

Fatores que interferem no sucesso dos resultados de prenhez pós-monta natural ou IATF

G. A. Perry¹, J. C. Dalton², e T. W. Geary³

¹South Dakota State University, Brookings, South Dakota

²University of Idaho, Caldwell, ID

³USDA-ARS Livestock and Range Research Laboratory, Miles City, MT

Introdução

As falhas reprodutivas são fonte importante de perdas econômicas na pecuária de corte. A maioria dessas perdas ocorre porque as vacas não emprenham durante a estação de monta pré-definida. Por esse motivo, o objetivo de qualquer programa reprodutivo (IA ou monta natural; sincronizada ou não) é maximizar o número de fêmeas prenhes. Isso significa que a fertilidade tem papel importante no sucesso de qualquer programa reprodutivo. Esta revisão focará nos fatores que influenciam as taxas de prenhez na monta natural ou na IA, em programas com ou sem sincronização. A fertilidade é influenciada por diversos fatores, e um dos melhores métodos para avaliá-los é analisar a “Equação da Reprodução.” Essa equação inclui itens de 4 áreas principais: 1) Porcentagem de fêmeas com cio detectado e inseminadas, 2) Eficiência do inseminador, 3) Nível de fertilidade do rebanho, e 4) Nível de fertilidade do sêmen.

Porcentagem de fêmeas com cio detectado e inseminadas

Para que haja sucesso na inseminação, as vacas precisam manifestar cio. A verificação de cio (detecção do estro) consiste na identificação das mudanças no comportamento relacionadas com a fêmea aceitar a monta por um touro ou vaca/novilha. Considera-se que a detecção de cio é mais fácil quando se usa monta natural, já que fica “a cargo” do touro. Entretanto, mesmo entre touros existe diferença na detecção de cio. A libido se refere ao desejo de um touro em cobrir uma fêmea. Acredita-se que ela é uma característica que possui alta herdabilidade, chegando a 0,59 (Chenoweth, 1997). Isto porque existe mais variação na libido entre filhos de touros diferentes do que entre filhos de um mesmo touro. É importante lembrar que a

circunferência escrotal, a qualidade do sêmen e a conformação física (avaliadas no exame andrológico) não estão relacionadas com a libido. A libido tem efeito direto sobre a taxa de gestação e, como tal, pode influenciar o sucesso da estação de monta. A libido pode ser avaliada de maneira prática através da observação cuidadosa de um touro logo que ele é introduzido no rebanho de vacas, determinando seu desejo para detectar as fêmeas em cio.

Em um programa de inseminação artificial, o produtor (gerente da fazenda, etc.) deve ocupar o lugar do touro na identificação das fêmeas (vacas e novilhas) que estão prontas para serem inseminadas. Ele deve identificar de maneira precisa as fêmeas que estão no cio, o que é essencial para o sucesso de qualquer programa de IA. Em estudo conduzido na Colorado State University os animais receberam um protocolo de sincronização de cio e foram monitorados para manifestação de cio 24 horas por dias através de um sistema computadorizado de detecção do estro (HeatWatch®), ou duas vezes por dia por 30 minutos através de observação visual. No dia 5 após a sincronização de cio, 95% dos animais monitorados por 24 horas foram identificados como estando no cio, enquanto apenas 56% dos animais observados duas vezes por dia por 30 minutos foram identificados como manifestando estro (Downing et al., 1998). Com uma taxa de detecção de cio de 95% e uma taxa de concepção de 70% ($95\% \times 70\% = 67\%$), 67% das fêmeas ficarão prenhes, mas haverá uma taxa de gestação de apenas 39% ($55\% \times 70\% = 39\%$) com uma taxa de detecção de cio de 55% (**Tabela 1**).

Tabela 1. Efeito da taxa de detecção de cio sobre o aumento na taxa de prenhez

Taxa de detecção de cio	55%	60%	65%	70%	75%	80%	85%	90%	95%
Taxa de concepção	70%	70%	70%	70%	70%	70%	70%	70%	70%
Taxa de prenhez	39%	42%	46%	49%	53%	56%	60%	63%	67%

Portanto o sucesso de qualquer programa de inseminação artificial exige a identificação dos animais que estão prontos para serem inseminados (em cio) e sua inseminação no momento certo. A falha na identificação das fêmeas em cio ou erros nessa identificação podem resultar em perdas econômicas importantes (Heersche & Nebel, 1994). A precisão na detecção

do estro pode ser uma atividade difícil e demorada. Quando o estro foi detectado em 500 vacas Angus usando-se o sistema de detecção de cio HeatWatch®, a duração do estro foi em média 10 horas (variando entre 0,5 e 24 horas); no entanto, 26% das vacas manifestaram estro por menos de 7 horas e foram montadas menos de 1,5 vezes por hora (Rorie et al., 2002). Embora a maioria das características do estro seja semelhante entre animais de raças taurinas e zebuínas, a duração da manifestação do estro (Brewester & Cole, 1941, Plasse et al., 1970) e o intervalo entre o início do estro e a ovulação (Randel, 1976) são menores entre fêmeas *Bos indicus* quando comparadas com *Bos taurus*.

Para maximizar a detecção do cio é extremamente importante monitorar visualmente o gado o maior número de vezes possível. As observações devem ser feitas o mais cedo e o mais tarde possível no dia, assim como no meio do dia. A observação contínua de mais de 500 animais apresentando estro natural em 3 estudos separados indicou que 55,9% das vacas começam a entrar no cio entre as 6 horas da tarde e as 6 horas da manhã (**Tabela 2**). Além disso, quando as vacas foram observadas para cio a cada 6 horas (6 da manhã, meio-dia, 6 da tarde e meia-noite) a detecção de cio aumentou 10% com a adição da observação de cio ao meio-dia e 19% quando o cio foi observado 4 vezes por dia (a cada 6 horas), quando comparada com a observação de cio apenas às 6 da manhã e 6 da tarde (Hall et al., 1959). A observação de cio pode ser uma das tarefas mais demoradas com relação à inseminação artificial e por isso foram desenvolvidas inúmeras ferramentas na tentativa de facilitar o processo. Essas ferramentas podem ajudar a determinar que vacas estão ou estiveram no cio, diminuindo um pouco do tempo necessário pra fazer a observação de cio visualmente. Uma comparação entre a detecção visual a cada 3 horas (8 vezes por dia), um animal marcador (um touro com desvio peniano) e adesivos EstroTECT® resultou em uma porcentagem semelhante ($P > 0,79$) de animais corretamente identificados como estando no cio (92%, 92%, e 91%, respectivamente; Perry, 2005). Entretanto, o aumento na observação visual somado ao uso de ferramentas para detecção de cio poderia melhorar a fertilidade através da determinação do momento mais adequado para a inseminação.

Tabela 2. Hora do dia em que as vacas manifestam cio

Hora do dia	Vacas em cio
6 da manhã até meio-dia	26,0 %
Meio-dia até 6 da tarde	18,1 %
6 da tarde até meia-noite	26,9 %
Meia-noite até 6 da manhã	29,0 %

Dados adaptados de (Hurnik & King, 1987; Xu et al., 1998, G.A. Perry dados não publicados).

As taxas de gestação também aumentaram quando os animais tiveram cio detectado dentro de 24 horas antes da inseminação em tempo fixo, independentemente do tamanho do folículo induzido a ovular (Perry et al., 2005). As vacas que entram no cio próximo ao momento da inseminação em tempo fixo tem concentrações pré-ovulatórias de estradiol aumentadas quando comparadas com vacas que não manifestaram cio (Perry & Busch, 2005). O transporte eficiente do sêmen através do trato reprodutivo da fêmea requer que essa fêmea esteja no cio ou sob a influência de estrógeno (Hawk, 1983). Em uma revisão recente de Santos et al. (2004) as falhas de fertilização em vacas de corte variaram entre 0 to 25% e em vacas de leite entre 12 e 45%. O estrógeno pode influenciar as taxas de fertilização tanto através do transporte dos espermatozoides como através da eficiência da fertilização, alterando o ambiente uterino próximo ao momento da fertilização. O pH do útero diminui no início do estro (Elrod & Butler, 1993) chegando a um pH semelhante ao do plasma seminal (Acott & Carr, 1984); essas mudanças no pH do útero parecem ser mediadas por trocadores sódio-hidrogênio (Wang et al., 2003; Grant & Perry 2010). O pH uterino é mais baixo nos animais em cio no momento da IATF comparado com o de animais que não estavam manifestando estro (Perry & Perry, 2008a; Perry & Perry, 2008b). Existe uma relação linear entre o pH do útero no momento da IATF e o sucesso

na gestação (Lares et al., 2008). Sendo assim, o aumento na taxa de prenhez mencionado anteriormente pode ter sido decorrente da redução do pH uterino induzida pelo estradiol no momento da inseminação e ao correspondente aumento na longevidade espermática. Esses dados são relevantes para protocolos de IATF nos quais o sêmen é depositado no momento da administração do GnRH em vez de 8 a 12 horas após a detecção do estro. Considerando um intervalo entre o início do estro (ou segunda aplicação de GnRH) e a ovulação de cerca de 30 horas (Pursley et al., 1995; Vasconcelos et al., 1999), uma redução no pH uterino no começo do estro pode inicialmente diminuir a motilidade espermática e com isso aumentar a longevidade dos espermatozoides. Então, vacas com um pH mais baixo no útero no momento da IATF tem taxa de sucesso mais alta quando comparadas com outras com pH maior no momento da IATF.

