



Aspectos uterinos, foliculares e seminais que afetam a IATF em vacas de corte no período pós-parto
Uterine, follicular and seminal aspects that affect timed AI

Jéssica de Souza Andrade¹, Elizângela Mírian Moreira², George Moreira da Silva³, Vanessa Lemos de Souza³, Vanessa Rachele Ribeiro Nunes⁴, Jair Sabio de Oliveira Júnior¹, José Roberto Potiens⁵, Luiz Francisco Machado Pfeifer^{6, ‡}

¹Bionorte, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia, Porto Velho, RO, Brasil.

²Bolsista Pós-Doc, FAPERO, Fundação de Amparo ao Desenvolvimento das Ações Científicas e Tecnológicas e à Pesquisa, Porto Velho, RO, Brasil.

³UNIR, Universidade Federal de Rondônia, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente, Porto Velho, RO, Brasil.

⁴FIMCA, Faculdades Integradas Aparício Carvalho, Porto Velho, RO, Brasil.

⁵Seleon Biotecnologia, Itatinga, SP, Brasil.

⁶Embrapa, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Porto Velho, RO, Brasil.

Resumo

O objetivo desse artigo é apresentar os resultados de pesquisas realizadas pelo laboratório de Biotecnologia da Embrapa Rondônia acerca de alguns dos eventos uterinos, foliculares e seminais que afetam a fertilidade de vacas submetidas a protocolos de inseminação artificial em tempo-fixado (IATF). Em avaliação retrospectiva dos resultados de IATF de 1152 vacas de corte no período pós-parto submetidas à IATF em diferentes dias pós-parto (DPP), observou-se que vacas submetidas à IATF antes de 35 DPP tem menor ($P \leq 0,05$) prenhez por IA (P/IA). Além disso, no intuito de esclarecer a relação entre DPP e fertilidade dos protocolos de IATF, realizou-se um estudo prospectivo que avaliou a condição uterina de 244 vacas Nelore em diferentes DPP por meio da proporção de células polimorfonucleares (PMN) no tecido endometrial. Observou-se que as vacas submetidas à IATF antes dos 30 DPP apresentaram maior proporção de células PMN (9,0%; $P < 0.001$) no útero e maior descarga vaginal purulenta quando comparadas às vacas submetidas à IATF entre 31 e 45 DPP e entre 46 e 60 DPP (3,8 e 2,2 %, respectivamente; $P < 0.001$). Em relação à P/IA, vacas submetidas à IATF entre 31 e 35 DPP e entre 46 e 60 DPP apresentaram uma maior ($P < 0.001$) P/IA (45,2%, 52/115 e 52,3%, 34/65, respectivamente) quando comparado à vacas submetidas antes dos 30 DPP (29,7%, 19/64). Experimentos avaliando a resposta ovariana de vacas submetidas à IATF também foram realizados. Em estudos retrospectivos pode-se observar que a resposta ovariana de vacas apresenta-se, de acordo com a distribuição do diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO), de forma gaussiana. Assim, sugeriu-se atrasar a inseminação de vacas que desenvolveram menor FPO e verificou-se que vacas múltiparas submetidas à protocolos de 3 manejos que desenvolvem FPOs menores podem ser inseminadas mais tarde em relação à vacas que desenvolvem FPOs maiores. Dessa forma, pode-se observar melhora na P/IA em comparação à protocolos tradicionais. Por fim, baseado no fato de que diferentes partidas de sêmen podem apresentar diferença na cinética espermática, realizou-se um experimento em que vacas com ovulação precoce e tardia foram inseminadas com sêmen hiperativado (H+) e não-hiperativado (H-). Nesse estudo observou-se que vacas com FPOs menores tem uma menor probabilidade de engravidar quando inseminadas com sêmen H+. Em contrapartida, as vacas com ovulação tardia e precoce, quando inseminadas com sêmen H- podem alcançar boa P/IA. Conclui-se que é importante considerar um adequado período voluntário de espera para submeter vacas de corte à programas de IATF. Além disso, notou-se que é possível realizar algumas mudanças no momento da inseminação, de acordo com a resposta ovariana, que podem melhorar a fertilidade, sendo que resposta ovariana ainda pode servir como ferramenta para ser associada às características cinéticas do sêmen no intuito de aumentar a fertilidade de vacas pós-parto submetidas à IATF.

Palavras-chave: corte, fertilidade, gametas e vacas.

Abstract

The objective of this study was to demonstrate the research data collected by the laboratory of biotechnology from Embrapa Rondônia on some uterine, follicular and seminal events that affect the fertility of timed insemination artificial (TAI). A retrospective analyses of the data from 1,152 cows subjected to TAI in different days postpartum (DPP), it was observed that cows that entered into the TAI protocol before 35 DPP had lower ($P \leq 0.05$) pregnancy per AI (P/AI). Furthermore, aiming to study the relationship between DPP, uterine health and the fertility of TAI protocols, a prospective study that evaluated 244 Nelore cows in different DPP was performed. Endometrial samples were collected on Day 0 of the TAI protocol to analyse the proportion of polymorphonuclear cells. It was observed that cows subjected to TAI before 30 DPP had less ($P < 0.05$)

[‡]Correspondência: luiz.pfeifer@embrapa.br

Recebido: 19 de setembro de 2018

Aceito: 18 de janeiro de 2019



pregnancies per AI (P/AI) than cows from Middle and Late groups; 29.7% (19/64), 45.2% (52/115), and 52.31% (34/65), respectively. Accordingly, cows subjected to TAI before 30 DPP had a greater ($P < 0.05$) proportion of PMN cells in the uterus than cows with 30 to 45 and cows with 46 to 60 DPP (9.0%, 3.8%, and 2.2%, respectively). Studies aiming evaluate the ovarian response from cows subjected to TAI protocols were also performed. It was observed that the proportion of cows developing preovulatory follicles (POF) presented a gaussian curve. Thus, it was suggested that cows with smaller POFs can be inseminated later than cows with larger POFs. Therefore, it was observed that this methodology increases P/AI in comparison to conventional protocols. Finally, since different semen batches can demonstrate different kinematics characteristics, an experiment in wich cows with Early and Late ovulation (EO and LO, respectively) were inseminated with semen considered as Hyperactivated (H+), and Non-Hyperactivated (H-) was performed. Pregnancy per AI (P/AI) was higher ($P < 0.05$) for EOH+, EOH-, and LOH- groups than for LOH+ group. Based on these considerations, it was observed that is important to consider an adequate waiting voluntary period to subject beef cows to TAI programs. Moreover, it was infered that some changes in the time of AI, according to the POF diameter, can increase fertility. Therefore, the the ovarian response can be an important tool to associate to the kinematics characteristics of semen aiming to increase fertility of postpartum cows subjected to TAI.

Keywords: *beef, cows, fertility and gametes.*

Introdução

Os programas de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) são considerados parte integrante do manejo reprodutivo em muitos rebanhos de corte e oferecem oportunidades de incorporar receita aos sistemas de cria por apresentar vantagens, como: potencializar o uso da inseminação artificial (IA), redução das perdas de diagnóstico de estro, concentração da parição, obtenção de lotes de bezerros mais homogêneos, antecipação da prenhez em até 30 dias, bezerros com maior peso e uniformidade à desmama, fêmeas com maior probabilidade de ficar gestante aos 24 meses, melhor performance reprodutiva na estação subsequente, redução da estação reprodutiva e de nascimento, redução do manejo, redução do número de touros na propriedade e aumento do ganho genético.

Após o surgimento e avanço da IATF, a comercialização de sêmen bovino aumentou 300% entre os anos de 2000 a 2011 de acordo com dados da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2017) e, em 2015, aproximadamente 10.000.000 de bovinos do rebanho comercial foram envolvidos em programas de IATF (Bo et al., 2016). A IATF movimenta aproximadamente R\$ 567 milhões, sendo realizada em 8,2 milhões de vacas de corte, gerando um aumento de 8% na produção de bezerros, o que representa aproximadamente 656 mil bezerros a mais por ano em comparação à monta natural (Baruselli et al., 2017).

Os protocolos de IATF que utilizam ésteres de estradiol, progesterona e prostaglandina proporcionam fertilidade satisfatória em rebanhos comerciais brasileiros. Nesses procedimentos de IATF, o estabelecimento da prenhez depende da interação harmônica entre os eventos foliculares ovarianos, ocasionados pela manipulação exógena do ciclo estral, os eventos uterinos e os seminais. Ainda que os protocolos de IATF convencionalmente utilizados em fazendas de corte demonstrem boa eficiência, vários estudos têm sido realizados para avaliar os fatores que afetam a fertilidade desses protocolos, como: a concentração hormonal, a duração do tratamento com progestágenos, o tempo e a dose da administração de PGF_{2α}, o indutor de ovulação (ECP, BE, LH, GnRH), o período do ciclo estral, ordem de parto, diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO), e a dose da gonadotrofina coriônica equina (eCG), entre outros (Meneghetti et al., 2009; Sa Filho et al., 2009).

