.

REFERÊNCIA: Marques, M.O.; Ribeiro Júnior, M.; Silva R.C.P.; Sá Filho, M.F.; Baruselli, P.S. A IATF melhora a eficiência reprodutiva de vacas nelore primíparas durante a estação de monta. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embrões – SBTE, Foz do Iguaçu – PR. Anais... p. 374, 2012.

APOIO FINANCEIRO:



EFEITO DA TETF NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE VACAS HOLANDESAS REPETIDORAS DE SERVIÇO



Rodrigues, C.A.¹; Teixeira, A.A.²; Ferreira, R.M.²; Ayres, H.²; Mancilha, R.F.¹; Souza, A.H.²; Baruselli, P.S.²
¹Clinica Veterinária SAMVET, São Carlos - SP. ²Departamento de Reprodução Animal, FMVZ/USP, São Paulo-SP.
 barusell@usp.br

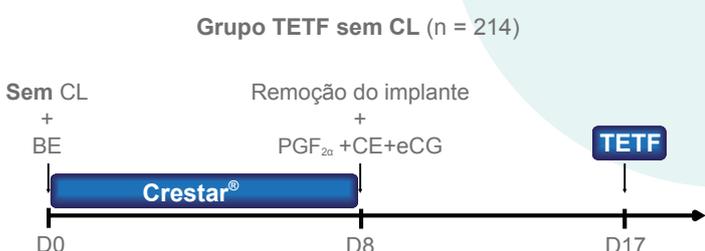
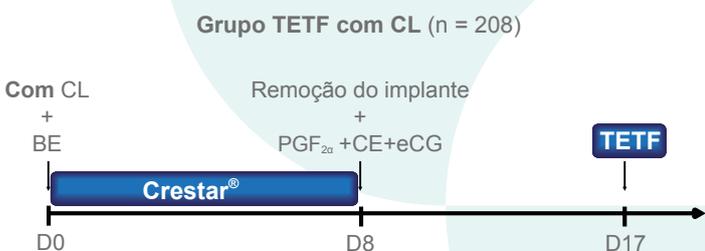
5º Simpósio Internacional de
Reprodução Animal Aplicada

OBJETIVO

Comparar o protocolo de sincronização da ovulação para TETF com a administração de uma aplicação de PGF_{2α} e detecção de cio.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Vacas Holandesas lactantes (n = 651) com pelo menos três serviços prévios foram classificadas de acordo com a presença de Corpo lúteo (CL). Vacas com CL foram divididas em receber PGF_{2α} e submetidas a detecção de estro ou submetidas a protocolo de TETF. Todas as vacas sem CL receberam o mesmo protocolo dos animais com CL e submetidos a TETF.



RESULTADO

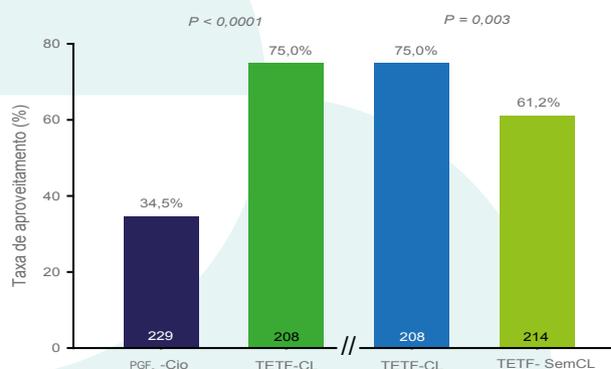


Gráfico 1. Taxa de aproveitamento (nº de animais que receberam a TE / nº de animais tratados) de vacas Holandesas repetidoras de serviço submetidas à PGF e detecção de cio (PGF_{2α}-Cio) ou à protocolo de sincronização para TETF, tendo CL (TETF-CL) ou não (TETF-semCL) no início do protocolo. Sendo os tratamentos diferentes quando P < 0,05.

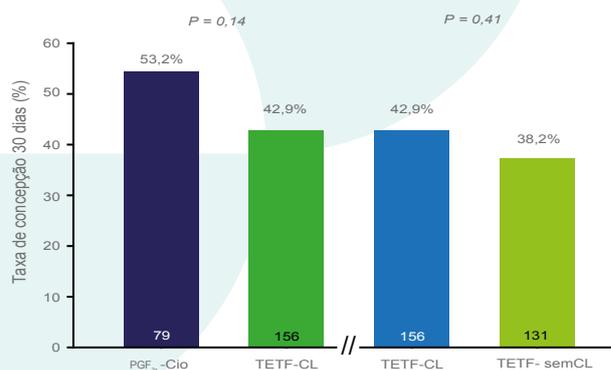


Gráfico 2. Taxa de concepção (nº de animais gestantes / nº de animais que receberam a TE) de vacas Holandesas repetidoras de serviço submetidas à PGF_{2α} e detecção de cio (PGF_{2α}-Cio) ou à protocolo de sincronização para TETF, tendo CL (TETF-CL) ou não (TETF-semCL) no início do protocolo. Sendo os tratamentos diferentes quando P < 0,05.

CONCLUSÃO

A utilização do protocolo de sincronização para TETF em vacas Holandesas repetidoras de serviço eliminou a necessidade de detecção de cio, aumentou a taxa de aproveitamento e a taxa de prenhez. Permitiu também a utilização de vacas que não apresentaram corpo lúteo no início do protocolo, sem diminuir a eficiência reprodutiva.

REFERÊNCIA: Rodrigues, C.A.; Teixeira, A.A.; Ferreira, R.M.; Ayres, H.; Mancilha, R.F.; Souza, A.H.; Baruselli, P.S. Efeito da TETF na eficiência reprodutiva de vacas holandesas repetidoras de serviço. *Animal Reproduction Science*. 118, 110–117, 2010.

APOIO FINANCEIRO:

