



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DIFERENTES PROTOCOLOS COM PROGESTERONA NA RESPOSTA  
SUPERESTIMULATÓRIA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE VACAS DO  
GRUPAMENTO GENÉTICO CURRALEIRO/PÉ-DURO**

**HEITOR CASTRO ALVES TEIXEIRA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF  
DEZEMBRO DE 2009**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DIFERENTES PROTOCOLOS COM PROGESTERONA NA RESPOSTA  
SUPERESTIMULATÓRIA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE VACAS DO  
GRUPAMENTO GENÉTICO CURRALEIRO/PÉ-DURO**

**ALUNO: Heitor Castro Alves Teixeira**

**ORIENTADOR: Arthur da Silva Mariante**

**CO-ORIENTADOR: Alexandre Floriani Ramos**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO: 021/2009**

**BRASÍLIA/DF  
DEZEMBRO DE 2009**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

TEIXEIRA, H.C.A. **Diferentes protocolos com progesterona na resposta superestimulatória e produção embrionária de vacas do grupamento genético Curraleiro/Pé-duro.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 56p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte

### FICHA CATALOGRÁFICA

TEIXEIRA, Heitor Castro Alves. **Diferentes protocolos com progesterona na resposta superestimulatória e produção embrionária de vacas do grupamento genético Curraleiro/Pé-duro.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

1. SOV. 2. Conservação. 3. Recursos Genéticos. 4. Protocolos P24 e P36. 5. Curraleiro/Pé-duro. I. Título

CDD ou CDU  
Agris/FAO

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**DIFERENTES PROTOCOLOS COM PROGESTERONA NA RESPOSTA  
SUPERESTIMULATÓRIA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE VACAS DO  
GRUPAMENTO GENÉTICO CURRALEIRO/PÉ-DURO**

**HEITOR CASTRO ALVES TEIXEIRA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA  
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS  
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS.**

**APROVADA POR:**

---

**ARTHUR DA SILVA MARIANTE, PhD (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia)  
(ORIENTADOR) E-mail: mariante@cenargen.embrapa.br**

---

**JAIRO PEREIRA NEVES, PhD (Universidade de Brasília)  
(EXAMINADOR INTERNO) E-mail: jpneves@unb.br**

---

**ANTÔNIO DE PINHO MARQUES JUNIOR, PhD (Universidade Federal de Minas  
Gerais)  
(EXAMINADOR EXTERNO) E-mail: ampinho@ufmg.br**

**BRASÍLIA/DF, 14 de DEZEMBRO de 2009**

À minha mãe, Glória (in memoriam), por ter proporcionado toda a educação e sabedoria para  
que eu pudesse me tornar o homem que sou hoje.  
À Socorro e Luize (in memoriam), sempre deixarão saudades.  
A vocês dedico.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu co-orientador prof. Dr. Alexandre Floriani Ramos, por muito me ensinar, por todas as oportunidades que me deu e por sempre exigir muito de mim.

Ao meu orientador Dr. Arthur da Silva Mariante, pela oportunidade oferecida e pelo incentivo ao meu desenvolvimento profissional.

À Universidade de Brasília pela oportunidade concedida para realização deste mestrado.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia pela oportunidade de realizar este trabalho.

A todos os funcionários e pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

A todos os funcionários, estagiários e amigos que fazem parte ou já passaram pelo Campo Experimental Sucupira.

Aos amigos Andrei Fidelis, Ângelo Rumpf, Emivaldo Siqueira filho, José Carvalho, Maria Clara Mattos, Michele Bastos, Monique Guardieiro, Nádia Fagundes, Rafael Kerkhoff e Tiago Diesel pela convivência, e pelo engrandecimento pessoal e profissional que me proporcionaram.

A CAPES pela bolsa de estudos concedida durante a realização deste mestrado.

## ÍNDICE

Capítulo	Página
RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	xi
CAPÍTULO 1 .....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Objetivo Geral .....	3
1.2 Objetivo Específico .....	3
1.3 Hipótese .....	4
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1 Conservação de Recursos Genéticos Animais.....	5
2.2 O Bovino Curraleiro/Pé-Duro.....	7
2.3 Dinâmica Folicular .....	9
2.4 Sincronização da Onda Folicular e Superestimulação Ovariana.....	13
CAPÍTULO 2 .....	17
1 RESUMO .....	18
2 ABSTRACT .....	20
3 INTRODUÇÃO.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1 Local do Experimento e Animais .....	25
4.2 Tratamentos .....	26
4.3 Avaliações Ultrassonográficas.....	28
4.4 Coleta e Avaliação dos Embriões .....	29
4.5 Análise Estatística.....	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
6 CONCLUSÕES .....	38
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39

## RESUMO

### **DIFERENTES PROTOCOLOS COM PROGESTERONA NA RESPOSTA SUPERESTIMULATÓRIA E PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE VACAS DO GRUPAMENTO GENÉTICO CURRALEIRO/PÉ-DURO**

Heitor Castro Alves Teixeira<sup>1,2</sup>, Arthur da Silva Mariante<sup>2</sup>, Alexandre Floriani Ramos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - UnB, DF, <sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF.

O Brasil tem uma enorme experiência na reprodução assistida de seu rebanho bovino comercial, e dois protocolos de superestimulação ovariana foram desenvolvidos, para animais *Bos taurus* (P36) e *Bos indicus* (P24). Tendo em vista que o Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) possui um número reduzido de embriões estocados de bovinos naturalizados brasileiros, torna-se necessário o estudo da resposta desses animais a programas de superovulação para coleta de embriões. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a resposta superestimulatória, a produção e a qualidade embrionária de matrizes do grupamento genético Curraleiro/Pé-duro utilizando os protocolos P24 e P36, visando promover o incremento de embriões desta população no BBGA. Doze vacas Curraleiras, originárias do rebanho de conservação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais: Controle, P24 e P36, em um delineamento experimental cross-over. Todas as doadoras tiveram o estro sincronizado e no quinto dia do ciclo estral as doadoras dos grupos P24 e P36 receberam implante intravaginal de progesterona e 2mg de benzoato de estradiol. A partir do nono dia do ciclo estral todas as doadoras receberam 133 mg de FSHp em oito doses decrescentes de 12 em 12 horas, com duas doses de 150µg de D-cloprostenol junto com a quinta e a sexta doses

de FSH. Os tratamentos P24 e P36 diferiram em relação ao momento da retirada do implante de progesterona, 24h ou 36h após a primeira aplicação de D-cloprostenol. Todas as doadoras receberam 25µg de lecorelina no décimo terceiro dia do ciclo estral, com as inseminações realizadas 12 e 24 horas após. A coleta dos embriões foi feita sete dias após a primeira inseminação artificial. A avaliação dos ovários foi realizada, por ultrassonografia, no momento da administração da primeira e oitava doses de FSH, dois dias após a inseminação artificial e no momento da coleta dos embriões. Não houve diferença ( $P>0,05$ ; Anova; Duncan) para resposta superestimulatória e superovulatória (folículos na emergência da onda, folículos ao fim da SOV, folículos não ovulados, corpos lúteos na coleta) entre os tratamentos. O número de estruturas totais foi maior ( $P<0,05$ ) no P24 do que no Controle e o número de estruturas viáveis foi maior ( $P<0,05$ ) no P24 e no P36 do que no Controle. O número de estruturas congeláveis e de estruturas inviáveis e a taxa de recuperação foram semelhantes entre os tratamentos ( $P>0,05$ ). As vacas do grupamento genético Curraleiro/Pé-duro se apresentaram fisiologicamente mais próximas de animais taurinos quanto à resposta superovulatória e produção embrionária. Os resultados sugerem que seria mais indicado o uso dos protocolos de superovulação P24 ou P36 do que protocolos sem utilização de implante de progesterona em vacas Curraleiras/Pé-duro. Entretanto, devido a maior proporção entre estruturas congeláveis e totais alcançada com o uso do protocolo P36, sugere-se que este protocolo pode ser o mais indicado quando se visa o enriquecimento de bancos de germoplasma.

Palavras Chave: SOV, Conservação, Recursos Genéticos, Embriões bovinos, Reprodução animal.

## ABSTRACT

### **DIFFERENT PROTOCOLS WITH PROGESTERONE ON SUPERESTIMULATORY RESPONSE AND EMBRYO PRODUCTION OF COWS OF THE CURRALEIRO/PÉ-DURO GENETIC GROUP**

Heitor Castro Alves Teixeira<sup>1,2</sup>, Arthur da Silva Mariante<sup>2</sup>, Alexandre Floriani Ramos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Agronomy and Veterinary Medicine Faculty - UnB, DF, <sup>2</sup>Embrapa Genetic Resources and Biotechnology – DF.