Nesse contexto, o objetivo desse artigo é apresentar os resultados de pesquisas que o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Rondônia tem desenvolvido acerca de alguns dos eventos relacionados ao útero, ao folículo pré-ovulatório (FPO) e ao sêmen que afetam a fertilidade dos protocolos de IATF.

Saúde uterina pós-parto

Após o parto, o útero passa por uma série de alterações morfofuncionais que corroboram para o restabelecimento da função reprodutiva. A eficiente reparação endometrial determina a saúde uterina e a fertilidade de vacas de corte pós-parto. No momento do parto, as barreiras físicas constituídas pela cérvix, vagina e vulva ficam comprometidas, possibilitando a invasão de bactérias do ambiente externo para trato genital, bem como da pele e das fezes do animal (Elliot et al., 1968; Gier e Marion, 1968; Sheldon e Dobson, 2004). Alterações nos mecanismos de defesa local do útero e a consequente persistência de patógenos, principalmente *Trueperella pyogenes*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Escherichia coli*, *Fusobacterium necrophorum* e *Prevotella melaninogenicus* (Williams et al., 2005; Bicalho et al., 2016), pode resultar em quadros de afecções uterinas (Sheldon et al., 2009) e gerar perdas na produtividade dos rebanhos (Radostits et al., 2002).

Casos de endometrite severa pós-parto são pouco detectados ou possuem limitado impacto na performance reprodutiva (Santos et al., 2009) de vacas de corte. Ainda assim, a endometrite subclínica (ESC), condição inflamatória do útero caracterizada pela infiltração de células polimorfonucleares (PMN) e com ausência de sinais clínicos, resulta em uma significativa redução da performance reprodutiva (Kasimanickam et al., 2004; Sheldon

et al., 2009; Ricci et al., 2017). A ESC pode atingir até 26% das vacas leiteiras entre 40 e 60 dias pós-parto (DPP) (Cheong et al., 2011), e 23% após 50 DPP em vacas de corte (Ricci et al., 2015). Além disso, associado à infiltração de PMN no útero, vacas durante o puerpério apresentam alta secreção de citocinas pró-inflamatórias incluindo as Interleucinas (IL)-1 β , IL-6, e IL-8 e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α).

Apesar de que alguns autores indicam que a recuperação uterina não ocorre antes da sexta semana pós-parto (Call, 1989; Dadarwal et al., 2017; Sheldon, 2004), a necessidade de atingir metas de produção induz as propriedades de bovinos de corte a realizar um manejo reprodutivo mais intensivo. Assim, vacas têm sido submetidas à protocolos de IATF entre 30 e 60 DPP (Sa Filho et al., 2009; Vasconcelos et al., 2009; Sa Filho et al., 2010, 2011; Sales et al., 2011, 2012; Pfeifer et al., 2014). Esses protocolos realizados precocemente após o parto têm demonstrado bons índices de prenhez por IA (P/IA), variando de 46% a 65%. Apesar disso, nenhum dos estudos realizados, nessas condições têm avaliado a relação entre a saúde uterina e a fertilidade no intuito de estabelecer o período pós-parto mais adequado para se iniciar um protocolo de IATF em vacas de corte. Estabelecer um mínimo de DPP ou período voluntário de espera (PVE) para inclusão de vacas de corte pós-parto em protocolos de IATF pode melhorar a eficiência de programas de IATF.

Baseado nessas informações, de acordo com o banco de dados consultado, realizou-se uma avaliação retrospectiva do efeito dos dias pós-parto na P/IA em vacas de corte submetidas à programas de IATF entre 2012 e 2017. Para tanto, 1152 vacas Nelore lactantes foram distribuídas em 7 grupos com intervalo de 5 dias de acordo com os DPP em que foram submetidas ao protocolo de IATF: 1) 30-35 DPP (n = 138); 2) 36-40 DPP (n = 106); 3) 41-45 DPP (n = 228); 4) 46-50 DPP (n = 235); 5) 51-55 DPP (n = 178); 6) 56-60 DPP (n = 118) e 7) >60 DPP (n = 149). Foram avaliados a P/IA, a chance de ocorrência de prenhez e os intervalos de confiança de 95% (Tab. 1). A curva ROC foi usada para estimar o ponto de corte de DPP relacionado à prenhez. Vacas submetidas à IATF antes de 35 DPP tem menor ($P \leq 0,05$) prenhez por IA (P/IA) comparado aos demais grupos. Considerando as chances de ocorrência, todos os grupos diferiram significativamente ($P < 0,05$) do grupo 1 (referência). Vacas submetidas a IATF após 35DPP tiveram de 1.78 (IC = 1.08-2.93) a 1.99 (IC = 1.29-3.06) mais chances de ficarem prenhas. A curva ROC demonstrou que houve uma tendência ($P = 0,1$) para maior P/IA quando os protocolos de IATF foram iniciados após 37 DPP (área sob a curva: 0,527, sensibilidade: 89,3% e especificidade: 17,7%).

Tabela 1. Taxa de prenhez e razão de chances de vacas de corte submetidas a IATF em diferentes período pós-parto.

Grupo	Período pós-parto (dias)	Taxa de prenhez	Razão de chances	Intervalo de Confiança (95% IC)
1	30-35	39,1% (54/138) ^A	Referência	Referência
2	36-40	55,7% (59/106) ^B	1.95	1.17-3.26
3	41-45	56,1% (128/228) ^B	1.99	1.29-3.06
4	46-50	53,6% (126/235) ^B	1.80	1.17-2.76
5	51-55	55,1% (98/178) ^B	1.91	1.22-3.0
6	56-60	53,4% (63/118) ^B	1.78	1.08-2.93
7	>60	54,4% (81/149) ^B	1.85	1.16-2.96

^{AB}Valores com letras diferentes na mesma linha diferem entre os grupos ($P < 0.05$).

Após a análise desses dados, com o objetivo de esclarecer a relação entre DPP e fertilidade dos protocolos de IATF, realizou-se um estudo prospectivo que avaliou a condição uterina de vacas Nelore em diferentes dias pós-parto (DPP) por meio da proporção de células PMN no tecido endometrial (Pfeifer et al., 2018). Para isso, 244 vacas foram separadas em três grupos de acordo com os dias pós-parto (DPP): 1) Pós-parto Recente (n = 64), composto por vacas com DPP entre 21 a 30; 2) Pós-parto Médio (n = 115), composto por vacas com DPP entre 31 e 45 e 3) Pós-parto Tardio (n = 65), composto por vacas com DPP entre 46 e 60 submetidas à um protocolo de IATF a base de estradiol e progesterona (D0, 2 mg benzoato de estradiol + implante de P4; D8, 150 μ g PGF + 300 UI eCG + 0,5 mg ECP – implante de P4; e D10, IATF). No D0, antes do início do protocolo, as vacas foram submetidas à coleta citológica do tecido uterino por meio da técnica de *cytobrush*. As amostras coletadas foram fixadas em lâminas de vidro, coradas com kit Panótico (Corante Rápido RenyLab[®], Barbacena, Brasil) e depois submetidas à contagem de 200 células (incluindo células epiteliais e PMN, excluindo eritrócitos) sob microscopia óptica.

Um subgrupo de vacas (n = 148) foi examinado por vaginoscopia para avaliar e caracterizar a presença de corrimento vaginal (Pleticha et al., 2009) no D0 do protocolo de IATF. Independente do período pós-parto, todas fêmeas com corrimento vaginal purulento foram classificadas como vacas com descarga vaginal purulenta (DVP+).

Observou-se que as vacas do grupo Recente apresentaram maior proporção de células PMN (9.03 ± 1.47 ; $P < 0.001$) no útero e maior descarga vaginal quando comparado aos grupos Médio e Tardio (3.83 ± 0.72 e 3.83 ± 0.72 , respectivamente; $P < 0.001$; Tab. 2). Da mesma forma, a proporção de vacas com DVP+ foi maior ($P < 0,001$) no grupo Precoce, 45% (23/51), do que nos grupos Médio, 18% (9/50) e Tardio, 15% (7/47; Tab. 2).

Tabela 2. Resposta de fertilidade de vacas de acordo com o período no protocolo de IATF no pós-parto.

Parâmetros	Grupo			P-Valor
	Precoce	Médio	Tardio	
Proporção de células PMN* ¹ (%)	9.03 ± 1.47 ^A	3.83 ± 0.72 ^B	2.23 ± 0.42 ^B	<0.001
Vacas com DVP+ ^{1**}	45% ^A (23/51)	18% ^B (9/50)	15% ^B (7/47)	<0.001
Prenhez por AI ²	29.7% ^A (19/64)	45.2% ^B (52/115)	52.3% ^B (34/65)	0.02

*Células polimorfonucleares; **Baseado na presença de descarga vaginal purulenta; ¹Descarga vaginal e proporção de células PMN observadas entre os subgrupos de vacas (148 de 244) no Dia 0; ²Todas vacas; ^{AB}Valores com letras diferentes na mesma linha diferem entre os grupos (P < 0.05).

Em relação à P/IA, os animais dos grupos Médio e Tardio apresentaram uma maior (P < 0.001) P/IA (45.2%, 52/115 e 52.3%, 34/65, respectivamente) quando comparado ao grupo Precoce (29.7%, 19/64; Tab. 2). Independentemente dos dias pós-parto, as vacas com menor proporção (<2,5%) de células PMN no útero tiveram 11,8 vezes mais chances de ficarem prenhas do que as vacas com maior proporção (> 15%) de células PMN (P < 0,001; Tab. 3). Em vista desses resultados, o modelo de regressão indicou uma relação negativa entre DPP e proporção de PMN no endométrio uterino (% PMN = 13,3 - 0,23 * DPP; R = 0,36; P < 0,001; Fig. 1) e com base na curva ROC, o ponto de corte de > 35,5 DPP foi correlacionado com o estado de prenhez na IATF. Esse ponto de corte ótimo apresentou 69,5% de especificidade e 48,2% de sensibilidade (AUC = 0,58, P = 0,01; Fig. 2).

O estabelecimento de um apropriado PVE para incluir vacas de corte pós-parto em programas de IATF pode melhorar a eficiência reprodutiva dos protocolos. Os estudos descritos acima indicam que as vacas com DPP adequado e um útero mais saudável, devido à redução da proporção da inflamação e o progresso da involução uterina, tem mais chances de conceber logo ao primeiro serviço pós-parto. Além disso, em fazendas que utilizam manejo reprodutivo intensivo, o exame ginecológico de vacas pré-IATF pode reduzir as perdas na fertilidade, pois pode-se excluir dos protocolos vacas que ainda apresentam descarga vaginal purulenta.

Tabela 3. Fator de risco para a ocorrência de gestação de acordo com a proporção de células PMN no útero em vacas de corte pós-parto por IA.

Proporção de células PMN	P/AI, %	OR (95% CI)	P - Valor
0 – 2.5 %	54.2 (45/83) ^A	11.8 (1.45 - 96.80)	P < 0.01
3 – 6.5 %	40.0 (10/25) ^A	6.7 (0.73 - 60.55)	
7- 10.5 %	36.8 (7/19) ^A	5.8 (0.61 - 55.77)	
11 – 15 %	10.0 (1/10) ^B	1.1 (0.06 - 20.50)	
>15 %	9.1 (1/11) ^B	Referência	

^{AB} Valores com letras diferentes na mesma linha diferem entre os grupos (P < 0.05).

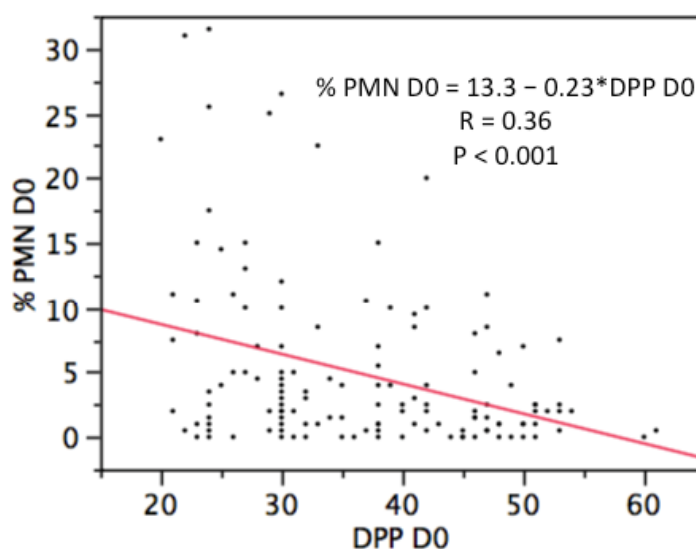


Figura 1. Relação entre a proporção de células PMN no endométrio uterino e dias pós-parto em vacas Nelore submetidas ao protocolo de IATF (Fonte: Pfeifer et al., 2018).

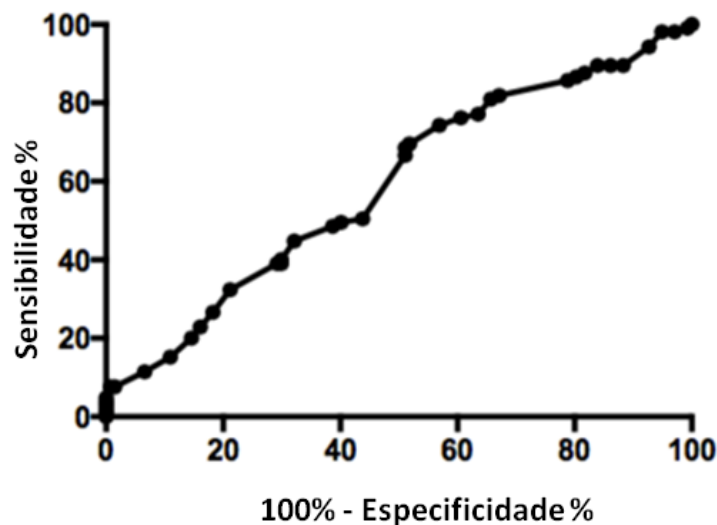


Figura 2. Curva Receiver Operating Characteristic (ROC) para determinar a relação entre o DPP e o estado de prenhez de vacas de corte. A análise do ROC indicou que o uso de um ponto de corte superior a 35,5 DPP apresentou 69,5% de especificidade e 48,2% de sensibilidade. Área sob a curva = 0,58, P = 0,01 (Fonte: Pfeifer et al., 2018).

Folículo pré-ovulatório ovariano

O sucesso dos programas de sincronização do ciclo estral e ovulação dependem de uma eficiente manipulação dos eventos biológicos relacionados ao ciclo estral, tais como o recrutamento de uma nova onda folicular, o controle da dominância folicular, a duração do proestro e o intervalo entre a indução da ovulação e a inseminação artificial (Bisinotto et al., 2010). Embora os protocolos de sincronização convencionalmente usados no Brasil representem um método eficaz e bem estabelecido para induzir a emergência e sincronizar a onda folicular, ainda há uma grande variação no diâmetro dos folículos ao final do programa de sincronização, fator que exerce influência nas taxas de concepção e na eficiência dos protocolos de IATF.

A capacidade ovulatória está associada ao diâmetro e/ou maturidade do folículo dominante (Gimenes et al., 2008; Sa Filho et al., 2010). Nesse sentido, quando avalia-se a resposta ovariana de vacas submetidas à protocolos de IATF, verifica-se que as fêmeas apresentam folículos de diferentes diâmetros e, conseqüentemente, distinto potencial ovulatório. Em estudos recentes, a equipe do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Rondônia avaliou dados de IATF de 1152 animais e foi possível observar a amplitude e variação no diâmetro do FPO no momento da IATF (Fig. 3). De acordo com a resposta ovariana, podemos inferir que fêmeas submetidas à protocolos de IATF apresentam dispersão na capacidade ovulatória (Pfeifer et al., 2015). Pode-se verificar que a resposta ovariana de vacas submetidas à protocolos de IATF apresenta uma distribuição gaussiana (Fig. 3), onde, 66% das fêmeas apresentam FPO com diâmetro entre 11 e 15 mm. No entanto, 34% apresentam FPO > 14 mm e < 11 mm. Esta variação na resposta ovariana pode ser explicada pelo maior ou menor intervalo entre a emergência da onda folicular até a ovulação (Bo et al., 2003; Kim et al., 2005; Martinez et al., 2005).

Em estudos retrospectivos em que se avaliou 17 lotes de IATF, pode-se observar que a distribuição do diâmetro do FPO de vacas submetidas à protocolos de IATF apresenta uma distribuição gaussiana. Além disso, quando agregou-se lotes de IATF que geraram P/IA ruim (<45%), média (45 – 60%) ou adequada (>60%), visualizou-se que a curva de Gauss tende a estar mais para a esquerda, em protocolos com resultados ruins e mais à direita, em protocolos com resultados adequados (Fig. 4). Assim observamos que quanto melhor a resposta ovariana aos protocolos de IATF, melhor é a P/IA do lote.

