

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DE CIO E APLICAÇÃO DE GNRH COMO
ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAR PROTOCOLOS DE IATF
COM SÊMEN SEXADO EM VACAS NELORE

Acadêmica: Ana Caroline Bini de Lima

Aquidauana-MS
Março/2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

AVALIAÇÃO DE CIO E GNRH COMO ESTRATÉGIAS
PARA OTIMIZAR PROTOCOLOS DE IATF COM SÊMEN
SEXADO EM VACAS NELORE

Acadêmica: Ana Caroline Bini de Lima
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fabiana de Andrade Melo Sterza
Coorientador: Prof. Dr. Érikliis Nogueira

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia”

Aquidauana-MS
Março/2020

L696a Lima, Ana Caroline Bini de

Avaliação de cio e aplicação de GnRH como estratégias para otimizar protocolos de IATF com sêmen sexado em vacas Nelore/ Ana Caroline Bini de Lima. – Aquidauana, MS: UEMS, 2020.

47p.

Tese (Mestrado) – Zootecnia – Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, 2020.

Orientadora: Prof.^a Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza.

1. Reprodução animal 2. Inseminação artificial 3. Sêmen sexado I. Sterza, Fabiana de Andrade Melo II. Título

CDD 23. ed. - 636.08245



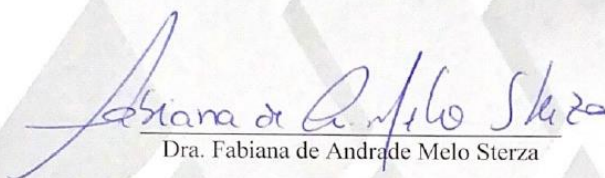
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Área de Concentração: Produção Animal

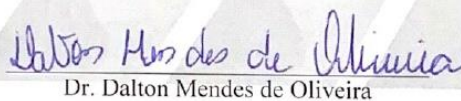


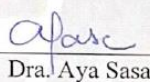
ANA CAROLINE BINI DE LIMA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/02/2020.


Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza


Dr. Dalton Mendes de Oliveira


Dra. Aya Sasa

A Deus, meus familiares e amigos.

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, Jesus Cristo e ao Espírito Santo por nunca me deixarem só, manterem-me firme e me acolherem nos dias bons e ruins da caminhada.

Aos meus pais, Karina Cristiana Bini e Pedro Rocha de Lima, por todo suporte, amor e paciência que me permitiram chegar até aqui.

Aos meus avós, Maria Pereira da Silva Bini e João Segundo Bini, em quem eu tanto me espelho, muito obrigada! Eu amo vocês.

Ao meu namorado, João Vicente Pegorer Pereira, por todo amor e cuidado que me ajudaram a vencer as dificuldades do cotidiano.

À Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul/UUAq e a todos os funcionários e professores que contribuíram na minha formação profissional.

À minha orientadora, Dr.^a Fabiana de Andrade Melo Sterza, pela enorme contribuição no meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu coorientador, Dr. Érikliis Nogueira, por estar sempre à disposição para ajudar e compartilhar seu conhecimento.

A todos os meus colegas de trabalho do GENTRA, mas, em especial, Geancarlos Carraro e Aldair Félix, pois, mais do que colegas, tornaram-se amigos que me deram suporte em muitos momentos difíceis.

As minhas amigas Nayara Gonçalves e Vitória Soares, nada disso seria possível sem vocês, meninas!

Aos produtores Cláudio Zotesso e Grasiela Simon por todo apoio e contribuição durante a execução deste projeto.

Às empresas Zoetis, IMV, Real H e Zebu Fértil pela contribuição disponibilizando produtos de qualidade para que o projeto fosse executado.

À CAPES pelo suporte financeiro ao longo do projeto.

SUMÁRIO

RESUMO.....	Ix
ABSTRACT.....	X
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1 - INTRODUÇÃO.....	01
2 - REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 – CICLO ESTRAL EM FÊMEAS BOVINAS.....	03
2.1.1– ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ESTRAL.....	04
2.1.2 – DINÂMICA FOLICULAR.....	05
2.2 – INFLUÊNCIA DOS GAMETAS SOBRE A FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	07
2.2.1 – O OÓCITO.....	07
2.2.2 – O ESPERMATOZOIDE.....	09
2.3 – CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL.....	11
2.3.1 – INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF).....	12
2.4 – SÊMEN SEXADO.....	15
2.4.1 – SEXAGEM ESPERMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	15
2.5 – ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAR PROTOCOLOS DE IATF COM SÊMEN SEXADO.....	17
2.5.1 – AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CIO.....	18
2.5.2 – APLICAÇÃO DE GNRH NO MOMENTO DA IATF.....	20
3 - OBJETIVOS.....	23
3.1. OBJETIVO GERAL.....	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24
CAPÍTULO 2- AVALIAÇÃO DE CIO E APLICAÇÃO DE GNRH COMO ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAR PROTOCOLOS DE IATF COM	

SÊMEN SEXADO EM VACAS NELORE (THERIOGENOLOGY).....	33
RESUMO.....	33
ABSTRACT.....	34
1– INTRODUÇÃO.....	35
2 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
2.1 – Protocolo de IATF.....	36
2.2 – Experimento 1.....	36
2.3 – Experimento 2.....	37
2.4 – Análise estatística.....	39
3 – RESULTADOS.....	39
3.1 – Experimento 1.....	39
3.2 – Experimento 2.....	40
4 – DISCUSSÃO.....	41
5 – CONCLUSÕES.....	44
6 – REFERÊNCIAS.....	45
CAPITULO 3- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 – Hormônios utilizados em protocolos de IATF.....	14
---	----

CAPÍTULO 2

Tabela 1 – Diâmetro do folículo dominante no momento da IATF (DFIATF) e taxa de concepção (TC) de vacas Nelore lactantes de acordo com a intensidade do estro (ESCT) e o tratamento com GnRH no momento da IATF.....	40
---	----

Tabela 2 – Taxa de ovulação (TO), área do corpo lúteo (ACL) e vascularização do corpo lúteo (VSCL) de vacas Nelore lactantes em função da intensidade do estro (ESCT) e o tratamento com GnRH.....	40
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Representação das fases de uma onda de crescimento folicular e dos hormônios envolvidos no ciclo estral.....	05
Figura 2 – Representação das diferentes classes de desenvolvimento folicular.....	08
Figura 3 – Representação do processo da sexagem espermática por citometria de fluxo.....	16
Figura 4 – a: Aplicação do bastão no D8; b – d: Escores de remoção de tinta da cauda em vacas submetidas à IATF (b: ESCT1; c: ESCT2; d: ESCT3).....	19

CAPÍTULO 2

Figura 1 – Design experimental demonstrando os hormônios aplicados e os manejos realizados durante o experimento 1.....	37
Figura 2 – Design experimental demonstrando os hormônios aplicados e os manejos realizados durante o experimento 2.....	38
Figura 3 – Exemplos de vascularização do corpo lúteo (VSCL) observados 7 dias após a IATF: (a) 10% VSCL; (b) 50% VSCL; (c) 85% VSCL.....	41

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização do escore de cio (ESCT) e da aplicação do GnRH no momento da IATF como estratégias para otimizar os resultados da IATF com sêmen sexado em vacas Nelore lactantes. Para tal, foram realizados 2 experimentos e, em ambos, vacas multíparas foram sincronizadas com protocolo padrão à base de progesterona e estradiol, com 3 manejos. A IATF foi realizada 60 horas após a retirada do dispositivo de progesterona (P₄). No momento da IATF, foi avaliado o ESCT (1 a 3) e aproximadamente 50% das fêmeas de cada escore receberam a aplicação de 100 µg de GnRH via intramuscular. No experimento 1, 119 fêmeas foram inseminadas, sendo que 91 tiveram o diâmetro do folículo dominante avaliado no momento da IATF. Realizou-se o diagnóstico de gestação 30 dias após a IATF. No experimento 2, 33 vacas foram submetidas à ultrassonografia transretal em intervalos de 24, 12 e 6 horas, a partir da retirada do dispositivo de P₄. Sete dias após a IATF, foi realizada a avaliação do corpo lúteo (CL) por meio de ultrassonografia Doppler. No experimento 1, embora não tenha sido observada diferença significativa, a taxa de concepção de fêmeas sem expressão de cio (ESCT1) tratadas com GnRH foi 23,8% maior em relação às de mesmo ESCT não tratadas. Além disso, no grupo sem GnRH a taxa de concepção de vacas com alta expressão de cio (ESCT3) foi 22,5% superior comparada às de ESCT1. No experimento 2, a taxa de ovulação (ESCT1 = 66,6%; ESCT2 = 92,3%; ESCT3 = 100%; P = 0,08) foi superior nas fêmeas com ESCT3, e a vascularização do CL (ESCT1 = 45%; ESCT2 = 56,6%; ESCT3 = 68,5%; P = 0,07) foi superior nas fêmeas com ESCT3 e que receberam GnRH (Sem GnRH = 57,8% vs GnRH = 67,3%; P = 0,08). Diante disso, a avaliação do ESCT, imediatamente antes da IATF, e a aplicação de GnRH no momento da inseminação em animais que não expressaram cio mostraram-se estratégias interessantes para otimizar protocolos de IATF com sêmen sexado.

Palavras-chave: biotecnologia da reprodução, bovino, inseminação artificial, sexagem.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of heat score (HEATSC) and the injection of GnRH at the time of TAI as strategies to optimize the results of TAI with sexed semen in suckled Nelore cows. Thus, 2 experiments were performed and, in both, multiparous cows were synchronized with a standard estrogen/progesterone-based protocol, with 3 managements. The TAI was performed 60 hours after the removal of the progesterone (P₄) device. At the time of TAI, HEATSC (1 to 3) was evaluated and approximately 50% of females from each HEATSC received 100 µg of GnRH intramuscularly. In experiment 1, 119 females were inseminated, considering that 91 had the diameter of the dominant follicle evaluated at the time of TAI. Pregnancy was diagnosed 30 days after TAI. In experiment 2, 33 cows underwent transrectal ultrasound at 24, 12, and 6-hour intervals, from the removal of the P₄ device. Seven days after TAI, the corpus luteum (CL) was evaluated by Doppler ultrasonography. In experiment 1 although there was no significant difference, the conception rate of females with no heat expression (HEATSC1) treated with GnRH was 23.8% higher compared to the same untreated HEATSC. In addition, in the group without GnRH the conception rate was 22.5% higher for cows with high heat expression (HEATSC3) compared to those of HEATSC1. In experiment 2 the ovulation rate (HEATSC1 = 66.6%; HEATSC2 = 92.3%; HEATSC3 = 100%; P = 0.08) was higher in females with HEATSC3, and the vascularization of the CL (HEATSC1 = 45%; HEATSC2 = 56.6%; HEATSC3 = 68.5%; P = 0.07) was higher in females with HEATSC3 and in those treated with GnRH (Without GnRH = 57.8% vs GnRH = 67.3%; P = 0.08). Therefore, the evaluation of HEATSC immediately before TAI and the injection of GnRH at the time of insemination in animals with no heat expression proved to be interesting strategies to optimize TAI protocols with sexed semen.

Keywords: artificial insemination, cattle, reproduction biotechnology, sexing.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO

No contexto atual da produção de carne bovina, o Brasil destaca-se sendo o segundo maior produtor mundial (USDA, 2019). Nesse cenário, animais *Bos indicus* são os mais utilizados e, com o objetivo de aumentar a produtividade nos rebanhos de cria, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) tem sido difundida com sucesso, viabilizando a multiplicação de animais que apresentem características zootécnicas desejáveis.

Com o avanço da IATF, vem ocorrendo um aumento do interesse na associação dessa técnica com outras biotecnologias, como a sexagem espermática. Nos últimos anos, a sexagem espermática por quantificação do DNA utilizando a citometria de fluxo tem sido a mais utilizada (FOOTE, 2010; VILLADIEGO et al., 2018). Esse método baseia-se na diferença do conteúdo de DNA entre espermatozoides X e Y (JOHNSON et al., 1987; GARNER, 2001).

Apesar do uso comercial, sabe-se que o processo de sexagem pode causar danos irreparáveis ao espermatozoide, comprometendo sua eficiência no processo de fertilização e produção de embriões devido ao estresse mecânico e químico ao qual são expostos (LIMA, 2007). Em função disso, as taxas de concepção com sêmen sexado na IATF, em geral, são inferiores quando comparadas com as taxas obtidas com sêmen convencional (MOCÉ et al., 2006).

Ainda assim, o uso de sêmen sexado oferece uma série de benefícios aos sistemas de produção, uma vez que determinar o sexo da progênie permite maximizar a produtividade animal e acelerar o ganho genético dos rebanhos (SCHENK; SEIDEL JR., 1999). Logo, a busca por ferramentas que possam incrementar as taxas de concepção em protocolos de IATF com sêmen sexado é imprescindível.

Uma opção para incremento dos resultados da IATF é o uso de bastões marcadores na região sacrocaudal para identificar vacas com maior expressão de cio submetidas à IATF, visto que, a expressão de cio em fêmeas bovinas

está associada a maiores taxas de prenhez (SÁ FILHO et al., 2011). Recentemente, com o intuito de padronizar a utilização dos bastões marcadores em protocolos de IATF, foi desenvolvida a avaliação do ESCT (escore de remoção de tinta da cauda), uma estratégia simples, de baixo custo, que já vem sendo aplicada em muitas propriedades (NOGUEIRA et al., 2019).

Outra opção para otimizar os protocolos de IATF é a aplicação de GnRH no momento da inseminação. Essa alternativa tem sido usada com o objetivo de incrementar a fertilidade, partindo do princípio de que, com essa aplicação, garante-se uma maior taxa de ovulação e um corpo lúteo de melhor qualidade, devido à capacidade luteinizante do GnRH (PETERS, 2005; SÁ FILHO et al., 2010).

De fato, tanto a avaliação do ESCT quanto a aplicação de GnRH no momento da IATF são estratégias que têm sido aplicadas em programas de IATF com sêmen convencional, existindo, no entanto, uma lacuna no que diz respeito à utilização desses recursos em protocolos em que as fêmeas são inseminadas com sêmen sexado.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CICLO ESTRAL EM FÊMEAS BOVINAS

Entende-se como ciclo estral o intervalo entre o início de um período de receptividade sexual até o seguinte (MELO STERZA et al., 2015). O ciclo, que tem duração média de 21 dias em bovinos, divide-se em quatro fases: estro, metaestro, diestro e proestro (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O estro marca o início do ciclo estral, podendo ser detectado por meio de observações visuais, uma vez que fêmeas nessa fase expressam comportamento característico em resposta aos estímulos hormonais, em especial dos elevados níveis de estradiol. É comum que as fêmeas fiquem inquietas, apresentem comportamento homossexual, imobilidade durante a monta, mugidos frequentes, reduzam o apetite, aumentem a frequência de micção, diminuam a produção de leite e apresentem corrimento muco vaginal claro e viscoso (BARUSELLI et al., 2007).

Em geral, o estro dura de 12 a 18 horas. *Bos indicus* apresentam duração menor do estro ($12,9 \pm 2,9$ horas em Nelore) do que *Bos taurus* ($16,3 \pm 4,8$ horas em Angus), embora o intervalo entre o estro e a ovulação não apresente diferença entre essas duas subespécies (Nelore, $27,1 \pm 3,3$ h vs. Angus, $26,1 \pm 6,3$ h) (MITZUDA, 2003).

O metaestro caracteriza-se como o período pós-estro em que ocorre a ovulação (liberação do óvulo pelo folículo). Em bovinos, a ovulação ocorre geralmente de 30 a 32 horas após o início do estro. Após a ruptura, as células da parede interna do folículo se multiplicam dando origem ao corpo hemorrágico e, posteriormente, ao corpo lúteo (CL) (VALLE, 1991; MELO STERZA et al., 2015).

O diestro é a fase mais longa do ciclo estral, com duração de 10 a 14 dias, e é marcada pela plena funcionalidade do CL. Nos primeiros 11 dias do diestro, o endométrio passa de um estágio proliferativo para secretor devido à alta concentração de progesterona, ocorrendo, consequentemente, espessamento do epitélio glandular, com ramificação, enovelamento e secreção das glândulas. Ao final dessa fase, caso não tenha se estabelecida a

gestação, ocorre a lise do CL e a regressão das glândulas endometriais (CORMACK, 1985).

O proestro é a fase que antecede o estro, tendo início após a regressão do CL. Nessa fase, ocorrem comportamentos semelhantes aos expressos durante o estro, no entanto um sinal marcante que distingue as duas fases é o comportamento da vaca de montar sobre outras fêmeas, porém não se deixa montar-lhe (MELO STERZA et al., 2015).

2.1.1 ENDOCRINOLOGIA DO CICLO ESTRAL

A regulação do ciclo estral se dá por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos, marcados pela interação dos hormônios GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina), FSH (hormônio folículo estimulante), LH (hormônio luteinizante), E_2 (estradiol), P_4 (progesterona) e $PGF_{2\alpha}$ (prostaglandina).

O GnRH é produzido pelo hipotálamo e regula a liberação pela hipófise anterior das gonadotrofinas FSH e LH, responsáveis pela atividade ovariana. O folículo e o CL produzem os hormônios E_2 e P_4 respectivamente. O E_2 está ligado à manifestação do estro, enquanto a P_4 relaciona-se à manutenção da gestação (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

O ciclo estral de fêmeas bovinas pode ser dividido em duas fases: folicular e luteínica. A fase folicular corresponde ao período do proestro e estro. No proestro, os níveis de P_4 estão baixos e, paralelamente, o GnRH estimula a secreção de FSH e LH. O FSH induz o crescimento folicular, consequentemente promovendo um aumento gradativo da produção de E_2 , o que, por sua vez, por meio do mecanismo de *feedback* positivo estimula o hipotálamo a liberar mais GnRH. Ao atingir determinado tamanho, o folículo passa a produzir o hormônio inibina. A partir desse momento, inibi-se a liberação de FSH e prioriza-se a liberação do LH que atuará sobre a maturação final do folículo, ovulação e formação do CL (MELO STERZA et al., 2015).

A presença do folículo pré-ovulatório no ovário é marcada por um aumento nas concentrações plasmáticas de E_2 , fundamental para a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH responsável pela indução da ovulação (BERTAN et al., 2006).

A fase luteínica corresponde ao período do metaestro e diestro. Após a ovulação que ocorre durante o metaestro, no diestro, o CL funcional sintetiza e libera elevados níveis de P_4 , o que inibe a liberação de GnRH pelo hipotálamo, por um mecanismo de *feedback* negativo. Se o oócito for fecundado, o CL será mantido e os níveis de P_4 permanecerão elevados durante a gestação (VALLE, 1991).

Caso não ocorra a fecundação, o CL regredirá por meio de um mecanismo denominado luteólise, fenômeno estimulado pela $PGF_{2\alpha}$, hormônio luteolítico produzido no endométrio. Após sua ação, os níveis séricos de P_4 diminuem e, por fim, inicia-se um novo ciclo estral (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

2.1.2. DINÂMICA FOLICULAR

O ciclo estral bovino é caracterizado por uma série de ondas de crescimento folicular marcadas por três fases distintas: recrutamento, divergência e dominância. O contínuo processo de crescimento e regressão dos folículos antrais que levam ao desenvolvimento do folículo pré-ovulatório ao longo de cada onda é denominado dinâmica folicular (LUCY et al., 1992; BARUSELLI et al., 2007) (Figura 1).

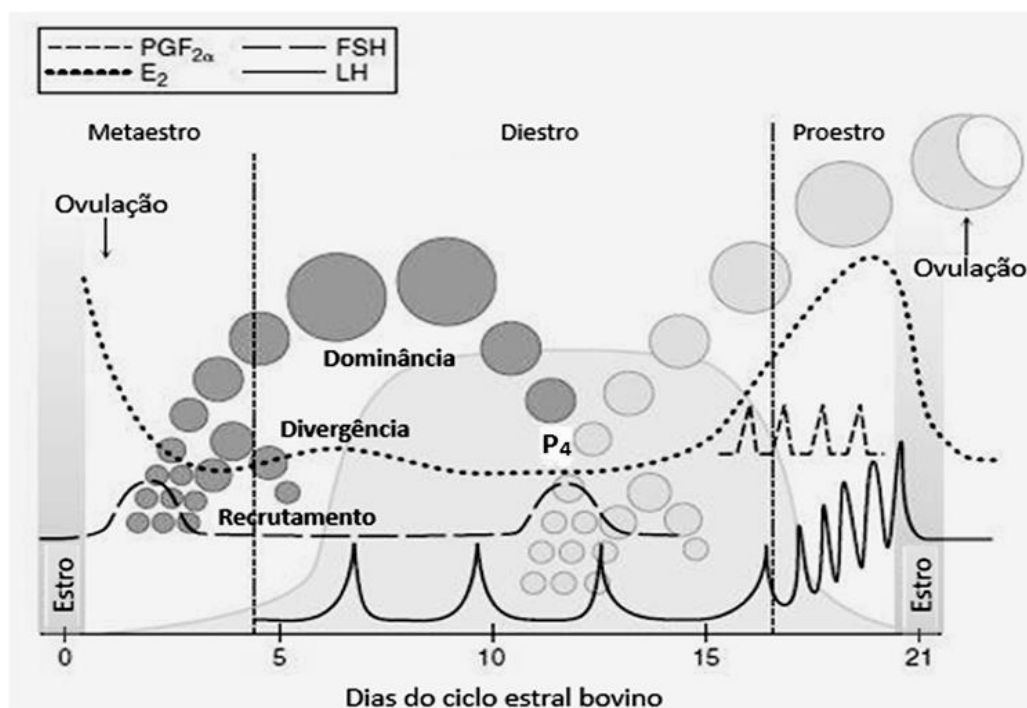


Figura 1. Representação das fases de uma onda de crescimento folicular e dos hormônios envolvidos no ciclo estral (Adaptado de STEVENSON, 2007).

O recrutamento marca o início da onda folicular. Nessa fase, um *pool* de folículos emerge para um período de crescimento comum precedido de um aumento na concentração sérica de FSH. Próximo ou no momento em que o futuro folículo dominante daquela onda atinge o diâmetro médio de 4 mm, ocorre um pico de FSH, que entra em declínio assim que este e os demais folículos de maior diâmetro atingem 6 mm. O declínio do FSH é necessário para o estabelecimento da fase de divergência (GINTHER et al., 1996; GINTHER et al., 2003).

A fase de divergência caracteriza-se pelo crescimento contínuo do maior folículo de uma onda folicular, que, ao atingir um determinado estágio de desenvolvimento, aciona mecanismos de divergência que bloqueiam o crescimento do segundo maior folículo e reduzem ou interrompem o crescimento dos folículos de menor diâmetro (GINTHER et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2011).

Dados encontrados na literatura demonstram que o diâmetro folicular médio dos dois maiores folículos no início da fase de divergência pode diferir entre animais *Bos taurus* e *Bos indicus*. Ginther et al. (1996) relataram valores de 8,5 mm e 7,7 mm para os dois maiores folículos em fêmeas holandesas, enquanto Gimenes et al. (2008) relataram 6,2 mm e 5,9 mm para tais folículos em fêmeas Nelore.

Os mecanismos de divergência que levam à seleção do folículo dominante (FD) não estão completamente elucidados, no entanto parecem estar intimamente ligados à aquisição de receptores de LH pelas células da granulosa, o que permite que o FD altere sua dependência primária de FSH para LH e mantenha seu desenvolvimento. Paralelamente, os folículos subordinados, cuja dependência primária é de FSH, entram em atresia à medida que os hormônios E_2 e inibina suprimem as concentrações de FSH para níveis abaixo do limiar necessário para que estes possam manter seu desenvolvimento (DRIANCOURT, 1991; CASTILHO; GARCIA, 2005).

A inibina e o E_2 suprimem o FSH por meio do mecanismo de *feedback* negativo sobre a hipófise. O estradiol começa a atuar mais intensamente próximo ao início da divergência, enquanto a inibina atua antes da divergência. A inibina é produzida inicialmente por múltiplos folículos e, em seguida, pelo folículo dominante em desenvolvimento, que mantém a produção durante a

fase de dominância, utilizando-se deste como um dos recursos para manter seu status de dominância (FORTUNE et al., 2004; GINTHER et al., 2003).

Na fase de dominância, o FD atinge seu diâmetro máximo, que pode variar entre animais *Bos taurus* e *Bos indicus*. Borges et al. (2004), ao avaliarem o diâmetro do folículo pré-ovulatório de zebuínos, relataram valores de 9,8 a 15 mm e de 10,6 a 14,5 mm para fêmeas das raças Gir e Nelore, respectivamente. Já em taurinos, Cummins et al. (2012) relataram valores de 16,76 a 17,91 mm para fêmeas Holandesas.

Ondas foliculares ocorrem tanto na fase folicular quanto luteínica do ciclo estral, porém na fase luteínica o FD torna-se anovulatório devido aos altos níveis de P_4 , que reduzem a pulsatilidade do LH. Nesse caso, o FD sofre atresia e perde seu status de dominância, o que possibilita o início de uma nova onda folicular (ADAMS et al., 2008).

2.2 INFLUÊNCIA DOS GAMETAS SOBRE A FECUNDAÇÃO E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Define-se como fecundação o processo de fusão entre o espermatozoide (gameta masculino) e o oócito (gameta feminino), formando uma única célula chamada zigoto. Após a fecundação, ocorre o processo de clivagem embrionária, que se caracteriza pela divisão das células do zigoto até a fase de blastocisto eclodido (estágio de desenvolvimento embrionário prévio ao início da placentação) (HAFEZ; HAFEZ, 2004; MELO STERZA et al., 2015).

Porém, para que a fecundação e o subsequente desenvolvimento embrionário sejam bem-sucedidos, é necessário que os gametas anteriormente passem por uma série de complexos eventos. O estabelecimento da prenhez está relacionado à qualidade dos gametas ao fim desses eventos.

2.2.1 O OÓCITO

A qualidade ou competência de desenvolvimento do oócito é adquirida ao longo do processo de oogênese à medida que o oócito cresce e passa pela maturação meiótica, citoplasmática e molecular. Esses eventos ocorrem sobre

influência de fatores tanto intra como extraovarianos (KRISHER, 2004; RODRIGUEZ; FARIN 2004; DICKINSON et al., 2016).

Os fatores intraovarianos estão ligados ao ambiente ao qual o oócito está exposto ao longo do seu desenvolvimento. O ambiente folicular é composto por células somáticas (células da teca, granulosa e *cumulus*) e o próprio oócito, os quais interagem para garantir a viabilidade e comunicação intrafolicular (KRISHER, 2013; CROCOMO et al., 2019).

É importante ressaltar a interação que ocorre entre o oócito e as células do *cumulus* que o circundam, pois constituem uma unidade funcional designada como complexos *cumulus*-oócito (COCs). Os COCs ligam-se por meio de junções gap que permitem a transferência de moléculas de baixo peso molecular. Essa comunicação é fundamental para a coordenação da maturação meiótica e citoplasmática e consequente aquisição de competência oocitária (EPPIG, 1991; GANDOLFI et al., 2005).

À medida que o oócito cresce, as células somáticas sofrem alterações morfológicas, multiplicando-se e passando pelo processo de citodiferenciação. Com base nessas alterações, é possível identificar o grau de desenvolvimento em que se encontram os folículos e classificá-los em: pré-antrais (primordiais, primários e secundários) ou antrais (terciários e pré-ovulatórios) (FIGUEIREDO et al., 2008; SCARAMUZZI et al., 2011) (Figura 2).

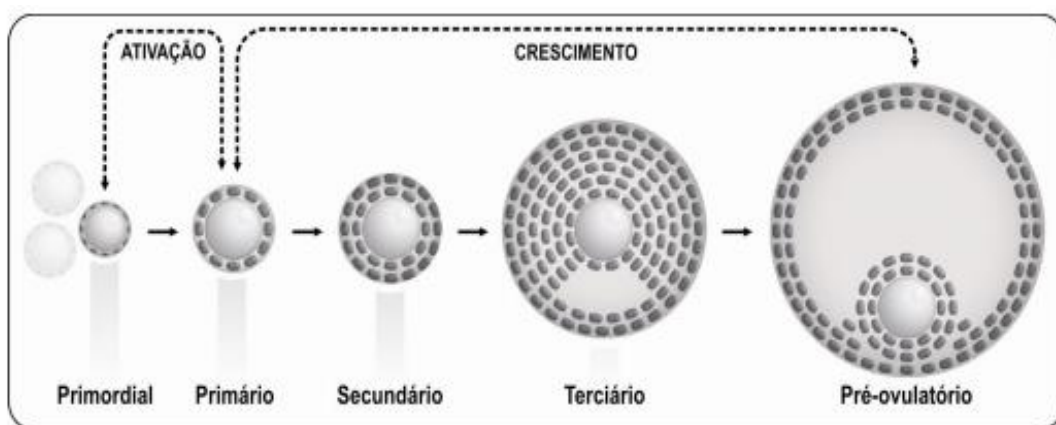


Figura 2. Representação das diferentes classes de desenvolvimento folicular (LIMA-VERDE et al., 2011).

Os diâmetros oocitário e folicular refletem o grau de maturação do oócito, atuando, assim, como indicadores de qualidade. Segundo Hyttel et al. (1997), o período de crescimento oocitário inicia-se com oócitos de diâmetro

inferior a 30 μ m em folículos primordiais que crescem até atingir mais de 120 μ m em folículos terciários.

Em um experimento realizado por Sartori et al. (2001) com vacas Holandesas, os folículos demonstraram adquirir capacidade ovulatória com aproximadamente 10 mm, porém exigiram uma dose maior de LH para induzir a ovulação quando comparados a folículos maiores. Posteriormente, Perry et al. (2005) observaram que a ovulação induzida de folículos ≤ 11 mm resultou em diminuição das taxas de prenhez e aumento da mortalidade fetal/embrionária tardia, demonstrando o impacto negativo de induzir a ovulação de folículos fisiologicamente imaturos.

Os fatores extraovarianos, de forma geral, são eventos externos ao ambiente folicular que, indiretamente, desencadeiam reações capazes de modificar suas condições. O estresse consiste em um importante fator que interfere na qualidade do oócito e da fertilidade. Fêmeas submetidas a condições de estresse sofrem um aumento no nível circulante de cortisol que inibe a biossíntese de estradiol comprometendo o desenvolvimento oocitário (RENSIS; SCARAMUZZI, 2003; PRASAD et al., 2016).

Também exercem influência negativa sobre a competência oocitária o desequilíbrio nutricional, que pode levar a alterações na composição química e hormonal do fluido folicular, acarretando distúrbios metabólicos nos oócitos (ASHWORTH et al., 2009), e a idade da fêmea, pois oócitos oriundos de fêmeas senis apresentam competência de desenvolvimento e taxas de fertilização reduzidas, sendo o estresse oxidativo apontado como a principal causa da redução da qualidade de oócitos envelhecidos (TAKEO et al., 2013; IGARASHI et al., 2015).

2.2.2 O ESPERMATOZOIDE

Em geral, para que o sêmen seja considerado de qualidade, preconizam-se nas análises laboratoriais os seguintes atributos: motilidade progressiva, vigor e baixa taxa de espermatozoides anormais. A motilidade e o vigor estão ligados à capacidade do espermatozoide de se deslocar até o oócito, enquanto a normalidade morfológica influencia sobre a fecundação

propriamente dita e, posteriormente, sobre a qualidade e desenvolvimento do embrião (SILVA et al., 1993; SILVA et al., 2002).

A formação dos espermatozoides origina-se no testículo ao longo do processo de espermatogênese. No entanto, a habilidade e a capacidade de fecundação são adquiridas à medida que os espermatozoides passam pelo epidídimo, durante a maturação espermática (OKABE et al., 1992; NISHIMUNE; OKABE, 1993).

Iniciado o processo de ejaculação, os espermatozoides deixam o epidídimo e entram em contato com o plasma seminal secretado pelas glândulas anexas. O plasma seminal é composto por aminoácidos, íons e proteínas, que habilitam os espermatozoides para a capacitação, ligação à zona pelúcida e reação acrossômica (MAXWELL; JOHNSON, 2000; SILVA et al., 2003).

Para facilitar a comercialização e o armazenamento, a criopreservação do sêmen é usual nas centrais de coleta de sêmen. Esse procedimento tem como objetivo a suspensão do metabolismo espermático, permitindo a manutenção de suas características morfofuncionais por maior tempo. O processo de criopreservação envolve as seguintes etapas: redução de temperatura, desidratação, congelamento e descongelamento (MEDEIROS et al., 2002).

No entanto, embora seja uma prática imprescindível, o processo de criopreservação causa danos irreversíveis às membranas espermáticas, diminuindo a viabilidade celular e a motilidade pós-congelação, levando, por fim, ao declínio da qualidade celular pós-congelação (TARTAGLIONE; RITTA, 2004).

Em programas de inseminação artificial, após o descongelamento o sêmen é depositado no trato genital da fêmea bovina, onde os espermatozoides passam pelas etapas finais de maturação, cujos fenômenos-chave são a capacitação e a reação do acrossômica (OKABE et al., 1992; SEVERO, 2009).

A capacitação espermática compreende as mudanças fisiológicas que conferem ao espermatozoide potencial de fertilização (DASGUPTA et al., 1994). Por outro lado, a reação acrossômica é caracterizada pela liberação das enzimas acrossomais que viabilizam a penetração do espermatozoide na zona

pelúcida e fusão com a membrana plasmática do oócito (DÍAZ-PÉRES et al., 1988).

Após a fecundação, a qualidade do DNA espermático é essencial para que o desenvolvimento embrionário seja bem-sucedido. Resultados apresentados por Fatehi et al. (2006) mostraram que, embora danos no DNA não prejudiquem a fertilização do oócito ou a conclusão das primeiras 2 a 3 clivagens, podem prejudicar a formação de blastocistos ao induzir apoptose.

Simon et al. (2014) observaram que o aumento do dano ao DNA espermático é capaz de afetar a qualidade do embrião a partir do dia 2 do desenvolvimento embrionário inicial e continua após a transferência do embrião, resultando em baixas taxas de prenhez.

De fato, os oócitos possuem mecanismos capazes de reparar danos do DNA espermático, porém essa capacidade é limitada e, caso o nível de dano ao DNA exceder a capacidade do oócito de repará-lo completamente, o embrião pode falhar em qualquer estágio da prenhez ou desenvolver anomalias (ERENPREISS et al., 2006; SIMON et al., 2014).

2.3 CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL

Nas últimas décadas, informações geradas pela comunidade científica permitiram maior compreensão dos mecanismos que regem o ciclo estral e a dinâmica folicular das fêmeas bovinas. Logo, tornou-se possível realizar o controle farmacológico do ciclo estral por meio de protocolos hormonais, com o intuito de maximizar a eficiência reprodutiva dos rebanhos.

O controle farmacológico do ciclo estral potencializou a aplicação de biotécnicas já existentes, como a inseminação artificial (IA), e impulsionou o surgimento de novas biotécnicas, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A IA consiste na deposição de espermatozoides no trato reprodutivo feminino por meios artificiais (BARBOSA; MACHADO, 2008). Antes do advento dos protocolos hormonais, essa deposição era realizada 12h após a detecção do estro, que era feita principalmente por meio de observação visual do estro natural. Porém, a dificuldade em detectar o estro comprometia os resultados, inviabilizando a biotécnica principalmente em grandes rebanhos.

Com os protocolos hormonais passou-se a sincronizar o estro, tornando-

se possível a manifestação do estro conjunta de um lote de animais em um intervalo específico de dias, facilitando-se a detecção e tornando-se a IA mais interessante do ponto de vista reprodutivo e operacional nas propriedades. No entanto, o grande avanço se deu com utilização de protocolos hormonais para sincronizar o momento da ovulação, permitindo-se trabalhar não mais apenas com dias, mas sim com um intervalo de horas específico predeterminado, descartando-se a necessidade da observação do cio, surgindo, assim, a IATF.

2.3.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)

O aumento do mercado de IA no Brasil ocorreu paralelamente à disseminação dos programas de IATF. Dados publicados recentemente apontam que em 2019 foram comercializados 16.382.488 de protocolos. Esses dados indicam que 87% das inseminações no Brasil foram realizadas por IATF, o que demonstra a consolidação dessa tecnologia no mercado de inseminação artificial (BARUSELLI, 2020).

O percentual de matrizes inseminadas também tem crescido significativamente no país. No ano de 2002, apenas 5,8% das matrizes do rebanho brasileiro eram inseminadas, todavia, em 2018, foi atingido o percentual de 13,1% do total de matrizes do rebanho nacional e estima-se que esse valor chegue a 20% nos próximos 10 anos (BARUSELLI et al., 2019).

O progresso observado na utilização da IATF está ligado às vantagens que essa biotecnologia oferece. Com a implementação da IATF tornou-se possível inseminar um maior número de vacas em menor espaço de tempo; acelerar o melhoramento genético do rebanho com o uso de sêmen de touros com avaliação genética; estabelecer o nascimento e o desmame em épocas mais favoráveis ao bezerro; uniformizar os lotes de bezerros, facilitando sua comercialização, e diminuir o intervalo entre partos (BARUSELLI et al., 2013).

No que diz respeito à utilização da IATF na bovinocultura de corte, em que predominam matrizes zebuínas, alguns dos benefícios da utilização dessa biotécnica se tornam mais evidentes. Fêmeas zebuínas possuem um período de anestro pós-parto mais longo quando comparadas com fêmeas taurinas, o que reflete em perdas econômicas para os pecuaristas devido ao maior intervalo entre parto e concepção. Nesse sentido, a capacidade dos protocolos

hormonais de induzir a ciclicidade de vacas em anestro pós-parto é de grande interesse, pois impacta sobre as taxas de concepção e, conseqüentemente, aumenta a eficiência reprodutiva do rebanho (RABASSA et al., 2007; MENEGHETTI; VASCONCELOS, 2008).

Para um rebanho comercial obter máximo desempenho reprodutivo, preconiza-se a produção de um bezerro/vaca/ano. Dessa forma, as vacas deveriam conceber no máximo entre 80 e 85 dias pós-parto, pois o período de gestação é de aproximadamente 280 dias (BARUSELLI et al., 2004b). Quando a IATF é utilizada adequadamente, aproximadamente 50% das matrizes sincronizadas emprenham com apenas uma inseminação realizada no período de pós-parto recente (80 dias), e os animais que não conceberem nessa inseminação podem ser novamente sincronizados ou colocados com touros para repasse (GODOI et al., 2010).

Outro fator relevante é que o período de manifestação do estro é mais curto em fêmeas zebuínas, e há uma alta incidência de manifestação do estro à noite, de modo que aproximadamente 30% das fêmeas iniciam e terminam o estro durante a noite, o que dificulta a utilização da IA convencional (PINHEIRO et al., 1998; BARUSELLI et al., 2004a). Nessas condições, a possibilidade de sincronizar o estro e posterior ovulação que os protocolos hormonais oferecem se torna ainda mais interessante.

Para que um protocolo de IATF seja considerado eficaz, precisa ser capaz de sincronizar a onda de desenvolvimento folicular, do recrutamento até a ovulação por meio da associação dos hormônios escolhidos, ou seja, precisa induzir atresia de todos os folículos terciários sem desenvolvimento nos ovários, resultando no recrutamento de uma nova onda folicular, desenvolvimento síncrono de um novo folículo dominante em todas as fêmeas e ovulação em um tempo previsível (DRIANCORT, 2001; BARUSELLI et al. 2006).

Existem diversos protocolos hormonais disponíveis no mercado que se baseiam em combinações de P_4 , E_2 , $PGF_{2\alpha}$, GnRH, LH, eCG (gonadotrofina coriônica equina) e hCG (gonadotrofina coriônica humana); com isso é fundamental o conhecimento de como cada um dos diferentes hormônios atua ao se optar pelo controle farmacológico do ciclo estral (Tabela 1).

Tabela 1. Hormônios utilizados em protocolos de IATF (Adaptado de GOTTSCHALL et al., 2008).

Tipo de Controle	Forma de Controle	Ação Farmacológica
Sincronização do crescimento da onda folicular	GnRH	Induz o pico de LH e ovulação e/ou luteinização do folículo. Aproximadamente ½ dia depois, ocorre a emergência de uma nova onda de crescimento folicular em animais responsivos.
	P ₄ +E ₂	Induz atresia folicular. Após 4 ½ dias inicia uma nova onda de crescimento folicular em animais responsivos. O implante simula a presença de um CL, controlando a duração da fase luteal. A P ₄ sensibiliza o sistema reprodutivo de animais em anestro.
Regressão do CL	PGF _{2α}	Controla a duração da fase luteal pela indução de luteólise em animais com CL responsivo (entre o 6º e o 17º dia do ciclo estral). Não sincroniza a onda folicular.
Indução da Ovulação	E ₂	Induz à liberação de GnRH e LH (15h) e à ovulação de 41h a 45h após sua aplicação em animais responsivos.
	GnRH	Induz à liberação de LH em 2h e à ovulação de 28h a 30h após sua aplicação em animais responsivos.
	LH	Simula o pico endógeno de LH, induzindo à ovulação de 26h a 28h após sua aplicação em animais responsivos.
	hCG	Efeito semelhante ao LH, induzindo à ovulação de 26h a 28h após sua aplicação em animais responsivos.

Em bovinos de corte, os protocolos de IATF mais usados são os que associam P₄, E₂ e PGF_{2α}. Em geral, o protocolo padrão consiste na inserção de um dispositivo intravaginal impregnado com P₄ e administração de E₂ no dia 0 (sincronização do crescimento da onda folicular), administração de PGF_{2α} no dia da retirada do dispositivo, que pode ser feita nos dias 7, 8 ou 9 do protocolo (controle da regressão do CL) e a subsequente aplicação de uma dose mais baixa de E₂ 24 horas após a retirada do dispositivo intravaginal (indução da

ovulação), seguida pela IATF 52-56 h após a retirada do dispositivo (BÓ et al., 2002; BARUSELLI et al. 2006). A última aplicação de E₂ pode ser substituída por qualquer outro indutor de ovulação desde que o momento da IATF seja ajustado em função do intervalo de horas que cada um induz à ovulação.

No entanto, mesmo que os protocolos sejam eficazes e ocorra a ovulação, ainda há uma série de fatores que podem interferir (condições clínico-reprodutivas das fêmeas em protocolo, a experiência do inseminador e o sêmen utilizado) impedindo que se estabeleça a prenhez.

2.4 SEMÊN SEXADO

Em mamíferos, o sexo é determinado de acordo com informação cromossômica transportada pelo espermatozoide. Sua sexagem permitiu diferenciar e separar espermatozoides vivos contendo cromossomos X e Y com o intuito de produzir uma prole de um determinado sexo (GARNER; SEIDEL, 2008).

A seleção do sexo da progênie é vantajosa para a bovinocultura de corte, pois viabiliza o nascimento de um maior número de animais com valor econômico significativo. Além disso, o uso do sêmen sexado associado à inseminação artificial (IA) permite que os produtores predeterminem o sexo de bezerros de acasalamentos genéticos específicos, o que leva a um ganho genético mais rápido dentro dos rebanhos (SCHENK; SEIDEL JR., 1999).

2.4.1 SEXAGEM ESPERMÁTICA POR CITOMETRIA DE FLUXO

A sexagem espermática por quantificação do DNA utilizando a citometria de fluxo tem sido a mais utilizada nos últimos anos (FOOTE, 2010; VILLADIEGO et al., 2018). Esse método é baseado na diferença do conteúdo de DNA dos espermatozoides, uma vez que o cromossomo X contém 3,8% a mais de DNA do que o cromossomo Y em bovinos (JOHNSON et al., 1987; GARNER, 2001).

No citômetro, os espermatozoides corados com Hoechst 33342 (corante que se liga especificamente ao DNA) são expostos a um laser de luz ultravioleta. Aqueles de cromossomo X, por possuírem maior quantidade de

DNA, apresentam um brilho maior do que os de cromossomo Y. Então, uma carga elétrica positiva ou negativa é atribuída de acordo com a intensidade de fluorescência emitida, o que permite separar os espermatozoides X e Y e conduzi-los a diferentes tubos de coleta após passarem pelo campo elétrico do separador (SCHENK; SEIDEL JR., 1999) (Figura 3).

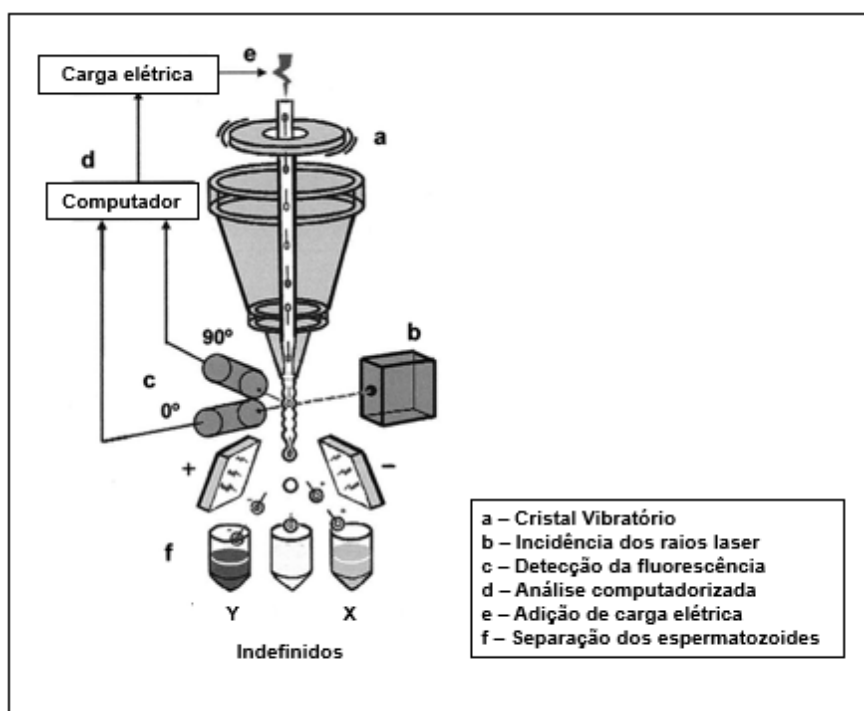


Figura 3. Representação do processo da sexagem espermática por citometria de fluxo (Adaptado de GARNER et al., 2013).

A acurácia do procedimento de separação pode variar de 85% a 95%. Essa possível variação se dá em função de diversos fatores, como: operador, velocidade de separação e variações individuais do ejaculado de cada touro (SEIDEL; GARNER, 2002). Porém, ainda que apresente alta acurácia, o processo de sexagem pode causar danos irreparáveis ao espermatozoide, comprometendo sua eficiência no processo de fertilização e produção de embriões devido ao estresse mecânico e químico ao qual são expostos (LIMA, 2007).

Outro aspecto relevante da sexagem pelo método de citometria de fluxo, é que a velocidade de separação (aproximadamente 3000 a 4000 células vivas/minuto/sexo) é relativamente lenta, e produzir palhetas com a mesma concentração utilizada para sêmen convencional tornaria inviável a comercialização dessa biotecnologia. Para uma maior viabilidade econômica, tem sido usado o mínimo de espermatozoides por inseminação necessária

para alcançar taxas aceitáveis de prenhez, sendo usual a utilização da concentração de 2×10^6 espermatozoides/dose (GARNER, 2001; BARUSELLI et al., 2007; VILLADIEGO et al., 2018).

Com a produção e a comercialização do sêmen sexado, adicionar a etapa de criopreservação ao processo tornou-se inevitável. Logo, além do processo de sexagem, a célula espermática precisa ainda passar pela criopreservação, sendo exposta ao congelamento e descongelamento, o que pode causar mais injúrias, resultando em baixas taxas de prenhez e altas percentagens de degeneração embrionária (SARTORI et al., 2004; ANDERSON et al., 2006).

Além disso, o processo de sexagem induz a mudanças na membrana do sêmen, o que acelera o processo da capacitação e da reação acrossômica dos espermatozoides após a criopreservação. A pré-capacitação não é interessante, pois diminui a sobrevivência do espermatozoide sexado no sistema genital da fêmea (MOCÉ et al., 2006).

Deve-se ressaltar que, devido às características intrínsecas de cada reprodutor, o sêmen pode apresentar maior ou menor tolerância quando submetido aos processos de sexagem e criopreservação (SCHENK; SEIDEL JR., 1999). De forma geral, preconiza-se o uso de touros de alta fertilidade, para que se possa obter resultados satisfatórios, apesar da baixa concentração da dose inseminante e das injúrias causadas pelo processamento (FRIJTERS et al., 2009).

2.5 ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAR PROTOCOLOS DE IATF COM SÊMEN SEXADO

A tecnologia de sexagem espermática por citometria de fluxo tem evoluído desde que foi validada por Johnson et al. (1989). No entanto, o sêmen sexado ainda apresenta uma série de particularidades que deve ser levada em consideração quando se opta por associar essa tecnologia à IATF.

O grande gargalo da utilização do sêmen sexado na inseminação artificial é a baixa taxa de concepção. Em geral, a taxa de concepção com sêmen sexado é cerca de 50% a 60% da taxa de concepção verificada com o uso de sêmen convencional (BARUSELLI et al., 2007). Por esse motivo, o alvo

de muitas pesquisas tem sido a busca por alternativas que possam incrementar esses resultados.

Considerando a menor sobrevivência do espermatozoide sexado no trato genital da fêmea e a baixa dose inseminante comercializada, realizar a inseminação mais próxima à ovulação é uma estratégia que tem sido estudada para aumentar a taxa de concepção (BARUSELLI et al., 2007; THOMAS et al., 2014). Baruselli et al. (2007), trabalhando com vacas Nelore pós-parto submetidas à IATF, alcançaram resultados satisfatórios, com taxa de concepção semelhante entre sêmen convencional e sexado (48,4% e 46,4%, respectivamente) quando a IATF com sêmen sexado foi realizada 60 horas após a retirada do implante de progestágeno.

O local de deposição do sêmen também já foi explorado como estratégia para otimizar o uso de sêmen sexado em protocolos de IATF, partindo do princípio que a deposição mais profunda no útero melhoraria a taxa de concepção. No entanto, a inseminação com espermatozoides sexados no corpo do útero apresentou valores semelhantes aos alcançados com inseminação no corno do útero (SÁ FILHO et al., 2012).

Outras estratégias, como a avaliação da expressão de cio e a aplicação de GnRH no momento da ovulação, têm se destacado em experimentos associando sua aplicação a protocolos de IATF com sêmen convencional. Logo, há uma tendência de que essas alternativas venham a ser testadas utilizando sêmen sexado com o intuito de maximizar os resultados e tornar a técnica mais interessante do ponto de vista econômico.

2.5.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE CIO

A expressão do cio em fêmeas bovinas está associada a maiores diâmetros foliculares no momento da IATF, maiores concentrações séricas de P_4 durante a fase lútea subsequente e maiores taxas de prenhez (SÁ FILHO, 2011). Testando a importância da expressão do cio sobre a taxa de prenhez em fêmeas inseminadas com sêmen sexado, Sá Filho et al. (2012) observaram que vacas que expressaram cio apresentaram maior diâmetro folicular e que, quando os folículos eram ≥ 9 mm, a taxa de prenhez foi semelhante entre sêmen convencional e sexado (58,9% e 56,8%, respectivamente). Portanto, o

diâmetro folicular na IATF e a ocorrência do cio podem ser utilizados como critério de seleção para identificar vacas com maior probabilidade de emprenhar para receber o sêmen sexado em protocolos de IATF.

Existem vários métodos que auxiliam na detecção do cio, sendo a observação visual o mais convencional (PALOMBI et al., 2013). Esse método consiste na observação das alterações de comportamento do animal e em modificações na genitália externa. No entanto, quando somente esse método é utilizado, aproximadamente 20 a 40% das manifestações de cio não são identificadas, e de 15 a 20% são falso-positivas (CAETANO; JÚNIOR, 2015). A utilização de drones pode ser uma alternativa à observação visual, visto que permite captar um maior número de animais em cio ao mesmo tempo, com menor demanda de mão de obra e maior comodidade e segurança (ANACHE, 2018).

Embora não tão disseminado quanto a observação visual, já existe no mercado um dispositivo eletrônico para a detecção de cio, denominado de Heat-Watch®. Esse sistema é composto por transmissores sensíveis à pressão fixados na região da inserção da cauda, que, quando acionados pela pressão gerada na atividade de monta, emitem sinais de radiofrequência (Radiotelemetria) que são captados por uma antena e enviados para um receptor que armazena os dados e monitora o comportamento do animal ao longo de 24 horas. Todavia, esse método apresenta um alto custo para o produtor (CAETANO; JÚNIOR, 2015).

O bastão marcador é outro método auxiliar de detecção do cio, que consiste na aplicação da tinta do bastão na região sacrocaudal e à medida que a fêmea aceita a monta, a tinta é retirada gradativamente (SKENANDORE; CARDOSO, 2017). Com a finalidade de padronizar a utilização desse método em protocolos de IATF, recentemente foi desenvolvida a avaliação do ESCT (escore de remoção de tinta da cauda) (NOGUEIRA et al., 2016), que permite não somente identificar o cio como classificar os animais de acordo com a intensidade de sua expressão.

Para avaliar a expressão de cio de acordo com os escores de remoção de tinta da cauda, é realizada a marcação com bastões coloridos no dia da retirada do implante de P₄. Posteriormente, no momento da IATF (D10), avalia-se o ESCT e os animais são classificados em: ESCT1 - sem remoção de tinta =

sem expressão de cio; ESCT2 - pouca remoção de tinta = baixa expressão de cio; ESCT3 - muita ou remoção total de tinta = alta expressão de cio (NOGUEIRA et al., 2019). O uso do ESCT mostrou ser eficiente na detecção de animais em cio, mostrando correlação com o diâmetro folicular no momento da IATF bem como com a taxa de prenhez (NOGUEIRA et al., 2016).

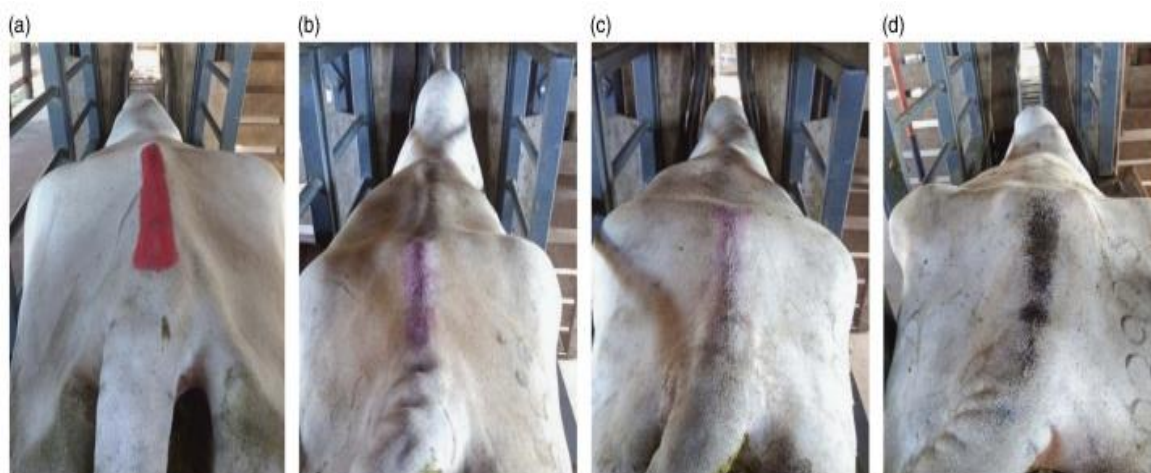


Figura 4. a: Aplicação do bastão no D8; b – d: Escores de remoção de tinta da cauda em vacas submetidas à IATF (b: ESCT1; c: ESCT2; d: ESCT3) (Nogueira et al., 2019).

A técnica possui algumas limitações que comprometem a leitura correta do método, tais como: animais falso-positivos, vacas que apresentam cio silencioso e, portanto, não são montadas e ainda animais que perdem a marcação em dias chuvosos (SKENANDORE; CARDOSO, 2017). Ainda assim, a utilização de escores de avaliação de cio com bastões marcadores no momento da IATF é uma estratégia simples, de baixo custo, útil para identificar vacas com maior expressão de estro e já vem sendo aplicada em muitas propriedades (NOGUEIRA et al., 2019).

2.5.2 APLICAÇÃO DE GNRH NO MOMENTO DA IATF

O conhecimento a respeito do mecanismo de ação do GnRH e sua importância sobre a fisiologia reprodutiva de fêmeas bovinas impulsionaram a realização de diversos estudos visando ao aumento da fertilidade dos animais por meio da aplicação de análogos comerciais. A priori, o GnRH foi utilizado como estratégia para prevenir a perda embrionária, induzir a ovulação de fêmeas em anestro pós-parto e tratar cistos ovarianos (PETERS, 2005).

Em estudos recentes, a aplicação de GnRH no momento da inseminação em protocolos de IATF tem sido testada com o objetivo de incrementar a fertilidade, partindo do princípio de que com essa aplicação se garantiria uma maior taxa de ovulação e um CL de melhor qualidade devido à capacidade luteinizante do GnRH (PETERS, 2005; SÁ FILHO et al., 2010).

Ferreira et al. (2017), avaliando o efeito da aplicação de uma dose de 10,5 µg de GnRH (acetato de buserelina) no momento da IATF sobre a taxa de prenhez de novilhas Nelore, observaram um aumento significativo na taxa de prenhez de fêmeas que receberam o GnRH em comparação às que não receberam, independentemente destas terem expressado ou não cio. No entanto, os autores enfatizam que a administração do hormônio teve maior impacto sobre as fêmeas que não expressaram cio.

Gonçales Junior et al. (2017) desenvolveram um experimento semelhante avaliando, porém, a resposta de primíparas Nelore. Assim como no experimento anterior, foi utilizada uma dose de 10,5 µg de GnRH (acetato de buserelina) no momento da IATF e as taxas de prenhez foram avaliadas com e sem expressão de cio entre os grupos. Mais uma vez, as fêmeas que receberam a aplicação de GnRH apresentaram uma taxa de prenhez maior quando comparado com o grupo controle, independentemente de expressarem ou não o cio, demonstrando que o tratamento com GnRH pode ser uma ferramenta interessante para otimizar os resultados da IATF tanto nessa categoria quanto em novilhas.

Já quando o teste foi realizado com multíparas, os resultados foram controversos. Consentini et al. (2017) avaliaram a resposta de multíparas Nelore recebendo uma dose de 10 µg de GnRH (acetato de buserelina) no momento da inseminação artificial. Nesse caso, não houve melhora na fertilidade de fêmeas que expressaram cio e receberam GnRH, e as fêmeas que não expressaram cio e receberam GnRH apresentaram apenas uma tendência ao aumento da prenhez.

No entanto, em um estudo mais recente, Rodrigues et al. (2019), avaliando a resposta de vacas multíparas à aplicação de GnRH no momento da IATF, obtiveram resultados satisfatórios. Nesse estudo, foi utilizado um princípio ativo diferente (gonadorelina) e o método utilizado para avaliar a expressão de cio (escore de remoção de tinta - ESCT). Dessa forma, foi

observado um aumento significativo na taxa de prenhez de fêmeas de ESCT 1 e 2 que receberam a aplicação GnRH. Destarte, demonstrou-se que a aplicação de GnRH pode beneficiar fêmeas com baixa expressão de cio e que a avaliação do ESCT é uma ferramenta simples e econômica que pode ser utilizada para otimizar os protocolos reprodutivos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar alternativas para otimizar as taxas de concepção em programas de IATF utilizando sêmen sexado em vacas Nelore lactantes.

3.2 Objetivos específicos

a) Avaliar a influência da expressão de cio e da aplicação de GnRH sobre a taxa de ovulação;

b) Avaliar o uso de GnRH em fêmeas com diferentes escores de remoção de tinta da cauda sobre a taxa de concepção;

c) Avaliar a influência do uso de GnRH e do escore de remoção de tinta da cauda sobre a área e vascularização do corpo lúteo.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. P. et al. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 69, n. 1, p. 72-80, 2008.

ANACHE, N. A. **Metodologias de identificação do estro como alternativa de otimizar os resultados da IATF**. 43 f. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2018.

ANDERSSON, M. et al. Pregnancy rates in lactating Holstein–Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, Malden, v. 41, n. 2, p. 95-97, 2006.

ASHWORTH, C. J.; TOMA, L. M.; HUNTER, M. G. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, London, v. 364, n. 1534, p. 3351-3361, 2009.

BARBOSA, R. T.; MACHADO, R. Panorama da inseminação artificial em bovinos. **Embrapa Pecuária Sudeste**, São Carlos, n. 84. 26p. 2008.

BARUSELLI, P. S. Avaliação do mercado de IATF no Brasil (2019). **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP**, São Paulo, ed. 3, 2020. Disponível em: <<http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>>. Acesso em: 11 mar. 2020.

BARUSELLI, P. S. et al. Avanços conceituais aplicados à IATF em vacas de cria I. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE SISTEMAS DE PRODUÇÃO DE BOVINOS DE CORTE E CADEIA PRODUTIVA. 1., 2013, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2013, p. 33.

BARUSELLI, P. S. et al. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 43, n. 2, p. 308-314, 2019.

BARUSELLI, P. S. et al. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: SIIRA, 2006, p. 113-132.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 205-211, 2007.

BARUSELLI, P. S. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, Nova York, v. 82, p. 479-486, 2004a.

BARUSELLI, P. S. et al. Inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina: SIRAA, 2004b, p. 155-165.

BERTAN, C. M. et al. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise: revisão de literatura. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 43, n. 6, p. 824-840, 2006.

BÓ, G. A. et al. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 57, n. 1, p. 53-72, 2002.

BORGES, A. M. et al. Dinâmica folicular e momento da ovulação em vacas não lactantes das raças Gir e Nelore durante duas estações do ano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 56, n. 3, p. 346-354, 2004.

CASTILHO, C.; GARCIA, J. M. Divergência no crescimento folicular: efeito na competência oocitária para produção *in vitro* de embriões - Revisão. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v. 10, n. 3, 2005.

CONSENTINI, C. E. C. et al. Reproductive efficiency of Nelore cows submitted to 7-d FTAI protocols initiated with estradiol benzoate or GnRH and with or without GnRH at the time of AI. **Animal Reproduction**, v.14, n.3, p. 652, 2017.

CORMACK, D. H. **Histologia**. Rio de Janeiro, RJ: Ed. Guanabara Koogan, 1985. 510p.

CROCOMO, L. F. et al. Competência oocitária: importância e fatores determinantes in vivo e in vitro. **Medicina Veterinária (UFRPE)**, Recife, v. 13, n. 1, p. 117-125, 2019.

CUMMINS, S. B. et al. Genetic merit for fertility traits in Holstein cows: II. Ovarian follicular and corpus luteum dynamics, reproductive hormones, and estrus behavior. **Journal of dairy science**, v. 95, n. 7, p. 3698-3710, 2012.

DASGUPTA, S.; MILLS, C. L.; FRASER, L. R. A possible role of Ca²⁺ T_pase in human sperm capacitation. **Reproduction**, v. 102, p. 107-116, 1994.

DÍAZ-PÉREZ, E.; THOMAS, P.; MEIZEL, S. Evidence suggesting a role for sperm metalloendoprotease activity in penetration of zona-free hamster eggs by human sperm. **Journal of Experimental Zoology**, Hoboken, v. 248, n. 2, p. 213-221, 1988.

DICKINSON, S. et al. Efeito da maturação do folículo pré-ovulatório no estabelecimento da prenhez em bovinos: o papel da competência oocitária e do ambiente materno. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 30. 2016, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: SBTE, 2016. p. 107.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, New York, v. 35, p. 35-55, 1991.

EPPIG, J. J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **Bioessays**, Hoboken, v. 13, n. 11, p. 569-574, 1991.

ERENPREISS, J. et al. Sperm chromatin structure and male fertility: biological and clinical aspects. **Asian Journal of Andrology**, Hoboken, v. 8, n. 1, p. 11-29, 2006.

FATEHI, A. N. et al. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. **Journal of Andrology**, Hoboken, v. 27, n. 2, p. 176-188, 2006.

FERREIRA, Roberta Machado *et al.* Treatment with GnRH (Gonaxal®) at AI increases pregnancy rate of nelore cyclic heifers that showed or not estrus during the TAI protocol, with greater impact in those without estrus demonstration. **Animal Reproduction**, v.14, n.3, p.713, 2017.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais - MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B. D; FIGUEIREDO, J. R; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Roca, 2008. p. 303-327.

FOOTE, R. H. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, p. 1-10, 2010.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, New York, v. 82, p. 109-126, 2004.

FRIJTERS, A. C. J. et al. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process?. **Theriogenology**, New York, v. 71, n. 1, p. 64-67, 2009.

GANDOLFI, F. et al. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. **Revue scientifique et technique-Office international des épizooties**, Paris, v. 24, n. 1, p. 413, 2005.

GARNER, D. L. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. **Journal of Andrology**, Hoboken, v. 22, n. 4, p. 519-526, 2001.

GARNER, D. L.; EVANS, K. M.; SEIDEL, G. E. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. **Spermatogenesis**, Totowa, p. 279-295, 2013.

GARNER, D. L.; SEIDEL JR, G. E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, New York, v. 69, n. 7, p. 886-895, 2008.

GIMENES, L. U. et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in Bos indicus heifers. **Theriogenology**, New York, v. 69, n. 7, p. 852-858, 2008.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 hours through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, New York, v. 52, n. 6, p. 1079-1093, 1999.

GINTHER, O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 55, p. 1187-1194, 1996.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, New York, v. 60, p. 61-79, 2000.

GINTHER, O. J. et al. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, New York, v. 78, n. 3-4, p. 239-257, 2003.

GODOI, C. R.; SILVA, E. F P.; DE PAULA, A. P. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **PUBVET**, Maringá, v. 4, p. 802-808, 2010.

GONÇALES JUNIOR, W. A. et al. Treatment with GnRH (Gonaxal®) at AI increases pregnancy rate of Nelore primiparous cows that showed or not estrus during the TAI protocol. **Animal Reproduction**, v.14, n.3, p.714, 2017.

GOTTSCHELL, C. S. et al. Aspectos relacionados à sincronização do estro e ovulação em bovinos de corte. **A Hora Veterinária**, n. 164, p.43-48, 2008.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. Ed. Barueri, SP: Manole, 2004. 468p.

HYTTEL, P. et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.

IGARASHI, H.; TAKAHASHI, T.; NAGASE, S. Oocyte aging underlies female reproductive aging: biological mechanisms and therapeutic strategies. **Reproductive Medicine and Biology**, Tokio, v. 14, n. 4, p. 159-169, 2015.

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, n. 2, p. 199-203, 1989.

JOHNSON, L. A.; FLOOK, J.P.; LOOK, M. V. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. **Gamete Research**, Hoboken, v. 17, n. 3, p. 203-212, 1987.

KRISHER, R. L. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1, n. 1, p. 393-417, 2013.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 82, n. suppl_13, p. E14-E23, 2004.

LIMA, V. F. M. H. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 36, p. 219-228, 2007.

LUCY, M. C. et al. Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of PGF2 α for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal beef heifers, and dairy heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 79, n. 4, p. 982-995, 2001.

LUCY, M. C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3615-3626, 1992.

MAXWELL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa of a dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, New York, v. 52, p.1273-1280, 2000.

MEDEIROS, C. M. O. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, New York, v. 57, p. 327-344, 2002.

MELO STERZA, Fabiana de Andrade et al. **Noções Básicas da Reprodução de Bovinos**. Dourados, MS: UEMS, 2015. 100p.

MENEGHETTI, M.; VASCONCELOS, J. L. M. Calving date, body condition score, and response to a timed artificial insemination protocol in first-calving beef cows. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 60, n. 4, p. 786-793, 2008.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (Bos taurus indicus), Angus (Bos taurus taurus) e Nelore x Angus (Bos taurus indicus x Bos taurus taurus)**. 2003. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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**, New York, v. 66, n. 4, p. 929-936, 2006.

NISHIMUNE, Y.; OKABE, M. Mammalian Male Gametogenesis: Growth, Differentiation and Maturation of Germ Cells. **Development, growth & differentiation**, Hoboken, v. 35, n. 5, p. 479-486, 1993.

NOGUEIRA, É. et al. **IATF + CIO: estratégia prática de avaliação de cio e aumento de prenhez**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2016. 8 p.

NOGUEIRA, É. et al. Timed artificial insemination plus heat I: effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to progesterone–estradiol-based protocols. **Animal**, Cambridge, p. 1-8, 2019.

OKABE, M.; YANAGIMACHI, R. Sperm capacitation. **Tokyo University Press**, p. 152- 67, 1992.

OLIVEIRA CAETANO, G. A.; JÚNIOR, M. B. C. Métodos de detecção de estro e falhas relacionadas. **PUBVET**, Maringá, v. 9, p. 348-399, 2015.

OLIVEIRA, Maria Emilia Franco; FERREIRA, Roberta Machado; MINGOTI, Gisele Zoccal. Controle do crescimento e da seleção folicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 4, p. 418-432, 2011.

PALOMBI, C. et al. Evaluation of remote monitoring of parturition in dairy cattle as a new tool for calving management. **BMC Veterinary Research**, England, v. 9, n. 1, p. 191, 2013.

PERRY, G. A. et al. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. **National Academy of Sciences**, Washington, v. 102, n. 14, p. 5268-5273, 2005.

PETERS, A. R. Veterinary clinical application of GnRH - questions of efficacy. **Animal Reproduction Science**, New York, v. 88, n. 1, p. 155-167, 2005.

PINHEIRO, O. L. et al. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in nelore cattle (*Bos indicus* with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 α or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. 3, p. 667-681, 1998.

PRASAD, S. et al. Impact of stress on oocyte quality and reproductive outcome. **Journal of Biomedical Science**, England, v. 23, n. 1, p. 36, 2016.

RABASSA, V. R. et al. Anestro pós-parto em bovinos: Mecanismos fisiológicos e alternativas hormonais visando reduzir este período—Uma revisão. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 1, 2007.

RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow—a review. **Theriogenology**, New York, v. 60, n. 6, p. 1139-1151, 2003.

RODRIGUES, W. B. et al. Timed artificial insemination plus heat II: gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. **Animal**, Cambridge, p. 1-6, 2019.

RODRIGUEZ, K. F.; FARIN, C. E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 16, n. 2, p. 55-67, 2003.

SÁ FILHO, M. F. et al. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial

insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, New York, v. 73, n. 5, p. 651-658, 2010.

SÁ FILHO, M. F. et al. Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 90, n. 6, p. 1816-1823, 2012.

SÁ FILHO, M. F. et al. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology**, New York, v. 76, p. 455-463, 2011.

SARTORI, R. et al. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, Madson, v. 65, n. 5, p. 1403-1409, 2001.

SARTORI, R. et al. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 86-90, 2018.

SCARAMUZZI, R. J. et al. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 23, n. 3, p. 444-467, 2011.

SCHENK, J. L.; SEIDEL JR, G. E. Imminent Commercialization of Sexed Bovine Sperm. In: THE RANGE BEEF COW SYMPOSIUM, 16., 1999, Greeley. **Anais...** Greeley: University of Nebraska, 1999. p. 89-96.

SEIDEL JR, G. E.; GARNER, D. L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. **Reproduction**, Cambridge, v. 124, n. 6, p. 733-743, 2002.

SEVERO, N. C. Influência da qualidade do sêmen bovino congelado sobre a fertilidade. **A Hora Veterinária**, v. 28, n. 167, p. 36-39, 2009.

SILVA, A. E. D. F. et al. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozoides do epidídimo e ejaculado de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 1890-1900, 2003.

SILVA, A. E. D. F. et al. Relação da circunferência escrotal e parâmetros da qualidade do sêmen em touros da raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 31, n. 3, p. 1157-1165, 2002.

SIMON, L. et al. Paternal influence of sperm DNA integrity on early embryonic development. **Human Reproduction**, England, v. 29, n. 11, p. 2402-2412, 2014.

SKENANDORE, C. S.; CARDOSO, F. C. The effect of tail paint formulation and heifer behavior on estrus detection. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 113-120, 2017.

STEVENSON, J. S. Clinical reproductive physiology of the cow. **Theriogenology**, New York, 2007. p. 258-270.

TAKEO, S. et al. Age-associated changes in gene expression and developmental competence of bovine oocytes, and a possible countermeasure against age-associated events. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 80, n. 7, p. 508-521, 2013.

TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, New York, v. 62, n. 7, p. 1245-1252, 2004.

THOMAS, J. M. et al. Delayed insemination of nonestrous cows improves pregnancy rates when using sex-sorted semen in timed artificial insemination of suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 92, n. 4, p. 1747-1752, 2014.

USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Livestock and Poultry: World Markets and Trade**. New York, NY: USDA, 2019. 21 p.

VALLE, E. R. **O ciclo estral de bovinos e métodos de controle**. Campo Grande, MS: Embrapa/CNPGC, 1991. 24 p.

VILLADIEGO, C. et al. Semen sexado a través de citometría de flujo y centrifugación por gradiente de concentración. **Revista de Medicina Veterinaria**, Bogotá, v. 1, n. 36, p. 121-133, 2018.

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DE CIO E APLICAÇÃO DE GNRH COMO ESTRATÉGIAS PARA OTIMIZAR PROTOCOLOS DE IATF COM SÊMEN SEXADO EM VACAS NELORE (THERIOGENOLOGY)

Avaliação de cio e aplicação de GnRH como estratégias para otimizar protocolos de IATF com sêmen sexado em vacas Nelore

Heat Score and GnRH injection as strategies to optimize TAI protocols with sex-sorted semen in Nelore cows

BINI DE LIMA, A. C.¹; SILVA, G. C. ¹; SILVA, A. F. ¹; OLIVEIRA, S. S. ¹;

GHELLER, J. M.²; NOGUEIRA, É.³; MELO-STERZA, F. A.¹

¹ Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Aquidauana-MS, Brasil; ² Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, Brasil; ³ Embrapa Pantanal, Corumbá- MS, Brasil.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização do escore de cio (ESCT) e da aplicação do GnRH no momento da IATF como estratégias para otimizar os resultados da IATF com sêmen sexado em vacas Nelore lactantes. Para tal, foram realizados 2 experimentos e, em ambos, vacas multíparas foram sincronizadas com protocolo padrão à base de progesterona e estradiol, com 3 manejos. A IATF foi realizada 60 horas após a retirada do dispositivo de progesterona (P4). No momento da IATF, foi avaliado o ESCT (1 a 3) e aproximadamente 50% das fêmeas de cada escore receberam a aplicação de 100 µg de GnRH via intramuscular. No experimento 1, 119 fêmeas foram inseminadas, sendo que 91 tiveram o diâmetro do folículo dominante avaliado no momento da IATF. Realizou-se o diagnóstico de gestação 30 dias após a IATF. No experimento 2, 33 vacas foram submetidas à ultrassonografia transretal em intervalos de 24, 12 e 6 horas, a partir da retirada do dispositivo de P4. Sete dias após a IATF, foi realizada a avaliação do corpo lúteo (CL) por meio de ultrassonografia Doppler. No experimento 1 embora não tenha sido observada diferença significativa, a taxa de concepção de fêmeas sem expressão de cio (ESCT1) tratadas com GnRH foi 23,8% maior em relação às de mesmo ESCT não tratadas. Além disso, no grupo sem GnRH a taxa de concepção de vacas com alta expressão de cio (ESCT3) foi 22,5% superior comparada às de ESCT1. No experimento 2 a taxa de ovulação (ESCT1 = 66,6%; ESCT2 = 92,3%; ESCT3 = 100%; P = 0,08) foi superior nas fêmeas com ESCT3, e a vascularização do CL (ESCT1 = 45%; ESCT2 = 56,6%; ESCT3 = 68,5%; P = 0,07) foi superior nas fêmeas com ESCT3 e que receberam GnRH (Sem GnRH = 57,8% vs GnRH = 67,3%; P = 0,08). Diante disso, a avaliação do ESCT imediatamente antes da IATF e a aplicação de GnRH no momento da inseminação em animais que não expressaram cio, mostraram-se estratégias interessantes para otimizar protocolos de IATF com sêmen sexado.

Palavras-chave: inseminação artificial, sexagem, biotecnologia da reprodução, bovino

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the use of heat score (HEATSC) and the injection of GnRH at the time of TAI as strategies to optimize the results of TAI with sexed semen in suckled Nelore cows. Thus, 2 experiments were performed and, in both, multiparous cows were synchronized with a standard estrogen/progesterone-based protocol, with 3 managements. The TAI was performed 60 hours after the removal of the progesterone (P4) device. At the time of TAI, HEATSC (1 to 3) was evaluated and approximately 50% of females from each HEATSC received 100 µg of GnRH intramuscularly. In experiment 1, 119 females were inseminated, considering that 91 had the diameter of the dominant follicle evaluated at the time of TAI. Pregnancy was diagnosed 30 days after TAI. In experiment 2, 33 cows underwent transrectal ultrasound at 24, 12, and 6-hour intervals, from the removal of the P4 device. Seven days after TAI, the corpus luteum (CL) was evaluated by Doppler ultrasonography. In experiment 1 although there was no significant difference, the conception rate of females with no heat expression (HEATSC1) treated with GnRH was 23.8% higher compared to the same untreated HEATSC. In addition, in the group without GnRH the conception rate was 22.5% higher for cows with high heat expression (HEATSC3) compared to those of HEATSC1. In experiment 2 the ovulation rate (HEATSC1 = 66.6%; HEATSC2 = 92.3%; HEATSC3 = 100%; $P = 0.08$) was higher in females with HEATSC3, and the vascularization of the CL (HEATSC1 = 45%; HEATSC2 = 56.6%; HEATSC3 = 68.5%; $P = 0.07$) was higher in females with HEATSC3 and in those treated with GnRH (Without GnRH = 57.8% vs GnRH = 67.3%; $P = 0.08$). Therefore, the evaluation of HEATSC immediately before TAI and the injection of GnRH at the time of insemination in animals with no heat expression proved to be interesting strategies to optimize TAI protocols with sexed semen.

Keywords: artificial insemination, cattle, reproduction biotechnology, sexing

1 Introdução

O uso de sêmen sexado beneficia os sistemas de produção, visto que viabiliza o nascimento de um maior número de animais do sexo desejado provenientes de acasalamentos genéticos específicos, o que leva a um ganho genético mais rápido dentro dos rebanhos [1].

A acurácia da sexagem é muito satisfatória, variando de 85% a 95% [2]. No entanto, devido às injúrias sofridas durante o seu processamento a taxa de concepção com sêmen sexado é cerca de 50% a 60% da taxa de concepção verificada com o uso de sêmen convencional [3, 4]. Isto impulsiona a busca por ferramentas que aperfeiçoem sua utilização e a torne viável economicamente.

Já foi demonstrado que a aplicação de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas) no momento da IATF é uma estratégia capaz de melhorar a sincronização e as taxas de concepção [5]. No entanto, foi sugerido que a aplicação de GnRH fosse limitada a fêmeas com baixa expressão de cio [6, 7]. A expressão do cio está associada a maiores diâmetros foliculares no momento da IATF, maiores concentrações séricas de progesterona (P4) durante a fase lútea subsequente e maiores taxas de prenhez [8], logo, a aplicação de GnRH em fêmeas com alta expressão de cio seria dispensável.

Embora um dos princípios e vantagens da IATF seja a inseminação de todas as vacas sincronizadas, independentemente de expressar cio ou não, a identificação do cio poderia melhorar a fertilidade, viabilizando o uso do sêmen sexado. Essa alternativa, no entanto, seria viável apenas se a identificação do cio não interferisse no manejo da IATF. Diante disto, recentemente foi desenvolvida a avaliação do ESCT (escore de remoção de tinta da cauda), uma estratégia simples de baixo custo, e eficiente na identificação e classificação da intensidade do cio [9].

De fato, tanto a aplicação de GnRH no momento da IATF quanto a avaliação do ESCT são estratégias que têm sido estudadas associando sua aplicação a protocolos de IATF, existindo no entanto, uma lacuna no que diz respeito à utilização desses recursos em protocolos em que as fêmeas sejam inseminadas com sêmen sexado.

Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi avaliar a utilização do escore de cio (ESCT) e da aplicação de GnRH no momento da IATF como estratégias para otimizar os resultados da IATF com sêmen sexado em vacas Nelore lactantes.

2 Materiais e métodos

Foram projetados dois experimentos para avaliar as estratégias propostas para otimizar o uso de sêmen sexado em programas de IATF.

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul (protocolo nº028/2018).

2.1 Protocolo de IATF

Para ambos experimentos foram selecionadas vacas lactantes (30 a 60 dias pós-parto), com escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 e 3,75 (escala de 1 a 5; [10]) e em boas condições clínico-reprodutivas com base na avaliação ginecológica prévia via ultrassonografia transretal (SonoScape® A5V; SonoScape Co. Ltd., Shenzhen, China; com transdutor linear de 7,5 MHz de frequência).

O protocolo foi iniciado em um dia aleatório do ciclo estral (D0), em que as fêmeas receberam 2 mg de benzoato do estradiol (BE) (RIC-BE®; Agener União, São Paulo, Brasil) intramuscular (i.m.) e um dispositivo intravaginal com 1 g de progesterona (P4) (Cronipress Mono Dose M-24®; Biogenesis Bagó, Curitiba, Brasil). No 8º dia após o início do protocolo (D8), o dispositivo de P4 foi removido e foi administrado 150µg de d-Cloprostenol (Prolise®; ARSA, Buenos Aires, Argentina), 1 mg de cipionato de estradiol (ECP®; Zoetis, São Paulo, Brasil) e 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG)(Folligon® 5000 UI; MSD, São Paulo, Brasil) i.m.. Logo em seguida todas as vacas foram marcadas na região sacrocaudal com bastões marcadores (Raidl-Maxi; RAIDEX, Alemanha).

Sessenta horas após a remoção do dispositivo de P4 (D11) e imediatamente antes da IATF, os animais foram classificados em: ESCT1 - sem remoção de tinta = sem expressão de cio; ESCT2 - pouca remoção de tinta = baixa expressão de cio; ESCT3 - muita ou remoção total de tinta = alta expressão de cio [9]. Aproximadamente 50% das fêmeas de cada escore de cio (Exp. 1: ESCT1 = 7, ESCT2 = 16, ESCT3 = 36; Exp. 2: ESCT1 = 2, ESCT2 = 7, ESCT3 = 7) receberam a aplicação de 100 µg de gonadorelina (GnRH) (1 ml de Fertagyl®, MSD, São Paulo, Brasil) i.m. no momento da IATF.

2.2 Experimento 1

Neste experimento, 119 vacas multíparas em lactação da raça Nelore (*Bos indicus*), pertencentes a uma fazenda comercial situada na região de Planalto do Estado

de Mato Grosso do Sul, Brasil, foram submetidas à IATF com sêmen sexado para fêmea de 2 touros Nelore de fertilidade testada. Aproximadamente 50% das fêmeas, de cada ESCT foram inseminadas com Touro A e o restante com Touro B (Touro A = 59; Touro B = 60).

Uma amostra das fêmeas em protocolo ($n = 91$) foi examinada via ultrassonografia transretal para mensuração do diâmetro do folículo dominante no momento da IATF (DFIATF). No ultrassom, utilizando uma imagem estática foram mensurados os dois diâmetros máximos do folículo, sendo considerado o DFIATF a média dos dois valores obtidos.

Realizou-se o diagnóstico de gestação por ultrassonografia transretal 30 dias após a IATF para verificar a concepção (Figura 1). A partir dos dados calculou-se a taxa de concepção (TC), pela fórmula: $TC = \text{n}^\circ \text{ de vacas gestantes} / \text{n}^\circ \text{ de vacas inseminadas} \times 100$.

