

**FABIANO BUSS CRUZ**

**ALTERNATIVAS PARA MAXIMIZAR A CAPACIDADE REPRODUTIVA  
DE BOVINOS.**

**LAGES/SC  
2007**

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC**  
**CENTRO DE AGROVETERINÁRIAS – CAV**  
**DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E PATOLOGIA**

**FABIANO BUSS CRUZ**

**ALTERNATIVAS PARA MAXIMIZAR A CAPACIDADE REPRODUTIVA  
DE BOVINOS.**

Dissertação apresentada a coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (CAV-UDESC), como requisito para a obtenção do título de Mestre no mencionado curso.

Orientador: Dr. Alceu Mezzalira

Lages-SC

**FABIANO BUSS CRUZ**

**ALTERNATIVAS PARA MAXIMIZAR A CAPACIDADE REPRODUTIVA  
DE BOVINOS.**

A comissão Examinadora, abaixo relacionada,  
aprova a Dissertação de Mestrado.

Banca Examinadora

Orientador:

\_\_\_\_\_  
Dr. Alceu Mezzalira (CAV/UDESC)

Membro:

\_\_\_\_\_  
Dr. Jairo Pereira Neves (UnB)

Membro:

\_\_\_\_\_  
Dr. Arnaldo Diniz Vieira (CAV/UDESC)

Membro:

\_\_\_\_\_  
Dr. Marcelo Bertolini (CAV/UDESC)

Lages/SC 15/06/2007

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar este momento.

Aos meus pais, Clóvis e Neide, pelo apoio, carinho e exemplo, que foram de vital importância na minha formação.

As minhas irmãs: Beatriz e Alice, pela motivação e afeto nos momentos mais difíceis.

Ao meu orientador e amigo Alceu Mezzalira, por seu profissionalismo, caráter, aprendizado e incentivo em prosseguir no aprimorando de meu conhecimento.

Aos Professores Arnaldo Diniz Vieira e Marcelo Bertolini pelo convívio e aprendizado.

Aos colegas de curso Silvério Bunn e Ivens Ortigari Junior por todo auxílio prestado.

Aos amigos que fiz no Laboratório de Reprodução Animal Prof. Assis Roberto de Bem: Joana, Leonardo, Eduardo, André, Matheus, Saul, Pedro, Monalyza e tantos outros que tiveram constante participação na realização deste trabalho.

Ao Centro de Ciências Agroveterinárias (CAV/UDESC), pela disponibilização de sua estrutura para realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que, por puro esquecimento, não foram aqui mencionados, mas que direta ou indiretamente me ajudaram a vencer mais esta etapa da minha vida.

## **RESUMO**

Dissertação de Mestrado  
Programa de Mestrado em Ciências Veterinárias  
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

### **ALTERNATIVAS PARA MAXIMIZAR A CAPACIDADE REPRODUTIVA DE BOVINOS.**

Autor: Fabiano Buss Cruz  
Orientador: Alceu Mezzalira  
Lages SC 15 de Junho de 2007

Este trabalho teve por objetivos abordar as formas de avaliação da capacidade reprodutiva de touros da raça Devon, criados em Santa Catarina, bem como propor alternativas para maximizar a capacidade produtiva de bovinos de corte. Os temas foram agrupados por seus conteúdos em quatro capítulos. No capítulo 1, procedeu-se a revisão bibliográfica do exame andrológico do touro. Foram abordados: o exame físico, a coleta do ejaculado, a avaliação seminal e a avaliação da capacidade de serviço, com base nos dados da literatura. No capítulo 2, são avaliados dados obtidos de exames andrológicos de 207 touros da raça Devon, sendo determinado o percentual de animais aptos à reprodução, baseado no exame clínico, seminal e de comportamento sexual, bem como o número de animais reprovados em cada etapa. Ainda foram catalogadas as medidas médias de circunferência escrotal para a raça Devon, nas diferentes faixas etárias. A média de touros aprovados foi 71,6%, com a seguinte medida média da circunferência escrotal (CE): Animais de 18 a 22 meses,  $35,2 \pm 2,93\text{cm}$ ; Animais de 23 a 27 meses,  $37,3 \pm 2,75\text{cm}$  e animais com mais de 30 meses  $38,2 \pm 3,6\text{cm}$ . No capítulo 3, foi avaliada a metodologia da vagina artificial interna (VAI) proposta pelo Dr. Albert Barth, como forma de coletar a amostra do sêmen e simultaneamente avaliar o comportamento e a fertilidade de touros da raça Devon. Dos 52 animais examinados 60,0% foram considerados aptos. Foi possível realizar a coleta do ejaculado com a utilização da VAI em 45 animais (86,5%). Dos touros coletados com a VAI (n=45), 69% foram considerados aptos à reprodução e 31% inaptos. Quando se considerou o total de touros examinados (n=52), o percentual de touros aprovados após coleta de sêmen

e avaliação da capacidade de cópula com a VAI foi de 60,0%. Concluiu-se que a VAI foi efetiva na coleta dos ejaculados, permitindo a avaliação simultânea da capacidade de serviço. A técnica mostrou-se de fundamental importância, já que 11,1% dos animais reprovados no teste seriam inadequadamente considerados aptos à reprodução, se apenas os exames físico e de qualidade seminal fossem empregados. No capítulo 4 consta um experimento que teve como objetivo determinar o número médio de oócitos recuperados por OPU, em fêmeas bovinas da raça Devon e Nelore, bem como avaliar a utilização da criopreservação por vitrificação dos oócitos imaturos obtidos por OPU ou de ovários provenientes de abatedouro, das duas raças. O número médio de oócitos por sessão de OPU foi de 4,6 oócitos na raça Devon, que foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) aos 16,3 obtidos na raça Nelore. Após o reaquecimento, maturação e cultivo dos oócitos vitrificados foram observadas taxas de clivagem de 17,6% no grupo OPU / Devon, 29,1% no grupo OPU / Nelore, 22,8% no grupo ovários abatedouro / Devon e 14,5% no grupo ovários abatedouro / Nelore, não havendo diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os grupos. Na avaliação do desenvolvimento embrionário, observou-se apenas um embrião atingindo o estágio de blastocisto, no grupo OPU / Devon. O experimento demonstra que fêmeas da raça Nelore possibilitam um número significativamente maior de oócitos recuperados por sessão quando comparado com fêmeas da raça Devon, e que a associação da técnica de OPU com vitrificação dos oócitos na própria fazenda, não produz taxas aceitáveis de desenvolvimento de embriões. O estudo demonstra que existem alternativas para melhorar a capacidade reprodutiva de bovinos que, todavia, devem ser previamente avaliadas e adequadas às condições existentes.

Palavras Chave – touros, avaliação andrológica, sêmen, VAI, oócito, vitrificação.

## **ABSTRACT**

Master Dissertation

Programa de Mestrado em Ciências Veterinárias

Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

### **ALTERNATIVES TO MAXIMIZE BOVINE REPRODUCTIVE CAPACITY.**

Author: Fabiano Buss Cruz

Adviser: Alceu Mezzalira

Lages SC 15 de Junho de 2007

The aim of this work was to approach the breeding soundness evaluation of Devon breed bulls, in Santa Catarina state, Brazil, as well to propose alternatives to maximize the productive capacity of beef cattle. The themes were selected according its contents and described in four chapters. Chapter one was a bibliographical review of bulls breeding soundness evaluation. They were approached: the clinical exam, the collection of the semen, the seminal evaluation and serving ability according literature data. In the Chapter 2, data obtained from 207 breeding soundness exams of Devon bulls were evaluated to determine the rate of approved bulls, based on the clinical and seminal exam and serving ability, as well as the unsatisfactory bulls number in each stage. The average measures of scrotal circumference in Devon bulls were determined in each one of different age groups. The average rate of satisfactory bulls was 71.6%, with the following scrotal circumference (CE) average: 18 to 22 months bulls,  $35.2 \pm 2.93\text{cm}$ ; 23 to 27 months bulls,  $37.3 \pm 2.75\text{cm}$ , and 30 months or above bulls,  $38.2 \pm 3.6\text{cm}$ . In the Chapter 3, the internal artificial vagina (IAV) methodology, proposed by Dr. Albert Barth as a form of collecting the semen sample, and simultaneously evaluate the serving ability and the fertility of Devon bulls was performed. From 52 examined bulls 60.0% were considered satisfactory. In 45 bulls (86.5%) it was possible to collect the semen with the aid of IAV. From bulls collected with IAV (n=45) 69.0% were considered satisfactory to breed, and 31.0% unsatisfactory. When the total number of examined bulls (n=52) was considered, the rate of satisfactory bulls after semen collection and serving ability evaluation with IAV

was 60.0%. It was concluded that IAV was effective to collect semen, allowing the simultaneous evaluation of the serving ability. This new technique has a fundamental importance, since 11.1% of the unsatisfactory bulls in the test would be inadequately considered satisfactory, if only clinical and seminal quality exams were performed. Chapter 4 relates a study to determine the mean number of oocytes obtained by OPU, as well as to evaluate the vitrification of immature oocytes obtained by OPU or from slaughter house ovaries from Devon and Nelore cows. The mean number by OPU session was 4.6 oocytes in Devon breed, significantly lower ( $p < 0.05$ ) than 16.3 obtained in Nelore breed. After warming, maturation and culture of vitrified oocytes a cleavage rate of 17.6% was observed in OPU/Devon group, 29.1% in the OPU/Nelore group, 22.8% in the slaughterhouse/Devon ovaries group, and 14.5% in the slaughterhouse/Nelore ovaries group. There were no statistical differences ( $p > 0.05$ ) among the groups. In the embryo developmental evaluation, it was just observed one embryo reaching the blastocyst stage, in the OPU/Devon group. We conclude that Nelore cows had a higher number of oocytes recovered by session when compared with Devon cows, and that the association of the technique of OPU with oocyte vitrification in the farm does not produce acceptable rates of embryo development. The study demonstrates that there are alternatives to improve the reproductive capacity of bovine, but they should be previously evaluated and adapted to the existent conditions.

**Key Words** – bulls, breeding soundness evaluation, semen, IAV, oocyte, vitrification

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Componentes da VAI.....	37
Figura 2 – VAI pronta para o uso.....	37

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Número de exames andrológicos realizados em touros Devon, agrupados em quatro faixas etárias.....	26
Tabela 2.	Medidas de circunferência escrotal de touros Devon avaliados no período de 2003 a 2006, de acordo com a idade dos animais.....	26
Tabela 3.	Resultados da avaliação andrológica de reprodutores bovinos da raça Devon, realizadas no período de 2003 a 2006, de acordo com a faixa etária.....	27
Tabela 4.	Quantificação e causas de reprovação no exame andrológico com avaliação da capacidade de serviço de touros Devon, no período de 2005 e 2006.....	28
Tabela 5.	Causas de inaptidão reprodutiva em touros da raça Devon submetidos ao exame andrológico no período de 2003 a 2006.....	29

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAP	Classificação Andrológico Por Pontos
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CE	Circunferência Escrotal
CEPA	Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola
DPBS	Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EG	Etileno Glicol
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
OPU	Ovum Pick-Up
OPS	Open Pulled Straw
PIV	Produção <i>in vitro</i> de embriões
SEE	Soro de Égua em Estro
SOFaaci	Synthetic Oviduct Fluid with amino acids and sodium citrate.
SV	Solução de Vitrificação
SV50	Solução de Equilíbrio
TCS	Teste de Capacidade de Serviço
TCM 199	Tissue Culture Medium.
VAI	Vagina Artificial Interna

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	01
1 - CAPÍTULO 1 – EXAME ANDROLÓGICO NO TOURO / REVISÃO.....	03
1.1 – Introdução e Revisão Bibliográfica.....	03
1.2 – Exame Físico.....	04
1.3 – Coleta do Ejaculado.....	08
1.4 – Avaliação do Ejaculado.....	09
1.5 - Avaliação da Capacidade de Serviço.....	12
1.6 – Conclusão.....	13
1.7 – Referências Bibliográficas.....	14
2 – CAPITULO 2 - AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA DE REPRODUTORES BOVINOS DA RAÇA DEVON EM SANTA CATARINA.....	19
2.1 – Introdução e Embasamento Teórico.....	19
2.2 – Materiais e Métodos.....	22
2.2.1 – Avaliação Física.....	23
2.2.2 – Coleta e Avaliações dos Ejaculados.....	23
2.2.3 – Avaliação da Capacidade de Serviço.....	24
2.3 – Resultados.....	25
2.4 – Discussão.....	29
2.5 – Conclusão.....	32
2.6 – Referências Bibliográficas.....	32
3 – CAPITULO 3 - USO DA VAGINA ARTIFICIAL INTERNA NA COLETA DE SÊMEN BOVINO.....	35
3.1 – Introdução.....	35
3.2 – Materiais e Métodos.....	36
3.3 – Resultados e Discussão.....	38
3.4 – Conclusão.....	40
3.5 – Referências Bibliográficas.....	40
4 – CAPITULO 4 - PUNÇÃO FOLICULAR E VITRIFICAÇÃO DOS OÓCITOS OBTIDOS DE FÊMEAS ZEBUINAS E TAURINAS.....	43
4.1 – Introdução.....	44
4.2 – Materiais e Métodos.....	46
4.3 – Resultados e Discussão.....	50
4.4 – Conclusões.....	53
4.5 – Referências Bibliográficas.....	53
5 – CONCLUSÕES FINAIS.....	57

## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas a humanidade tem experimentado mudanças significativas em todas as áreas de conhecimento. Face ao desenvolvimento de diferentes tecnologias, especialmente aquelas ligadas a universalização da comunicação, o conhecimento produzido é imediata e rapidamente disponibilizado e, por vezes, aplicado na prática. Face a esta dinâmica de geração e disponibilidade do saber, diariamente são propostas novas alternativas em diferentes áreas do conhecimento. A bovinocultura de corte, principalmente a praticada no sul do Brasil e mais especificamente no estado de Santa Catarina, ainda não conseguiu se adequar a esta nova realidade de maximização da produção. Um dos principais entraves para a busca da melhoria da produção de carne é o baixo desempenho reprodutivo dos rebanhos. Neste aspecto, a avaliação dos machos reprodutores tem um papel fundamental, já que invariavelmente são responsáveis por uma grande geração de descendentes. Embora com esta importância, pouca atenção tem sido dada aos métodos de avaliação da capacidade reprodutiva do macho. Neste aspecto, o presente trabalho aborda diferentes tópicos da avaliação andrológica do touro. Como forma de facilitar o entendimento, a descrição esta dividida em capítulos. O capítulo 1 é composto de uma revisão bibliográfica sucinta a respeito do exame andrológico do touro. No capítulo 2, são relatados e discutidos dados da avaliação andrológica de touros da raça Devon, realizados nos anos de 2003 a 2006, no estado de Santa Catarina. No capítulo 3, é proposta e avaliada uma nova metodologia de avaliação andrológica, com o emprego do dispositivo denominado vagina artificial interna (VAI), desenvolvido por Barth et al (2004), no Canadá. Os três capítulos iniciais buscam metodologias que possam servir como alternativas

para maximizar a capacidade reprodutiva de touros. Finalmente, o capítulo 4 descreve um trabalho experimental no qual se buscou quantificar os oócitos obtidos com a punção folicular guiada por ultrassom, de fêmeas Nelore e Devon, bem como avaliar a possibilidade de criopreservar estes oócitos, logo após sua obtenção, ainda na fazenda. Os diferentes capítulos são descritos em formato de trabalhos científicos, contemplando os itens previstos na metodologia científica.