Em estudo anterior, observou-se que há uma razão direta entre diâmetro do folículo dominante e momento da ovulação (Pfeifer et al., 2015). Dessa forma, por meio de uma regressão linear foi possível estimar o momento da ovulação de acordo com o diâmetro do FPO (Tab. 4). Esta correlação indica que as vacas com folículos menores ovulam mais tarde do que as vacas com folículos maiores e, portanto, necessitam de um intervalo maior entre a remoção do implante intravaginal de progesterona e a IATF, o que permite o maior crescimento e maturação do FPO.

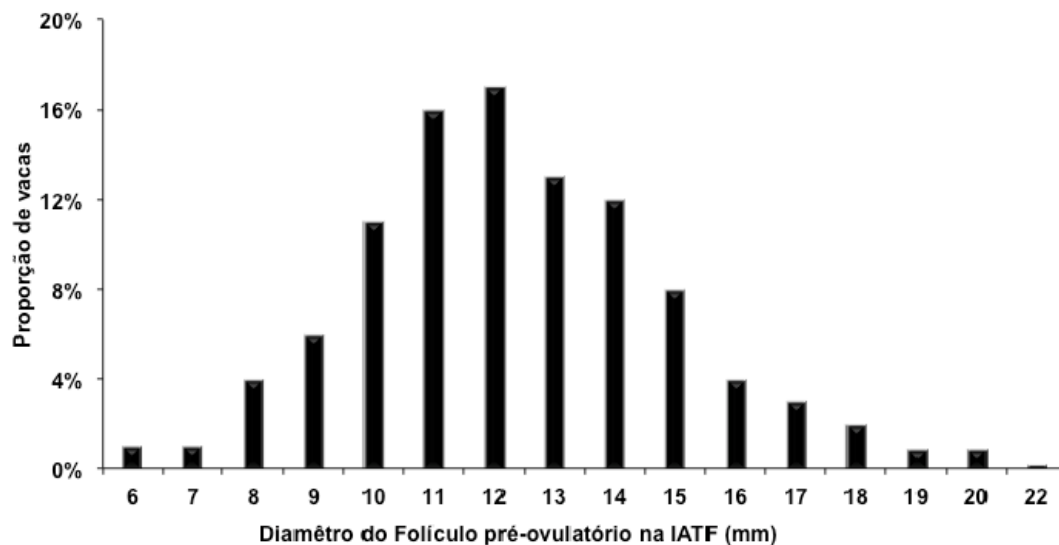


Figura 3. Proporção de vacas Nelore de acordo com o diâmetro do folículo pré-ovulatório detectado no momento da IATF (n = 1152) (Fonte: Pfeifer et al., 2018).

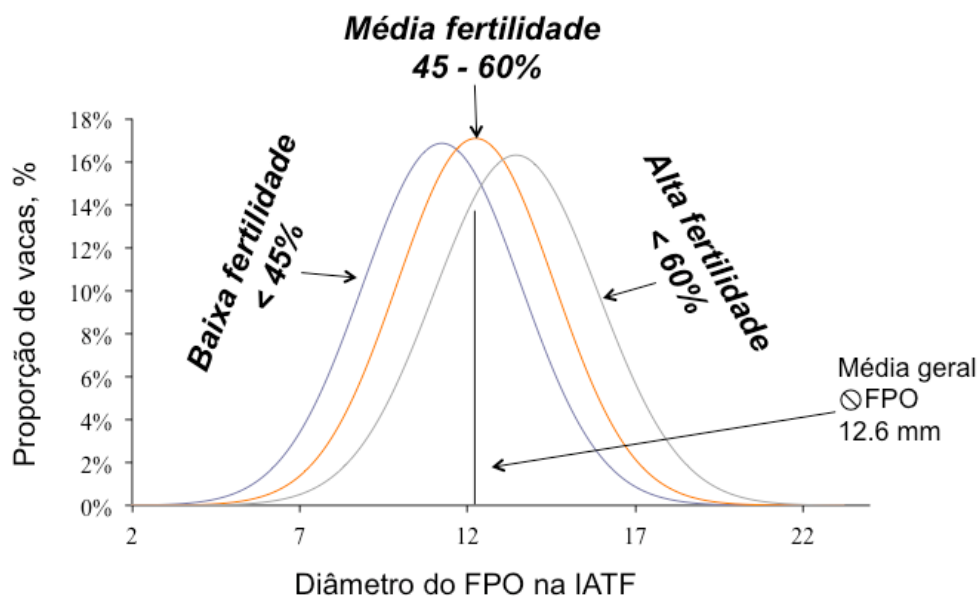


Figure 4. Distribuição gaussiana dos FPO de acordo com a fertilidade do protocolo. Foram avaliados 17 lotes de IATF, com um total de 1152 vacas.

Tabela 4. Tempo e/ou momento da ovulação, tempo estimado para IAB de acordo com o diâmetro do FPO (vacas Nelore, n = 96).

Diâmetro do FPO (mm)	Tempo da ovulação (h)	Tempo da inseminação, (h*)
8	96.46	72,46
9	82.8	58,8
10	73.85	49,85
11	52.54	28,54
12	44.42	20,44
13	34.5	10,5
14	27.78	3,78
15	26.18	2,18
16	24	0

*Calculado de acordo com o tempo de ovulação menos 24 h, relativo ao tempo aproximado de sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo da fêmea.

Baseando-se nessas observações, foi desenvolvida uma alternativa para inseminar vacas que apresentam FPO de diâmetro diferentes, a chamada IATF em blocos (IAB). Para tanto, um experimento com 412 vacas Nelore

multíparas foi realizado com o objetivo de inseminar as vacas de acordo com o diâmetro do FPO. As vacas entre 30 e 80 DPP foram submetidas a um protocolo de IATF a base de estradiol e progesterona (D0, 2 mg benzoato de estradiol + implante de P4; D8, 150 µg PGF + 300 UI eCG + 0,5 mg ECP – implante de P4; e D10, IATF). No D10 pela manhã, as vacas foram examinadas por ultrassonografia (US) para mensuração do diâmetro do FPO. Com base no diâmetro do FPO, foi possível estimar o momento da ovulação. Dessa forma, as vacas foram distribuídas em dois grupos de inseminação: Grupo Bloco (n=203) e Grupo Controle (n = 209). As vacas do grupo Bloco foram classificadas em um dos 4 lotes de inseminação: B0 (POF ≥ 15 mm, IATF imediatamente, após a US), n = 51), B1 (POF = 13–14.9 mm, IATF 6 h após a US, n = 70), B2 (POF = 10.1–12.9 mm, IATF 24 após a US, n = 54) e B3 (POF ≤ 10mm, IATF 30h após a US, n = 28). As vacas do Grupo controle (n = 209) foram inseminadas convencionalmente junto às vacas do grupo B0.

Observou-se, que ao atrasar a IATF em função do diâmetro do FPO, se conseguiu melhorar a prenhez por IA (P/IA), principalmente em vacas com folículos menores. As vacas do grupo Bloco apresentaram maior P/IA (P < 0.01) quando comparadas às vacas do grupo controle (129/203, 63.5% vs 102/209, 48.8%), respectivamente (Tab. 5). Portanto, um intervalo diferente entre a remoção do implante intravaginal de progesterona, pode ser necessário para alcançar uma melhor sincronia entre o momento da ovulação e a IATF. Essa condição pode ser facilmente avaliada por exame ultrassonográfico e utilizada como uma ferramenta para melhorar a tomada de decisões, identificando o momento ideal da IATF.

Efeito positivo do diâmetro do FPO sobre a porcentagem de vacas que ovularam e sobre o aumento da P/IA foram observados em vacas *Bos taurus* (Vasconcelos et al., 1999) e vacas *Bos indicus* (Meneghetti et al., 2009; Sa Filho et al., 2009). Contudo, no presente estudo o diâmetro do FPO não afetou P/IA de vacas inseminadas após IATF convencional ou de IAB. Assim, podemos observar que folículos com diferentes diâmetros não necessariamente possuem diferente fertilidade. A P/IA baixa observada em estudos anteriores em vacas com folículos menores, pode ocorrer em razão do momento inadequado em que a IA foi realizada.

Os protocolos de sincronização da ovulação com remoção do implante intravaginal de progesterona no Dia 8 e Dia 9 do protocolo foram descritos previamente por Baruselli et al. (2004) e Meneghetti et al. (2009), respectivamente, e são reconhecidos como os protocolos mais utilizados para IATF em vacas Nelore lactantes no Brasil. Diante dessa informação, também foi avaliado o efeito da IAB na P/IA de vacas multíparas e primíparas submetidas à protocolos de IATF com 3 e 4 manejos.