Todos os exames de ultrassonografia transretal foram realizados com um ultrassom SonoScape (SonoScape® A5V; SonoScape Co. Ltd., Shenzhen, China) com probe linear de 7,5 MHz de frequência.

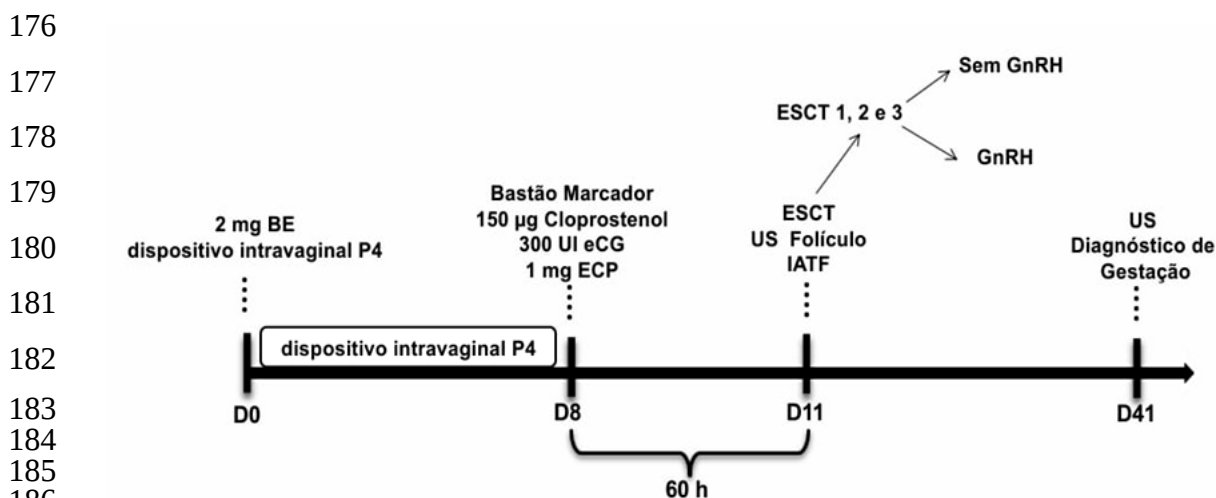


Figura 1. Design experimental. D0 = dia zero; D8 = dia 8; D11 = dia 11; D41 = dia 41; BE = benzoato de estradiol; P4 = progesterona; ECP = cipionato de estradiol; eCG = gonadotrofina coriônica equina; bastão marcador = marcação na cauda com bastão colorido; IATF = inseminação artificial em tempo fixo; ESCT = escore de retirada da tinta da cauda; GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina; US = avaliação ultrassonográfica.

2.3 Experimento 2

Utilizou-se 33 vacas multíparas em lactação da raça Nelore pertencentes à fazenda da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, unidade de Aquidauana. Os animais foram submetidos a tratamento hormonal e avaliação ultrassonográfica.

A partir do D8 os animais foram submetidos à ultrassonografia transretal (SonoScape® A5V; SonoScape Co. Ltd., Shenzhen, China) com transdutor linear de 7,5 MHz de frequência, em intervalos de 24, 12, e 6 horas (Figura 2) até o momento da ovulação. O procedimento foi realizado por um único operador.

Definiu-se como o momento de ovulação, o momento em que o folículo pré-ovulatório, presente até a avaliação anterior, não foi mais visualizado com posterior confirmação da formação de corpo lúteo.

Sete dias após a IATF, foi realizada a avaliação do corpo lúteo (CL) com um equipamento de ultrassonografia (EXAPad®; IMV Imaging, Bellshill, Escócia) equipado com a função Doppler colorido e probe linear retal de 7,5 MHz de frequência. A partir da detecção de um CL no mesmo ovário em que foi observado o folículo pré-ovulatório calculou-se a taxa de ovulação (TO) pela fórmula: $TO = \frac{\text{n}^\circ \text{ de vacas com corpo lúteo}}{\text{n}^\circ \text{ de vacas inseminadas}} \times 100$.

Após a detecção do CL, foi determinada a posição e mensurada a área da seção transversal do CL (ATCL) e de cavidades luteais (CCL) eventualmente presentes por meio do dispositivo do próprio aparelho. Para análise considerou-se como área do CL (ACL) a ATCL menos a CCL. A vascularização do CL (VSCL) também foi avaliada por meio do dispositivo do próprio aparelho. Considerou-se o percentual de área com pontos coloridos como o percentual de VSCL.

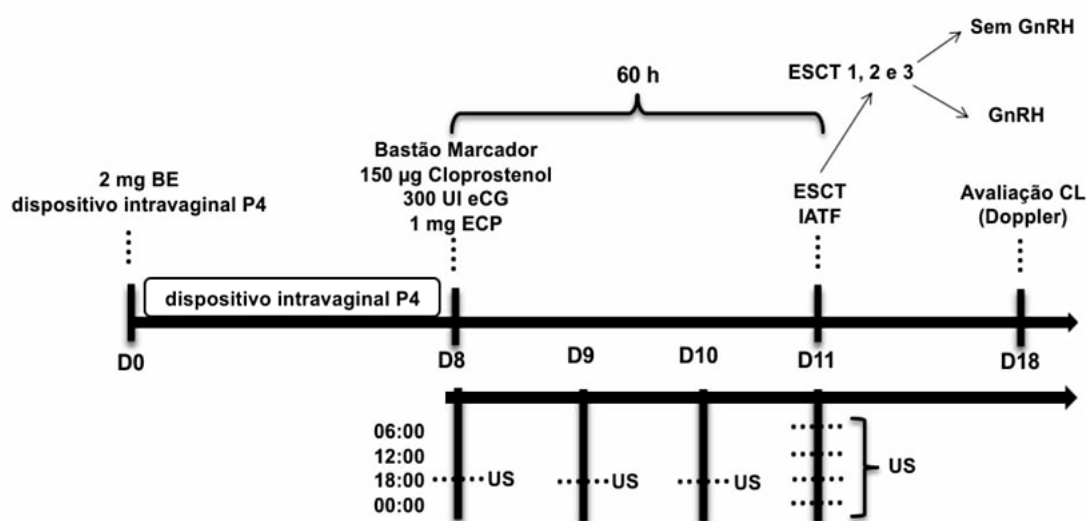


Figura 2. Design experimental. D0 = dia zero; D8, = dia 8; D9 = dia 9; D10 = dia 10; D11 = dia 11; D18 = dia 18; BE = benzoato de estradiol; P4 = progesterona; ECP = cipionato de estradiol; eCG = gonadotrofina coriônica equina; bastão marcador = marcação na cauda com bastão colorido; ESCT = escore de retirada da tinta da cauda; GnRH = hormônio liberador de gonadotrofina; US = avaliação ultrassonográfica; CL = corpo lúteo.

2.4 Análise estatística

As variáveis analisadas no experimento 1 foram: diâmetro do folículo dominante no momento da IATF e taxa de concepção. Neste experimento, utilizou-se um modelo, que além dos efeitos fixos de escore de cio e uso do GnRH e de sua interação, considerou ainda os efeitos aleatórios de touro, ECC, peso e contagem de folículos antrais (CFA).

No experimento 2 foram analisadas: taxa de ovulação e área e vascularização do corpo lúteo. Neste experimento, utilizou-se um modelo semelhante ao descrito no experimento 1. Efeitos aleatórios ou interações foram removidas do modelo estatístico quando apresentaram um valor-P maior que 0,10.

Utilizou-se o PROC GLIMMIX do SAS University (Sas Institute Inc., Cary, CA, EUA) para a análise estatística. Quando identificado efeito de algum tratamento, comparou-se as médias pelo teste Tukey. Adotou-se um nível de significância de 10% em todas as análises estatísticas.

3 Resultados

3.1 Experimento 1

Neste experimento, 10,9% (13/119) das fêmeas apresentaram ESCT1, 30,2% (36/119) ESCT2 e 58,8% (70/119) apresentaram ESCT3. A proporção de fêmeas com alta expressão de cio (ESCT3) indica uma excelente resposta dos animais ao protocolo.

O diâmetro do folículo dominante no momento da IATF foi semelhante ($P > 0,10$) entre os grupos de ESCT1, 2 e 3, assim como entre os animais que receberam ou não GnRH (Tabela 1).

No momento da avaliação 42% (38/91) das fêmeas não apresentaram folículo dominante. Das fêmeas classificadas como ESCT1, 25% (3/12) não apresentaram folículo dominante no momento da IATF, das de ESCT2 40% (14/35) e das de ESCT3 50% (25/50).

A taxa de concepção geral foi 52,5% (62/119), quando observada as taxas obtidas em função do ESCT e da aplicação de GnRH (Tabela 1) não foi verificada diferença significativa ($P > 0,10$) entre os grupos.

271 Tabela 1. Diâmetro do folículo dominante na IATF (DFIATF) e taxa de concepção (TC)
 272 de vacas Nelore lactantes de acordo com a intensidade do estro (ESCT) e o tratamento
 273 com GnRH no momento da IATF.

	ESCT						Valor P		
	Sem GnRH			GnRH			ESCT	GnRH	ESCT*GnRH
	1	2	3	1	2	3			
DFIATF (mm)	10,4 ±1,65	10,5 ±1,57	11,4 ±2,61	10,2 ±0,51	10,6 ±2,22	11,6 ±3,91	0,32	0,41	0,68
TC (%)	33,3 (2/6)	47,3 (9/20)	55,8 (19/34)	57,1 (4/7)	56,2 (9/16)	52,7 (19/36)	0,83	0,52	0,67

274 ESCT = escore de remoção de tinta da cauda, onde ESCT1 - sem remoção de tinta = sem expressão de
 275 cio; ESCT2 - pouca remoção de tinta = baixa expressão de cio; ESCT3 - muita ou remoção total de tinta =
 276 alta expressão de cio.

277

278 3.2 Experimento 2

279 Neste experimento, 9,1% (3/33) das fêmeas apresentaram ESCT1, 39,4 %
 280 (13/33) ESCT2 e 51,5% (17/33) ESCT3.

281 A taxa de ovulação foi superior ($P < 0,10$) para o grupo de ESCT3, mas não
 282 variou em função do tratamento com GnRH (Tabela 2).

283 A área do corpo lúteo não diferiu em função do ESCT ou do uso de GnRH
 284 (Tabela 2). A vascularização do corpo lúteo, porém, foi maior ($P < 0,10$) no grupo de
 285 ESCT3. Da mesma forma, fêmeas que receberam GnRH tiveram maior ($P < 0,10$)
 286 vascularização em relação às que não receberam (Tabela 2).

287

288 Tabela 2. Taxa de ovulação (TO), área do corpo lúteo (ACL) e vascularização do corpo
 289 lúteo (VSCL) de vacas Nelore lactantes em função da intensidade do estro (ESCT) e o
 290 tratamento com GnRH.

	Tratamentos						
	ESCT			Uso GnRH		Valor P	
	1	2	3	Sem GnRH	GnRH	ESCT	GnRH
TO (%)	66,6 ^b (2/3)	92,3 ^{ab} (12/13)	100 ^a (17/17)	94,1 (16/17)	93,7 (15/16)	0,08	0,67
ACL (mm ²)	259,5	280,6	274,1	273,7	277,7	0,87	0,75
VSCL (%)	45 ^b	56,6 ^b	68,5 ^a	57,8 ^b	67,3 ^a	0,07	0,08

291 ESCT = escore de remoção de tinta da cauda, onde ESCT1 - sem remoção de tinta = sem expressão de
 292 cio; ESCT2 - pouca remoção de tinta = baixa expressão de cio; ESCT3 - muita ou remoção total de tinta =
 293 alta expressão de cio. *Médias seguidas de letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem entre si
 294 pelo teste de Tukey ($P < 0,10$).
 295

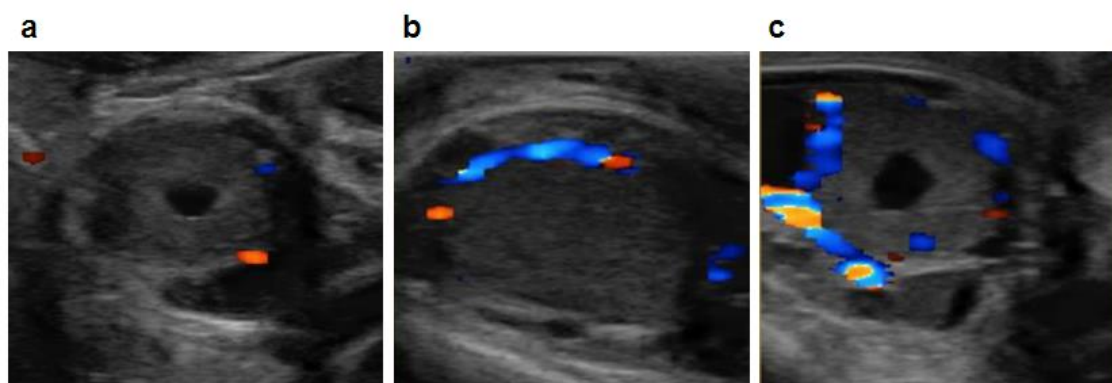


Figura 3 – Exemplos de vascularização do corpo lúteo (VSCL) observados 7 dias após a IATF: (a) 10% VSCL; (b) 50% VSCL; (c) 85% VSCL.

4 Discussão

A utilização do ESCT tem sido recomendada para otimizar os resultados da IATF, pois permite identificar fêmeas com alta expressão de cio e, portanto, maior probabilidade de prenhez [9, 11]. Por esse motivo acredita-se que essa ferramenta seja uma alternativa interessante para selecionar fêmeas que devam receber o sêmen sexado, que, em geral, apresenta fertilidade inferior. O presente estudo é o primeiro a testar este método de avaliação de cio em um protocolo de IATF a base de estradiol/progesterona com sêmen sexado.

Neste experimento, a IATF foi realizada 60 horas após a retirada do dispositivo de P4. Essa estratégia foi proposta por Baruselli et al. [4], para permitir que o espermatozoide sexado, que tem menor sobrevivência no trato genital da fêmea, fosse depositado em um momento mais próximo da ovulação, aumentando as chances de prenhez. Buscando ainda melhores resultados associamos ao horário da IA, a avaliação do ESCT e a aplicação do GnRH.