Um estudo recente envolvendo transferência recíproca de embriões de e para vacas induzidas com GnRH a ovularem um folículo grande ou pequeno revelaram alguns resultados interessantes sobre fatores influenciando a fertilidade (Atkins et al., 2010, submetido para publicação). Embora o tamanho do folículo ovulatório e as concentrações séricas de estradiol estejam altamente correlacionadas ($r = 0,49$; $P < 0,0001$), tanto as concentrações de estradiol quanto o tamanho do folículo tiveram efeitos positivos independentes sobre a presença de um embrião vivo 7 dias depois. Características adicionais que aumentaram diretamente a taxa de ovulação incluíram aumento no intervalo pós-parto, aumento no peso da vaca, e idade mais baixa. As vacas mais jovens também produziram embriões mais bem desenvolvidos no dia 7 do que vacas mais velhas. Sendo assim, a falha de fertilização é mais alta em vacas mais velhas e naquelas que pariram mais tarde na estação de parição e que estavam mais magras. Adicionalmente, as receptoras que não estavam ciclando no início da sincronização tiveram probabilidade mais baixa de engravidarem após a transferência do embrião (Atkins et al., 2010).

Durante a maturação final, os espermatozoides perdem sua capacidade de biossíntese, reparo, crescimento e divisão, e se tornam muito simples em suas funções metabólicas (Hammerstedt, 1993). Isso significa que eles se tornam completamente dependentes do ambiente externo. No epidídimo, os espermatozoides ficam armazenados por longo período de tempo em estado relativamente quiescente, mas com a ejaculação ou diluição do fluido na

cauda do epidídimo, a motilidade aumenta (Acott & Carr, 1984; Carr & Acott, 1984). Entretanto, a consequência desse aumento na motilidade é a redução na viabilidade de várias semanas para apenas algumas horas no trato feminino (Austin, 1975). O pH do meio afetou a motilidade dos espermatozóides coletados da cauda do epidídimo (Acott & Carr, 1984). Goltz et al. (1988) mostraram a motilidade de espermatozóides de touro dos quais a membrana havia sido removida (demembrated bull sperm) aumenta à medida em que o pH do meio é elevado de 6,6 para 7,1. Um aumento na motilidade espermática acima dos níveis basais parece ser necessário para ajudar o espermatozóide a penetrar o muco viscoso do oviduto e a matriz do cumulus que envolve o oócito (Suarez & Dai, 1992), assim como o próprio oócito para que ocorra a fertilização (Stauss et al., 1995). Desse modo, as mudanças que ocorrem no pH do útero do início do estro (pH baixo) até a ovulação podem ter papel vital sobre a fertilização.

Após a fertilização, a secreção de progesterona pelo corpo lúteo durante o ciclo estral seguinte é necessária para a sobrevivência do embrião/feto (McDonald et al., 1952), e já foi associada com a fertilidade de bovinos por estimular tanto as secreções uterinas (Geisert et al., 1992) quanto o desenvolvimento e crescimento do embrião (Garrett et al., 1988; Mann et al., 1996). Secreções uterinas incluindo nutrientes, fatores de crescimento, agentes imunossupressores, enzimas, íons e esteróides contribuem para o crescimento/sobrevivência inicial do conceito (Geisert et al., 1992; Gray et al., 2001). Vacas com embrião com melhor desenvolvimento tinham concentrações mais altas de progesterona nos dias 3 e 6 após a inseminação quando comparadas com vacas com embrião em degeneração (Maurer & Echternkamp, 1982). Após um protocolo de IATF, as concentrações de progesterona foram afetadas ($P < 0,04$) pelo tamanho do folículo dominante induzido a ovular (**Figura 1**). Mais especificamente, a elevação na progesterona após a ovulação induzida pelo GnRH foi menor ($P < 0,01$) nas vacas que ovularam folículos de até 12 mm quando comparadas com outras que ovularam folículos maiores. Além disso, vacas induzidas a ovularem folículos com menos de 12 mm tiveram taxas de gestação mais baixas ($P < 0,05$) comparadas com outras induzidas a ovularem folículos maiores (29% vs. 71%, respectivamente, Perry et al., 2002a). Essa redução nas concentrações de progesterona são dependentes do tamanho dos folículos. No estudo de transferência recíproca de embriões mencionado anteriormente (Atkins et al., 2010), as

concentrações séricas de progesterona no dia 7 (na coleta do embrião) foram maiores nas vacas produzindo embrião mais avançado. O tamanho do folículo ovulatório e o volume do corpo lúteo estavam positivamente correlacionados ($r = 0,46$; $P < 0,0001$) na transferência de embriões recíproca estudada por Atkins e colaboradores (2010). A relação entre o tamanho do folículo e a produção de progesterona 7 dias mais tarde também estava positivamente correlacionada ($r = 0,31$; $P < 0,0001$). Não foi observado efeito do estro, tamanho do folículo ou peso do CL aos 10 dias sobre a expressão de enzimas esteroidogênicas (StAR, CYP11A1 ou 3 β ; Fields et al., 2011). No entanto, houve correlação entre o tamanho do folículo e o peso do CL ($P = 0,01$; $R^2 = 0,51$); para cada aumento de 1 mm no tamanho do folículo, o peso do CL no dia 10 aumentou 1,1 g (Fields et al., 2011). Portanto, à medida em que aumenta o tamanho do folículo, aumenta o peso do CL e as concentrações de progesterona.

Durante as mudanças que vão ocorrendo ao longo do ciclo estral, o endométrio uterino também sofre alterações de composição e diferenciação. Essas mudanças são reguladas principalmente pelo estradiol, pela progesterona e pela ocitocina (Spencer et al., 2004). Há relatos de que o estradiol induz a expressão de receptores de progesterona (Zelinski et al., 1980) e ocitocina (Lamming & Mann, 1995) no endométrio de ruminantes. A expressão desses receptores (receptor α de estradiol e receptor nuclear de progesterona) parecem mudar ao longo do ciclo estral (Robinson et al., 2001) e tem papel essencial na regulação do ambiente uterino necessário para o desenvolvimento da gestação. O ambiente no útero é fundamental para o desenvolvimento do embrião, reconhecimento da gestação, alongamento e fixação. Os nutrientes, fatores de crescimento, agentes imunossupressores, enzimas e íons secretados pelo endométrio contribuem para ao crescimento/sobrevivência inicial do concepto (Geisert et al., 1992; Gray et al., 2001). Sendo assim, mudanças no ambiente uterino podem influenciar bastante a viabilidade inicial do embrião, e já foram relatadas diferenças na expressão de genes que sabidamente tem papel na fertilidade entre animais que estavam no cio ou não no momento de um protocolo de IATF (Perry et al., 2008; Schiefelbein et al., 2008; Perry et al., 2009).

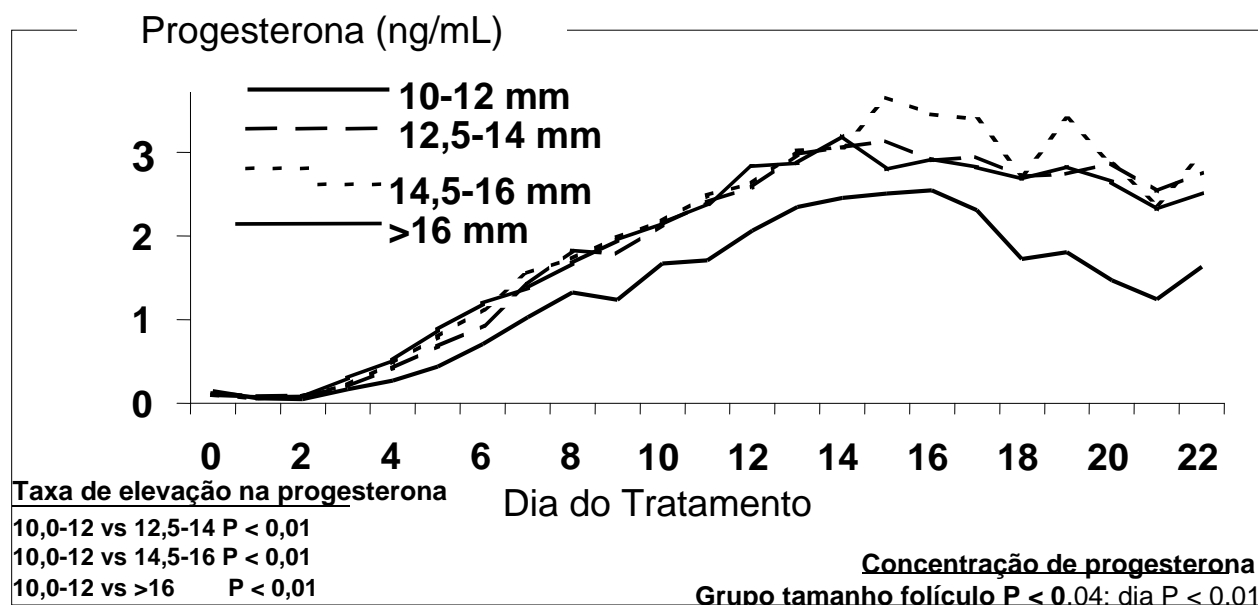


Figura 1. Efeito do tamanho do folículo ovulatório, em vacas em anestro e ciclando, sobre as concentrações médias de progesterona do dia 0 (segunda injeção de GnRH) até o dia 22, e taxa de aumento na progesterona do dia 0 até o pico de concentração de progesterona. (Perry et al., 2005)

A sincronização do estro e a fertilidade

Sincronização do estro

Sincronização do estro quer dizer simplesmente que foi feita alguma manipulação em vacas ou novilhas para que elas entrem no cio mais ou menos no mesmo momento. Isso pode reduzir bastante o número de dias necessários para detectar um grupo de animais manifestando cio. No entanto, normalmente se pergunta se a sincronização do estro aumenta ou reduz a fertilidade. Para responder a essa pergunta é necessário comparar fêmeas que são inseminadas por monta natural e IA.

Monta natural: *Fêmeas não sincronizadas:* Quando as vacas são cobertas por monta natural, o manejo da capacidade de serviços do touro passa a ser de extrema importância. As recomendações para o número de fêmeas por touro quando as vacas não são sincronizadas variam de 1:10 a 1:60. Essa faixa depende da idade, da experiência e da qualidade do sêmen do touro, assim como a topografia do pasto. Não foram observadas diferenças entre proporções de

touro por vaca de 1:25 a 1:60 em termos de detecção de estro e taxa de gestação nos primeiros 21 dias da estação de monta, desde que os touros usados fossem altamente férteis e tivessem circunferência escrotal grande (Rupp et al., 1977).

Monta natural: Fêmeas sincronizadas: Quando as vacas são sincronizadas e cobertas por monta natural, devem ser feitas considerações de manejo quanto à capacidade de serviço do touro. Healy et al. (1993) relataram tendência ($P < 0,10$) para taxa de prenhez mais baixa em uma estação de monta de 28 dias com as fêmeas sincronizadas quando a proporção touro:vaca foi de 1:50 (77%) comparada com 1:16 (84%); no entanto, não foi observada diferença quando as proporções usadas foram 1:16 e 1:25 (84% e 83%, respectivamente). Nos estudos seguintes usaram-se proporções touro:vaca de até 1:25.

Inseminação artificial: A sincronização do estro torna a inseminação artificial mais factível devido à redução no tempo e na mão-de-obra necessária para a verificação de cio. Quando a IA é combinada com a sincronização de cio, remove-se a limitação na capacidade de serviço de um único touro, e mais fêmeas podem ser inseminadas por um único touro ou grupo de touros durante os primeiros dias da estação de monta. Isso pode resultar no nascimento dos bezerros de maneira mais uniforme e em animais mais velhos e mais pesados na desmama.

Inseminação em tempo-fixo (IATF)

Para expandir a utilização da inseminação artificial e aumentar a taxa de adoção de outras tecnologias emergentes na reprodução, métodos precisos de controle da ovulação precisam ser desenvolvidos. Vários estudos foram conduzidos para induzir a ovulação em bovinos em momento específico, eliminando desse modo o tempo e a mão-de-obra necessária para a verificação de cio. Stevenson et al. (2000) relataram taxas de prenhez mais altas ($P < 0,05$) para vacas inseminadas artificialmente após a detecção de cio (44%; Select Synch - GnRH no dia -9, PG no dia -2 e verificação de cio) comparadas com vacas inseminadas com IA programada (33%; CO-Synch – Select Synch com inseminação programada e uma segunda aplicação de GnRH no dia 0). Entretanto, Lemaster et al. (2001) relataram taxa de prenhez mais alta ($P < 0,05$) para IA programada usando o protocolo CO-Synch (31%) comparada com IA feita após verificação de cio e utilização do protocolo Select Synch (21%).

Atualmente, a maioria dos protocolos de IATF (protocolos de sincronização da ovulação) usam uma injeção de GnRH para que o folículo dominante ovule próximo ao momento da inseminação. Os protocolos Ovsynch (Pursley et al., 1998) e CO-Synch (Geary & Whittier, 1998) incluem os mesmos tratamentos hormonais para a sincronização da ovulação [no dia -9, é aplicado o GnRH, no dia -2, é administrada PG e 48 horas mais tarde (dia 0) é aplicado GnRH para induzir a ovulação próximo ao momento da inseminação]. O protocolo de IATF MGA-Select inclui o fornecimento de MGA no cocho por 14 dias, GnRH no dia 26, PG no dia 33 e GnRH 80 horas mais tarde para induzir a ovulação próximo ao momento em que será feita a inseminação (Perry et al., 2002b). O uso do GnRH na hora da inseminação resultou na indução da ovulação de folículos de vários tamanhos diferentes (Perry et al., 2005), e embora os folículos dominantes de bovinos (≥ 10 mm) possam ovular em resposta à onda de gonadotrofinas induzida pelo GnRH, foi necessária uma dose mais alta de LH para induzir a ovulação de um folículo de 10 mm comparado com folículos maiores (Sartori et al., 2001). Uma diminuição na taxa de gestação foi observada quando folículos menores foram induzidos à ovulação seguindo um protocolo de IATF, tanto em novilhas quanto em vacas (protocolo CIDR – Lamb et al., 2001; T.W. Geary dados não publicados; protocolo CO-Synch – Perry et al., 2005; Perry et al., 2004; **Figura 2**). Resultados semelhantes foram relatados em vacas *Bos indicus*. A avaliação do tamanho do folículo no momento da IATF de 2388 vacas Nelore e Nelore x Angus indicou que um folículo de no mínimo 11,1 mm de diâmetro era necessário para que houvesse o máximo de sucesso na gestação (Sa Filho et al., 2010). Portanto, o folículo ovulatório pode influenciar a fertilidade através da preparação do oócito para o desenvolvimento embrionário, preparação das células foliculares para a luteinização e/ou preparação do ambiente uterino para o estabelecimento e manutenção da gestação. No entanto, quando embriões de qualidade semelhante foram transferidos para vacas induzidas a ovularem folículos pequenos (< 12 mm) ou grandes (> 12 mm), as vacas que ovularam folículos pequenos tiveram taxa de prenhez significativamente mais baixa quando comparadas com vacas que ovularam folículos grandes (Mussard et al., 2003). O estudo anterior indica que o ambiente uterino é provavelmente um fator importante na redução da fertilidade que acompanha a indução da ovulação de folículos dominantes pequenos.

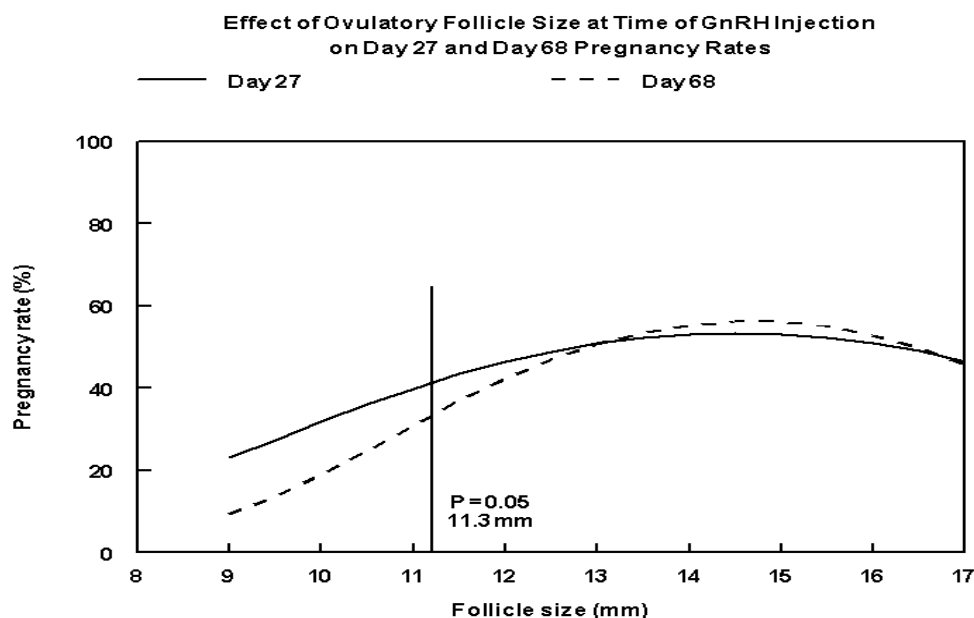


Figura 2. Análise de regressão do efeito do tamanho do folículo ovulatório no momento da aplicação do GnRH/inseminação sobre a taxa de prenhez 27 e 68 dias após a inseminação. O tamanho dos folículos a partir do qual houve redução na taxa de gestação ($P < 0,05$) está indicado pela linha vertical. (Perry et al., 2005)

Existe variação na proporção de animais induzidos a ovularem folículos pequenos dependendo do protocolo de IATF. Após o protocolo CO-Synch, 30% das vacas e 52% das novilhas (G.A. Perry dados não publicados) foram induzidas a ovularem folículos < 11,5 mm de diâmetro. No entanto, quando a IATF foi feita em vacas com ou sem CIDR do dia -9 a -2 [no dia -9 elas receberam GnRH, no dia -2 PG e 48 horas mais tarde (dia 0) elas receberam GnRH e foram inseminadas], a porcentagem de vacas que ovularam folículos < 11,5 mm foi de 7% para aquelas tratadas com CIDR e 15% para aquelas que não receberam CIDR (T.W. Geary dados não publicados). Sendo assim, alguns protocolos de IATF são mais eficientes em reduzir a porcentagem de folículos pequenos induzidos a ovularem. No entanto, independentemente do protocolo de sincronização, a redução na fertilidade parece ocorrer sempre que folículos pequenos são induzidos à ovulação (**Figura 2**).

Eficiência do inseminador

As taxas de fertilização observadas com monta natural ou inseminação artificial em bovinos variam entre 89 e 100% (Bearden et al., 1956; Diskin & Sreenan, 1980; Gayerie de Abreu et al., 1984; Kidder et al., 1954; Maurer & Chenault, 1983). Quando taxas de gestação de 13.942 primeiras coberturas por inseminação artificial foram comparadas com 6.310 primeiras coberturas por monta natural, não foi detectada diferença ($P > 0,10$) entre os métodos (Williamson et al., 1978).

Com a monta natural a eficiência do inseminador é determinada pela capacidade do touro em cobrir uma vaca. O objetivo de um exame andrológico é avaliar se o touro consegue cobrir as fêmeas, ou seja, se ele possui as características físicas necessárias para emprenhar a vaca. Além de problemas estruturais, doenças ou lesões no pênis ou prepúcio podem impedir a cobertura por monta natural. Essas anomalias são detectadas através de um exame andrológico cuidadoso e da observação do animal tentando cobrir uma vaca. Um touro que tem sêmen de alta qualidade, mas que fisicamente é incapaz de cobrir uma fêmea não pode ser usado na monta natural.

Com a IA, a eficiência do inseminador é influenciada pelo manuseio do sêmen e pela habilidade do técnico em depositar o sêmen no local correto. Um inventário detalhado do sêmen deve ser facilmente acessível para que as palhetas possam ser localizadas e retiradas do botijão rapidamente evitando a exposição do sêmen à temperatura ambiente. Quando uma palheta é retirada do botijão é essencial que o técnico mantenha a caneca, os racks e as palhetas não utilizadas o mais baixo possível no gargalo do botijão. O ideal é manter todas as palhetas que não serão usadas abaixo da linha de congelamento no gargalo do botijão. A temperatura dentro do botijão de nitrogênio líquido é de -196 graus Celsius ($^{\circ}\text{C}$; -326 graus Fahrenheit, $^{\circ}\text{F}$). Os espermatozoides começam a ser danificados (avaliados pela motilidade espermática) quando a temperatura chega a -79 $^{\circ}\text{C}$ (-110 $^{\circ}\text{F}$; Etgen et al., 1957; Bean et al., 1963; DeJarnette, 1999). O nível de nitrogênio líquido dentro do botijão que está sendo usado durante as inseminações pode afetar dramaticamente a temperatura das palhetas que são repetidamente levantadas e abaixadas para a retirada das doses. Quando o botijão está cheio de nitrogênio

líquido, a elevação do sêmen até o gargalo do tanque por um período de aproximadamente 1 minuto resulta em aumento na temperatura de apenas 15 °C (de -196 para -180 °C). Entretanto, quando o nível de nitrogênio líquido está baixo (aproximadamente 14 cm), a temperatura das palhetas aumenta 72 °C (de -196 para -124 °C) e a temperatura não retorna para -196 °C quando as palhetas são recolocadas. Mais ainda, os danos aos espermatozoides não podem ser corrigidos quando se retorna o sêmen ao nitrogênio líquido (Berndtson et al., 1976; Saacke et al., 1978).

Quando várias vacas precisam ser inseminadas em um determinado dia, múltiplas palhetas de sêmen são rotineiramente descongeladas simultaneamente para facilitar a IA. Dalton et al. (2004) conduziram um experimento para determinar: a) o efeito do descongelamento simultâneo de várias palhetas de 0,5-mL de sêmen e a sequência das inseminações (1^a, 2^a, 3^a ou 4^a) sobre as taxas de concepção, b) se as taxas de concepção obtidas após IA feita por técnicos profissionais (PAI) e inseminadores das fazendas (HI) eram diferentes, e c) o efeito do tempo entre o início do descongelamento das palhetas até a deposição do sêmen sobre as taxas de concepção. Houve uma diferença na média da taxa de concepção entre PAI e HI (45% vs. 27%, respectivamente), mas o descongelamento simultâneo e a sequência das inseminações (1^a, 2^a, 3^a ou 4^a), e o tempo decorrido entre o descongelamento inicial e a conclusão da quarta IA não tiveram efeito sobre as taxas de concepção entre os grupos de inseminadores (Dalton et al., 2004). Uma recomendação geral sobre o número de palhetas que podem ser descongeladas simultaneamente deprecia a importância geral do manuseio adequado do sêmen para o sucesso na IA. As taxas de concepção tendem a ser maximizadas quando os funcionários: a) identificam corretamente e administram os tratamentos adequados a todas as vacas para a sincronização do estro ou ovulação, b) identificam corretamente as vacas em estro, c) seguem as recomendações da Central de IA para o descongelamento do sêmen, d) evitam o contato direto entre as palhetas durante o descongelamento de várias delas simultaneamente para evitar a redução na viabilidade espermática pós-descongelamento que pode ocorrer quando as palhetas grudam umas nas outras (Brown et al., 1991), e) uso de higiene adequada para os procedimentos, f) manutenção da proteção térmica das palhetas durante a montagem do aplicador e transporte até a vaca e g) depósito do sêmen no útero da vaca dentro de um intervalo máximo de 15 minutos do descongelamento da palheta.

Usando sêmen convencional, muitos estudos compararam a deposição de sêmen próximo à grande curvatura dos cornos uterinos com a deposição tradicional no corpo do útero. Embora Senger et al. (1988), López-Gatius (1996), e Pursley (2004) tenham relatado aumento nas taxas de concepção quando o sêmen foi depositado nos cornos uterinos em vez de no corpo, Hawk & Tanabe (1986), Williams et al. (1988), e McKenna et al. (1990) não encontraram diferença na fertilidade quando compararam esses dois locais para deposição do sêmen. Além disso, Diskin et al. (2004) relataram uma interação entre inseminador e local de deposição do sêmen, com evidências de que dependendo de cada inseminador pode haver um aumento, redução, ou nenhum efeito da deposição no corno uterino sobre a taxa de concepção.

Infelizmente não está claro por que alguns estudos mostram vantagem após a inseminação no corno, e outros não. Uma possível explicação para o efeito positivo das inseminações no corno pode estar relacionada com a minimização ou eliminação da deposição de sêmen na cérvix. Erros com a inseminação cervical respondem por aproximadamente 20% das tentativas de deposição no corpo do útero (Peters et al., 1984). Macpherson (1968) relatou que a inseminação cervical resultou em redução de 10% na fertilidade quando comparada com a deposição de sêmen no corpo do útero. Claramente, todos os técnicos de IA precisam desenvolver suas habilidades para reconhecerem quando a ponta do aplicador ainda está dentro da cérvix. Para maximizarem as taxas de concepção, os técnicos de IA precisam continuar a manipular o trato reprodutivo até que a ponta do aplicador tenha passado a cérvix e só daí depositarem o sêmen no corpo do útero.

Nível de fertilidade do rebanho

O nível de fertilidade do rebanho talvez seja um dos fatores mais difíceis de se avaliar. A fertilidade do rebanho inclui se as vacas estão ciclando ou não, eficiência na aplicação dos protocolos, mortalidade embrionária, condição corporal (nível nutricional dos animais) e sanidade. Vários desses tópicos (se as vacas estão ciclando ou não e nutrição) serão discutidas em mais detalhes em outros capítulos destes anais. Esta revisão enfocará na perda embrionária e fatores de manejo que podem aumentar ou diminuir essa mortalidade embrionária.

As taxas de fertilização costumam variar entre 89% e 100% quando o sêmen está presente no momento em que ocorre a ovulação (Bearden et al., 1956; Diskin & Sreenan, 1980; Gayerie de Abreu et al., 1984; Kidder et al., 1954; Maurer & Chenault, 1983). Embora a fertilização normalmente ocorra, as taxas de prenhez (número de animais que emprenham dividido pelo número de animais inseminados) costuma ser de 60% a 70% para monta natural ou inseminação artificial. Embora a natureza (oócitos de qualidade ruim, doenças, alterações cromossômicas, etc) contribua bastante para essas perdas, as práticas de manejo também podem aumentar a mortalidade embrionária. Estresse, principalmente térmico ou de transporte, podem ser prejudiciais aos embriões e reduzirem as taxas de gestação.

Para entender como o estresse pode aumentar a mortalidade embrionária, é necessário primeiro entender como o embrião se desenvolve (**Tabela 3**). Assim como no ciclo estral, o desenvolvimento do embrião começa a ser contado no dia 0, ou no dia em que a vaca manifesta o cio. Nesse dia a fêmea fica receptiva ao macho e ocorre a inseminação. A ovulação ocorre no dia 1 ou cerca de 30 horas após a primeira monta (Pursley et al., 1995; Vasconcelos et al., 1999; Wiltbank et al., 2000). Se há um espermatozóide viável presente, a fertilização ocorre dentro do oviduto logo após a ovulação. A primeira divisão celular ocorre no dia 2, e no dia 3 o embrião alcança o estágio de 8 células (Shea, 1981). Entre os dias 5 e 6 o embrião migra para o corno uterino e nos dias 7 a 8 forma um blastocisto (Shea, 1981, Flechon & Renard, 1978, Peters, 1996). Nesse estágio podem ser vistas duas partes diferentes no embrião: 1) uma massa de células internas que dará origem ao feto e 2) o trofoblasto, que formará a placenta. Entre os dias 9 a 11 o embrião eclode da zona pelúcida, uma casca protetora que envolve o embrião até esse momento (Shea, 1981, Peters, 1996). Depois, nos dias 15 a 17 o embrião produz um sinal químico para prevenir a destruição do corpo lúteo, permitindo que a vaca continue prenhe (Peters, 1996). O embrião então se fixa ao útero no dia 19, e por volta do dia 25, a placentação, uma interface celular complexa começa a se formar entre a vaca e o bezerro. No dia 42 o embrião já está completamente fixado ao útero da vaca (Peters, 1996).

Tabela 3. Cronograma do desenvolvimento inicial do embrião bovino

Evento	Dia
Estro	0
Ovulação	1
Fertilização	1
Primeira divisão celular	2
Estágio de 8 células	3
Migração para o útero	5-6
Blastocisto	7-8
Eclosão	9-11
Reconhecimento materno da gestação	15-17
Fixação ao útero	19
Adesão ao útero	21-22
Placentação	25
Fixação definitiva do embrião ao útero	42
Nascimento	285

Dados adaptados de: (Shea, 1981, Flechon & Renard, 1978, Peters, 1996, Telford et al., 1990)

Estresse do transporte e mortalidade embrionária

Quando se conhecem os pontos críticos no desenvolvimento dos embriões, é possível entender como o estresse do transporte pode aumentar a mortalidade embrionária em bovinos (**Tabela 4**). Quando os animais são carregados em um caminhão e transportados para outro local, eles ficam estressados e liberam hormônios relacionados ao estresse. Esses hormônios desencadeiam a liberação de outros hormônios que mudam o ambiente uterino no qual o embrião está se desenvolvendo. Durante a formação do blastocisto, eclosão, reconhecimento materno da gestação e fixação ao útero, o embrião fica vulnerável a essas mudanças. Os pontos de tempo mais críticos são entre os dias 5 e 42 após a inseminação. Antes do dia 5, o embrião está no oviduto e não fica sujeito a alterações no ambiente uterino, o que significa que o

estresse não interfere com a viabilidade do embrião nesse ponto. Quanto mais tempo depois do dia 42, menos grave parece ser a interferência do estresse do transporte sobre a perda embrionária. Quanto a fixação do embrião ao útero se completa o embrião é sustentado pela mãe e parece não ser tão facilmente afetado por mudanças no ambiente. Por outro lado, entre esses dias (dias 5 a 42), o embrião está sob o maior risco. O transporte da vaca nesse período pode provocar alterações prejudiciais no ambiente uterino que podem resultar na morte do embrião. A administração de flunixin meglumine, um inibidor de prostaglandina, a vacas ou novilhas 10 a 13 dias após a IA (quando os animais são transportados) reduziu a perda gestacional em cerca de 9% (Merrill et al., 2007). Entretanto, a administração de flunixin meglumine 10 a 15 dias após a inseminação não aumentou o estabelecimento da gestação em bovinos. Em outro estudo, o manuseio das novilhas para a administração do flunixin meglumine (comparado com deixar as novilhas no pasto) reduziu a taxa de prenhez em 6% (Geary et al., 2010). A combinação desses estudos nos dá evidências de que algumas novilhas são mais sensíveis ao estresse do manejo.

Tabela 4. Efeito de quanto tempo após a inseminação é feito o transporte sobre as taxas de prenhez

	Quanto dias após a inseminação o transporte é feito			
	1 a 4	8 a 12	29 a 33	45 a 60*
Taxa de prenhez com sincronização	74%	62%	65%	
% perda gestacional comparada com transporte nos dias 1 a 4		12%	9%	6%*
Taxa de prenhez na estação de monta	95%	94%	94%	

*Perda em novilhas comparada com a porcentagem de prenhas antes do transporte (gestação determinada através de ultra-sonografia transretal)

Dados adaptados de Harrington et al., 1995, e T. W. Geary dados não publicados

Estresse térmico e mortalidade embrionária

O melhor momento para transportar as vacas é durante os estágios iniciais do desenvolvimento. No entanto, esse é o momento em que o embrião é mais susceptível a aumentos na temperatura. Temperatura, umidade, calor irradiante e vento influenciam o estresse térmico das vacas. A temperatura retal normal de bovinos é 39 °C (102,2 °F), e um aumento na temperatura retal de apenas 1 °C (2° F) já pode resultar na redução no desenvolvimento embrionário (Ulberg & Burfening, 1967). Quando a temperatura retal chega a 41 °C (105,8°F) por 9 horas no dia da inseminação, o desenvolvimento embrionário já pode ser comprometido (Rivera & Hansen, 2001). Há relatos também de que o estresse térmico altera as ondas foliculares, resultando na redução da qualidade dos oócitos (Wolfenson et al., 1995). Pesquisadores relataram que o estresse térmico 42 dias antes (Al-Katanani et al., 2001) e até 40 dias após a inseminação pode influenciar as taxas de gestação (Cartmill et al., 2001). Isso mostra o quão importante é fazer um bom planejamento antes da estação de monta.

Vários métodos foram pesquisados para reduzir os efeitos do estresse térmico. Sombra, ventiladores, nebulizadores, todos podem ajudar mitigar os efeitos do estresse térmico em programas de monta natural e inseminação artificial. Esses métodos permitem que os animais fiquem mais frescos durante as horas mais quentes do dia. Em regiões onde há alta umidade, os nebulizadores podem não beneficiar os animais, pois a água não evapora impedindo que os animais se refresquem.

Produtores que utilizam IA também podem incluir protocolos de IATF para aumentarem as taxas de gestação durante os meses mais quentes do verão. A IATF aumentou a taxa de prenhez de animais inseminados 12 horas após a detecção do cio sob condições de estresse térmico (Aréchiga et al., 1998; de la Sota et al., 1998). Isso se deve provavelmente ao fato de que menos animais manifestam sinais de cio quando estão sob condições de estresse térmico. A detecção do cio é parte fundamental de se conseguir que mais animais emprenhem. Como menos vacas manifestam os sinais do cio, menos são inseminadas. Neste caso, os protocolos de que sincronizam a ovulação seriam a melhor opção, pois eliminam a necessidade da verificação de cio.

A utilização da transferência de embriões em épocas de estresse térmico também pode ajudar a aumentar as taxas de prenhez. Comprovou-se que embriões frescos de alta qualidade elevam as taxas de gestação em vacas inseminadas sob condições de estresse térmico (Putney et al., 1989). Os embriões conseguem se adaptar a temperaturas mais elevadas no momento da transferência. Sendo assim, a utilização da transferência de embriões durante períodos de calor pode ajudar a melhorar o sucesso na prenhez.

Estresse por mudanças na dieta

Mudanças no estado nutricional, através de diversos mecanismos, também podem ter influência tremenda sobre a sobrevivência embrionária. Novilhas alimentadas com 85% dos requerimentos de energia e proteína de manutenção tiveram embriões com desenvolvimento reduzido no dia 3 e no dia 8, indicando redução no crescimento embrionário, comparadas com novilhas alimentadas com 100% de seus requerimentos de manutenção (Hill et al., 1970). Portanto, mudanças nutricionais podem influenciar a sobrevivência embrionária e a capacidade de novilhas engravidarem durante uma estação de monta definida.

Pesquisas anteriores indicaram que a habilidade de pastejo é aprendida (Flores et al., 1989a, b, c) no início da vida (Provenza & Balph, 1988). Esse aprendizado resulta no desenvolvimento de preferências ou aversão a plantas e no desenvolvimento das habilidades necessárias para a coleta e ingestão de forragens de maneira eficiente (Provenza & Balph, 1987). Novilhas criadas a pasto da desmama até a inseminação em vez de em piquetes onde são alimentadas no cocho parecem reter melhor essa capacidade de pastejo e apresentam um ganho de peso médio maior no verão seguinte (Olson et al., 1992; Salverson et al., 2009). Redução no consumo de ração de 120% para 40% dos requerimentos de manutenção resultou na perda de 25,5 kg (56,3 lbs) ao longo de duas semanas (1,8 kg/dia; Mackey et al., 1999); semelhante às perdas relatadas por Salverson et al. 2009; **Figura 3**) quando novilhas que cresceram em um confinamento da desmama até a primavera seguinte foram transferidas para um pasto. No entanto, novilhas criadas no pasto com suplementação da desmama até a primavera, não perderam peso na primavera seguinte. A nutrição após a inseminação pode influenciar a sobrevivência embrionária através de diversos mecanismos. Podem ocorrer

mudanças nutricionalmente mediadas no ambiente uterino com a alteração dos componentes das secreções ou das concentrações circulantes de progesterona, que regula o ambiente uterino (vide a revisão de Foxcroft, 1997). Em estudo recente criamos novilhas de corte da desmama até a inseminação em um confinamento ($n = 52$; LOT) ou no pasto ($n=53$; GRASS). Imediatamente após a IATF todas as novilhas foram colocadas no mesmo pasto. A confirmação da gestação foi feita 42 dias após a IA. Houve tendência ($P = 0,10$) de haver mais novilhas LOT ciclando antes da estação de monta (94% vs. 84%), mas as novilhas do grupo GRASS tenderam ($P = 0,20$) a terem taxas de concepção mais altas como resultado da IATF quando comparadas com as novilhas LOT (57% vs. 44%).

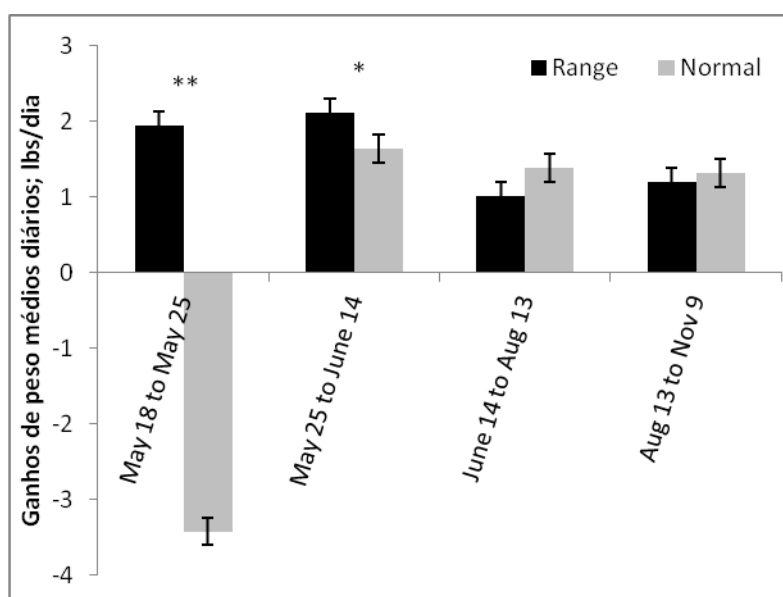


Figura 3. Ganho de peso médio diário (lbs/dia) de novilhas desmamadas e criadas no pasto (Range) comparadas com novilhas desmamadas e criadas em confinamento (Normal). Todas as novilhas foram transferidas para um mesmo pasto no dia 18 de maio (* $P = 0,06$; ** $P < 0,05$)

Em outro estudo recente, novilhas de corte ($n = 164$) foram criadas em confinamento da desmama até a inseminação. Quando inseminadas, as novilhas foram alocadas para um de dois tratamentos: 1) novilhas transferidas do confinamento para um pasto de primavera, ou 2)

novilhas foram movidas para um pasto de primavera e suplementadas com DDGS (5 lbs/cabeça/dia) por 42 dias. A confirmação da gestação foi determinada 42 dias após a IA. As novilhas alimentadas somente com as forragens do pasto perderam $16,8 \pm 1,8$ kg, mas as novilhas que receberam forragem mais suplementação ganharam $20,4 \pm 1,4$ kg da IA até a confirmação da prenhez ($P < 0,01$). O sucesso na gestação foi diferente entre os tratamentos ($P = 0,05$). As novilhas que não foram suplementadas depois da IA tiveram taxa de sucesso mais baixa (26%) quando comparadas com novilhas suplementadas (40%). Portanto, quando as novilhas foram criadas em confinamento, houve tendência de o sucesso na prenhez ser influenciado pela suplementação e pelo ganho de peso subsequente quando os animais foram transferidos para o pasto.

Como descrito por Salverson et al. (2009) quando novilhas criadas em confinamento foram transferidas para o pasto houve redução no ganho de peso médio diário comparado com novilhas criadas a pasto pelos primeiros 30 dias. Entretanto, depois de 30 dias no pasto com forragens de primavera o ganho de peso médio diário foi semelhante entre os tratamentos. Dados esses resultados, conduzimos um estudo para determinar qual é a influência de transferir novilhas criadas em confinamento para o pasto antes da IA sobre a sucesso na gestação. Na primeira réplica deste estudo, 50 novilhas foram igualmente divididas entre dois tratamentos: 1) transferidas para o pasto 30 dias antes da IA e 2) deixadas no confinamento até a IA. Após a IA todas as novilhas foram colocadas no mesmo pasto por 35 dias até a confirmação da prenhez. Da IA até a verificação da gestação (35 dias após a IA) as novilhas transferidas para o pasto haviam ganhado 7,7 kg, enquanto as que continuaram no confinamento ganharam apenas 0,3 kg ($P = 0,07$). O sucesso na gestação foi de 57% (12/21) para as novilhas transferidas para o pasto e 46% (11/24) para aquelas que ficaram no confinamento. Na segunda réplica desse estudo, 191 novilhas foram igualmente divididas entre dois tratamentos: 1) transferidas para o pasto 30 dias antes da IA e 2) deixadas no confinamento até a IA. Após a IA todas as novilhas foram colocadas no mesmo pasto por 35 dias até a confirmação da gestação. Da IA até a verificação da gestação (dia 70 após a IA) as novilhas transferidas para o pasto antes da IA ganharam 47,6 kg e as novilhas que ficaram no confinamento ganharam apenas 1,3 kg ($P < 0,01$). O sucesso final na gestação após a IA seguindo a detecção de cio foi de 63% (52/82) e

58% (46/80) para as novilhas transferidas para o pasto e deixadas no confinamento, respectivamente ($P = 0,28$). Ao longo de todos esses estudos vimos que a mudança de peso das novilhas da IA até a confirmação da gestação parece influenciar o sucesso na gestação.

Nível de fertilidade do sêmen

Claramente existem diferenças entre touros com relação à capacidade de emprenharem as vacas. Por muitas décadas as características seminais foram estudadas na tentativa de prever o sucesso reprodutivo. Mesmo assim, para determinar as diferenças de fertilidade entre touros é necessária a inseminação de diversos milhares de animais sob as mesmas práticas de manejo. Todos os touros de monta natural devem ser aprovados por um exame andrológico abrangente aproximadamente 60 dias antes de cada estação de monta. Quer se use monta natural ou IA, dois dos indicadores mais importantes disponíveis atualmente para avaliação da fertilidade dos touros são estudos da motilidade e morfologia espermática.

Conclusões

Esta revisão enfocou alguns dos muitos fatores que influenciam as taxas de gestação tanto para monta natural quanto para IA e programas reprodutivos que incluem ou não a sincronização dos animais. Um dos métodos mais abrangentes para a avaliação dos fatores que influenciam a fertilidade é a “Equação da Reprodução”, que inclui itens de 4 áreas principais: 1) Porcentagem de fêmeas com cio detectado e inseminadas, 2) Eficiência do inseminador, 3) Nível de fertilidade do rebanho, e 4) Nível de fertilidade do sêmen.

Literatura Citada

- Acott, T. S., and D. W. Carr. 1984. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: II. Interaction of pH and a quiescence factor. *Biol Reprod* 30: 926-935.
- Al-Katanani, Y. M., F. F. Paula-Lopes, and P. J. Hansen. 2001. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 85:390–396.
- Aréchiga, C. F., C. R. Staples, L. R. McDowell, and P. J. Hansen. 1998. Effects of timed insemination and supplemental β -carotene on reproduction and milk yield of dairy cows under heat stress. *J. Dairy Sci.* 81:390–402.

- Austin, C. R. 1975. Sperm fertility, viability and persistence in the female tract. *J Reprod Fertil Suppl*: 75-89.
- Bean, B.H., B.W. Pickett, and R.C. Martig. 1963. Influence of freezing methods, extenders and storage temperatures on motility and pH of frozen bovine semen. *J. Dairy Sci.* 46:145.
- Bearden, H. J., W. M. Hansel, and R. W. Bratton. 1956. Fertilization and embryonic mortality rates of bulls with histories of either low or high fertility in artificial breeding. *J Dairy Sci* 39: 312-318.
- Berndtson, W.E., B.W. Pickett, and C.D. Rugg. 1976. Procedures for field handling of bovine semen in plastic straws. In: *Proc. Nat'l. Assoc. Anim. Breeders 6th Tech. Conf. on Artif. Insem. and Reprod.*, Columbia, MO, p. 51-60.
- Brewster, J., and C. L. Cole. 1941. The time of ovulation in cattle. *J. Dairy Sci.* 24:111.
- Brown, D.W. Jr., P.L. Senger, and W.C. Becker, 1991. Effect of group thawing on post-thaw viability of bovine spermatozoa packaged in .5-milliliter French straws. *J. Anim. Sci.* 69:2303-2309.
- Carr, D. W., and T. S. Acott. 1984. Inhibition of bovine spermatozoa by caudal epididymal fluid: I. Studies of a sperm motility quiescence factor. *Biol Reprod* 30: 913-925.
- Cartmill, J. A., S. Z. El-Zarkouny, B. A. Hensley, T. G. Rozell, J. F. Smith, and J. S. Stevenson. 2001. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperature before or after calving or both. *J. Dairy Sci.* 84:799-806.
- Chenoweth, P. J. 1997. Bull libido/serving capacity. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 13: 331-344.
- Dalton, J.C., A. Ahmadzadeh, B. Shafii, W.J. Price, and J.M. DeJarnette. 2004. Effect of thawing multiple 0.5-mL semen straws and sequential insemination number on conception rates in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 87:972-975.
- DeJarnette, J.M. 1999. Factors affecting the quality of frozen semen after thawing. In: *Proc. Soc. for Therio. Ann. Conf.*, Nashville, TN, pp. 267-279.
- de la Sota, R. L., J. M. Burke, C. A. Risco, F. Moreira, M. A. DeLorenzo, and W. W. Thatcher. 1998. Evaluation of timed insemination during summer heat stress in lactating dairy cattle. *Theriogenology* 49:761-770.
- Diskin, M. G., and J. M. Sreenan. 1980. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J Reprod Fertil* 59: 463-468.
- Diskin, M.G., J.R. Pursley, D.A. Kenny, J.F. Mee, and J.M. Sreenan. 2004. The effect of deep intrauterine placement of semen on conception rate in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:(Suppl. 1):257 (Abstr.).
- Downing, E. R., D. Schutz, D. Couch, D. G. LeFever, J. C. Whittier, and T. W. Geary. 1998. Methods of estrous detection to increase pregnancies using the select synch protocol., *Colorado State University Beef Program Report*.
- Elrod, C. C., and W. R. Butler. 1993. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *J Anim Sci* 71: 694-701.
- Etgen, W.M., J.M. Ludwick, H.E. Rickard, E.A. Hess, and F. Ely. 1957. Use of mechanical refrigeration in preservation of bull semen. *J. Dairy Sci.* 40:774.
- Fields, S. D., Gebhart, K. L., Perry, B. L., Gonda, M. G., Wright, C.L., Bott, R. C., and Perry, G. A. 2011. Effects of Initiation of Standing Estrus PRIOR TO an Injection of GnRH on LH