As vacas foram divididas aleatoriamente em dois grupos de acordo com o protocolo de sincronização; Grupo 8d: vacas submetidas à protocolo de sincronização com a remoção do implante intravaginal de progesterona no Dia 8 (n = 124; 60 vacas primíparas e 64 multíparas). Grupo 9d: vacas submetidas à protocolo de sincronização com a remoção do implante intravaginal de progesterona no Dia 9 (n = 129; 60 vacas primíparas e 69 multíparas). Não foi observado diferença na P/IA entre os animais do Grupo 8d (49.2%, 61 de 124) quando comparado aos animais do Grupo 9d (45%, 58/129; P = 0.5; Tab. 6). As respostas ovarianas indicaram que vacas do Grupo 9d tenderam a ter um maior FOP (13 ± 0.2 mm) do que as vacas do Grupo 8d (12.3 ± 0.2 mm; P = 0.07). É importante salientar que o estudo anterior (Pfeifer et al., 2015) foi realizado utilizando apenas vacas multíparas submetidas à protocolos de sincronização com a remoção do implante intravaginal de progesterona no Dia 8 (3 manejos). Apesar dos resultados de prenhez registrados em ambos os protocolos tenham ficado abaixo do esperado, quando a prenhez de vacas multíparas protocoladas com 3 manejos foi analisada, verificou-se que a P/IA foi de 64%, que é consistente com os resultados previamente obtidos.

Tabela 5. Fertilidade de vacas inseminadas de acordo com a IA convencional (Grupo Controle) e IAB

Fertilidade	Tratamento		P-valor
	Controle	IAB	
Diâmetro FPO (mm)*	12.6 ± 0.28	12.9 ± 0.27	0.48
Diâmetro CL (mm)**	16.67 ± 0.41	17.23 ± 0.39	0.33
% de vacas que ovularam, (n)**	84 (48/57)	89 (52/58)	0.38
Prenhez/IA, % (n)	48.8 (102/209)	63.5 (129/203)	< 0.01

*Diâmetro do FPO avaliado no Dia 10; **Diâmetro do CL 7 dias após a IATF e a % de vacas que ovularam foi calculada em um subgrupo de animais (115 de 412).

Tabela 6. Prenhez por IA de vacas primíparas e multíparas submetidas a protocolos de 8 d e 9 d (CIDR- BE) e inseminadas em blocos.

Item	Protocolo		P-valor ¹
	8d	9d	
Animais	49.2% (61/124)	45% (58/129)	0.5
Primíparas	33.3% (20/60)	40% (24/60)	0.45
Multíparas	64.1% (41/64)	49.3% (34/69)	0.08

¹Valor de P que indica diferença entre protocolos dentro de cada categoria

Apesar dos resultados promissores observados com a IAB, é inquestionável que a técnica apresenta limitações de uso, principalmente devido ao aumento de manejo que demanda, especialmente por tratar-se do manejo intensivo de vacas de corte recém paridas. Assim, no intuito de reduzir o manejo da técnica, foi iniciado um outro

estudo com a redução de 2 lotes de inseminação em blocos. Nesse estudo, 147 vacas Nelore lactantes foram separadas no momento da IATF, de acordo com o FPO, em apenas 2 lotes, vacas com FPO > 13 mm, que deveriam ser inseminadas logo após o fim dos exames ultrassonográficos e vacas com FPO < 13 mm, que deveriam ser todas inseminadas na manhã seguinte (+ 24 h pós US). A P/IA geral desse lote foi consideravelmente alta, não havendo diferença entre os grupos. Vacas com maior FPO no Grupo Controle chegou a apresentar P/IA maior que 80% (Tab. 7). Apesar de não ter sido detectado diferença entre os grupos, pode-se notar que a IAB em apenas 2 blocos teve aumento numérico na P/IA em fêmeas com folículos menores, ou seja, não há efeito deletério na gestação quando se atrasa a inseminação dessas vacas em 24 h. Esses estudos necessitam continuar para que possamos identificar se realmente há melhora na fertilidade dos protocolos de IAB realizados com apenas 2 blocos.

Ainda que mais estudos sejam necessários para que a IAB possa tornar-se uma técnica mais viável para ser implementada nos sistemas de produção de carne, os resultados atuais apresentam-se animadores, uma vez que o uso da IAB pode ser um procedimento eficaz para melhorar os resultados de fertilidade com IATF. O Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Rondônia continua trabalhando para melhorar os aspectos limitantes que a técnica ainda apresenta.

Tabela 7. Prenhez por IA para vacas Nelore pós-parto inseminadas em 2 Blocos ou convencionalmente de acordo com o diâmetro do FPO no momento da IATF.

Item	Controle	Blocos (1 e 2)	P-valor
Prenhez por IA	66,7% (52/78)	68,1% (47/69)	0,8
De acordo com \varnothing do FPO			
≥ 13 mm	81,2% (26/32)	71,8% (28/39)	0,35
< 13 mm	56,5% (26/46)	63,3% (19/30)	0,5

\varnothing Diâmetro.

Cinética espermática

Além dos fatores previamente discutidos que afetam a fertilidade de vacas em programas de IATF, há outros, que ainda, não receberam atenção adequada, como por exemplo, a cinética do sêmen utilizado na inseminação. Touros diferem entre si na capacidade de fecundar oócitos e no desenvolvimento de blastocistos após o procedimento de fertilização *in vitro* (Zhang et al., 1997; Wei e Fukui, 1999; Sudano et al., 2011). Além disso, há uma variabilidade marcante na fertilidade de touros a campo (Correa et al., 1997; Ward et al., 2001; Andersson et al., 2004).

Ao avaliar touros utilizados em programas de IATF, observou-se a fertilidade de 5 (cinco) reprodutores que obtiveram bons índices de fertilidade (Tab. 8). Interessantemente, quando avalia-se a capacidade desses mesmos reprodutores fecundar vacas com diferentes diâmetros de FPO, verifica-se que existem touros, ou algumas partidas do sêmen desses touros, que apresentam boa fertilidade mesmo quando são utilizados em vacas com FPO menores, ou seja, àquelas com maior probabilidade de terem atraso na ovulação. Pode-se observar que touros que alcançam índices de prenhez acima de 60% são os que atingem bons índices de fertilidade mesmo quando usados em vacas com pior resposta ovariana (Tab. 8). Apesar de todas as partidas de sêmen utilizadas nessas avaliações apresentarem bons resultados na IATF, esses registros indicam que existem partidas de sêmen com características cinéticas que podem ser exploradas como ferramenta para uso em vacas de acordo com a resposta ovariana.

Tabela 8. Prenhez por IA total e de acordo com o diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO) de touros utilizados em programas de IATF

Touro	Total P/IA	P/IA de acordo com o POF		P-Valor
		FPO menor (<13mm)	FPO maior (\geq 13mm)	
A	63%(30/47)	70%(14/20)	59%(16/27)	0,4
B	69%(37/50)	62%(17/27)	76%(20/26)	0,27
C	52%(38/72)	29% ^A (9/12)	65% ^B (31/48)	<0,01
D	63%(21/33)	75%(9/12)	57%(12/21)	0,3
E	58%(39/67)	39% ^A (9/23)	68% ^B (30/44)	0,02

Vários métodos não invasivos para examinar e prever o potencial de produção de sêmen e fertilidade de touros têm sido utilizados (Thompson e Johnson, 1995; Lunstra et al., 1997; Kastelic et al., 2001; Brito et al., 2004; Arteaga et al., 2005; Celeghini et al., 2007). No entanto, os resultados de tais procedimentos nem sempre se correlacionam com os resultados de campo (Sudano et al., 2011).

Uma estimativa mais precisa do potencial de fertilidade de um protocolo de IATF, que envolve uma série de eventos que culminam no desenvolvimento e maturação dos gametas masculinos e femininos, pode ser alcançada quando as características do sêmen e a resposta ovariana são consideradas. Assim, o estudo da cinética do sêmen congelado e descongelado de touros pode fornecer informações adicionais sobre a viabilidade dos espermatozoides no

trato reprodutivo da fêmea. Os espermatozoides requerem um período de maturação, denominado capacitação, que ocorre após a ejaculação e antes da reação acrossômica e fecundação do óvulo (Austin 1951; Chang, 1951; Bedford, 1983). Espermatozoides quando submetidos à capacitação apresentam motilidade hiperativada, caracterizada por aumento de amplitude flagelar e batimento flagelar assimétrico, antes de chegar ao local da fecundação (Demott e Suarez, 1992; Saurez e Dai, 1992; Suarez, 1987; Katz e Vanagimachi, 1980). A hiperativação é fundamental para a função espermática, pois afeta a capacidade do espermatozoide de ascender com sucesso no trato reprodutivo da fêmea e chegar ao local da fecundação (Suarez, 1991; Saurez e Dai, 1992; Suarez et al., 1992; Alasmari et al., 2013).