Já foi demonstrado que fêmeas Nelore com alta expressão de cio (ESCT3) apresentam diâmetro do folículo dominante significativamente superior no momento da IATF (ESCT1 = 10,3 mm; ESCT2 = 12,6 mm; ESCT3 = 14 mm; $P < 0,05$) quando avaliado 44 a 54 horas após a retirada do dispositivo de P4 [9], esse fato não foi observado no presente estudo, 60 horas após a retirada do dispositivo de P4, e pode estar ligado ao momento em que as fêmeas ovularam.

Neves [12] relatou que vacas com ovulação prematura (ocorrida de 48 a 59 h após a remoção do dispositivo P4) apresentaram folículo ovulatório maior ($14,0 \pm 2,2$ mm) do que vacas com ovulação tardia ($11,4 \pm 2,2$ mm; 73 a 96 h após a remoção do dispositivo P4) e vacas com ovulação no tempo esperado (60 a 72 h após remoção do

334 dispositivo P4), que apresentaram folículos ovulatórios de diâmetro intermediário (13,6
335 $\pm$ 2,1 mm). No experimento 1, 42% das fêmeas já haviam ovulado no momento da
336 avaliação, sendo a maioria delas de ESCT2 e 3, portanto, acredita-se que as vacas que já
337 haviam ovulado eram as de maior diâmetro folicular, restando as demais de diâmetro
338 intermediário similar, o que justifica não ter sido notada diferença significativa entre
339 vacas de ESCT1, 2 e 3.

340 A taxa de concepção de fêmeas sem expressão de cio (ESCT1) tratadas com
341 GnRH foi 23,8% maior em relação as vacas não tratadas de mesmo ESCT. Além disso,
342 no grupo sem GnRH a taxa de concepção foi 22,5% superior para vacas com alta
343 expressão de cio (ESCT3) comparada às de ESCT1. Embora não tenha sido observada
344 diferença significativa, a diferença observada em função do ESCT e da aplicação de
345 GnRH refletiram em taxas de concepção próximas às relatadas na literatura para sêmen
346 convencional [4, 9, 15], um resultado bastante satisfatório, já que em geral, o sêmen
347 sexado apresenta taxas de concepção inferiores quando comparado ao convencional [4].
348 Estes resultados corroboram com os de Sá Filho et al. [18], que observaram taxa de
349 prenhez semelhante entre sêmen convencional e sexado (58,9% e 56,8%,
350 respectivamente) em vacas *Bos indicus* lactantes que apresentam folículo maior ($\geq$ 9
351 mm) no momento da IATF (60 a 64 horas após a retirada do dispositivo de P4).

352 O experimento 2 foi desenvolvido com o objetivo de investigar demais
353 parâmetros ligados a concepção que pudessem esclarecer os resultados obtidos no
354 Experimento 1, já que diferenças numéricas observadas não foram estatisticamente
355 explicadas.

356 Nesse experimento foi possível verificar que a taxa de ovulação de vacas com
357 alta expressão de cio (ESCT3) é significativamente superior. A partir destes resultados
358 infere-se que, os mecanismos fisiológicos que interferem sobre a ovulação parecem ter
359 ocorrido de forma bem sucedida em fêmeas com alta expressão de cio. A expressão do
360 cio é estimulada pelo aumento das concentrações de estradiol que, por sua vez, é
361 fundamental para a ocorrência do pico pré-ovulatório de LH, responsável pela indução
362 da ovulação [13], o que poderia justificar os resultados obtidos. Deve-se ressaltar que os
363 efeitos da secreção adequada de estradiol repercutem até a fase lútea, auxiliando na
364 preparação do ambiente materno para a prenhez [14].

365 Havia uma expectativa de que a taxa de ovulação também fosse incrementada
366 com a aplicação do GnRH, o que não foi observado neste experimento, corroborando os
367 resultados obtidos por outros autores trabalhando com fêmeas Nelore e a mesma dose

368 de GnRH utilizada no presente experimento [5, 15]. Esses resultados podem estar
369 relacionados ao momento do tratamento com GnRH em relação ao pico de LH
370 endógeno. A administração de GnRH próximo ao início do cio pode induzir o pico do
371 LH ou aumentar sua magnitude [16], contudo, após o pico espontâneo de LH endógeno
372 foi demonstrado que o tratamento com GnRH resultou em pico de menor duração e
373 magnitude reduzida [17]. Provavelmente a aplicação de GnRH 60 horas após retirada do
374 dispositivo de P4 ocorreu após o pico espontâneo de LH, não beneficiando a taxa de
375 ovulação.

376 O sistema de vascularização do CL é responsável pelo fornecimento de
377 nutrientes para as células lúteas, indispensáveis para a manutenção da secreção de P4
378 [19]. A manutenção da secreção de progesterona por um corpo lúteo viável é vital no
379 início da gestação, sendo a luteólise prematura uma das principais causas de perda
380 embrionária [20]. Fêmeas bovinas que expressam cio de maior intensidade apresentam,
381 em geral, corpos lúteos maiores e consequentemente maiores concentrações séricas de
382 P4 durante a fase lútea [8], o que deve estar associado à maior vascularização do CL.
383 No presente estudo foi observada maior vascularização do CL em vacas de alta
384 expressão de cio, o que poderia beneficiar a manutenção da gestação.

385 O GnRH apresenta capacidade luteinizante, que auxilia na formação de um CL
386 de melhor qualidade e, consequentemente, na manutenção da gestação [20]. Nas
387 condições desse experimento somente a vascularização foi influenciada pela aplicação
388 de GnRH e essa reposta por si só, reflete positivamente sobre a manutenção da
389 gestação.

390 Pugliesi et al. [21] testando o uso da ultrassonografia color-doppler para
391 otimizar a seleção de receptoras com melhor receptividade para transferência de
392 embriões produzidos *in vitro*, observaram um aumento progressivo na prenhez/TE
393 associado ao aumento da vascularização luteal (Baixa, 45,1%^B; Média, 55,9%^{AB}; e Alta,
394 62,3%^A; $P < 0,05$). Fêmeas de ESCT3 e que receberam GnRH apresentaram taxa de
395 vascularização semelhante as consideradas de alta vascularização no experimento de
396 Pugliesi et al. [21] que realizou a avaliação do CL no mesmo dia do protocolo que o
397 presente estudo.

398 Diante disso, acredita-se que as diferenças numéricas observadas no primeiro
399 experimento podem ser consideradas como biologicamente relevantes, podendo ser
400 justificadas pela maior taxa de ovulação e maior taxa de vascularização observadas no
401 segundo experimento nos grupos em que as vacas apresentaram maior intensidade de

402 cio. A aplicação do GnRH nas vacas que não expressaram cio tornou os corpos lúteos
403 mais vascularizados e pode justificar o fato da taxa de concepção não ter variado entre
404 os animais com diferentes intensidades de cio na mesma proporção observada no grupo
405 não tratado.

406 Estudos futuros seriam importantes para verificar se a aplicação de GnRH em
407 vacas com diferentes ESCT submetidas a protocolos IATF com sêmen sexado no
408 horário convencional de inseminação (44 a 54 horas após a retirada do dispositivo de
409 P4) promoveria resultados semelhantes aos observados com a IATF 60 horas após a
410 retirada do dispositivo de P4, manejo que é mais difícil de implementar nas fazendas
411 pois demanda a realização de manejos noturnos.

412

413 **5 Conclusão**

414 Fêmeas com alta expressão de cio apresentaram maior taxa de ovulação e maior
415 vascularização do corpo lúteo, e a aplicação de 100 µg de GnRH no momento da
416 inseminação foi capaz de melhorar a taxa de vascularização do corpo lúteo 7 dias após a
417 IATF, resultados que justificariam maior taxa de concepção à IATF com sêmen sexado.

418 Diante disso, a avaliação do ESCT imediatamente antes da IATF e a aplicação de
419 GnRH no momento da inseminação em animais que não expressaram cio mostraram-se
420 estratégias interessantes para otimizar protocolos de IATF com sêmen sexado.

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

6 Referências Bibliográficas

- [1] Schenk JL, Seidel Jr, GE. Imminent Commercialization of Sexed Bovine Sperm. The Range Beef Cow Symposium XVI 1999; 89-96.
- [2] Seidel Jr. GE, Garner DL. Current status of sexing mammalian spermatozoa. Reproduction (Cambridge, England) 2002; 124:733-743.
- [3] Mocé E, Graham JK, Schenk JL. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. Theriogenology 2006; 66: 929-936.
- [4] Baruselli PS, Souza AH, Martins CM, Gimenes LM, Sales JNS, Ayres H, Andrade AFS, Raphae CF, Arruda RP. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. Revista Brasileira de Reprodução Animal 2007; 31: 374-381.
- [5] Sá Filho MF, Ayres H, Ferreira RM, Marques MO, Reis EL, Silva RCP, Rodrigues CA, Madureira EH, Bó GA, Baruselli PS. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. Theriogenology 2010; 73:651-658.
- [6] Bishop BE, Thomas JM, Abel JM, Poock SE, Ellersieck MR, Smith MF, Patterson DJ. Split-time artificial insemination in beef cattle: I—Using estrous response to determine the optimal time (s) at which to administer GnRH in beef heifers and postpartum cows. Theriogenology 2016; 86: 1102-1110.
- [7] Hill SL, Grieger DM, Olson KC, Jaeger JR, Dahlen CR, Crosswhite MR, Fischer MC. Gonadotropin-releasing hormone increased pregnancy risk in suckled beef cows not detected in estrus and subjected to a split-time artificial insemination program. Journal of animal science 2016; 94: 3722-3728.
- [8] Sá Filho MF, Santos JEP, Ferreira RM, Sales JNS, Baruselli PS. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. Theriogenology 2011; 76: 455-463.
- [9] Nogueira E, Silva MR, Silva JCB, Abreu UPG, Anache NA, Silva KC, Cardoso CJT, Sutovsky P, Rodrigues WB. Timed artificial insemination plus heat I: effect of estrus expression scores on pregnancy of cows subjected to progesterone—estradiol-based protocols. Animal 2019; 1-8.
- [10] Houghton PL, Lemenager RP, Moss GE, Hendrix KS. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. Journal of animal science 1990; 68: 1428-1437.
- [11] Nogueira E, Silva JCB, Silva MR, Silva AS, Rodrigues WB, Bezerra AO, Jara J, Silva KC, Anache NA. IATF + CIO: estratégia prática de avaliação de cio e aumento de prenhez. Embrapa Pantanal 2016; 133:1-8.
- [12] Neves KAL. Effect of interval between insemination and ovulation in conception rates in Nelore cows timed AI with sexsorted. Master Diss. University of Sao Paulo, Brazil. 2010; 57.
- [13] Bertan CM, Binelli M, Madureira EH. Mecanismos endócrinos e moleculares envolvidos na formação do corpo lúteo e na luteólise - revisão de literatura. Brazilian J Vet Res Anim Sci 2006; 43: 824-40.
- [14] Perry GA, Perry BL. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. Domestic Animal Endocrinology 2008; 34: 333-338.
- [15] Rodrigues WB, Silva AS, Silva JCB, Anache NA, Silva KC, Cardoso CJT, Garcia WR, Sutovsky P, Nogueira E. Timed artificial insemination plus heat II: gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores increased

- 486 pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. *Animal* 2019; 1-6.
- 487 [16] Kaim M, Bloch B, Wolfenson D, Braw-Tal R, Rosenberg M, Voet H, et al. Effects
488 of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation. *J Dairy*
489 *Sci* 2003;86:2012–2021.
- 490 [17] Lucy MC, Stevenson JS. Gonadotropin-releasing hormone at estrus: Luteinizing
491 hormone, estradiol, and progesterone during the periestrual and post insemination
492 periods in dairy cattle. *Biol Reprod* 1986; 35:300-311.
- 493 [18] Sá Filho MF, Girotto R, Abe EK, Penteado L, Campos Filho EP, Moreno JF, Sala
494 RV, Nichi M, Baruselli, PS. Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed
495 artificial insemination programs for suckled beef cows. *J Anim Sci* 2012; 90: 1816–
496 1823.
- 497 [19] Ayres H, Mingoti GZ. Angiogênese, vascularização e uso do ultrassom Doppler
498 colorido na avaliação de estruturas ovarianas. *Rev Bras Reprod Anim* 2012; 36:
499 174-180.
- 500 [20] Peters AR. Veterinary clinical application of GnRH—questions of efficacy. *Anim*
501 *Reprod Sci* 2005; 88: 155–67.
- 502 [21] Pugliesi G, Silva JCB, Nishimura T, Miyai D, Silva LA, Binelli M. Use of Color-
503 Doppler ultrasonography to improve selection of higher fertility beef recipient
504 cows for embryo transfer. Proc of the 30th Ann Meet of the Braz Embryo Tech So
505 (SBTE); Foz do Iguaçu, PR, Brazil, August 25th to 27th, 2016. p.454.
- 506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535

CAPÍTULO 3 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um dos grandes gargalos da utilização do sêmen sexado em protocolos de IATF são as baixas taxas de concepção obtidas e o elevado preço das doses quando comparadas a doses de sêmen convencional. No entanto, neste experimento ficou claro que, em boas condições de manejo e adaptando o protocolo para favorecer o uso deste tipo de sêmen, já é possível alcançar taxas de concepção satisfatórias, o que poderia justificar a utilização desta biotecnologia do ponto de vista econômico.

Além disso, foi possível atingir resultados significativamente melhores em parâmetros ligados a manutenção da gestação utilizando a avaliação do ESCT e a aplicação de GnRH, mesmo em um pequeno número de animais.

A avaliação do ESCT em especial teve influência sobre a taxa de ovulação de forma que, vacas com alta expressão de cio apresentaram maior taxa de ovulação. Logo, otimizando o protocolo em mais um aspecto e sendo a estratégia de menor custo testada neste experimento.

Sugere-se novos estudos testando a avaliação do ESCT e aplicação de GnRH em protocolos IATF com sêmen sexado no horário convencional de inseminação (44 a 54 horas após a retirada do dispositivo de P₄) para determinar se estas estratégias seriam capazes de otimizar o protocolo de forma tal que o atraso na inseminação seria desnecessário, facilitando assim o manejo.