## **CAPÍTULO 1**

### **EXAME ANDROLOGICO NO TOURO / REVISÃO**

#### **INTRODUÇÃO**

Embora seja prática comum a realização de avaliações da aptidão reprodutiva de touros, frequentemente as mesmas avaliam apenas de forma parcial os diferentes aspectos do processo. Para maximizar a utilização dos reprodutores em sistema de monta natural, bem como realizar uma seleção criteriosa de touros de alta fertilidade, torna-se necessário à realização de um exame bastante acurado sobre a fertilidade dos reprodutores. Um bom reprodutor deve possuir três características principais: Boa capacidade física para percorrer grandes distâncias a procura de fêmeas em cio e poder realizar as montas; Produção espermática adequada em quantidade e qualidade e finalmente alta capacidade de serviço, ou seja, capacidade de cobrir um elevado número de fêmeas disponíveis. Nos últimos anos, poucas publicações tem tratado do tema exame andrológico de touros, o que motivou esta revisão bibliográfica.

#### **1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Para uma completa avaliação da aptidão reprodutiva de touros é necessária a realização dos seguintes passos: 1º - Anamnese, buscando dados do histórico clínico, condições ambientais, tipo de alimentação e medicamentos aplicados no animal. Estes fatores, isolados ou associados, podem afetar a qualidade seminal por um período prolongado, pois para um ciclo espermato gênico é necessário um

período aproximado de 60 dias. Uma anamnese bem conduzida é vital para identificar a etiologia de possíveis alterações nos exames específicos, buscando um diagnóstico preciso da fertilidade do reprodutor. 2º - Exame físico, devendo ser observadas as condições que possam interferir na habilidade de monta, além de defeitos congênitos. Observa-se ainda os aprumos, dentição, condição corporal, bem como a incidência de doenças. Também deve ser realizado o exame físico específico dos órgãos reprodutivos, avaliando-se as glândulas anexas (glândulas vesiculares, ampolas dos ductos deferentes e próstata), bem como o exame externo (pênis, prepúcio, escroto, testículo, epidídimo, cordão espermático e mensuração do perímetro escrotal). 3º - Avaliação das características físicas do ejaculado (volume, aspecto, movimento de massa, motilidade e vigor), avaliação da concentração espermática e morfologia dos espermatozóides. Finalmente como 4º item, observa-se a capacidade de realizar a cópula e avaliação de libido ou interesse sexual por fêmeas em estro.

## 1.2. Exame físico

Esta etapa tem a finalidade de identificar alterações físicas que impossibilitem ou dificultem ao reprodutor a detecção de fêmeas em cio ou a monta, além das patologias geneticamente transmitidas.

O exame clínico geral envolve a avaliação das distintas partes do corpo do animal. Pode ser iniciada pela avaliação dos olhos, onde pode-se encontrar alterações como carcinomas, bastante comuns em raças com mucosas despigmentadas. Em animais da raça Hereford, Carroll et al. (1963) encontraram 3,7% de animais com este tipo de patologia, que além de atrapalhar a visão e gerar um grande desconforto ao animal, é hereditária. Animais com este distúrbio são facilmente dominados por

outros touros, reduzindo o número de fêmeas cobertas pelos mesmos (PARKER et al., 1999).

Pernas e pés são de vitais para a sustentação do animal, especialmente o touro, que pode atingir peso acima de uma tonelada. Na busca de fêmeas em estro uma adequada locomoção é essencial, além de, no momento da cópula, os membros posteriores sustentarem todo o peso do animal. Inúmeros são os problemas de aprumos que, além de dificultar a cópula, podem ser hereditários e conseqüentemente reduzirem a vida produtiva do animal e da sua prole. Animais estabulados, que recebem dietas ricas em carboidratos não-estruturais e baixos níveis de fibra, são susceptíveis a quadros de laminite (DIAS et al., 2003), e segundo Nocek, (1997), 62% das lesões de casco estão associados a estes quadros.

Nos cascos, além do crescimento anormal (chinelamento) causado geralmente por acidose sub-clínica, pode-se ainda encontrar: úlceras, abscessos, doença da linha branca e hematomas, todos localizados na sola do casco. Além destas, outras patologias são freqüentes, como verruga de casco, erosão do talão e o Gabarro que acomete o espaço interdigital. McGowan et al., (2002) encontraram 36, 3 e 5% de anormalidades no aparelho locomotor em animais das raças Santa Gertudis, Brahmam e Belmont Red, respectivamente. Em mais de 10 mil animais examinados, Carroll et al. (1963) encontraram 5% de animais com problemas no sistema locomotor. Além dos problemas de aprumos, outras patologias hereditárias que devem ser evitadas são as hérnias e defeitos na arcada dentária, como bragnatismo e prognatismo.

A condição corporal do reprodutor também é um importante fator a ser avaliado, no entanto ainda não existe uma verdade absoluta sobre esta característica. É sugerido que o animal inicie a estação de monta com uma condição corporal entre 5 a 7, em

uma escala em que 1 é muito magro e 9 é obeso. Os extremos devem sempre ser evitados, já que se sabe que ambos os casos determinam um decréscimo na qualidade seminal.

No exame físico específico avalia-se a integridade dos órgãos reprodutivos, iniciando-se pela palpação retal das glândulas anexas, como vesícula seminal, ampola do ducto deferente e próstata. São avaliadas a consistência, tamanho, simetria e ausência de sensibilidade. As patologias encontradas podem ser tanto de origem infecciosa como hereditária, como a aplasia, hipoplasia, cistos e duplicação das glândulas (BARTH, 2000).

Em relação ao prepúcio e pênis, deve-se inicialmente proceder à avaliação visual, buscando identificar a presença de tumores, miiases, lesões, bem como avaliar se o óstio prepucial tem abertura suficiente para a passagem do pênis. O comprimento do prepúcio também deve ser avaliado, pois reprodutores submetidos a sistemas extensivos de criação, locomovem-se em diferentes tipos de vegetação que determinam lesões nos prepúcios pendulosos. As patologias mais comumente encontradas são a fimose e parafimose, presença de lesões, massas tumorais e aderências. A avaliação do pênis é feita no momento da coleta do sêmen, quando muitos animais o exteriorizam, mesmo com eletroejaculação, ou no momento da cópula, quando a coleta é realizada com vagina artificial. Fraturas e desvios são as lesões mais freqüentes e que dificultam ou impossibilitam a cópula. Em uma população de 235 reprodutores examinados, McGowan et al. (2002) encontraram 3,4% de animais com frenulum persistente, 0,5% com desvio ventral de pênis e 1,8% com balanopostite.

A bolsa escrotal deve sofrer inspeção visual em busca de lesões e traumatismos. Os testículos são submetidos a um exame detalhado, avaliando-se sua mobilidade

dentro da bolsa escrotal, consistência, simetria, sensibilidade e alterações na cabeça, corpo e cauda do epidídimo, bem como no cordão espermático. O músculo cremaster, importante no processo de termo regulação, deve ser avaliado levando-se em consideração que, em dias quentes deve estar relaxado e os testículos afastados do corpo, evitando o aquecimento do órgão e nos dias frios deve estar contraído, fazendo a aproximação dos testículos ao corpo, evitando a perda de calor.

A medida mais utilizada para mensuração testicular é a circunferência escrotal (CE), sendo um indicador bastante preciso do peso e da massa testicular, que é determinante na produção espermática (COULTER, 1987). Além de fácil e rápida, a mensuração apresenta alta repetibilidade (SILVA et al., 2002) e moderada a alta herdabilidade (KESSLER 1998). No entanto, quando a CE é realizada por distintos operadores, pode apresentar diferentes resultados, em virtude da variação na força empregada por cada operador ao realizar a leitura. Como forma de solucionar este problema, a equipe do Dr. Alberth Barth desenvolveu um equipamento que controla a pressão empregada na fita sobre os testículos, determinando uma homogeneidade da força exercida, possibilitando assim uma alta acurácia nos resultados, mesmo com diferentes operadores.

Animais de maior CE, além de produzirem um maior número de espermatozóides, devido a maior quantidade de túbulos seminíferos, normalmente são portadores de boa saúde testicular, boa espermatogênese, com menor número de espermatozóides defeituosos. Em touros jovens (BRUNER et al., 1995) encontrou uma correlação positiva entre CE e qualidade espermática. No entanto esta avaliação não deve ser a única característica utilizada para se avaliar a qualidade do sêmen (MARTINEZ et al., 2000).

Existe ainda uma forte correlação negativa entre a CE dos pais e a idade a puberdade das filhas, ou seja, filhas de touros de alta CE chegam mais rapidamente à puberdade, em relação às filhas de touros de baixa CE (MOSER et al., 1996).

### 1.3. Coleta do ejaculado

Existem inúmeras metodologias para coleta de sêmen de reprodutores bovinos tais como: uso de uma fêmea em cio e coleta do ejaculado após a cópula por aspiração vaginal, massagem retal das glândulas anexas, eletroejaculação e vagina artificial. Cada uma destas metodologias apresenta vantagens e limitações. Como exemplo, o uso da aspiração do conduto vaginal, apesar de ser um método totalmente fisiológico, a amostra obtida não é adequada, não permite a avaliação do volume total, além do risco da transmissão de doenças venéreas. A massagem das glândulas anexas possibilita obter ejaculado suficiente para a realização de um bom exame, no entanto exige um grande esforço físico do técnico na realização das massagens e muitas vezes as amostras obtidas são de baixa qualidade (PALMER et al., 2004). Desde a metade do último século, a eletroejaculação tem se mostrado um método efetivo e de fácil execução na coleta de sêmen bovino. O método vem sendo aperfeiçoado, existindo hoje aparelhos automáticos, que dispensam até mesmo a necessidade do operador controlar os estímulos elétricos (PALMER, 2005). Ejaculados obtidos com esta metodologia são bastante confiáveis e proporcionam a realização de um espermiograma adequado. Como desvantagem, o método é pouco fisiológico, produzindo fortes contrações musculares, inquietude, vocalização e até mesmo decúbito, sinais que fortemente indicam desconforto animal (PALMER, 2005). Em função disso em muitos países europeus sua realização foi proibida, sem o emprego de anestesia (MOSURE et al., 1998). A vagina artificial é um método

mais fisiológico para coleta de sêmen, permitindo a obtenção de bons ejaculados e avaliando a capacidade do animal realizar a cópula. Esta é uma grande vantagem sobre os demais métodos, como a eletroejaculação, que não permite avaliar a capacidade de cópula. No entanto, por haver a necessidade de uma aproximação entre o técnico e o animal no momento da cópula, apenas animais condicionados a este tipo de procedimento podem ser coletados, inviabilizando sua utilização em animais de campo, ou animais arredios, que impõem riscos ao técnico, além de apresentar baixa efetividade com animais não condicionados.

Recentemente, Barth et al. (2004) desenvolveram um dispositivo denominado de vagina artificial interna (VAI), que permite a coleta dos animais sem a necessidade do envolvimento direto do técnico no momento da coleta. O dispositivo é introduzido no interior do conduto vaginal de uma fêmea, preferencialmente em cio, e contida em brete adequado. Isto possibilita que os touros de campo efetuem a cópula, permitindo a obtenção do ejaculado e avaliando simultaneamente a capacidade de serviço, sem o envolvimento direto do técnico.

#### 1.4. Avaliação seminal

Inúmeros são os testes de avaliação seminal capazes de prever a fertilidade de reprodutores bovinos, no entanto em sua maioria exigem a utilização de metodologias específicas, somente realizáveis em laboratórios apropriados, e que mesmo assim não são totalmente seguros, pois em muitas situações apresentam resultados contraditórios (BELLIN, 1994, 1996; HAMMERSTEDT, 1996; FITZPATRICK et al, 2002). No entanto, avaliações simples como aspecto, volume, movimento de massa, motilidade, vigor, concentração e morfologia espermáticas,

facilmente executáveis no campo, são bons indicativos da fertilidade do animal (CHENOWETH et al., 1996).

O volume do ejaculado pode ter uma grande variação, por conta de fatores individuais, de raça, número de ejaculações sucessivas, alimentação (MIES FILHO, 1987), bem como do método de coleta empregado (BARTH, 2000). São valores aceitáveis para a espécie bovina 0,5 a 14 ml, sendo mais comumente encontradas cifras entre 5,0 e 6,0 ml (MIES FILHO, 1987).

O aspecto do sêmen tem importância no julgamento, pois de forma subjetiva possibilita uma estimativa da concentração do ejaculado, permitindo a identificação de conteúdos estranhos, como pus ou mesmo sangue.

A primeira avaliação microscópica a ser realizada é o movimento de massa ou turbilhão, que deve ser avaliada no menor aumento do microscópio. Uma pequena gota do sêmen é depositada sobre uma lâmina aquecida, sendo observada a presença de ondas no ejaculado. A grande intensidade destas ondas forma um turbilhão, que atesta a boa qualidade do ejaculado, pois para sua formação existe a contribuição de três fatores: alta concentração; alta motilidade progressiva e alto vigor destes espermatozóides. A escala empregada para esta avaliação vai do zero (espermatozóides imóveis) até 5 (ondas vigorosas e muito intensas). Na ausência de um destes fatores o movimento de massa é fortemente prejudicado ou mesmo inexistente (BARTH, 2000).

O passo seguinte na avaliação microscópica é quantificar a motilidade progressiva, ou seja, determinar o percentual de espermatozóides com movimento retilíneo progressivo, assim como o vigor, que é a força com que os espermatozóides estão se deslocando. A escala empregada vai do zero (ausência de movimento) até 5 (espermatozóides com movimentos extremamente vigorosos).

Para avaliar as patologias, realiza-se a contagem de 200 células em diferentes campos do microscópio, com aumento de 1000 vezes. Os defeitos encontrados podem ser classificados entre primários (oriundos da espermatogênese) ou secundários (ocorridos durante o transito do espermatozóide). No entanto, a classificação mais utilizada hoje, é a descrita por Mies Filho (1987) que preconiza a classificação em defeitos maiores e menores de acordo com a importância de cada patologia.

Para determinar a concentração espermática, os métodos mais utilizados no campo são a câmara de Neubauer, para contagem de células (que exige a utilização do microscópio), ou a utilização do Espermodensímetro de Karras (Minitub), que em função da opacidade determinada pela concentração de células na suspensão, permitindo uma leitura rápida.

Segundo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), para um animal ser considerado apto para utilização em sistema de monta natural, este deve apresentar um ejaculado com um mínimo de 50% de motilidade, vigor 3 e um mínimo de 70% de espermatozóides morfolologicamente normais. Touros que apresentam parâmetros inferiores a estes índices, possuem reduzida capacidade reprodutiva. Fitzpatrick et al., (2002) relatam que animais com ejaculados com motilidade igual ou inferior a 50%, tiveram um reduzido número de terneiros nascidos em sistema de monta natural com múltiplos reprodutores. Já os animais que apresentaram motilidade progressiva superior a 70%, alcançaram os maiores índices de nascimentos.

Para a classificação entre reprodutores, clinicamente normais, sob o ponto de vista andrológico, Vale Filho (1997) seguindo a metodologia descrita por (CHENOWETH, et al., 1993), propõe o uso da classificação andrológica por pontos (CAP), onde é

estabelecido um índice de 0 a 100, levando em consideração a circunferência escrotal, motilidade e morfologia espermática. Este método é de fácil execução e permite uma análise comparativa segura num processo de seleção de futuros reprodutores (VALE FILHO et al., 1999).

#### 1.5. Avaliação da capacidade de serviço.

Nenhuma avaliação *in vitro* é eficaz para avaliar o potencial de acasalamento do touro, sendo necessário observar a execução da monta, para se obter tal informação. Fato semelhante ocorre com a avaliação da libido, que também exige a realização do teste, pois a avaliação de características seminais bem como a CE apresentam resultados contraditórios em relação a esta característica (BERTRAM et al., 2002). No entanto, estas avaliações são de fundamental importância para prever a fertilidade do animal. Segundo Landaeta-Hernández et al. (2001) o uso de touros de alto libido é benéfico para aumentar taxa de prenhez, diminuir o intervalo de concepção e comprimento de estações parição, produzindo assim terneiros mais homogêneos no desmame, além de otimizar a mão de obra na fazenda.

O teste de capacidade de serviço (TCS) foi desenvolvido como forma de identificar animais com problemas físicos que impeçam a realização da cópula, bem como identificar aqueles animais de baixa libido. Atualmente a metodologia mais empregada é a desenvolvida por Chenoweth (1984), onde os animais permanecem com fêmeas previamente contidas, preferencialmente em cio, por um período de vinte minutos, onde o comportamento sexual é avaliado. Segundo Barth (2000), aqueles animais que completam a cópula em poucos minutos de contato com a fêmea podem ser retirados de teste e considerados como animais de boa libido, agilizando a execução do exame e preservando a vaca utilizada como manequim,

permitindo que possa ser utilizada em um número maior de reprodutores. Barth et al. (2004) utilizando a metodologia da VAI encontraram 5% de animais com defeitos físicos que impossibilitavam a cópula e 39,4% dos animais não demonstraram interesse pela fêmea em cio, no entanto, em sua maioria, apresentavam sêmen de boa qualidade, obtido por eletroejaculação. Posteriormente os animais examinados foram observados em condições de campo, duas vezes ao dia, sendo constatado que 80% dos animais que não realizaram a cópula durante o período de teste, também não foram observados realizando cópula em condições naturais. Já Bertram et al. (2002), trabalhando com raças índicas não encontraram correlação entre o número de terneiros nascidos e a pontuação obtida no teste da libido. No entanto, os autores ressaltam a importância do teste de capacidade de serviço na avaliação da capacidade do animal em realizar a cópula. Apesar de existirem dados na literatura sobre o comportamento sexual dos zebuínos (PINEDA et al., 1997; SILVA-MENA et al., 2000; SALVADOR et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2007) as características de comportamento sexual destes animais ainda não estão bem definidas, sendo evidente que o temperamento agitado, as metodologias de aplicação do teste e os aspectos de hierarquia social têm confundido os resultados (SANTOS et al., 2004). Assim, ao menos para os reprodutores de origem taurina, a VAI parece ser uma alternativa viável e de fácil aplicação. Todavia, mesmo com estes quesitos, sua realização não é permitida nos Países Baixos, Bélgica e Luxemburgo, sob alegação de risco sanitário e também por questões éticas, em função do desconforto das fêmeas utilizadas como manequins (HOFLACK et al., 2006).

## 1.6. CONCLUSÃO

Para uma adequada avaliação da capacidade reprodutiva de touros é necessário considerar, além dos aspectos tradicionais como o exame clínico geral e específico, a avaliação da qualidade seminal e a capacidade de cópula, outros aspectos inerentes a característica da própria raça. Alternativas que mimetizam a condição natural, como a coleta com VAI, podem evidenciar a real capacidade reprodutora do animal. Ainda, técnicas que evidenciem a real capacidade de serviço dos animais podem agregar valor aos reprodutores, além de reduzir custos e manejo, pela otimização da utilização do reprodutor. Certamente, para que estas condições sejam alcançadas, é necessário o conhecimento mais acurado do comportamento dos animais de cada raça, bem como suas características reprodutivas, sejam fisiológicas, anatômicas ou comportamentais.

## 1.7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTH, A.D. Bull Breeding Soundness Evaluation. 2. ed. Lacombe: Ed.: Western Canadian Association of Bovine Practitioners, 2000.

BARTH, A.D., ARTEAGA, A.A., BRITO, L.F.C., PALMER, C.W. Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: an alternative for electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. **Animal Reproduction Science**, n. 84, p. 315–325, 2004.

BELLIN, M.E., HAWKINST, H.E., AX, R.L. Fertility of Range Beef Bulls Grouped According to Presence or Absence of Heparin-Binding Proteins in Sperm Membranes and Seminal Fluid. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2441-2448, 1994.

BELLIN, M. E., HAWKINS, H.E., OYARZO, J.N., VANDERBOOM, R.J., AX, R.L. Monoclonal Antibody Detection of Heparin-Binding Proteins on Sperm Corresponds to Increased Fertility of Bulls. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 173–182, 1996.

BERTRAM, J.D., FORDYCE, G., MCGOWAN, M.R., JAYAWARDHANA, G.A., FITZPATRICK, L.A., DOOGANF, V.J., DE FAVERI, J., HOLROYD, R.G. Bull selection and use in northern Australia 3. Serving capacity tests. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 51–66, 2002.

CARROLL, E.J., BALL, L., SCOTT, J.A. Breeding soundness in bulls—a summary of 10,940 examinations. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 42, p. 1105–1111, 1963.

CHENOWETH, P.J. Examination of bulls for libido and breeding ability. **Vet. Clin. North Am.: Anim. Pract.**, v.5, p.59-74, 1984.

CHENOWETH, P.J., HOPKINS, F.M., SPITZER, J.C., LARSEN, R.E. Guidelines for using the bull breeding soundness evaluation form. *Theriogenology Handbook 1993*: B-10.

CHENOWETH, P.J., CHASE, C.C., THATCHER, M.J.D., WILCOX, C.J., LARSEN, R.E. Breed and other effects on reproductive traits and breeding soundness categorization in young beef bulls in Florida. **Theriogenology**, n. 46, p. 1159-1170, 1996.

DIAS, R.O.S., MARQUES JUNIOR, A.P. Casco em bovinos: identifique as lesões, as novas técnicas de tratamento e os principais métodos de controle. São Paulo: Lemos Editorial, 2003.

FITZPATRICK, L.A., FORDYCE, G., MCGOWAN, M.R., BERTRAM, J.D., DOOGAN, V.J., DE FAVERIF, J., MILLER, R.G., HOLROYD R.G. Bull selection and use in northern Australia Part 2. Semen traits. **Animal Reproduction Science**, n. 71, p. 39–49, 2002.

HAMMERSTEDT, R.H. Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 77-87, 1996.

HENRY, M., NEVES, J.P. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

HOFACK, G., VAN SOOM, A., MAES, D., KRUIF, A., OPSOMER, G., DUCHATEAU, L. Breeding soundness and libido examination of Belgian Blue and Holstein Friesian artificial insemination bulls in Belgium and The Netherlands. **Theriogenology**, n. 66, p. 207-216, 2006.

KESSLER, L.B. Perímetro escrotal e peso em bovinos com diferentes graus de sangue Nelore x Hereford. 1998. 68 f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

LANDAETA-HERNÁNDEZ, A.J., CHENOWETH, P.J., WILLIAM E. BERNDTSON, W.E. Assessing sex-drive in young *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 66, p. 151–160, 2001.

MARTINEZ, M.L., VERNEQUE, R.S., TEODORO, R.L., OLIVEIRA PAULA, L.R., CRUZ, M., CAMPOS, J.P., RODRIGUES, L.H., OLIVEIRA, J., VIEIRA, F., BRUSCHI, J.H., DURÃES, M.C. Correlações entre Características da Qualidade do Sêmen e a Circunferência Escrotal de Reprodutores da Raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 29, p. 700-706, 2000.

MCGOWAN, M.R., BERTRAM, J.D., FORDYCE, G., FITZPATRICK, L.A., MILLER, R.G., JAYAWARDHANA, G.A., DOOGAN, V.J. DE FAVERI, J., HOLROYD, R.G. Bull selection and use in northern Australia - 1. Physical traits. **Animal Reproduction Science**, n. 71, p. 25–37, 2002.

MIES FILHO, A. Inseminação Artificial, 6ª Edição. Porto Alegre: Ed. Sulina, 1987.

MOSER, D.W., BERTRAND, J.K., BENYSHEK, L.L., MCCANN, M.A., KISER, T. E. Effects of Selection for Scrotal Circumference in Limousin Bulls on Reproductive and Growth Traits of Progeny. **Journal Animal Science**, n, 74,p. 2052–2057, 1996.

MOSURE, W.L., MEYER, R.A., GUDMUNDSON, J., BARTH, A.D. Evaluation of possible methods to reduce pain associated with electroejaculation in bulls. **Can Vet J**, n. 39, p. 504-506, 1998.

NOCEK, J.E. Bovine acidosis: implications on laminitis. **Journal Dairy Science**, v.80, p. 1005-1028, 1997.

OLIVEIRA, C.B., GUIMARÃES, J.D., COSTA, E.P., SIQUEIRA, J.B., TORRES, C.A.A. CARVALHO, G.R., GUIMARÃES, S.E.F. Avaliação do comportamento sexual em touros Nelore: comparação entre os testes da libido em curral e do comportamento sexual a campo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 32-42, 2007.

PALMER, C.W., AMUNDSON, S.D., BRITO, L.F.C., WALDNER, C.L., BARTH, A.D. Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. **Animal Reproduction Science**, n. 80, p. 213–223, 2004.

PALMER, C.W. Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. **Theriogenology**, v. 64, p. 469-479, 2005.

PARKER, R., MATHIS, C., HAWKINS, D. Evaluating the Breeding Soundness of Beef Bulls. **Guide B-216**, New Mexico State University, 1999. Disponível em: <<http://cahedev.nmsu.edu/pubs/b/b-216.pdf>>. Acesso em: 27 abr. 2007.

PINEDA, N., LEMOS, P.F., FONSECA, O. Comparação entre dois Testes de Avaliação do Comportamento Sexual (libido) de Touros Nelore (*Bos taurus indicus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 4, p. 29-34, 1997.

SALVADOR, D.F., ANDRADE, V.J. VALE FILHO, V.R.; SILVA, A.S., COSTA; SILVA, E.V. Avaliação da libido de touros Nelore adultos em curral e sua associação com características andrológicas e desempenho reprodutivo a campo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, 2003.

SANTOS, M.D., TORRES, C.A.A., RUAS, J.R.M., SILVA FILHO, J.M., COSTAS, E.P., PEREIRA, J.C. Teste da libido e atividade de monta em touros da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 504-510, 2004.

SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M.; CORDEIRO, C.M.T.; et al. Relação da Circunferência Escrotal e Parâmetros da Qualidade do Sêmen em Touros da Raça Nelore, PO. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n. 3, p. 1157-1165, 2002.

SILVA-MENA, C., AKE-LOPEZ, R. DELGADO-LEON, R. Sexual Behavior and Pregnancy Rate of *Bos indicus* Bulls. **Theriogenology**, v. 53, p. 991-1002, 2000.

VALE FILHO, V.R. Andrologia no touro: avaliação genital, exame do sêmen e classificação por pontos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 21, n.3, p. 7-13, 1997.

VALE FILHO, V.R., QUIRINO, C.R., ANDRADE, V.J., BERGMANN, J.A.G., REIS, S.R., MENDONÇA, R.M.A., FONSECA, C.G. Parâmetros genéticos da classificação andrológica por pontos (CAP), em touros da raça nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 253-255, 1999.

## **CAPÍTULO 2**

### **AVALIAÇÃO ANDROLÓGICA DE REPRODUTORES BOVINOS DA RAÇA DEVON EM SANTA CATARINA.**

#### **2.1 - INTRODUÇÃO E EMBASAMENTO TEÓRICO**

A produção catarinense de carne bovina tem-se mantido estável nos últimos anos, não acompanhando o crescimento da população, determinando que o Estado aumente a importação de carne a cada ano. De 2002 a 2005, a importação aumentou de 55 mil para 66 mil toneladas, o que equivale a 1/3 da carne consumida no Estado (CEPA, 2006), sendo necessário que se modifique esta tendência. As áreas destinadas a este propósito estão cada vez menores, em função da inserção de outros tipos de atividades, o que tem impedido o crescimento do rebanho de corte no Estado.

Assim, a única forma de aumentar a produção de carne bovina no Estado é melhorar a taxa de natalidade e desfrute do rebanho existente. Sabe-se que os índices produtivos alcançados até o momento são muito baixos. Desta forma, medidas relativamente simples e de baixo custo, ainda pouco utilizadas em nosso meio, podem ser implementadas e melhorar os índices produtivos.

Um dos grandes obstáculos para a implementação e difusão de novas tecnologias na pecuária de corte é justamente o produtor. A falta de motivação para

investir, em função da longa crise por que passa o setor, o desconhecimento ou as informações equivocadas de que é necessário um alto investimento financeiro para a implantação de tecnologias, tem contribuído para que estas não sejam adotadas em Santa Catarina.

O rebanho bovino de corte catarinense é produzido em sistema extensivo, utilizando normalmente a monta natural como forma de multiplicação. Esta característica torna de extrema importância a avaliação do macho reprodutor. O impacto da fertilidade do touro no desempenho reprodutivo do rebanho é muito superior ao da vaca, pois a expectativa é que cada touro acasale com pelo menos 25 matrizes (VALLE et al., 1998). Se o reprodutor for um animal de baixa fertilidade, menores serão as chances das fêmeas ficarem gestantes ou quando isto ocorre, acarreta em atraso na concepção, que acarretará uma perda de 20 a 25 kg de peso do terneiro ao desmame, para cada 21 dias de atraso (BARTH, 2000). O atraso na concepção atrasa a parição e o conseqüente retorno à ciclicidade, na próxima estação reprodutiva. Este círculo vicioso acaba reduzindo as chances desta fêmea conceber. O emprego da taxa de prenhez, prática comum especialmente em Santa Catarina, como índice único para avaliar a fertilidade, pode levar a uma avaliação equivocada, especialmente quando a estação de monta tem longa duração, ou o número de fêmeas por touro é baixo. Nestas condições, reprodutores de alta fertilidade compensam os de baixa fertilidade, que todavia continuam onerando o sistema. Embora estas práticas pareçam compensar a inabilidade dos reprodutores, este fato não é verdadeiro, já que na época de parição, fêmea coberta por animais de alta fertilidade tem partos mais precoces e concentrados, o que resulta em lotes de terneiros mais homogêneos, mais pesados e conseqüentemente mais valorizados. Em animais prontos para o abate, há um ganho médio de 70 kg, em

favor dos animais que nascem no início da estação, quando comparados aos que nascem no final da estação, demonstrando a importância de antecipar e concentrar os nascimentos. Holroyd et al. (2002) avaliando a paternidade de terneiros produzidos por 235 touros em diferentes rebanhos, demonstraram que 58% dos reprodutores foram responsáveis por menos de 10% dos nascimentos, e 6% dos touros não produziram nenhum descendente.