A análise do sêmen assistida por computador (do inglês, CASA) tem sido usada para caracterizar a motilidade espermática e avaliar certas variáveis relacionadas à cinética, como a velocidade curvilínea (VCL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) e a linearidade (LIN). Essas variáveis estão associadas às características de hiperativação do sêmen congelado e descongelado e podem afetar a fertilidade a campo (Mortimer e Mortimer, 1990; Shojaei et al., 2012).

Baseado no argumento de que a fertilidade dos programas de IATF depende da íntima relação entre os gametas masculino e feminino, o Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Rondônia está atualmente trabalhando em um experimento que leva em consideração a capacidade ovulatória de vacas e a cinética do sêmen usado. O estudo está sendo realizado em parceria com um centro de processamento de sêmen bovino (Seleon Biotecnologia, Itatinga, SP, Brasil) e tem como objetivo avaliar a relação entre o grau de hiperativação espermática do sêmen e a capacidade ovulatória de vacas de corte submetidas a programas de IATF no período pós-parto. Para tanto, 47 partidas de sêmen de 20 touros foram submetidas a análises pelo Computer Assisted Sperm Analysis (CASA, Ivos-UltiMate®; Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA). O CASA é um sistema automático (hardware e software) utilizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas, fornecendo informações acuradas, precisas e significativas do movimento individual de cada célula, bem como de subpopulações de células espermáticas (Amann e Katz, 2004). Os parâmetros de motilidade espermática avaliados pelo CASA, foram: motilidade total (TM), motilidade progressiva (PM), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN). O grau de hiperatividade do sêmen foi classificado em Hiperativado (H+), em transição (TR) e não hiperativado (H-) (adaptado de Mortimer e Mortimer, 1990). As partidas de sêmen com aumento da VCL e ALH e diminuição da LIN foram classificados em hiperativados (H+). Já as partidas com diminuição da VCL e ALH e aumento da LIN foram classificados em não-hiperativados (H-). Por fim, partidas que apresentaram pelo menos uma dessas características que não preencheram totalmente os requerimentos para serem consideradas H+ ou H-, foram consideradas como partidas em transição (TR) e não foram utilizadas nesse experimento.

A análise da cinética espermática revelou que todas as variáveis avaliadas pelo CASA tiveram efeito de acordo com o grau de hiperativação espermática (Tab. 9). O sêmen classificado como H+ apresentou maior motilidade total, motilidade progressiva, VAP, VSL, ALH e VCL. Em contraste, o sêmen H+ apresentou LIN e STR inferiores quando comparado ao sêmen H-. Os resultados observados mostram claramente que as três classes da motilidade propostas: não hiperativada, fase transitória e hiperativada realmente representam alterações na cinética entre as classes espermáticas.

Tabela 9. Análise do sêmen de acordo com os parâmetros da cinética espermática (CASA).

Parâmetros	Cinética espermática*			P valor
	Não-hiperativado (H-)	Fase de transição (TR)	Hiperativado (H+)	
Motilidade total (%)	38.09 ± 1.84 ^A	44.45 ± 2.04 ^{AB}	48.47 ± 2.23 ^B	0.001
Motilidade progressiva (%)	29.11 ± 1.65 ^A	34.28 ± 2.08 ^{AB}	36.63 ± 1.7 ^B	0.01
VAP (µm/s)	90.26 ± 2.08 ^A	102.05 ± 3.57 ^B	112.60 ± 2.45 ^C	< 0.001
VSL (µm/s)	78.72 ± 1.97 ^A	88.46 ± 3.80 ^A	93.89 ± 2.50 ^B	0.001
LIN (%)	55.47 ± 0.39 ^A	53.42 ± 0.84 ^B	48.84 ± 0.90 ^B	< 0.001
STR (%)	85.14 ± 0.45 ^A	84.55 ± 0.79 ^B	81.16 ± 0.96 ^B	< 0.001
ALH (µm)	6.10 ± 0.11 ^A	7.16 ± 0.11 ^B	8.78 ± 0.23 ^C	< 0.001
VCL (µm/s)	143.73 ± 3.11 ^A	164.73 ± 4.43 ^B	194.40 ± 4.95 ^C	< 0.001

VAP: Velocidade média da trajetória; VSL: Velocidade linear progressiva; LIN: Linearidade; STR: Retilinearidade; ALH: Amplitude de deslocamento lateral da cabeça; VCL: Velocidade curvilínea; *Adaptado de Mortimer e Mortimer, 1990.

Dos 20 touros avaliados pelo CASA, 2 (chamados touros B e K) congelaram partidas de semen H+ e H- e, portanto, foram escolhidos para serem utilizados na IATF. As amostras de sêmen selecionadas para os testes de fertilidade a campo foram utilizadas em vacas multíparas da raça Nelore. Até o momento, 244 vacas foram submetidas a um mesmo protocolo de IATF entre 30 e 40 dias pós-parto. No Dia 10 pela manhã (07:00 h), as vacas foram submetidas à ultrassonografia e divididas em dois grupos de acordo com o diâmetro do FPO (Pfeifer et al., 2015): Grupo Ovulação Precoce (OP, n = 126), vacas com FPO ≥ 13 mm; e Grupo Ovulação Tardia (OT, n = 118), vacas com FPO < 13 mm de diâmetro.

Resultados parciais revelaram que a capacidade ovulatória (OP vs OT) não teve efeito na P/IA (P > 0.05;

Tab. 10). Entretanto, vacas inseminadas com sêmen H- não apresentaram diferença na P/IA ($P > 0.2$) quando comparado às vacas inseminadas com sêmen H+ (Tab. 10). A P/IA de acordo com a capacidade ovulatória (precoce ou tardia) e hiperativação espermática (H+ e H-) está demonstrada na Fig. 5. Estudos anteriores observaram que a fertilidade do sêmen congelado melhora quando o tempo da inseminação e ovulação são reduzidos (Parrish e Foote, 1986; Chen et al., 1989; Maxwell et al., 1993). Infelizmente, essa aproximação entre a IA e a ovulação não é fácil de ser implantado nas fazendas que utilizam a técnica (Thundathil et al., 1999). Por esta razão, a abordagem aqui proposta, de utilizar a IA de acordo com a resposta ovariana e a cinética espermática, pode representar uma alternativa para melhorar a fertilidade de vacas submetidas à IATF.

Tabela 10. Prenhez por IA de acordo com a capacidade ovulatória (OP x OT) e hiperativação espermática (H+ vs. H-).

Capacidade ovulatória		Prenhez por IA, % (n/n)	P-valor
Precoce		66,7 (84/126)	0,06
	Tardia	55,1 (65/118)	
Hiperativação espermática	H+	57,9 (81/140)	>0.2
	H-	65,4 (68/104)	

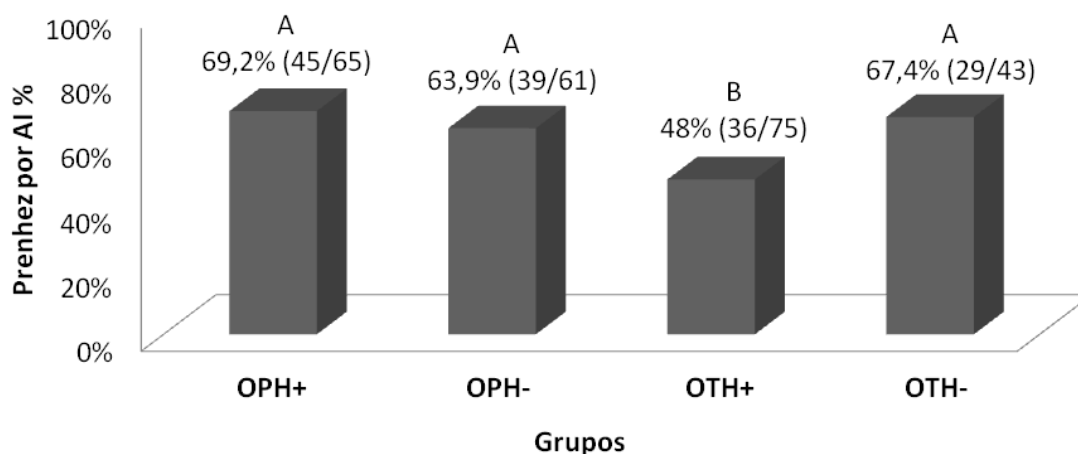


Figure 5. Prenhez por IA em vacas lactantes de acordo com a capacidade ovulatória (Precoce ou Tardia) e a hiperativação espermática (H+ ou H-). Diferentes letras indicam efeito entre grupos ($P < 0.05$). Os grupos de animais OPH- e OTH+ tendem a ser diferentes entre si ($P=0.06$) (Fonte: de Oliveira Júnior et al., 2018).