Brazil has an enormous experience in the attended reproduction of its commercial cattle breeds, and two protocols of ovarian superstimulation were developed: one for *Bos taurus* (P36) and another for *Bos indicus* (P24) animals. The Brazilian Animal Gene Bank (BAGB) counts with a small number of stored embryos of local cattle breeds, for this reason it is necessary to study the response of those animals to superovulation and embryo transfer programs. The objective of this work was to evaluate superestimulatory response, embryo production and embryonic quality of Curraleiro/Pé-duro cows, using the protocols P24 and P36, seeking to promote the increase of criopreserved embryos of this population in BAGB. Twelve cows Curraleiro/Pé-duro, from the Conservation nucleus of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, were divided in three experimental groups: Control, P24 and P36, in a crossover experimental design. All cows had the estrus synchronized and in the fifth day of the estrus cycle, the cows of the groups P24 and P36 received an intravaginal progestogen implant and 2mg of estradiol benzoate. Starting from the ninth day of the estrus cycle all cows received 133 mg of FSHp in eight decreasing in 12 hours interval, with two doses of 150µg of D-cloprostenol with the fifth and the sixth doses of FSH. Treatments P24 and P36 differed in the moment of the progestogen implant removal, that occurred 24 or 36 hours after the first application of D-cloprostenol. All cows received 25µg of lecireline in the thirteenth day of the estrus cycle, with the inseminations accomplished 12 and 24 hours after.

The embryo collection was done seven days after the first artificial insemination. The evaluation of the ovaries was done through ultrasound scanning, in the moment of the administration of the first and eighth doses of FSH, two days after the artificial insemination and in the moment of the embryo collection. There was no difference ( $P>0,05$ , Anova Duncan) for superestimulatory and superovulatory response (follicles in the wave emergency, follicles in the end of SOV, follicles not ovulated and corpora lutea) among treatments. The number of total structures was greater ( $P>0.05$ ) in P24 than in the Control and the number of viable structures was greater ( $P>0,05$ ) in P24 and in P36 than in the Control. The number of frozen structures, unviable structures and recovery tax were not different ( $P>0,05$ ) among treatments. The curraleiro/Pé-duro cows presented physiological behavior common to *Bos taurus* when superestimulatory response and embryo production were evaluated. The results suggest that the use of P24 or P36 superstimulation protocols were better than the use of protocols without progestogen implant in Curraleiro/Pé-duro cows. However, a greater proportion of frozen structures related to the total structures was reached with the use of the P36 protocol, what suggests that this is the one that should be used when the enrichment of germoplasm bank is sought.

Keywords: SOV, Conservation, Genetic Resources, Bovine embryos, Animal reproduction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Pré-sincronização realizada em vacas Curraleiras/Pé-duro submetidas a todos os tratamentos superovulatórios.....	26
Figura 2.2 – Tratamentos superovulatórios a que as vacas Curraleiras/Pé-duro foram submetidas, protocolos convencional (Controle), com implante de P <sub>4</sub> removido 24 (P24) e 36 horas após a administração de PGF <sub>2α</sub> (P36). Círculos sinalizam a inserção e a remoção dos implantes de P <sub>4</sub> . .....	28
Figura 2.3 – Média e Desvio Padrão do número de folículos na emergência da onda folicular, de folículos ao fim da superovulação, de folículos não ovulados e de corpos lúteos no momento da coleta dos embriões em vacas Curraleiras/Pé-duro submetidas aos tratamentos superovulatórios convencional (Controle), com implante de P <sub>4</sub> removido 24 (P24) e 36 horas após a administração de PGF <sub>2α</sub> (P36). .....	32
Figura 2.4 – Média e Desvio Padrão de estruturas totais, estruturas viáveis, estruturas congeláveis e estruturas inviáveis em vacas Curraleiras/Pé-duro submetidas aos tratamentos superovulatórios convencional (Controle), com implante de P <sub>4</sub> removido 24 (P24) e 36 horas após a administração de PGF <sub>2α</sub> (P36). .....	35
Figura 2.5 – Distribuição (em valores absolutos) da qualidade dos embriões coletados de vacas Curraleiras/Pé-duro submetidas aos tratamentos superovulatórios convencional (Controle), com implante de P <sub>4</sub> removido 24 (P24) e 36 horas após a administração de PGF <sub>2α</sub> (P36). .....	37

## **CAPÍTULO 1**

## 1 INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira tem tido uma demanda crescente de animais de elevado mérito genético, o que tem impulsionado o uso de técnicas avançadas de biotecnologia, notadamente aquelas associadas à reprodução animal, tal como a superovulação (SOV) e transferência de embriões (TE). Entretanto, a utilização excessiva de técnicas de reprodução assistida e o melhoramento animal seguindo sempre uma linha determinada de utilização de sêmen de poucos animais, aumentando assim a quantidade de animais descendentes dos mesmos touros, vêm causando a perda da diversidade genética do rebanho nacional (Ramos et al., 2009).