- Release, Subsequent Concentrations of Progesterone, and steroidogenic enzyme expression. Dom. Anim. Endo. (In Press)
- Flechon, J. E., and J. P. Renard. 1978. A scanning electron microscope study of the hatching of bovine blastocysts in vitro. J Reprod Fertil 53: 9-12.
- Flores, E. R., F. D. Provenza, and D. F. Balph. 1989a. The effect of experience on the foraging skill of lambs: Importance of plant form. Applied Animal Behaviour Science 23: 285-291.
- Flores, E. R., F. D. Provenza, and D. F. Balph. 1989b. Relationship between plant maturity and foraging experience of lambs grazing hycrested wheatgrass. Applied Animal Behaviour Science 23: 279-284.
- Flores, E. R., F. D. Provenza, and D. F. Balph. 1989c. Role of experience in the development of foraging skills of lambs browsing the shrub serviceberry. Applied Animal Behaviour Science 23: 271-278.
- Foxcroft, G. R. 1997. Mechanisms mediating nutritional effects on embryonic survival in pigs. J Reprod Fertil Suppl 52: 47-61.
- Garrett, J. E., R. D. Geisert, M. T. Zavy, and G. L. Morgan. 1988. Evidence for maternal regulation of early conceptus growth and development in beef cattle. J Reprod Fertil 84: 437-446.
- Gayerie de Abreu, F., G. E. Lamming, and R. C. Shaw. 1984. A cytogenetic investigation of early stage bovine embryos - relation with embryo mortality. In: 10th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination, Urbana, IL. p 82.
- Geary, T. W., and J. C. Whittier. 1998. Effects of a timed insemination following synchronization of ovulation using the Ovsynch or CO-Synch protocol in beef cows. Prof. Anim. Sci. 14: 217-220.
- Geary, T. W., J. C. Whittier, E. R. Downing, D. G. LeFever, R. W. Silcox, M. D. Holland, T. M. Nett, and G. D. Niswender. 1998. Pregnancy rates of postpartum beef cows that were synchronized using Syncro-mate-B or the Ovsynch protocol. J Anim Sci 76: 1523-1527.
- Geary, T. W., R. P. Ansotegui, M. D. MacNeil, A. J. Roberts, and R. C. Waterman. 2010. Effects of flunixin meglumine on pregnancy establishment in beef cattle J Anim Sci 2010 88: 943-949.
- Geisert, R. D., G. L. Morgan, E. C. Short, Jr., and M. T. Zavy. 1992. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. Reprod Fertil Dev 4: 301-305.
- Goltz, J. S., T. K. Gardner, K. S. Kanous, and C. B. Lindemann. 1988. The interaction of pH and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate on activation of motility in triton x-100 extracted bull sperm. Biol Reprod 39: 1129-1136.
- Grant, J. K., and G. A. Perry. 2010. Uterine expression of Na⁺/H⁺ antiporters 1, 2, and 4 in beef cows following CIDR removal. Reproduction in Domestic Ruminants VII abstr. 564.
- Gray, C. A., K. M. Taylor, W. S. Ramsey, J. R. Hill, F. W. Bazer, F. F. Bartol, and T. E. Spencer. 2001. Endometrial glands are required for preimplantation conceptus elongation and survival. Biol Reprod 64: 1608-1613.
- Hall, J. G., C. Branton, and E. J. Stone. 1959. Estrus, estrous cycles, ovulation time, time of service, and fertility of dairy cattle in Louisiana. J. Dairy Sci. 42: 1086-1094.

- Hammerstedt, R. H. 1993. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: A review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod Fertil Dev* 5: 675-690.
- Harrington, T. E., M. E. King, H. E. Mihura, D. G. LeFever, R. Hill, and K. G. Odde. 1995. Effect of transportation time on pregnancy rates of synchronized yearling beef heifers. *Colorado State Univ. Beef Program Rep.*, Fort Collins, CO.
- Hawk, H. W. 1983. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *J Dairy Sci* 66: 2645-2660.
- Hawk, H.W., and T.Y. Tanabe. 1986. Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single-ovulating cattle. *J. Anim. Sci.* 63:551-560.
- Healy, V. M., G. W. Boyd, P. H. Gutierrez, R. G. Mortimer, and J. R. Piotrowski. 1993. Investigating optimal bull:Heifer ratios required for estrus- synchronized heifers. *J Anim Sci* 71: 291-297.
- Heersche, G., Jr., and R. L. Nebel. 1994. Measuring efficiency and accuracy of detection of estrus. *J Dairy Sci* 77: 2754-2761.
- Hill, J. R., Jr., D. R. Lamond, D. M. Henricks, J. F. Dickey, and G. D. Niswender. 1970. The effects of undernutrition on ovarian function and fertility in beef heifers. *Biol Reprod* 2: 78-84.
- Hurnik, J. F., and G. J. King. 1987. Estrous behavior in confined beef cows. *J Anim Sci* 65: 431-438.
- Kidder, H. E., W. G. Black, J. N. Wiltbank, L. C. Ulberg, and L. E. Casida. 1954. Fertilization rates and embryonic death rates in cows bred to bulls of different levels of fertility. *J Dairy Sci* 37: 691-697.
- Lamb, G. C., C. R. Dahlen, K. A. Vonnahme, G. R. Hansen, J. D. Arseneau, G. A. Perry, J. Clement, and J. D. Arthington. 2006. Effects of estrous synchronization with a CIDR prior to the breeding season in bull-breeding herds on pregnancy rates. *J. Anim. Sci.* 84(Suppl. 1):433 Abstr. 580.
- Lamb, G. C., J. S. Stevenson, D. J. Kesler, H. A. Garverick, D. R. Brown, and B. E. Salfen. 2001. Inclusion of an intravaginal progesterone insert plus gnrh and prostaglandin f2alpha for ovulation control in postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci* 79: 2253-2259.
- Lares, S. F., S. D. Fields, B. L. Perry, D. G. Chen, and G. A. Perry. 2008. Relationship between uterine pH at fixed-time AI and pregnancy success in beef cattle. *J. Anim. Sci.* 86(E-Suppl. 2): Abstr 721.
- Lemaster, J. W., J. V. Yelich, J. R. Kempfer, J. K. Fullenwider, C. L. Barnett, M. D. Fanning, and J. F. Selph. 2001. Effectiveness of gnrh plus prostaglandin f2alpha for estrus synchronization in cattle of *bos indicus* breeding. *J Anim Sci* 79: 309-316.
- Lobato, J. F. P., G. R. Pearce, and R. G. Beihaarz. 1980. Effect of early familiarization with dietary supplements on the subsequent ingestion of molasses-urea blocks by sheep. *Applied Animal Ethology* 6: 149-161.
- López-Gatius, F. 1996. Side of gestation in dairy heifers affects subsequent sperm transport and pregnancy rates after deep insemination into one uterine horn. *Theriogenology* 45:417-425.