As vacas com ovulação precoce e tardia tiveram fertilidade semelhante quando inseminadas com sêmen não hiperativado (H-). Uma possível razão e/ou explicação pela qual as palhetas de sêmen H- apresentam uma fertilidade adequada independentemente da resposta ovariana, é de que os espermatozoides H- podem hiperativar rapidamente quando encontram um ambiente hormonal apropriado no oviduto antes à ovulação. Os espermatozoides capacitados têm uma menor taxa de sobrevivência no trato reprodutivo da fêmea quando comparado aos espermatozoides ainda não capacitados. Uma vez capacitado, o espermatozoide apresenta uma alta taxa metabólica e aumenta fluidez e permeabilidade da membrana; caso não consigam penetrar no oócito sofrem exocitose e reação acrossômica espontânea devido ao influxo de Ca^{2+} na célula. (Comier et al., 1997). Por isso, a vida útil dos espermatozoides capacitados é limitada. O sêmen não hiperativado pode sobreviver por um longo período no oviduto. Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar essas questões científicas.

Os resultados desse estudo demonstram que VCL, ALH e LIN são parâmetros úteis para a caracterização da hiperativação do sêmen de touros utilizados em programas de IATF. Além disso, vacas com FPOs menores tem uma menor probabilidade de engravidar quando inseminadas com sêmen H+. Em contrapartida, as vacas com ovulação tardia e precoce, quando inseminadas com sêmen H- podem alcançar um desempenho adequado e semelhante P/IA.

Esperamos que esses “*insights*” obtidos no presente estudo possam promover novas abordagens para a IA e desenvolvimento de novas ferramentas que visam melhorar a fertilidade. Com base nesses resultados, deve ser possível alcançar uma melhor fertilidade ajustando a motilidade espermática para compensar o atraso na ovulação de vacas com pior resposta ovariana.

Considerações finais

Ao observar os efeitos da interação entre a saúde uterina, folículo pré-ovulatório e a cinética espermática



sobre a fertilidade em vacas de corte, é possível notar que as ferramentas aplicadas ao manejo reprodutivo podem ser melhor exploradas e ainda apresentam vasto campo de pesquisa. Assim, apesar dos protocolos hormonais da IATF estarem bem definidos e com seus resultados consistentes, as boas práticas reprodutivas, como exame ginecológico prévio à estação reprodutiva, ainda devem ser adotadas. Nas avaliações da saúde uterina foi evidenciado a importância da seleção das fêmeas e a possibilidade de detectar e descartar vacas com descarga vaginal purulenta. Além disso, foi observado que a obtenção de boa resposta ovariana é imprescindível para que os programas de IATF resultem em boa eficiência. Finalmente, com os estudos de associação da cinética espermática e resposta ovariana, observou-se que a informação da cinética espermática pode representar um avanço no uso sistemático do sêmen bovino. Caso essa tecnologia tenha consistência nos resultados a campo, talvez seja possível realizar novas formas de comercialização do sêmen bovino, ou mesmo, talvez agregar essa informação à cada partida de sêmen comercializada. Entretanto, essas modificações exigem mudanças nos métodos de avaliação e comercialização do sêmen produzido nas centrais de IA. Além disso, a logística de tantas mudanças deve ser melhor avaliada por todos os setores da cadeia produtiva. O certo é que quando uma tecnologia apresenta ganhos reais e consistentes, a força do mercado leva à sua própria demanda e mudança nos procedimentos convencionalmente adotados.

Agradecimentos

Esses resultados são frutos de vários projetos que foram ou estão atualmente em vigor e que deram suporte aos nossos estudos (Embrapa MP1/PC3 n. 01.03.14.011.00.00; MP2 n. 02.10.01.021.00.00 e CNPq Universal n: 407307/2016-8). Agradecemos à toda equipe do Laboratório de Biotecnologia da Embrapa Rondônia pela dedicação e apoio de sempre. Também agradecemos à todos os produtores que disponibilizaram as fêmeas para as avaliações e todo o suporte da fazenda onde esses experimentos foram desenvolvidos.

Referências

- Alasmari W, Barratt CL, Publicover SJ, Whalley KM, Foster E, Kay V, Martins SS, Oxenham SK.** The clinical significance of calcium-signalling pathways mediating human sperm hyperactivation. *Hum Reprod*, v.28, p.866-876, 2013.
- Amann R, Katz DF.** Reflections on CASA after 25 years. *J Androl*, v.25, p.317-325, 2004.
- Andersson M, Taponen J, Koskinen E, Dahlbom M.** Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology*, v.61, p.1583-1588, 2004.
- Arteaga AA, Barth AD, Brito LF.** Relationship between semen quality and pixel-intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. *Theriogenology*, v.64, p.408-415, 2005.
- Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA).** 2017. [internet]. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/relatorios/>. Acesso em 08 ago. 2018.
- Austin CR.** Observations on the penetration of the sperm in the mammalian egg. *Aust J Sci Res B*, v.4, p.581-596, 1951.
- Baruselli PS, Ferreira RM, Colli MHA, Ellif FM, Sa Filho MF, Vieira L, Freitas BG.** Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. *Anim Reprod*, v.14, p.558-571, 2017.
- Baruselli PS, Reis EL, Marques MO, Nasser LF, Bo GA.** The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p.479-486, 2004.
- Bedford JM.** Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals. *Biol Reprod*, v.28, p.108-120, 1983.
- Bicalho ML, Lima FS, Machado VS, Junior-Meira EB, Ganda EK, Foditsch C, Bicalho RC, Gilbert RO.** Associations among Trueperella pyogenes, endometritis diagnosis, and pregnancy outcomes in dairy cows. *Theriogenology*, v.85, n.2, p.267-274, 2016.
- Bisinotto RS, Ribeiro ES, Martins LT, Marsola RS, Greco LF, Favoreto MG, Risco, CA, Thatcher WW, Santos JE.** Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. *J Dairy Sci*, v.93, p 5798-5808, 2010.
- Bo GA, Baruselli PS, Martinez MF.** Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.307-326, 2003.
- Bó GA, de la Mata JJ, Baruselli PS, Menchaca A.** Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology*, v.86, p.388-396, 2016.
- Brito, LF, Silva, AE, Barbosa, RT, Kastelic, JP.** Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology*, v.61, p.511-528, 2004.
- Call EP.** Involution of the uterus of dairy cattle. *Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports*, v.0, p.63-65, 1989.
- Celeghini EC, de Arruda RP, de Andrade AF, Nascimento J, Raphael CF.** Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod Domest*