Outro aspecto importante a ser considerado é a sub-utilização dos reprodutores de alta fertilidade, quando utilizado o sistema tradicional que preconiza um reprodutor para 25-30 fêmeas, uma vez que alguns destes animais tem capacidade de cobrir um número maior de fêmeas. O uso racional destes reprodutores possibilita reduzir o número de touros na propriedade, reduzindo os custos e possibilitando manter uma fêmea produtiva adicional, em seu lugar. Fonseca et al. (2000), utilizando reprodutores da raça Nelore, no Brasil central, mostraram que a mudança do sistema tradicional de acasalamento que utiliza um reprodutor para 30 fêmeas, por um sistema que utiliza um reprodutor para cada 60 ou 80 fêmeas, proporciona uma redução de 18,6 e 22,8%, respectivamente, no custo do bezerro desmamado.

Isto demonstra que existem tecnologias fáceis e de baixo custo para serem aplicadas, por exemplo, a avaliação da capacidade reprodutiva de touros destinados ao regime de monta natural, que é fundamental para a obtenção de bons resultados, porém ainda é pouco utilizada, especialmente em Santa Catarina. Para evitar os problemas de fertilidade relativos ao macho, a avaliação andrológica dos reprodutores deve ser realizada a cada início de estação reprodutiva, a fim de eliminar reprodutores problemáticos, evitando assim as perdas econômicas decorrentes da sua utilização.

A identificação e seleção do tipo desejado de reprodutor normalmente esbarra na carência de informações sobre a fertilidade dos reprodutores mantidos em condições de campo em nosso Estado. Além disso, os parâmetros reprodutivos de determinadas raças, importantes para as nossas condições, inexistem, fazendo com que as informações obtidas em outros países, em diferentes condições, sejam utilizadas.

Uma raça européia bastante difundida nas propriedades catarinenses é a Devon. Por ser de origem inglesa, pouco é conhecido sobre as características e comportamento reprodutivo de touros Devon em nossas condições. Este estudo teve como objetivos determinar o percentual de animais aptos como reprodutores, baseado no exame clínico, seminal e de comportamento sexual; Demonstrar a importância da realização de cada etapa do exame, determinando o número de animais reprovados em cada etapa; Obter medidas médias de circunferência escrotal para a raça Devon nas diferentes faixas etárias.

## **2.2 - MATERIAIS E MÉTODOS**

Este experimento foi realizado durante o período de inverno e primavera, entre os anos de 2003 e 2006, na Agropecuária Arapari, que conta com duas propriedades, sendo uma situada no município de Água Doce (26° 59' 52" S e 51° 33' 21" O) e outra no município de Vargeão (26°51'49" S e 52°09'18" O), na região oeste do estado de Santa Catarina.

Foram utilizados um total de 207 animais da raça Devon (*Bos taurus taurus*), com idade variando de 18 meses até 10 anos, perfazendo um total de 233 exames realizados. Todos os animais eram mantidos em pastagens naturais da região e uma suplementação com silagem de milho. No período de inverno eram mantidos em

pastagem de aveia (*Avena sativa*) e azevém (*Lolium multiflorum*), além de suplementação mineral *ad libitum* em cochos coletivos.

Os touros foram classificados como aptos ou inaptos à reprodução, de acordo com os resultados obtidos no exame físico, exame seminal e comportamento sexual. Foram considerados inaptos aqueles que não atingiam os valores mínimos recomendados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), em qualquer um dos três exames acima citados.

### 2.2.1. AVALIAÇÃO FÍSICA

Nesta parte do exame foi considerado o estado geral do animal, além da observação de olhos, cascos, pernas e estado nutricional, através da condição corporal. No exame clínico dos órgãos reprodutivos foram examinados os testículos: avaliando-se sensibilidade a palpação, mobilidade dentro bolsa escrotal, consistência, simetria, além da mensuração do perímetro escrotal realizada no local da maior circunferência, com auxílio de uma fita própria para esta finalidade.

Como o CBRA não apresenta recomendações específicas de circunferência escrotal (CE) para a raça Devon, foram utilizados os critérios mínimos recomendados por Barth (2000), com pequenas modificações em virtude de diferenças na faixa etária dos grupos. Foram considerados aptos os animais que atingiram a medida mínima de CE para sua faixa etária, que é:  $\geq 34$  cm para animais até 22 meses e  $\geq 35$  cm para animais com idade igual ou superior a 23 meses.

A avaliação peniana foi realizada no momento da coleta de sêmen, que por sua vez foi realizada com eletroejaculador ou vagina artificial. As glândulas anexas foram avaliadas por palpação retal, avaliando-se sensibilidade, consistência, tamanho e simetria das estruturas.

## 2.2.2. COLETA E AVALIAÇÕES DOS EJACULADOS.

### 2.1. Coletas

As coletas de sêmen foram realizadas através de eletroejaculação nos anos de 2003, 2004 e 2005. No ano de 2006 foi utilizada a vagina artificial interna (VAI), desenvolvida pela equipe do Dr. Albert Barth, da Universidade de Saskatchewan, no Canadá e sob número de patente Norte Americana 6.554.811.

### 2.2. Avaliações dos ejaculados

Imediatamente após a coleta, os ejaculados eram levados até o laboratório montado próximo ao local da coleta, onde foram avaliados macroscopicamente: volume e aspecto; e microscopicamente: movimento de massa, motilidade e vigor, seguindo as normas do CBRA. Também foi retirado uma amostra de 25µl diluída em 5ml de uma solução de formol, perfazendo uma diluição de 1:200 para realização da concentração espermática. Para avaliar a morfologia espermática, eram confeccionados dois esfregaços com 5µl de sêmen, corados com cristal violeta, dos quais eram avaliadas aleatoriamente 200 células, sendo os defeitos classificados como maiores e menores seguindo a metodologia descrita por (MIES FILHO et al., 1987), e os animais considerados aptos ou inaptos segundo as normas do CBRA.

### 2.2.3. Avaliação da Capacidade de Serviço

Esta avaliação foi realizada apenas nos anos de 2005 e 2006, sendo no primeiro ano feito a coleta do sêmen com eletroejaculador e quinze dias mais tarde feito o teste de capacidade de serviço. No ano seguinte o teste de capacidade de serviço (TCS) foi realizado simultaneamente a coleta do sêmen, pois esta foi realizada com a VAI.

Como manequins foram utilizadas fêmeas não gestantes, de tamanho corporal adequado e em bom estado nutricional. Com antecedência de 48hs do início das

coletas, foi aplicado 3ml de Cipionato de Estradiol (ECP®) e 2ml de Prostaglandina (Ciosin®), para indução comportamental do estro. Cada fêmea foi utilizada para coletar 5 a 6 reprodutores. As vacas eram mantidas em um brete de contenção construído em madeira, semelhante ao utilizado para coleta de sêmen com vagina artificial convencional, dentro de uma mangueira de aproximadamente 25m<sup>2</sup>. As fêmeas muito agitadas no momento da coleta foram substituídas.

Os touros a serem examinados entravam em duplas na mangueira de teste, com exceção dos animais adultos que entravam sozinhos. Realizada a cópula o touro era imediatamente retirado. Os machos que não demonstravam interesse sexual pela fêmea, no período de 10 minutos, eram retirados da mangueira e no dia seguinte era repetido o exame, por mais 10 minutos, sem a presença de outro macho.

Enquanto aguardavam o teste, os machos permaneciam agrupados em mangueiras, de onde podiam observar a fêmea em cio e o comportamento dos touros na mangueira teste.

Foram considerados aptos no TCS apenas os reprodutores que completaram a cópula dentro dos 10 primeiros minutos ou nos 10 minutos adicionais, sem levar em consideração aspectos como: reflexo de Flemhem, exposição de pênis e tentativas de monta.

### **2.3. RESULTADOS**

Durante o período total do experimento foram realizados 233 exames andrológicos, sendo em sua maioria touros jovens, abaixo de 30 meses. A distribuição dos exames por faixa etária está demonstrada na Tabela 1.

Tabela 1 - Número de exames andrológicos realizados em touros Devon, agrupados em quatro faixas etárias.

CLASSES	NÚMERO
18,19, 20, 21, 22 e MESES	117
23, 24, 25, 26 e 27 MESES	80
≥ 30 MESES	36

Do total de exames realizados, sem considerar o TCS, 71,6% dos animais foram considerados aptos à reprodução, como demonstra a Tabela 2. Observou-se a existência de uma correlação positiva entre a porcentagem de animais aptos e a idade dos mesmos ao exame, sendo observado 62,4% de animais aptos na categoria de 18 a 22 meses, 80,0% para animais na faixa etária de 23 a 27 meses e 83,3% para animais com idade igual ou superior a 30 meses.

As causas que determinaram as reprovações variaram nas diferentes faixas etárias. No grupo 1 (18 a 22 meses), o principal motivo de reprovações foi a CE abaixo do mínimo desejável, sendo que todos os animais reprovados no exame físico, neste grupo, apresentavam esta característica. As medidas de CE obtidas em cada faixa etária estão na Tabela 2.

Tabela 2. Medidas de circunferência escrotal de touros Devon avaliados no período de 2003 a 2006, de acordo com a idade dos animais.

CLASSES	N	MÉDIA	MÍNIMO – MÁXIMO
18, 19, 20, 21, 22 e MESES	117	35,2 ±2,93	29 – 44
23, 24, 25, 26 e 27 MESES	80	37,3 ±2,75	29,5 – 44
≥ 30 MESES	36	38,2 ±3,6	31 – 48

No grupo 2 (23 a 27 meses) houve uma equivalência entre a porcentagem de animais reprovados no exame físico e avaliação seminal, respectivamente 11,2 e 13,75%. Neste grupo um animal foi reprovado por baixa qualidade seminal, apresentando ainda vesículas seminais com aumento de volume e sensibilidade à palpação. Ainda neste grupo, chamou a atenção um animal que apresentou ejaculado com mais de 50% dos espermatozóides decapitados, em sucessivas coletas. No grupo 3 (acima de 30 meses) se manteve uma equivalência entre o número de reprovações no exame físico e qualidade seminal (Tabela 3). Neste grupo foi constatada presença de um animal com fratura e aderência peniana.

Tabela 3 – Resultados da avaliação andrológica de reprodutores bovinos da raça Devon, realizadas no período de 2003 a 2006, de acordo com a faixa etária.

GRUPOS	APTOS		INAPTOS		
	N	%	TOTAL	EXAME FÍSICO	SÊMEN
Grupo 1 (18 a 22 meses)	73	(62,4)	44 (37,6)	35 (29,9)	11 (9,4)
Grupo 2 (23 a 27 meses)	64	(80,0)	16 (20,0)	09 (11,2)	11 (13,75)
Grupo 3 ( $\geq$ 30 meses)	30	(83,3)	06 (16,6)	04 (11,1)	02 (5,5)
<b>TOTAL</b>	<b>167</b>	<b>(71,6)</b>	<b>66 (28,3)</b>	<b>48 (20,6)</b>	<b>24 (10,3)</b>

Nos anos de 2005 e 2006 além das avaliações físicas e seminais também foi incluído no exame o TCS, sendo realizado 95 exames. Foram encontrados oito animais com algum tipo de distúrbio que impedia a realização da cópula (Tabela 4). Estes animais reprovados no TCS apenas um havia sido reprovado em função da baixa qualidade seminal. Nos demais, não foi constatado nenhuma irregularidade no exame físico ou na avaliação seminal. Dos machos reprovados, quatro não demonstraram nenhum tipo de interesse sexual pela fêmea em cio. Dos animais

restantes, um realizou sucessivas montas, com introdução do pênis na vagina da vaca sem, contudo, ejacular. Este mesmo comportamento foi observado no exame realizado no ano seguinte (2006). Outro animal apresentava a curvatura do jarrete excessivamente acentuada, o que o impedia a realização da monta, apesar de várias tentativas. Um terceiro animal também manifestou tentativas de saltar, no entanto demonstrava sensibilidade no membro posterior, o que impedia de concretizar a monta. Finalmente, outro animal apresentou desvio axial do pênis, que impedia a introdução na vagina.

Tabela 4 – Quantificação e causas de reprovação no exame andrológico com avaliação da capacidade de serviço de touros Devon, no período de 2005 e 2006.

FAIXA ETÁRIA	APTOS	INAPTOS							
		TOTAL		Exame Físico		SÊMEN		TCS	
		N	%	N	%	N	%	N	%
Grupo 1 (18 a 22 meses)	22 (62,8)	13	(37,2)	07	(20,0)	04	(11,4)	02	(5,7)
Grupo 2 (23 a 27 meses)	18 (58,1)	13	(41,9)	06	(19,3)	08	(25,8)	03	(9,7)
Grupo 3 ( $\geq$ 30 meses)	20 (68,9)	09	(31,1)	03	(10,3)	02	(6,9)	04	(13,7)
<b>TOTAL</b>	<b>60 (63,2)</b>	<b>35</b>	<b>(36,8)</b>	<b>16</b>	<b>(16,8)</b>	<b>14</b>	<b>(14,7)</b>	<b>09</b>	<b>(9,4)</b>

Na tabela 5 estão listados e quantificados as principais causas de reprovação dos animais. Observou-se uma similaridade entre o número de animais reprovados no exame físico e qualidade seminal. No exame físico a principal causa de reprovações foi à medida de CE abaixo do recomendado, enquanto em relação a qualidade seminal, houve uma predominância de defeitos morfológicos dos espermatozóides.

Os dois maiores quesitos de reprovação foram a medida de CE e a morfologia espermática, constantes dos exames físico e de qualidade seminal, respectivamente. A maioria dos reprodutores inaptos foi reprovada em apenas um

dos critérios, havendo, entretanto, animais que foram reprovados em dois critérios, não sendo encontrado nenhum animal reprovado nos três critérios.

Tabela 5. Causas de inaptidão reprodutiva em touros da raça Devon submetidos ao exame andrológico no período de 2003 a 2006.

Parâmetro não satisfatório	Freqüência
Circunferência escrotal	46 (19,7%)
Qualidade seminal	24 (10,3%)
Sem interesse sexual	4 (4,2%)*
Sistema locomotor	2 (0,8%)
Fratura pênis	1 (0,4%)
Desvio de pênis	1 (1,0%)*
Vesiculite	1 (0,4%)
Monta não ejacula	1 (1,0%)*

\* Porcentagem realizada em cima dos animais submetidos ao TCS.