- Mackey, D. R., J. M. Sreenan, J. F. Roche, and M. G. Diskin. 1999. Effect of acute nutritional restriction on incidence of anovulation and periovulatory estradiol and gonadotropin concentrations in beef heifers. *Biol Reprod* 61: 1601-1607.
- Macpherson, J.W. 1968. Semen placement effects on fertility in bovines. *J. Dairy Sci.* 51:807-808.
- Mann, G. E., S. J. Mann, and G. E. Lamming. 1996. The inter-relationship between the maternal hormone environment and the embryo during the early stages of pregnancy. *J Reprod Fertil Abstract series* 21: abstract 37.
- Maurer, R. R., and J. R. Chenault. 1983. Fertilization failure and embryonic mortality in parous and nonparous beef cattle. *J Anim Sci* 56: 1186-1189.
- Maurer, R. R., and S. E. Echternkamp. 1982. Hormonal asynchrony and embryonic development. *Theriogenology* 17: 11-22.
- McDonald, L. E., R. E. Nichols, and S. H. McNutt. 1952. Study of corpus luteum ablation and progesterone replacement therapy in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 13: 446-451.
- McKenna, T., R.W. Lenz, S.E. Fenton, and R.L. Ax. 1990. Nonreturn rates of dairy cattle following uterine body or cornual insemination. *J. Dairy Sci.* 73:1779-1783.
- Merrill, M. L., R. A. Ansotegui, P. D. Burns, M. D, MacNeil, and T. W. Geary. 2007. Effects of flunixin meglumine and transportation on establishment of pregnancy in beef cows. *J. Anim. Sci.* 85:1547-1554.
- Mussard, M. L., C. R. Burke, and M. L. Day. 2003. Ovarian follicle maturity at induced ovulation influences fertility in cattle. In: *Society for Theriogenology annual conference and symposium.*, Columbus, OH. p 179-185.
- Olson, K. C., J. R. Jaeger, and J. R. Brethour. 1992. Growth and reproductive performance of heifers overwintered in range or drylot environments. *Journal Production Agriculture* 5: 72-76.
- Perry, B. L., A. K. Schiefelbein, and G. A. Perry. 2008. Association between preovulatory concentrations of estradiol and expression of uterine milk protein precursor, inhibin beta A, and proenkephalin. *Biol. Reprod.* 78(Suppl. 1): Abstr. 361.
- Perry, G. A. 2005. Comparison of the efficiency and accuracy of three estrous detection methods to indicate ovulation in beef cattle. *South Dakota State University Beef Report* p. 122-127.
- Perry, G. A., and B. L. Perry. 2008a. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. *Domestic Anim. Endo.* 34:333-338.
- Perry, G. A. , and B. L. Perry. 2008b. Effects of standing estrus and supplemental estradiol on changes in uterine pH during a fixed-time AI protocol. *J. Anim. Sci.* 86: 2928-2935.
- Perry, G. A., B. L. Perry, and R. A. Cushman. 2009. Association between preovulatory concentrations of estradiol and expression of uterine milk protein precursor, inhibin beta A, period 1, proenkephalin, and receptors for oxytocin, progesterone, and estradiol. *Biol. Reprod.* 79(Suppl. 1): Abstr. 308.
- Perry, G. A., T. W. Geary, M. C. Lucy, and M. F. Smith. 2002a. Effect of follicle size at time of GnRH-induced ovulation on luteal function and fertility. In: *Western Section, American Society of Animal Science, Fort Collins, Co.* p 45-48.

- Perry, G. A., M. F. Smith, M. C. Lucy, J. A. Green, T. E. Parks, M. D. Macneil, A. J. Roberts, and T. W. Geary. 2005. Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 5268-5273.
- Perry, G. A., M. F. Smith, and D. J. Patterson. 2002b. Evaluation of a fixed-time artificial insemination protocol for postpartum suckled beef cows. *J Anim Sci* 80: 3060-3064.
- Perry, G. A., M. F. Smith, A. J. Roberts, M. D. MacNeil, and T. W. Geary. 2004. Effect of ovulatory follicle size on pregnancy rates and fetal mortality in beef heifers. *J Anim Sci* 82(Suppl. 1.): 102(Abstr. 101).
- Peters, A. R. 1996. Embryo mortality in the cow. *Anim. Breeding Abstr.* 64: 587-598.
- Peters, J.L., P.L. Senger, J.L. Rosenberger, and M.L. O'Connor. 1984. Radiographic evaluation of bovine artificial inseminating technique among professional and herdsman-inseminators using .5- and .25-mL French straws. *J. Anim. Sci.* 59:1671-1683.
- Plasse, D., A. C. Warnick, and M. Koger. 1970. Reproductive behavior of *Bos Indicus* in a subtropical environment. IV. Length of oestrous cycle, duration of oestrus, time of ovulation, fertilization, and embryo survival in grade Brahman heifers. *J. Anim. Sci.* 30:63.
- Provenza, F. D., and D. F. Balph. 1987. Diet learning by domestic ruminants: Theory, evidence and practical implications. *Applied Animal Behaviour Science* 18: 211-232.
- Provenza, F. D., and D. F. Balph. 1988. Development of dietary choice in livestock on rangelands and its implications for management. *J. Anim. Sci.* 66: 2356-2368.
- Pursley, J.R. 2004. Deep uterine horn AI improves fertility of lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87:(Suppl. 1):372(abstr.).
- Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF₂ and GnRH. *Theriogenology* 1995; 44: 915-923.
- Pursley, J. R., R. W. Silcox, and M. C. Wiltbank. 1998. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 81: 2139-2144.
- Putney, D. J., M. Drost, and W. W. Thatcher. 1989a. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology* 31:765-778.
- Randel, R. D. 1976. LH and ovulation in Brahman X Hereford and Hereford heifers. *J. Anim. Sci.* Abstract 43:300.
- Rivera, R. M., and P. J. Hansen. 2001. Development of cultured bovine embryos after exposure to high temperatures in the physiological range. *Reproduction* 121: 107-115.
- Rorie, R. W., T. R. Bilby, and T. D. Lester. 2002. Application of electronic estrus detection technologies to reproductive management of cattle. *Theriogenology* 57: 137-148.
- Rupp, G. P., L. Ball, M. C. Shoop, and P. J. Chenoweth. 1977. Reproductive efficiency of bulls in natural service: Effects of male to female ratio and single- vs multiple-sire breeding groups. *J Am Vet Med Assoc* 171: 639-642.
- Sá Filho, M. F., A. M. Crespilho, J. E. P. Santos, G. A. Perry, and P. S. Baruselli. 2010. Factors Influencing Synchronization of Ovulation and Pregnancy per Insemination After Progesterone-Based Timed Insemination Protocols in Suckled *Bos indicus* Cows. *Anim. Reprod. Sci.* 120:23-30.

- Saacke, R.G., J.A. Lineweaver, and E.P. Aalseth. 1978. Procedures for handling frozen semen. In: Proc. 12th Conf. on AI in Beef Cattle, pp. 46-61.
- Santos, J. E., W. W. Thatcher, R. C. Chebel, R. L. Cerri, and K. N. Galvao. 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim Reprod Sci* 82-83: 513-535.
- Sartori, R., P. M. Fricke, J. C. Ferreira, O. J. Ginther, and M. C. Wiltbank. 2001. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. *Biol Reprod* 65: 1403-1409.
- Schiefelbein, A. K., B. L. Perry, and G. A. Perry. 2008. Association between preovulatory concentrations of estradiol and expression of uterine receptors for oxytocin, progesterone, and estradiol. *Biol. Reprod.* 78(Suppl. 1): Abstr. 362.
- Senger, P.L., W.C. Becker, S.T. Davidge, J.K. Hillers, and J.J. Reeves. 1988. Influence of cornual insemination on conception in dairy cattle. *J. Anim. Sci.* 66:3010-3016.
- Shea, B. F. 1981. Evaluating the bovine embryo. *Theriogenology* 15: 31-42.
- Stauss, C. R., T. J. Votta, and S. S. Suarez. 1995. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol Reprod* 53: 1280-1285.
- Stevenson, J. S., K. E. Thompson, W. L. Forbes, G. C. Lamb, D. M. Grieger, and L. R. Corah. 2000. Synchronizing estrus and(or) ovulation in beef cows after combinations of GnRH, norgestomet, and prostaglandin f2alpha with or without timed insemination. *J Anim Sci* 78: 1747-1758.
- Suarez, S. S., and X. Dai. 1992. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol Reprod* 46: 686-691.
- Telford, N. A., A. J. Watson, and G. A. Schultz. 1990. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: A comparison of several species. *Mol Reprod Dev* 26: 90-100.
- Ulberg, L. D., and P. J. Burfening. 1967. Embryo death resulting from adverse environment on spermatozoa or ova. *J. Anim. Sci.* 26:571-577.
- Vasconcelos JL, Silcox RW, Rosa GJ, Pursley JR, Wiltbank MC. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. *Theriogenology* 1999; 52: 1067-1078.
- Wang, X. F, Yu, M. K., Lam, S. Y., Leung, K. M., Jiang, J. L., Leung, P. S., Ko, W. H., Leung, P. Y., Chew, S. B. C., Liu, C. Q., Tse, C. M., Chan, H. C. 2003. Expression, immunolocalization, and functional activity of na⁺/h⁺ exchanger isoforms in mouse endometrial epithelium. *Biol. Reprod.* 68:302-308
- Williams, B.L., F.C. Gwazdauskas, W.D. Whittier, R.E. Pearson, and R.L. Nebel. 1988. Impact of site of inseminate deposition and environmental factors that influence reproduction of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 71:2278-2283.
- Williamson, N. B., R. S. Morris, and G. A. Anderson. 1978. Pregnancy rates and non-return rates following artificial and natural breeding in dairy herds. *Aust Vet J* 54: 111-114.
- Wiltbank, M. C., J. R. Pursley, and J. L. Vasconcelos. 2000. What is the optimal time for AI? In: 18th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction. p 83-89.

- Wolfenson, D., W. W. Thatcher, L. Badinga, J. D. Savio, R. Meidan, B. J. Lew, R. Braw-Tal, and A. Berman. 1995. Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle. *Biol. Reprod.* 52:1106–1113.
- Xu, Z. Z., D. J. McKnight, R. Vishwanath, C. J. Pitt, and L. J. Burton. 1998. Estrus detection using radiotelemetry or visual observation and tail painting for dairy cows on pasture. *J Dairy Sci* 81: 2890-2896.