- Anim, v.42, p.479-488, 2007.
- Chang MC.** Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. *Nature*, v.168, p.697-698, 1951.
- Chen Y, Li J, Simkin ME, Yang X, Foote RH.** Fertility of fresh and frozen rabbit semen inseminated at different times is indicative of male differences in capacitation time. *Biol Reprod*, v.41, p.848-853, 1989.
- Cheong SH, Nydam DV, Galvao KN, Crosier BM, Gilbert RO.** Cow-level and herd-level risk factors for subclinical endometritis in lactating Holstein cows. *J Dairy Sci*, v.94, p.762-770, 2011.
- Cormier N, Sirard MA, Bailey JL.** Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. *J Androl*, v.18, p.461-468, 1997.
- Correa J, Pace MM, Zavos PM.** Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, v.48, p.721-731, 1997.
- Dadarwal D, Palmer C, Griebel P.** Mucosal immunity of the postpartum bovine genital tract. *Theriogenology*, v.104, p.62-71, 2017.
- de Oliveira Júnior JS, Potiens JR; de Andrade JS, Moreira EM; Neves PMA; da Silva GM; Amorim RL; Pfeifer LFM.** Association between sperm hyperactivation and ovulatory capacity on fertility in timed AI postpartum cows. In: Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 32, 2018, Florianópolis. Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society. Florianópolis: SBTE, 2018, p.468.
- Demott RP, Suarez SS.** Hyperactivated sperm progress in the mouse oviduct. *Biol Reprod*, v.46, p.779-785, 1992.
- Elliot L, McMahan KJ, Gier HT, Marion GB.** Uterus of the cow after parturition: bacterial content. *Am J Vet Res*, v.29, p.77-81, 1968.
- Gier HT, Marion GB.** Uterus of the cow after parturition: involutinal changes. *Am J Vet Res*, v.29, p.83-96, 1968.
- Gimenes, LU, Sa Filho MF, Carvalho NA, Torres-Junior JR, Souza AH, Madureira EH, Trinca LA, Sartorelli ES, Barros, CM, Carvalho JB, Mapletoft RJ, Baruselli PS.** Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v.69, p.852-858, 2008.
- Kasimanickam R, Duffield TF, Foster RA, Gartley CJ, Leslie KE, Walton JS, Johnson WH.** Endometrial cytology and ultrasonography for the detection of subclinical endometritis in postpartum dairy cows. *Theriogenology*, v.62, p.9-23, 2004.
- Kastelic JP, Cook RB, Pierson RA, Coulter GH.** Relationships among scrotal and testicular characteristics, sperm production, and seminal quality in 129 beef bulls. *Can J Vet Res*, v.65, p.111-115, 2001.
- Katz DF, Vanagimachi R.** Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. *Biol Reprod*, v.22, p.759-764, 1980.
- Kim UH, Suh GH, Nam HW, Kang HG, Kim IH.** Follicular wave emergence, luteal function and synchrony of ovulation following GnRH or estradiol benzoate in a CIDR-treated, lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v.63, p.260-268, 2005
- Lunstra DD, Coulter GH.** Relationship between scrotal infrared temperature patterns and natural-mating fertility in beef bulls. *J Anim Sci*, v.75, p.767-774, 1997.
- Martinez MF, Kastelic JP, Bo GA, Caccia M, Mapletoft RJ.** Effects of oestradiol and some of its esters on gonadotrophin release and ovarian follicular dynamics in CIDR-treated beef cattle. *Anim Reprod Sci*, v.86, p.37-52, 2005.
- Maxwell WM, Evans G, Rhodes SL, Hillard MA, Bindon BM.** Fertility of superovulated ewes after intrauterine or oviducal insemination with low numbers of fresh or frozen-thawed spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, v.5, p.57-63, 1993.
- Meneghetti M, Sa Filho OG, Peres RF, Lamb GC, Vasconcelos JL.** Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows I: basis for development of protocols. *Theriogenology*, v.72, p.179-189, 2009.
- Mortimer ST, Mortimer D.** Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. *J Androl*, v.11, p.195-203, 1990.
- Parrish JJ, Foote RH.** Fertility of cooled and frozen rabbit sperm measured by competitive fertilization. *Biol Reprod*, v.35, p.253-257, 1986.
- Pfeifer LF, Castro NA, Melo VT, Neves PM, Cestaro JP, Schneider A.** Timed artificial insemination in blocks: A new alternative to improve fertility in lactating beef cows. *Anim Reprod Sci*, v. 163, p. 89-96, 2015.
- Pfeifer LFM, Andrade JS, Moreira EM, Silva RR, Neves PMA, Silva, GM, Lemos IC, Schneider A.** Uterine inflammation and fertility of beef cows subjected to timed AI at different days postpartum. v.197, p.268-277, *Anim Reprod Sci*, 2018.
- Pfeifer LFM, Leonardi CE, Castro NA, Viana JH, Siqueira LG, Castilho EM, Singh J, Krusser RH, Rubin MI.** The use of PGF α as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. *Theriogenology*, v.81, p.689-695, 2014.
- Pleticha S, Drillich M, Heuwieser W.** Evaluation of the Metriceck device and the gloved hand for the diagnosis of clinical endometritis in dairy cows. *J Dairy Sci*, v.92, p.5429-5435, 2009.
- Radostits OM, Blood DC, Gay CC.** Clínica Veterinária. Um tratado de doenças dos bovinos, ovinos, suínos, caprinos e eqüinos. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.1737 p.2002.



- Ricci A, Bonizzi G, Sarasso G, Gallo S, Dondo A, Zoppi S, Vincenti L.** Subclinical endometritis in beef cattle in early and late postpartum: Cytology, bacteriology, haptoglobin and test strip efficiency to evaluate the evolution of the disease. *Theriogenology*, v.94, p.86-93, 2017.
- Ricci A, Gallo S, Molinaro F, Dondo A, Zoppi S, Vincenti L.** Evaluation of subclinical endometritis and consequences on fertility in Piedmontese beef cows. *Reprod Domest Anim*, v.50, p.142-148, 2015.
- Sa Filho MF, Crespilho AM, Santos JE, Perry GA, Baruselli PS.** Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.120, p.23-30, 2010.
- Sa Filho MF, Santos JE, Ferreira RM, Sales JN, Baruselli PS.** Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology*, v.76, p.455-463, 2011.
- Sa Filho OG, Meneghetti M, Peres RF, Lamb GC, Vasconcelos, JL.** Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology*, v.72, p.210-218, 2009.
- Sales JN, Carvalho JB, Crepaldi GA, Cipriano RS, Jacomini JO, Maio JR, Souza JC, Nogueira GP, Baruselli PS.** Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*, v.78, p.510-516, 2012.
- Sales JN, Crepaldi GA, Girotto RW, Souza AH, Baruselli PS.** Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Anim Reprod Sci*, v.124, p.12-18, 2011.
- Santos NR, Lamb GC, Brown DR, Gilbert RO.** Postpartum endometrial cytology in beef cows. *Theriogenology*, v.71, p.739-745, 2009.
- Sheldon I M, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ.** Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod*, v.81, p.1025-1032, 2009.
- Sheldon IM, Cronin J, Goetze L, Donofrio G, Schuberth HJ.** Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle. *Biol Reprod*, v.81, p.1025-1032, 2009.
- Sheldon IM, Dobson H.** Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci*, v.82-83, p 295-306, 2004.
- Sheldon IM.** The postpartum uterus. *Vet. Clin. North Am Food Anim. Pract*, v.20, p.569-591, 2004.
- Shojaei H, Kroetsch T, Wilde, R, Blondin, P, Kastelic, JP, Thundathil JC.** Moribund sperm in frozen-thawed semen, and sperm motion end points post-thaw and post-swim-up, are related to fertility in Holstein AI bulls. *Theriogenology*, v.77, p.940-951, 2012.
- Suarez SS, Dai X.** Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod*, v.46, p.686-691, 1992.
- Suarez SS, Dai XB, DeMott RP, Redfern K, Mirando, MA.** Movement characteristics of boar sperm obtained from the oviduct or hyperactivated in vitro. *J Androl*, v.13, p.75-80, 1992.
- Suarez SS, Katz DF, Owen DH, Andrew JB, Powell RL.** Evidence for the function of hyperactivated motility in sperm. *Biol Reprod*, v.44, p.375-381, 1991.
- Suarez SS.** Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ. *Biol Reprod*, v.36, p.203-210, 1987.
- Sudano MJ, Crespilho AM, Fernandes CB, Junior AM, Papa FO, Rodrigues J, Machado R, Landim-Alvarenga FC.** Use of bayesian inference to correlate in vitro embryo production and in vivo fertility in zebu bulls. *Vet Med Int*, p.436-381, 2011.
- Thompson JA, Johnson WH.** Scrotal size of yearling sires and early calving in beef herds: epidemiological investigation of possible causal pathways. *Theriogenology*, v.43, p.1279-1287, 1995.
- Thundathil J, Gil J, Januskauskas A, Larsson B, Soderquist L, Mapletoft R, Rodriguez-Martinez H.** Relationship between the proportion of capacitated spermatozoa present in frozen-thawed bull semen and fertility with artificial insemination. *Int J Androl*, v.22, p.366-373, 1999.
- Vasconcelos JL, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR, Wiltbank MC.** Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.52, p. 1067-1078, 1999.
- Vasconcelos JL, Sa Filho OG, Perez GC, Silva AT.** Intravaginal progesterone device and/or temporary weaning on reproductive performance of anestrous crossbred Angus x Nelore cows. *Anim Reprod Sci*, v.111, p.302-311, 2009.
- Ward F, Rizos D, Corridan D, Quinn K, Boland M, Lonergan P.** Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Mol Reprod Dev*, v.60, p.47-55, 2001.
- Wei H, Fukui Y.** Effects of bull, sperm type and sperm pretreatment on male pronuclear formation after intracytoplasmic sperm injection in cattle. *Reprod Fertil Dev*, v.11, p.59-65, 1999.
- Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GCW, Noakes DE, Dobson H, Shelson IM.** Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology*, v. 63, p. 102-117, 2005.
- Zhang BR, Larsson B, Lundeheim N, Rodriguez-Martinez H.** Relationship between embryo development in vitro and 56-day nonreturn rates of cows inseminated with frozen-thawed semen from dairy bulls. *Theriogenology*, v.48, p.221-231, 1997.
-