## 2.4. DISCUSSÃO

Como resultado final dos 233 exames realizados, 71,6% dos animais foram considerados aptos à reprodução, na ausência do TCS. Estes valores são semelhantes a outros relatos da literatura. Avaliando animais de 16 a 20 meses Higdon et al. (2000) encontraram 75% de animais aprovados, semelhante aos 76,2% obtido por Kennedy et al. (2002), que avaliaram 3658 animais com idade inferior a dois anos. Entretanto, estes autores observaram uma variação de 63,3 a 80,3% entre diferentes fazendas. Observaram ainda uma grande variação entre raças, verificando 47,7% de animais aptos na raça Santa Gertrudis e 86,5% na raça Gelbvieh. Estes dados evidenciam a necessidade de se buscar os índices

específicos para cada raça. Neste estudo a média geral de animais com problemas no exame físico específico dos órgãos reprodutivos foi 20,6%, sendo a baixa CE a causa predominante. Como demonstrado na Tabela 3, houve uma melhora gradativa nos índices de aptidão reprodutiva dos touros Devon, com o aumento da idade dos animais, semelhante ao que foi descrito por Godfrey & Dodson (2005) em animais da raça Senepol e por Bruner et al. (1995) nas raças Simental, Hereford, Angus e Charoles. Já num estudo com diferentes raças e que incluiu a raça Devon, Gottschall et al. (1997) encontraram semelhante comportamento para touros de 2, 3 e 4 anos, sendo que nos animais com idade mais avançada, o índice de inaptos foi maior.

No Brasil, em relação a CE, a recomendação do CBRA é a utilização dos mesmos parâmetros para todos os reprodutores *Bos taurus taurus*, havendo restrição apenas para animais *Bos taurus indicus*. No entanto, Bruner et al. (1995), ao estudar diferentes raças (Continentais e Britânicas), observaram efeito significativo da raça sobre a medida de CE. Em virtude de existirem diferenças na CE nas diferentes raças taurinas Coulter et al. (1987) recomenda a utilização de medidas mínimas próprias para cada raça, sendo para animais de 21 a 30 meses: 36 cm para raça Simental, 35 cm para Angus e Charoles, 34 cm para Hereford e Shorthorn e 33 cm para raça Limousin. Neste estudo os critérios mínimos utilizados foram os recomendados por Barth (2000), em virtude não existirem dados específicos para a raça Devon, nas normas do CBRA. Seguindo o recomendado por Barth (2000), o índice de reprovação dos animais obtido neste quesito foi 18,9%, o que é muito próximo do critério proposto por Coulter et al. (1987), que sugerem que a medida mínima para cada raça seja o ponto onde 20% dos animais de uma população não seleta, sejam considerados inaptos para a característica. Já utilizando as medidas

recomendadas pelo CBRA para raças taurinas, o número de animais classificados como questionável neste estudo diminuiria para 4,2%, o que demonstra que animais da raça Devon possuem a medida de CE superior à média das raças pertencentes a esta subespécie, havendo a necessidade da obtenção de parâmetros próprios para a raça, que podem ser mais rigorosos.

Nas recomendações do CBRA, assim como as descritas por Barth (2000), os animais são agrupados em faixas etárias de 15 a 20 meses e de 21 a 30 meses. Neste estudo, foi observado um aumento médio de aproximadamente 2 cm nos animais com idade de 23 a 27 meses, quando comparado com o grupo de animais de 18 a 22 meses, demonstrando um desenvolvimento significativo das gônadas neste período, o que justifica plenamente a existência de mais sub-divisões. Divisões com grande intervalo de idade nas faixas etárias possibilitam uma variação muito grande na medida da CE, o que facilita aos animais de maior idade a obtenção de índices satisfatórios e dificulta aos animais jovens. Isto possibilita a seleção de animais que deveriam ser descartados e o descarte equivocado de animais mais jovens.

O segundo quesito em importância nas reprovações dos touros Devon, foi a qualidade seminal, com 10,3% dos animais reprovados. Quando se considerou as distintas faixas etárias, os índices de reprovação foram 9,4, 13,8 e 5,5% para os grupos 1, 2 e 3, respectivamente.

No TCS, dos 95 exames realizados 8 foram considerados inaptos, havendo animais reprovados em todas as faixas etárias e uma homogeneidade nos resultados. Quatro destes animais (4,2%) não manifestaram interesse sexual pela fêmea, índice bastante inferior ao observado por Barth et al. (2004), que obtiveram 39,4% de touros com esta característica. Os autores ainda avaliaram o comportamento destes

animais em condição de campo, observando que apenas 20% realizaram coberturas, o que demonstra a efetividade e a importância do teste. As demais causas de reprovação no TCS foram motivadas por defeitos físicos que impossibilitaram a realização da cópula que frequentemente não são detectadas nas etapas anteriores do exame. Dos animais reprovados no TCS, apenas um havia sido reprovado nas etapas anteriores, demonstrando a importância na realização do teste, pois a não realização do mesmo implicaria na aprovação de animais que são totalmente inférteis ou de fertilidade reduzida.

## **2.5. CONCLUSÃO**

Em cada uma das três etapas do exame houve animais reprovados, de todas as faixas etárias, demonstrando que todas as etapas são indispensáveis na avaliação andrológica de touros.

A medida média de CE para touros da raça Devon foi 35,2 cm para animais com idade de 18 a 22 meses, 37,3 para animais com 23 a 27 meses e 38,2 cm, para animais com idade igual ou superior a 30 meses, demonstrando a necessidade de que as faixas etárias sejam subdivididas para tornar o exame mais preciso.

Touros da raça Devon apresentam boa fertilidade baseado por suas características seminais, no TCS e nas medidas de CE.

## **2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BARTH, A.D. Bull Breeding Soundness Evaluation. 2. ed. Lacombe: Editora: Western Canadian Association of Bovine Practitioners, 2000.

BARTH, A.D., ARTEAGA, A.A., BRITO, L.F.C., PALMER, C.W. Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: an alternative for

electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. **Animal Reproduction Science**, n. 84, p. 315–325, 2004.

BRUNER, K.A., MCGRAW, R.L., WHITACRE, M.D., VAN CAMP, S.D. Breeding soundness examination of 1,952 beef bulls in North Carolina. **Theriogenology**, v. 44, p. 129-145, 1995.

CENTRO DE SOCIOECONOMIA E PLANEJAMENTO AGRÍCOLA. Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2005-2006. disponível em: [http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/sintese\\_2006/bovino\\_2006.pdf](http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/sintese_2006/bovino_2006.pdf)>. Acesso em: 27 abr. 2007.

CHENOWETH, P.J., HOPKINS, F.M., SPITZER, J.C., LARSEN, R.E. Guidelines for using the bull breeding soundness evaluation form. *Theriogenology Handbook 1993*: B-10.

COULTER, G.H., MAPLETOFT, R.J., KOZUB, G.C., CATES, W.F. Escrotal circumference of two-year-old bulls of several beef breeds. **Theriogenology**, v. 27, n. 3, p. 485-491, 1987.

FONSECA, V.O., FRANCO, C.S., BERGMANN, J.A.G. Potencial reprodutivo e econômico de touros Nelore acasalados coletivamente na proporção de um touro para 80 vacas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n. 1, 2000.

GODFREY, R.W., DODSON, R.E. Breeding soundness evaluations of Senepol bulls in the US Virgin Islands. **Theriogenology**, n. 63, p. 831–840, 2005.

GOTTSCHALL, C.S., MATTOS, R.C. Achados de exames andrológicos em touros de corte *Bos taurus* e *Bos indicus*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 21, p. 25-28, 1997.

HENRY, M., NEVES, J.P. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: **CBRA**, 1998. 49p.

HIGDON, H.L., SPITZER, J.C., HOPKINS, F.M., BRIDGES JR, W.C. Outcomes of breeding soundness evaluation of 2898 yearling bulls subjected to different classification systems. **Theriogenology**, v. 53, p. 1321-1332, 2000.

HOLROYD, R.G., DOOGAN, V.J., DE FAVERI, J., FORDYCE, G., MCGOWAN, M.R., BERTRAM, J.D., VANKAN, D.M., FITZPATRICK, L.A., JAYAWARDHANA, G.A., MILLER, R.G. Bull selection and use in northern Australia 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 67–79, 2002.

KENNEDY, S.P., SPITZER, J.C., HOPKINS, F.M., HIDGON, H.L., BRIDGES JR, W.C. Breeding soundness evaluations of 3648 yearling bulls using the 1993 Society for Theriogenology Guidelines. **Theriogenology**, v. 58, p. 947-961, 2002.

MIES FILHO, A. Inseminação Artificial, 6ª Edição. Porto Alegre: Ed. Sulina, 1987.

PALMER, C.W., AMUNDSON, S.D., BRITO, L.F.C., WALDNER, C.L., BARTH, A.D. Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. **Animal Reproduction Science**, n. 80, p. 213–223, 2004.

VALLE, E.R.do; ANDREOTTI, R.; THIAGO, L.R.L. de S. **Estratégias para aumento da eficiência reprodutiva e produtiva em bovinos de corte**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998. 80p.

## **CAPÍTULO 3**

### **USO DA VAGINA ARTIFICIAL INTERNA (VAI) NA COLETA DE SÊMEN BOVINO.**

#### **3.1 - INTRODUÇÃO**

O exame de avaliação reprodutiva de touros consiste basicamente na avaliação de três quesitos: Capacidade física; Produção espermática adequada e Capacidade de serviço (BARTH, 2000). Com a correta avaliação destas etapas, pode-se obter um rápido e seguro diagnóstico da fertilidade do animal, evitando a utilização de animais sub-férteis ou de fertilidade questionável (CHENOWETH, 2000). No entanto o método mais utilizado para coleta de sêmen ainda é a eletroejaculação, que apesar de permitir uma coleta adequada (PALMER et al., 2004), impede a avaliação da capacidade de serviço, determinando que muitos técnicos e pecuaristas desprezem este tipo de avaliação, em função do incremento de custos com uma nova visita do técnico a propriedade, bem como em virtude da necessidade de um novo manejo dos animais.

No entanto, inúmeros estudos vêm demonstrando a importância da realização do teste (LANDAETA-HERNÁNDEZ et al., 2001; BARTH et al., 2004; CRUZ et al 2006; HOFLACK et al., 2006;) para possibilitar o diagnóstico de animais sub-férteis ou mesmo inférteis. O reduzido interesse sexual ou a apresentação de patologias que impeçam a realização da cópula, não são detectados nos exames convencionais,

levando, com freqüência, machos inaptos a serem considerados aptos à reprodução pelo exame físico e avaliação seminal.

Apesar da avaliação de libido e TCS serem cruciais para avaliação da fertilidade de reprodutores, ainda existe a necessidade de uma metodologia adequada para esta mensuração. Mesmo existindo um grande número de testes, a maioria destes apresentam resultados contraditórios, em virtude de diferentes fatores que interferem no comportamento sexual dos animais (PETHERICK, 2005).

Recentemente, Barth et al., (2004) trabalhando com touros das raças Charolesa, Aberdeen Angus e Polled Hereford obtiveram 60,6% dos animais realizando a cópula em teste de mangueira, com a metodologia da Vagina Artificial Interna (VAI), que possibilita a coleta de sêmen, além da avaliação simultânea da capacidade de cópula. O método permite a avaliação de touros de campo, com menores riscos para o operador. Por ser uma metodologia recente, os dados na literatura internacional são escassos e não existem dados descritos em nossas condições. Assim sendo, o presente experimento teve por objetivo avaliar o comportamento e a fertilidade de touros da raça Devon submetidos a esta metodologia.

### **3.2 - MATERIAIS E MÉTODOS**

O estudo foi conduzido no municio de Vargeão, localizado no oeste catarinense, sendo utilizados 52 reprodutores da raça Devon (*Bos taurus taurus*), com idade variando entre 18 meses até 10 anos. Todos os animais foram submetidos a um completo exame de aptidão reprodutiva. Para coleta do sêmen foi utilizado a VAI. A VAI é um dispositivo composto por uma haste metálica, na qual uma das extremidades forma um circulo metálico de aproximadamente 7,5cm de diâmetro.

Uma segunda haste metálica tem uma de suas extremidades presa a um cone de látex de aproximadamente 30 cm de comprimento, utilizado em vagina artificial. Na montagem, as duas extremidades afiladas das hastes metálicas são unidas por uma mangueira plástica flexível. A seguir a extremidade livre do cone de látex é preso no círculo metálico, mantendo a abertura do cone. Sobre todo o dispositivo é colocado uma luva de palpação retal, com 1 dedo ou um saco plástico estreito, que é preso na porção final do cone de látex (Figura 01). Com a conexão das duas hastes, forma-se o arcabouço que permite suficiente rigidez para a introdução do dispositivo na vagina de uma fêmea, que servirá como manequim (Figura 02). Antes de ser inserida no conduto vaginal das fêmeas utilizadas como manequins a VAI era lubrificada externamente com mucilagem para facilitar sua inserção e internamente com solução não espermicida para facilita a penetração do pênis do animal, além da anestesia epidural baixa.



Figura 1 – Componentes da VAI.



Figura 2 – VAI pronta para o uso.

Como manequins foram utilizadas fêmeas não gestantes, em bom estado nutricional e de grande porte. As fêmeas tinham o comportamento estral induzido com a aplicação de 2ml de Prostaglandina (Ciosin®) + 3ml de Cipionato de Estradiol (ECP®), dois dias antes da realização dos exames, sendo utilizadas apenas fêmeas que demonstravam sinais de estro. No momento da coleta as fêmeas eram contidas

em um brete, semelhante ao utilizado para coleta de sêmen convencional, montado dentro de uma mangueira de aproximadamente 25m<sup>2</sup>. Os machos eram introduzidos dois a dois na mangueira de teste, permanecendo no máximo dez minutos. Os machos que realizavam a cópula eram imediatamente retirados da mangueira, sendo imediatamente substituído. Dentro da mangueira permanecia uma pessoa responsável pela movimentação dos animais e uma responsável pela inserção e retirada das VAI, que eram montadas por uma terceira pessoa.

Passados dez minutos, os animais que não efetuavam a cópula eram retirados e recebiam uma nova chance ao final dos exames, agora sem a presença de outro macho.

Os animais que não realizaram a monta foram então submetidos a coleta com auxílio de eletroejaculador. A avaliação seminal foi realizada logo após a coleta, seguindo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, sendo considerados aptos no TCS aqueles animais que realizaram a cópula em até dez minutos do primeiro exame ou do exame adicional.

### **3.3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Dos 52 animais examinados, em 45 (86,5%) foi possível realizar a coleta do ejaculado com a utilização da VAI. Do grupo de touros coletados com a VAI (n=45), 31 (69%) foram considerados aptos à reprodução, e 14 (31%) considerados inaptos. Quando se considerou o total de touros examinados (52), o percentual de touros aprovados após coleta de sêmen e avaliação da capacidade de cópula com a VAI foi 60,0%. Estes resultados são semelhantes aos descritos em diferentes raças por (GOTTSCHALL et al., 1997; CHACON, et al., 1999; HIGDON et al., 2000; KENNEDY et al., 2002) que obtiveram uma variação de 47,7 até 86,5%, com média de 60 a

70%. Porém os autores consideraram apenas o exame físico e de qualidade seminal.

Dos sete animais nos quais não foi possível realizar a coleta do ejaculado com a VAI, três não apresentaram interesse sexual pela fêmea; um apresentava um desvio do pênis, que não permitia sua introdução na vagina, e outro, apesar de introduzir o pênis na vagina da fêmea, não conseguia realizar a ejaculação. Este animal foi submetido a um novo teste de comportamento, agora sem a utilização da VAI, persistindo o comportamento mesmo com a introdução do pênis na vagina, sem qualquer anteparo. Isto reforça a possibilidade de não haver interferência da VAI na coleta do sêmen destes touros. Finalmente, os dois touros restantes não conseguiram realizar a monta na fêmea em virtude de problemas aparentes nos membros posteriores.

Os sete animais que não responderam a VAI foram submetidos ao eletroejaculador, sendo possível coletar o sêmen de todos. Ao final da avaliação seminal, apenas um dos touros foi considerado inapto, demonstrando a importância da comprovação da capacidade de cópula na avaliação de reprodutores bovinos. Desta forma, desconsiderando a avaliação da capacidade de cópula e ejaculação espontânea com a VAI, o índice de touros aptos à reprodução, que na verdade seria 60,0%, subiria para 71,2%. Estes dados claramente demonstram que 11,2% de touros seriam selecionados de forma equivocada, reduzindo a fertilidade dos rebanhos e gerando prejuízos.

Um comportamento incomum foi observado em alguns animais jovens e ainda inexperientes em relação à cópula. Oito machos executaram ao menos uma cópula no reto da fêmea manequim, antes de executar a cópula na VAI, inserida na vagina da fêmea. Um dos touros avaliados chegou a realizar quatro ejaculações no interior

do reto e somente na quarta tentativa conseguiu a realização adequada da cópula na vagina da fêmea. Em quatro oportunidades também foi possível observar a introdução do pênis na vagina da fêmea, seguida da execução do golpe dos rins, não sendo obtido ejaculado no interior da VAI. Estes dois comportamentos não foram descritos por Barth et al., (2004) que desenvolveram a metodologia. No entanto, os autores examinaram apenas touros sexualmente maduros e, portanto, experientes, enquanto em nosso experimento a maioria dos machos avaliados era jovem, sem qualquer contato com fêmeas até o dia do exame.

### **3.4. CONCLUSÃO**

A VAI demonstrou ser efetiva na coleta dos ejaculados de touros Devon, permitindo a avaliação simultânea da capacidade de serviço e coleta do ejaculado, otimizando assim a visita do técnico.

A avaliação da capacidade de serviço mostrou ser de vital importância, já que 11,1% dos animais reprovados no teste seriam inadequadamente considerados aptos à reprodução, se apenas os exames físico e de qualidade seminal fossem empregados.

### **3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

BARTH, A.D. Bull Breeding Soundness Evaluation. 2. ed. Lacombe: Editora: **Western Canadian Association of Bovine Practitioners**, 2000.

BARTH, A.D., ARTEAGA, A.A., BRITO, L.F.C., PALMER, C.W. Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: an alternative for

electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. **Animal Reproduction Science**, n. 84, p. 315–325, 2004.

CHACON, J., PÉREZ, E., MILLER, E., SDDERQUIST, L., RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Breeding Soundness Evaluation of Extensively Managed Bulls in Costa Rica. **Theriogenology**, v. 52, p. 221-231, 1999.

CRUZ, F.B., MARTINS, L.T., BUNN, S. RIBEIRO, E.S.,MEZZALIRA, A. Falha na ejaculação em *Bos taurus* – Relato de caso. XII – **Ciclo de Atualização em Medicina Veterinária**, Lages, p. 151, 2006.

GOTTSCHALL, C.S., MATTOS, R.C. Achados de exames andrológicos em touros de corte *Bos taurus* e *Bos indicus*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 21, p. 25-28, 1997.

HIGDON, H.L., SPITZER, J.C., HOPKINS, F.M., BRIDGES JR, W.C. Outcomes of breeding soundness evaluation of 2898 yearling bulls subjected to different classification systems. **Theriogenology**, v. 53, p. 1321-1332, 2000.

HOFACK, G., VAN SOOM, A., MAES, D., KRUIF, A., OPSOMER, G., DUCHATEAU, L. Breeding soundness and libido examination of Belgian Blue and Holstein Friesian artificial insemination bulls in Belgium and The Netherlands. **Theriogenology**, n. 66, p. 207-216, 2006.

KENNEDY, S.P., SPITZER, J.C., HOPKINS, F.M., HIDGON, H.L., BRIDGES JR, W.C. Breeding soudness evaluations of 3648 yerling bulls using the 1993 Society for Theriogenology Guidelines. **Theriogenology**, v. 58, p. 947-961, 2002.

LANDAETA-HERNÁNDEZ, A.J., CHENOWETH, P.J.,WILLIAM E. BERNDTSON, W.E. Assessing sex-drive in young *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 66, p. 151–160, 2001.

PALMER, C.W., AMUNDSON, S.D., BRITO, L.F.C., WALDNER, C.L., BARTH, A.D. Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. **Animal Reproduction Science**, n. 80, p. 213–223, 2004.

PETHERICK, J.C. A review of some factors affecting the expression of libido in beef cattle, and individual bull and herd fertility. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 90, p. 185–205, 2005.

## CAPÍTULO 4

### PUNÇÃO FOLICULAR E VITRIFICAÇÃO DOS OÓCITOS OBTIDOS DE FÊMEAS ZEBUINAS E TAURINAS

#### Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar o número médio de oócitos obtidos por punção folicular *in vivo* (OPU), de fêmeas bovinas de uma raça de origem *Bos taurus taurus* (Devon) e uma de origem *Bos taurus indicus* (Nelore). Ainda, avaliar a taxa de desenvolvimento embrionário, após vitrificação de oócitos obtidos por OPU, ou puncionados de ovários coletados em abatedouro, de ambas as raças. Os oócitos recuperados foram selecionados, e então submetidos ao seguinte protocolo de vitrificação: exposição por 30 segundos, a 10% de Etileno Glicol (EG) +10% de Dimetil Sulfóxido (DMSO), seguida da exposição por 20 segundos a solução de vitrificação composta por 20% EG + 20% DMSO + 0,5M de sacarose, envasados em OPS e mergulhados em nitrogênio líquido, e armazenados em botijão criogênico. Foram realizadas 60 sessões de OPU em vacas Devon obtendo-se em média 4,6 oócitos por sessão, inferior ( $P < 0,05$ ) aos 16,3 oócitos por coleta, obtidos em 12 sessões, com vacas Nelore. Os oócitos criopreservados foram reaquecidos em soluções decrescentes de sacarose (0,3 e 0,15M), 5 minutos cada, e então submetidos aos processos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. Na produção *in vitro* de embriões as taxas de clivagem foram as seguintes: OPU / Devon (17,6%), OPU / Nelore (29,1%), abatedouro / Devon (22,8%) e abatedouro / Nelore (14,5%), não havendo diferença estatística entre os grupos. Na avaliação de desenvolvimento embrionário, foi obtido apenas um blastocisto no grupo OPU / Devon. Conclui-se que

fêmeas da raça Nelore possibilitam um número significativamente maior de oócitos recuperados por sessão quando comparado com fêmeas da raça Devon e que nas condições deste experimento e com o atual nível de conhecimento a associação da técnica de OPU com vitrificação dos oócitos na própria fazenda, não produz taxas aceitáveis de desenvolvimento embrionário.

Palavras Chave: OPU, FIV, Vitrificação, oócitos, raças, bovinos.

#### **4.1 INTRODUÇÃO**

Nos últimos anos têm havido uma crescente demanda pela técnica de punção folicular (Ovum Pick Up - OPU), que consiste na punção de folículos ovarianos guiada por ultrasonografia, visando obter oócitos de doadoras vivas. Por ser uma metodologia pouco invasiva, de alta repetibilidade e proporcionar a obtenção de oócitos de boa qualidade (BOLS et al., 1996; WARD et al., 2000; SENEDA et al., 2003; BOLS et al 2004), a OPU vem sendo amplamente utilizada no Brasil. Associada à produção in vitro de embriões, pode gerar grande número de embriões por doadora/ano contribuindo significativamente para os programas de melhoramento genético (VIANA et al., 2004 ). Associadas, OPU e PIV permitem um aumento na produção de descendentes, quando comparadas com a produção convencional de embriões (KRUIP et al., 1994). A OPU pode ser realizada em qualquer estágio do ciclo estral, pois sempre haverá inúmeros folículos ovarianos, que se não aproveitados, serão fisiologicamente descartados pelo processo de atresia. A OPU/PIV ainda possibilita a utilização de fêmeas pré-púberes, em início de gestação, além de fêmeas com algum tipo de infertilidade adquirida. (VIANA et al.

2004). No Brasil, a técnica esta em franco crescimento, motivada pelo tamanho do rebanho bovino, que ultrapassa 170 milhões de animais, sendo 80% de origem zebuina ou resultante de seus cruzamentos (NOGUEIRA 2004). Em função disto, reprodutores qualificados destas raças apresentam um alto valor comercial, estimulando que os criadores a buscarem tecnologias que otimizem sua reprodução. Isto é demonstrado por mais de 63 mil embriões PIV transferidos no ano de 2003 na América do Sul (THIBIER, 2004), na maioria de origem zebuína. Outro fator que contribui para o predomínio dos zebuínos é o maior número de folículos presentes no ovário destes animais (SEGERSON et al., 1984). Entretanto, por sua dimensão continental, o Brasil tem regiões, principalmente o sul, onde não ocorre uma boa adaptação dos zebuínos, predominando rebanhos de origem européia. Destes rebanhos, especialmente em Santa Catarina, diferentes raças vem apresentando um significativo crescimento e importância, das quais cabe destacar a Devon. Entretanto, não existem trabalhos relacionados com OPU/FIV nesta raça.

Uma importante barreira para a maior difusão da OPU/PIV é o imediato reinício da meiose nos oócitos retirados dos folículos, o que exige um laboratório próximo para a obtenção de bons resultados. Uma alternativa para superar este entrave seria a criopreservação dos oócitos logo após a punção.

A criopreservação de oócitos permite um melhor aproveitamento dos oócitos que podem ser coletados e criopreservados ao longo de todo ano, permitindo assim que a produção de embriões seja realizada no momento mais adequado, permitindo também a manutenção da variabilidade genética com a formação de bancos genéticos (MERTON et al., 2003). Entretanto, algumas características biológicas dos oócitos tem limitado a eficiência da criopreservação (ARAV et al., 1996; LEDDA et al., 2001). No entanto, novas metodologias de criopreservação, como a vitrificação,

vem proporcionando taxas satisfatórias de blastocistos com oócitos imaturos criopreservados (BUNN et al., 2006; SANTOS et al., 2006, MARTINO et al., 1996) e inclusive produtos nascidos (VAJTA et al., 1998, VIEIRA et al., 2002).

Mesmo apresentando resultados aceitáveis para utilização comercial, não existem dados de experimentos utilizando oócitos imaturos obtidos de animais vivos por OPU, e vitrificados na própria fazenda. Este experimento teve como objetivo determinar o número médio de oócitos recuperados por OPU, em fêmeas bovinas de uma raça taurina, a Devon e uma indiana, a Nelore, bem como avaliar a utilização da criopreservação por vitrificação de oócitos imaturos obtidos por OPU ou de ovários provenientes de abatedouro, das duas raças.

## **4.2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Punção folicular guiada por ultrasonografia (OPU).**

Para coleta dos oócitos por OPU foram utilizadas doadoras das raças Devon (n=24) e Nelore (n=6). Os animais da raça Devon pertencentes a Agropecuária Arapari, localizada na cidade de Água Doce (26° 59' 52" S 51° 33' 21" O), no Oeste de Santa Catarina, e da raça Nelore pertencente a Fazenda Leopoldo Arruda, localizada na Cidade de Curitiba (27° 16' 58" S 50° 35' 02" O), região do planalto serrano de Santa Catarina. Foram realizadas 60 sessões de OPU em doadoras da raça Devon, sendo o intervalo mínimo entre sessões de 3 dias. Já as doadoras da raça Nelore foram submetidas a duas sessões com intervalo de 15 dias, totalizando doze sessões. Os animais foram mantidos em sistema de pastagem natural, com suplementação mineral, utilizando-se apenas doadoras não gestantes, ciclando e em perfeito estado de saúde.

As fêmeas foram contidas em bretes apropriados, submetidas a anestesia epidural com 5 ml de cloridrato de lidocaína a 2% e tiveram a região posterior higienizada com sabão e água corrente. Para a punção foi utilizado um aparelho de ultra-sonografia (Falcon 100, Pie Medical) equipado com probe linear na frequência de 8 MHz, acoplada a uma guia de punção transvaginal, sendo aspirados todos os folículos visíveis. Para a produção do vácuo necessário para a aspiração, utilizou-se uma bomba de infusão (Nutrimat II) que proporcionando um fluxo de aspiração de 10 ml de água por minuto. O fluido folicular foi aspirado através de agulhas hipodérmicas descartáveis 40x8 e 40x10, acopladas a um sistema de mangueiras de silicone, acopladas a tubos cônicos de 50 mL (Falcon) contendo 10ml de DPBS, previamente aquecido, e adicionado de 50 UI/ml de heparina (Liquemine®). Sistemáticamente o sistema era lavado com o DPBS adicionado de heparina. Todas as sessões de OPU foram realizadas pelo mesmo operador.

Após a punção, o conteúdo do tubo era submetido a lupas estereomicroscópicas para busca e seleção dos oócitos. Para o experimento, foram utilizados apenas oócitos com citoplasma homogêneo e ausência de pigmentações e cúmulus oóphorus, com pelo menos duas camadas de células. Os oócitos selecionados foram transferidos para o TCM-199 adicionado de Hapes e 10% soro de égua em estro (SEE) até a vitrificação.

## 2.2. Coleta em ovários provenientes de abatedouro

Os ovários de fêmeas da raça Devon foram obtidos em abatedouro da cidade de Água Doce/SC, enquanto os da raça Nelore, foram obtidos em abatedouro da cidade de Londrina/PR. Após a coleta, os ovários foram transportados até o laboratório em solução fisiológica adicionada de penicilina e

estreptomicina e aquecida a 37°C. A punção foi realizada com auxílio de uma bomba de vácuo, com fluxo de 10 ml de líquido/minuto. Os critérios de seleção foram os mesmos empregados par os oócitos obtidos por OPU.

### 2.3. Vitrificação

Os oócitos selecionados foram submetidos ao processo de vitrificação em palhetas estiradas (OPS), sendo expostos por 30 segundos uma solução de equilíbrio (SV50) contendo 50% dos crioprotetores contidos na solução de vitrificação (SV), esta composta de 20% EG (etileno glicol) + 20% DMSO (dimetil-sulfóxido) + 0,5M de sacarose, com exposição por 20 segundos. Neste período, procedia-se o envase por capilaridade e a imersão da OPS em N<sub>2</sub> líquido. Os oócitos vitrificados foram armazenados em botijões criogênicos até o momento do reaquecimento.

### 2.4. Reaquecimento

O reaquecimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal Assis Roberto de Bem – CAV/UEDESC em Lages/SC, pela exposição das OPS ao ar por 4 segundos, seguido da imersão e exposição em soluções decrescentes de sacarose em TCM Hepes (0,3 e 0,15M), cinco minutos cada. Após, os oócitos foram mantidos em meio de manutenção (TCM Hepes), com 10% de SEE.

### 2.5. Produção *in vitro* dos embriões

Os oócitos reaquecidos de cada um dos quatro grupos foram depositados 400µL de meio de maturação: TCM 199 + 5,95mg/mL Hepes + 0,025mg/mL Ácido Pirúvico + FSH 0,01 UI + LH 0,5µg/mL + 10% SEE, em placas nunc. Foram mantidos por 22-24 horas em estufa a 39°C, com 5% CO<sub>2</sub> e 95% de umidade relativa.

Após a maturação, os oócitos foram transferidos para o meio de fecundação: TALP Fert, adicionado de 6mg/mL de BSA + heparina 30µg/mL e PHE, permanecendo em cultivo por 22 horas.

A inseminação *in vitro* foi realizada com  $1 \times 10^6$  espermatozóides/mL, de conhecida fertilidade para a PIV, sendo selecionados pelo método de migração ascendente (swim-up) em meio TALP-Sperm + 6mg/mL de BSA.

Após a fecundação, os possíveis zigotos foram submetidos ao desnudamento, por agitação mecânica (Vortex), durante 60 segundos. A seguir foram lavados em TCM Hepes e depositados em 400µL do meio SOFaaci + 5% SEE, sob óleo mineral e com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e umidade saturada. Com 24 horas de cultivo foi avaliada a taxa de clivagem, retirando-se as estruturas não clivadas. A placa de cultivo foi introduzida então numa bolsa impermeável a gás, contendo uma mistura de 5% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>, para o cultivo adicional. No sétimo dia de cultivo, os embriões foram avaliados de acordo com o estágio de desenvolvimento.

## 2.6. Desenho experimental

Foram vitrificados oócitos provenientes de duas raças (Devon e Nelore) e com duas metodologias de recuperação (OPU e ovários de abatedouro), perfazendo quatro grupos experimentais. A cada rotina de reaquecimento foram utilizados 30 a 35 oócitos em cada um dos quatro grupos. Todos os tratamentos foram submetidos aos mesmos procedimentos de maturação, fecundação e cultivo. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado e a análise do número médio de oócitos obtidos por OPU em cada raça bem como a taxa de clivagem foi realizada através da análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5%.

### 4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O total de oócitos recuperados foi 472, sendo 276 provenientes da raça Devon e 196 na raça Nelore. O número médio de oócitos por sessão foi de 4,6 oócitos na raça Devon, que foi significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) aos 16,3 obtidos na raça Nelore.

Apesar de não haver dados específicos na literatura sobre o número de oócitos recuperados por OPU em fêmeas da raça Devon, os 4,6 oócitos por sessão obtidos neste trabalho, são semelhantes aos 4,25 oócitos por sessão obtidos por Chaubal et al., (2006) em vacas Angus e aos 4,6 oócitos por sessão recuperados por Seneda et al., (2003) em vacas da raça Blonde D´Aquitane.

A média de 16,3 oócitos por sessão obtida com animais da raça Nelore neste trabalho, embora seja pouco inferior aos 18,4 oócitos por sessão obtidos por Rubin et al., (2005), são bastante próximos. Estes autores ainda compararam o número de oócitos obtidos em fêmeas da raça Blonde D´Aquitane, com fêmeas  $\frac{1}{2}$  sangue Nelore X  $\frac{1}{2}$  sangue Blonde D´Aquitane obtendo média de 3,7 e 13,6 oócitos por sessão, respectivamente. Isto evidencia a influência do sangue zebuíno (Nelore) no número de oócitos recuperados.

Entretanto, em função da possibilidade de menor intervalo entre coletas das fêmeas Devon, a quantidade total oócitos obtidos num período mais prolongado, por exemplo 30 dias, acaba sendo semelhante.

A taxa de oócitos viáveis na seleção foi de 58,3% na raça Devon e 46,9% na raça Nelore. Obteve-se a média de 2,7 oócitos viáveis por coleta na raça Devon e

7,6 na raça Nelore. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Machado et al., (2006) utilizando animais da raça Simental.

Após o reaquecimento, maturação e cultivo dos oócitos vitrificados, foi observada uma taxa de clivagem de 17,6% no grupo OPU / Devon, 29,1% no grupo OPU / Nelore, 22,8% no grupo ovários abatedouro / Devon e 14,5% no grupo ovários abatedouro / Nelore, não havendo diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre os grupos. Na avaliação do desenvolvimento embrionário, observou-se apenas um embrião atingindo o estágio de blastocisto, no grupo OPU / Devon. Estes resultados são inferiores aos obtidos de clivagem anteriormente no laboratório por Vieira et al. (2002) (49,0%), Bunn et al. (2006) (43,6%, 31,4%) e Santos et al. (2006) (38,7%, 47,5%), utilizando oócitos provenientes de abatedouros e semelhante metodologia.

Com oócitos obtidos por OPU, já era esperado resultados um pouco inferior, em virtude da menor qualidade destes quando comparado aos oócitos obtidos de ovários coletados em abatedouros (MERTON et al., 2003). Esta menor qualidade dos oócitos obtidos por OPU em parte é devida ao método de coleta, já que os oócitos percorrem um caminho mais longo até o tubo de coleta, além da presença indesejável de sangue e das drogas anti-coagulantes. Ao contrário, em ovários de abatedouro existe uma menor adesão entre o oócito e a parede do folículo, em função da morte do animal, necessitando conseqüentemente, uma menor força de sucção para recuperar o oócito, possibilitando que o mesmo apresente um maior número de camadas de células do cumulus oophorus. A redução ou a ausência destas células determinam uma menor habilidade do oócito ser fecundado ou mesmo o comprometimento do posterior desenvolvimento embrionário (GORDON, 2003).

Outro aspecto relevante que pode ter contribuído para a redução dos resultados de desenvolvimento embrionário, foi o excessivo tempo decorrido desde as aspirações até a realização da vitrificação, pois os dois procedimentos eram inteiramente realizados por um mesmo técnico. Da mesma forma, em função das punções serem realizadas em fazenda, todo o material reciclável utilizado no experimento era processado na própria fazenda. Também, o laboratório era improvisado, sem as condições necessárias e adequadas para manipulação destas estruturas.

No entanto, embora estes fatos possam parcialmente justificar os baixos resultados dos grupos de oócitos obtidos por OPU, não justificam os verificados nos grupos que utilizaram oócitos de abatedouro e que foram manipulados em condições controladas. Sabe-se que, ainda hoje, não existe um método confiável que avalie o real potencial dos oócitos para chegarem ao estágio de blastocisto, existindo a possibilidade de que determinados lotes de animais produzam taxas muito reduzidas de desenvolvimento embrionário, que esporadicamente ocorrem nos laboratórios de PIV. As fêmeas doadoras dos ovários, da raça Nelore, assim como da raça Devon, eram oriundas de rebanhos específicos e foram abatidos em locais distintos daqueles em que regularmente se efetuava a coleta. Esta associação de fatos resultou em aumento do tempo de transporte dos ovários desde o frigorífico até o laboratório. Yang et al.,(1990) relatam uma drástica e crescente redução na produção de embriões com o aumento no tempo de transporte a 37°C, quando comparado com os ovários processados logo após a coleta. Isto ocorre em função de alterações degenerativas do ovário após a morte, que são maiores quanto maior a temperatura de transporte. Neste estudo, a temperatura inicial foi de 39°C, chegando ao laboratório 7 horas após o início da coleta a uma temperatura de 32°C.

Estes fatos demonstram a diversidade de fatores que podem interferir no processo de produção *in vitro* de embriões, especialmente quando utilizados oócitos previamente criopreservados.

#### 4.4. CONCLUSÕES

Fêmeas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) possibilitam um número significativamente maior de oócitos recuperados por sessão quando comparado com fêmeas da raça Devon (*Bos taurus taurus*).

A associação da técnica de OPU com vitrificação dos oócitos na própria fazenda, não produz taxas aceitáveis de desenvolvimento de embriões.

A produção *in vitro* de embriões a partir de oócitos imaturos vitrificados, provenientes de fêmeas Nelore ou Devon abatidas e com os ovários transportados e processados sem as condições adequadas, não permite a obtenção de desenvolvimento embrionário.

#### 4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BOLS, P.E.J., VAN SOOM, A., YSEBAERT, M.T., VANDENHEEDE, J.M.M., KRUIF.

A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p.1001–14, 1996.

BOLS, P.E.J., LEROY, J.L.M.R., VANHOLDER, T., VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology**, v. 62, p. 906–914, 2004.

BUNN, S.; BERTOLINI, M.; MEZZALIRA, A.; et al. Vitricificação de oócitos bovinos imaturos envasados em suportes com diferentes condutividades térmicas. **Acta Scientiae Veterinariae**, XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Araxá-MG, v.34, p. 322, 2006.

CHAUBAL, S.A., MOLINA, J.A., OHLRICH, C.L., FERRE, L.B., FABER, D.C., BOLS, P.E.J., RIESEN, J.W., TIAN, X., YANG, X. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology**, v. 65, p. 1631–1648, 2006.

GORDON, I. Laboratory Production of Cattle Embryos. Trowbridge: Ed. Cromwel, 2003.

KRUIP, T.A.M., BONI, R., WURTH, Y.A., ROELOFSEN, M.W.M., PIETERSE, M.C. Potencial use of ovum pick-up for embryo production and breeding cattle. **Theriogenology**, v. 42, p. 675-684, 1994.

LEDDA, S., LEONI, G., BOGLIOLO, L., NAITANA, S. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. **Theriogenology**, v. 55, p. 1359-1371, 2001.

MACHADO, S.A., REICHENBACH, H.D., WEPPERT, M., WOLF, E., GONÇALVES, P.B.D. The variability of ovum pick-up response and in vitro embryo production from monozygotic twin cows. **Theriogenology**, v. 65, p. 573-583, 2006.

MARTINO, A., SONGSASEN, N., LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes criopreservate by ultra-rapid cooling. *Biology Reproduction*, v. 54, p. 1059-1069, 1996.

MERTON, J.S., DE ROOS, A.P.W., MULLAART, E., DE RUIGH, L., KAAL, L., VOS, P.L.A.M., DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in

commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry.

**Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.

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

RUBIN, K.C.P., PONTES, J.H.F., SENEDA, M.M.; et al. Influence of Nelore blood on the in vitro production of oocytes. In: XIX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 2005, Angra dos Reis, RJ. **Anais...Angra dos Reis: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões**, p. 183, 2005.

SANTOS, R.M.; BARRETA, M.H.; MEZZALIRA, A.; et al. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. **Ciência Rural**, Santa Maria RS, v. 36, n. 5, 2006.

SEGERSON, E. C.; HANSEN, T. R.; LIBBY, D. W. et al. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. *Journal of Animal Science*, v. 59, 1026-1046, 1984.

SENEDA, M.M., ESPER, C.R., GARCIA, J.M., ANDRADE, E.R., BINELLI, M., OLIVEIRA, J.A. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, V. 59, P. 1435–40, 2003.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 22, n. 4, p. 12-19, 2004.

VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M., BOOTH, P.J., JACOBSEN, H., GREVE, T., CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) Vitrification: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 53-58, 1998.

VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A., FERREIRA, A.M., RAMOS, A.A., SÁ, W.F. Punção folicular e produção *in vitro* de embriões em vacas Gir submetidas a estimulação hormonal. **14<sup>o</sup> Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. EMBRAPA, Juiz de Fora, Novembro, 2004.

VIEIRA, A.D., MEZZALIRA, A., BARBIERI, D.P., LEHMKUHL, R.C., RUBIN, M.I.B., VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 45, p. 91-94, 2002.

WARD, F.A., LONERGAN, P., ENRIGHT, B.P., BOLAND, M.P., Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, v. 54, p. 433–46, 2000.

YANG, N.S., LU, K.H., GORDON, I. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. **Theriogenology**, v. 33, p. 352, 1990.

## CONCLUSÕES FINAIS

A bovinocultura de corte, principalmente a praticada no estado de Santa Catarina, ainda não se adaptou a nova realidade de otimização da produção. O baixo desempenho reprodutivo dos rebanhos determina taxas de desfrute muito baixas, o que impede a auto-suficiência na produção de carne. Neste aspecto, os dados evidenciados no capítulo 2 demonstram a importância da avaliação andrológica, já que aproximadamente 30% dos touros avaliados foram considerados inaptos. Também está claramente demonstrado que a supressão de qualquer uma das etapas do exame andrológico predispõe ao diagnóstico equivocado, pois as causas de desclassificação dos animais foram muito diversificadas. Foi demonstrado que alguns animais, apesar de clinicamente sadios e com sêmen de boa qualidade, são inférteis ou apresentam baixa fertilidade. Igualmente importante é uma adequada avaliação das características específicas de cada raça. Neste aspecto, o trabalho demonstrou a necessidade de que as faixas etárias de touros da raça Devon sejam subdivididas para tornar o exame mais preciso. As medidas médias de circunferência escrotal da raça Devon foram 35,2 cm para animais com idade de 18 a 22 meses, 37,3 para animais com 23 a 27 meses e 38,2 cm, para animais com idade igual ou superior a 30 meses, que são superiores às sugeridas pelo CBRA. A busca da maximização de resultados exige a aplicação de avanços tecnológicos, que não são necessariamente sinônimos de elevados investimentos. A utilização da VAI que se mostrou efetiva na coleta do ejaculado como relatado no Capítulo 3, também otimiza o trabalho do técnico, já que o método permite a avaliação simultânea da capacidade de cópula ou capacidade de serviço, com a coleta de sêmen. A implantação da técnica não exige um grande investimento financeiro,

sendo necessários uma mangueira, um brete, além das vaginas internas. Entretanto, é necessário levar em conta as características comportamentais dos animais a serem examinados. Em estudo conduzido com a metodologia da VAI em touros da raça Nelore, com idade variando entre dois e três anos, de 23 animais avaliados, não foi possível obter um único ejaculado (dados não publicados). O temperamento dócil da raça Devon, certamente facilitou a execução da técnica.

Em relação à tecnologia OPU, associada a vitrificação dos oócitos na própria fazenda, proposta no experimento constante no capítulo 4, foi observado que além da necessidade do embasamento teórico e prático, para a realização dos procedimentos existe a necessidade de condições laboratoriais mínimas. Finalmente, é importante salientar que alternativas tecnológicas para maximizar a reprodução existem e estão prontas para serem empregadas, sejam elas simples ou mais avançadas. No entanto, para usufruir de seus benefícios, deve existir um conhecimento prévio das condições mínimas para sua implantação.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTH, A.D. Bull Breeding Soundness Evaluation. 2. ed. Lacombe: Ed.: Western Canadian Association of Bovine Practitioners, 2000.

BARTH, A.D., ARTEAGA, A.A., BRITO, L.F.C., PALMER, C.W. Use of internal artificial vaginas for breeding soundness evaluation in range bulls: an alternative for electroejaculation allowing observation of sex drive and mating ability. **Animal Reproduction Science**, n. 84, p. 315–325, 2004.

BELLIN, M.E., HAWKINST, H.E., AX, R.L. Fertility of Range Beef Bulls Grouped According to Presence or Absence of Heparin-Binding Proteins in Sperm Membranes and Seminal Fluid. **Journal of Animal Science**, v. 72, p. 2441-2448, 1994.

BELLIN, M. E., HAWKINS, H.E., OYARZO, J.N., VANDERBOOM, R.J., AX, R.L. Monoclonal Antibody Detection of Heparin-Binding Proteins on Sperm Corresponds to Increased Fertility of Bulls. **Journal of Animal Science**, v. 74, p. 173–182, 1996.

BERTRAM, J.D., FORDYCE, G., MCGOWAN, M.R., JAYAWARDHANA, G.A., FITZPATRICK, L.A., DOOGANF, V.J., DE FAVERI, J., HOLROYD, R.G. Bull selection and use in northern Australia 3. Serving capacity tests. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 51–66, 2002.

BOLS, P.E.J., VAN SOOM, A., YSEBAERT, M.T., VANDENHEEDE, J.M.M., KRUIF. A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p.1001–14, 1996.

BOLS, P.E.J., LEROY, J.L.M.R., VANHOLDER, T., VAN SOOM, A. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology**, v. 62, p. 906–914, 2004.

BRUNER, K.A., MCGRAW, R.L., WHITACRE, M.D., VAN CAMP, S.D. Breeding soundness examination of 1,952 beef bulls in North Carolina. **Theriogenology**, v. 44, p. 129-145, 1995.

BUNN, S.; BERTOLINI, M.; MEZZALIRA, A.; et al. Vitriificação de oócitos bovinos imaturos envasados em suportes com diferentes condutividades térmicas. **Acta Scientiae Veterinariae**, XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Araxá-MG, v.34, p. 322, 2006.

CARROLL, E.J., BALL, L., SCOTT, J.A. Breeding soundness in bulls—a summary of 10,940 examinations. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 42, p. 1105–1111, 1963.

CENTRO DE SOCIOECONOMIA E PLANEJAMENTO AGRÍCOLA. Síntese anual da agricultura de Santa Catarina 2005-2006. disponível em: [http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/sintese\\_2006/bovino\\_2006.pdf](http://cepa.epagri.sc.gov.br/Publicacoes/sintese_2006/bovino_2006.pdf)>. Acesso em: 27 abr. 2007.

CHACON, J., PÉREZ, E., MILLER, E., SDDERQUIST, L., RODRIGUEZ MARTINEZ, H. Breeding Soundness Evaluation of Extensively Managed Bulls in Costa Rica. **Theriogenology**, v. 52, p. 221-231, 1999.

CHAUBAL, S.A., MOLINA, J.A., OHLRICH, C.L., FERRE, L.B., FABER, D.C., BOLS, P.E.J., RIESEN, J.W., TIAN, X., YANG, X. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows. **Theriogenology**, v. 65, p. 1631–1648, 2006.

CHENOWETH, P.J. Examination of bulls for libido and breeding ability. **Vet. Clin. North Am.: Anim. Pract.**, v.5, p.59-74, 1984.

CHENOWETH, P.J., HOPKINS, F.M., SPITZER, J.C., LARSEN, R.E. Guidelines for using the bull breeding soundness evaluation form. **Theriogenology Handbook 1993**: B-10.

CHENOWETH, P.J., CHASE, C.C., THATCHER, M.J.D., WILCOX, C.J., LARSEN, R.E. Breed and other effects on reproductive traits and breeding soundness categorization in young beef bulls in Florida. **Theriogenology**, n. 46, p. 1159-1170, 1996.

COULTER, G.H., MAPLETOFT, R.J., KOZUB, G.C., CATES, W.F. Escrotal circumference of two-year-old bulls of several beef breeds. **Theriogenology**, v. 27, n. 3, p. 485-491, 1987.

CRUZ, F.B., MARTINS, L.T., BUNN, S. RIBEIRO, E.S., MEZZALIRA, A. Falha na ejaculação em *Bos taurus* – Relato de caso. XII – **Ciclo de Atualização em Medicina Veterinária**, Lages, p. 151, 2006.

DIAS, R.O.S., MARQUES JUNIOR, A.P. Casco em bovinos: identifique as lesões, as novas técnicas de tratamento e os principais métodos de controle. São Paulo: Lemos Editorial, 2003.

FITZPATRICK, L.A., FORDYCE, G., MCGOWAN, M.R., BERTRAM, J.D., DOOGAN, V.J., DE FAVERIF, J., MILLER, R.G., HOLROYD R.G. Bull selection and use in northern Australia Part 2. Semen traits. **Animal Reproduction Science**, n. 71, p. 39–49, 2002.

FONSECA, V.O., FRANCO, C.S., BERGMANN, J.A.G. Potencial reprodutivo e econômico de touros Nelore acasalados coletivamente na proporção de um touro para 80 vacas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.52, n. 1, 2000.

GODFREY, R.W., DODSON, R.E. Breeding soundness evaluations of Senepol bulls in the US Virgin Islands. **Theriogenology**, n. 63, p. 831–840, 2005.

GORDON, I. Laboratory Production of Cattle Embryos. Trowbridge: Ed. Cromwel, 2003.

GOTTSCHALL, C.S., MATTOS, R.C. Achados de exames andrológicos em touros de corte *Bos taurus* e *Bos indicus*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, p. 25-28, 1997.

HAMMERSTEDT, R.H. Evaluation of sperm quality: Identification of the subfertile male and courses of action. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 77-87, 1996.

HENRY, M., NEVES, J.P. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

HIGDON, H.L., SPITZER, J.C., HOPKINS, F.M., BRIDGES JR, W.C. Outcomes of breeding soundness evaluation of 2898 yearling bulls subjected to different classification systems. **Theriogenology**, v. 53, p. 1321-1332, 2000.

HOFLACK, G., VAN SOOM, A., MAES, D., KRUIF, A., OPSOMER, G., DUCHATEAU, L. Breeding soundness and libido examination of Belgian Blue and Holstein Friesian artificial insemination bulls in Belgium and The Netherlands. **Theriogenology**, n. 66, p. 207-216, 2006.

HOLROYD, R.G., DOOGAN, V.J., DE FAVERI, J., FORDYCE, G., MCGOWAN, M.R., BERTRAM, J.D., VANKAN, D.M., FITZPATRICK, L.A., JAYAWARDHANA, G.A., MILLER, R.G. Bull selection and use in northern Australia 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. **Animal Reproduction Science**, v. 71, p. 67–79, 2002.

KENNEDY, S.P., SPITZER, J.C., HOPKINS, F.M., HIDGON, H.L., BRIDGES JR, W.C. Breeding soundness evaluations of 3648 yearling bulls using the 1993 Society for Theriogenology Guidelines. **Theriogenology**, v. 58, p. 947-961, 2002.

KESSLER, L.B. Perímetro escrotal e peso em bovinos com diferentes graus de sangue Nelore x Hereford. 1998. 68 f. Dissertação (Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

KRUIP, T.A.M., BONI, R., WURTH, Y.A., ROELOFSEN, M.W.M., PIETERSE, M.C. Potencial use of ovum pick-up for embryo production and breeding cattle. **Theriogenology**, v. 42, p. 675-684, 1994.

LANDAETA-HERNÁNDEZ, A.J., CHENOWETH, P.J., WILLIAM E. BERNDTSON, W.E. Assessing sex-drive in young *Bos taurus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 66, p. 151–160, 2001.

LEDDA, S., LEONI, G., BOGLIOLO, L., NAITANA, S. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. **Theriogenology**, v. 55, p. 1359-1371, 2001.

MACHADO, S.A., REICHENBACH, H.D., WEPPERT, M., WOLF, E., GONÇALVES, P.B.D. The variability of ovum pick-up response and in vitro embryo production from monozygotic twin cows. **Theriogenology**, v. 65, p. 573-583, 2006.

MARTINEZ, M.L., VERNEQUE, R.S., TEODORO, R.L., OLIVEIRA PAULA, L.R., CRUZ, M., CAMPOS, J.P., RODRIGUES, L.H., OLIVEIRA, J., VIEIRA, F., BRUSCHI, J.H., DURÃES, M.C. Correlações entre Características da Qualidade do Sêmen e a Circunferência Escrotal de Reprodutores da Raça Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, n. 29, p. 700-706, 2000.

MARTINO, A., SONGSASEN, N., LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes criopreservate by ultra-rapid cooling. **Biology Reproduction**, v. 54, p. 1059-1069, 1996.

MCGOWAN, M.R., BERTRAM, J.D., FORDYCE, G., FITZPATRICK, L.A., MILLER, R.G., JAYAWARDHANA, G.A., DOOGAN, V.J. DE FAVERI, J., HOLROYD, R.G. Bull selection and use in northern Australia - 1. Physical traits. **Animal Reproduction Science**, n. 71, p. 25–37, 2002.

MERTON, J.S., DE ROOS, A.P.W., MULLAART, E., DE RUIGH, L., KAAL, L., VOS, P.L.A.M., DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.

MIES FILHO, A. Inseminação Artificial, 6ª Edição. Porto Alegre: Ed. Sulina, 1987.

MOSER, D.W., BERTRAND, J.K., BENYSHEK, L.L., MCCANN, M.A., KISER, T. E. Effects of Selection for Scrotal Circumference in Limousin Bulls on Reproductive and Growth Traits of Progeny. **Journal Animal Science**, n, 74,p. 2052–2057, 1996.

MOSURE, W.L., MEYER, R.A., GUDMUNDSON, J., BARTH, A.D. Evaluation of possible methods to reduce pain associated with electroejaculation in bulls. **Can Vet J**, n. 39, p. 504-506, 1998.

NOCEK, J.E. Bovine acidosis: implications on laminitis. **Journal Dairy Science**, v.80, p. 1005-1028, 1997.

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

OLIVEIRA, C.B., GUIMARÃES, J.D., COSTA, E.P., SIQUEIRA, J.B., TORRES, C.A.A. CARVALHO, G.R., GUIMARÃES, S.E.F. Avaliação do comportamento sexual em touros Nelore: comparação entre os testes da libido em curral e do comportamento sexual a campo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 32-42, 2007.

PALMER, C.W., AMUNDSON, S.D., BRITO, L.F.C., WALDNER, C.L., BARTH, A.D. Use of oxytocin and cloprostenol to facilitate semen collection by electroejaculation or transrectal massage in bulls. **Animal Reproduction Science**, n. 80, p. 213–223, 2004.

PALMER, C.W. Welfare aspects of theriogenology: Investigating alternatives to electroejaculation of bulls. **Theriogenology**, v. 64, p. 469-479, 2005.

PARKER, R., MATHIS, C., HAWKINS, D. Evaluating the Breeding Soundness of Beef Bulls. **Guide B-216**, New Mexico State University, 1999. Disponível em: <<http://cahedev.nmsu.edu/pubs/b/b-216.pdf>>. Acesso em: 27 abr. 2007.

PETHERICK, J.C. A review of some factors affecting the expression of libido in beef cattle, and individual bull and herd fertility. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 90, p. 185–205, 2005.

PINEDA, N., LEMOS, P.F., FONSECA, O. Comparação entre dois Testes de Avaliação do Comportamento Sexual (libido) de Touros Nelore (*Bos taurus indicus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 4, p. 29-34, 1997.

RUBIN, K.C.P., PONTES, J.H.F., SENEDA, M.M.; et al. Influence of Nelore blood on the in vitro production of oocytes. In: XIX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 2005, Angra dos Reis, RJ. **Anais...**Angra dos Reis: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, p. 183, 2005.

SALVADOR, D.F., ANDRADE, V.J. VALE FILHO, V.R.; SILVA, A.S., COSTA; SILVA, E.V. Avaliação da libido de touros Nelore adultos em curral e sua associação com

características andrológicas e desempenho reprodutivo a campo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, 2003.

SANTOS, M.D., TORRES, C.A.A., RUAS, J.R.M., SILVA FILHO, J.M., COSTAS, E.P., PEREIRA, J.C. Teste da libido e atividade de monta em touros da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 4, p. 504-510, 2004.

SANTOS, R.M.; BARRETA, M.H.; MEZZALIRA, A.; et al. Vacuum-cooled liquid nitrogen increases the developmental ability of vitrified-warmed bovine oocytes. **Ciência Rural**, Santa Maria RS, v. 36, n. 5, 2006.

SEGERSON, E. C.; HANSEN, T. R.; LIBBY, D. W. et al. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 59, 1026-1046, 1984.

SENEDA, M.M., ESPER, C.R., GARCIA, J.M., ANDRADE, E.R., BINELLI, M., OLIVEIRA, J.A. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, V. 59, P. 1435–40, 2003.

SILVA, A.E.D.F.; UNANIAN, M.M.; CORDEIRO, C.M.T.; et al. Relação da Circunferência Escrotal e Parâmetros da Qualidade do Sêmen em Touros da Raça Nelore, PO. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1157-1165, 2002.

SILVA-MENA, C., AKE-LOPEZ, R. DELGADO-LEON, R. Sexual Behavior and Pregnancy Rate of Bos indicus Bulls. **Theriogenology**, v. 53, p. 991-1002, 2000.

THIBIER, M. Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 22, n. 4, p. 12-19, 2004.

VAJTA, G., HOLM, P., KUWAYAMA, M., BOOTH, P.J., JACOBSEN, H., GREVE, T., CALLESEN, H. Open Pulled Straw (OPS) Vitrication: A New Way to Reduce Cryoinjuries of Bovine Ova and Embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, p. 53-58, 1998.

VALE FILHO, V.R. Andrologia no touro: avaliação genital, exame do sêmen e classificação por pontos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n.3, p. 7-13, 1997.

VALE FILHO, V.R., QUIRINO, C.R., ANDRADE, V.J., BERGMANN, J.A.G., REIS, S.R., MENDONÇA, R.M.A., FONSECA, C.G. Parâmetros genéticos da classificação andrológica por pontos (CAP), em touros da raça nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 253-255, 1999.

VALLE, E.R.do; ANDREOTTI, R.; THIAGO, L.R.L. de S. **Estratégias para aumento da eficiência reprodutiva e produtiva em bovinos de corte**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998. 80p.

VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A., FERREIRA, A.M., RAMOS, A.A., SÁ, W.F. Punção folicular e produção *in vitro* de embriões em vacas Gir submetidas a estimulação hormonal. **14<sup>o</sup> Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**. EMBRAPA, Juiz de Fora, Novembro, 2004.

VIEIRA, A.D., MEZZALIRA, A., BARBIERI, D.P., LEHMKUHL, R.C., RUBIN, M.I.B., VAJTA, G. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. **Cryobiology**, v. 45, p. 91-94, 2002.

WARD, F.A., LONERGAN, P., ENRIGHT, B.P., BOLAND, M.P., Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, v. 54, p. 433–46, 2000.

YANG, N.S., LU, K.H., GORDON, I. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries. **Theriogenology**, v. 33, p. 352, 1990.