Com o aumento progressivo de animais de raças comerciais, as raças locais estão perdendo espaço na cadeia de produção da pecuária nacional. O grupamento genético Curraleiro/Pé-duro é formado por animais rústicos que se desenvolveram no semi-árido nordestino e nas regiões de cerrado do Goiás e Tocantins, onde apresentam um reduzido número de exemplares, criados em pequenas propriedades pouco tecnificadas (Boaventura, 2005). Diante disto, a Embrapa, ao criar o seu programa de conservação de recursos genéticos animais, decidiu incluir esta raça, buscando evitar a perda deste material genético inestimável (Mariante et al., 1999).

Com a criação do Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, iniciou-se a criopreservação de gametas e embriões de animais de conservação, mas depois de 25 anos de utilização de técnicas de

produção e criopreservação de embriões, ainda é pequena a quantidade de embriões armazenados no BBGA (Mariante & de Bem, 1992; Ramos et al., 2009).

O Brasil apresenta grande tecnologia na produção de embriões in vivo, desenvolvendo diversas técnicas e protocolos, dentre eles, os protocolos P24 e P36. Estes visam à produção de embriões em tempo fixo e sem observação de estro, priorizando uma maior ou menor exposição da Progesterona ( $P_4$ ) pelo implante intravaginal sobre os folículos/ovócitos. Como não se conhece a resposta de matrizes Curraleiras/Pé-duros a diferentes protocolos de superestimulação ovariana e programas de produção de embriões in vivo, acredita-se que estes possam ser utilizados com o intuito de aumentar o número de embriões passíveis de congelamento para o enriquecimento do BBGA.

### **1.1 Objetivo Geral**

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a influência de diferentes protocolos com progesterona (P24 e P36) na produção e qualidade embrionária de vacas do grupamento genético Curraleiro/Pé-duro.

### **1.2 Objetivo Específico**

Avaliar a resposta superestimulatória, superovulatória, produção e qualidade embrionária de vacas do grupamento genético Curraleiro/Pé-duro submetidas aos protocolos P24 e P36.

### **1.3 Hipótese**

Pelo fato de o protocolo P36 ter sido desenvolvido para animais de raças da espécie *Bos taurus*, ao qual o grupamento racial Curraleiro/Pé-duro pertence, espera-se que apresente melhor resultado que o protocolo P24.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Conservação de Recursos Genéticos Animais

Em sistemas de alta produção, raças especializadas para a produção de leite e carne foram desenvolvidas através de extensa seleção, e seu material genético foi vastamente disseminado. Em uma visão global, a intensa seleção para um número reduzido de características, e a intensa utilização de sêmen dos touros mais bem avaliados geneticamente conduziu a um baixo número efetivo da população nas raças mais utilizadas seja para leite como para o corte, com um real risco de perda de diversidade genética nestas raças (FAO, 1998; FAO, 2007).

Os recursos genéticos animais enfrentam um duplo desafio. Por um lado a demanda por produtos de origem animal aumenta em países desenvolvidos. A estimativa da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) é que a demanda por carne irá dobrar, e a demanda por leite será maior que o dobro até o ano de 2030. Por outro lado, as raças consideradas locais estão desaparecendo rapidamente em todo o mundo. Nos últimos 15 anos, 300 das mais de 6000 raças identificadas pela FAO foram consideradas extintas (Cardellino, 2005).

A conservação e o desenvolvimento de raças locais são importantes porque estas raças utilizam alimentação de baixa qualidade, são menos susceptíveis ao estresse climático, são mais resistentes a doenças e parasitas presentes em suas regiões, e representam uma fonte única de genes a serem utilizados para aumento de características de performance e manutenção da saúde em animais de raças comerciais. A utilização e o desenvolvimento de raças locais já adaptadas a ambientes hostis, e que demandam um manejo mínimo, é de extrema importância em alguns ecossistemas. Espera-se que animais geneticamente adaptados a essas condições sejam mais produtivos a baixos custos, sendo, portanto, fundamentais para comunidades locais (Cardellino, 2005).

Em animais domésticos, o aumento da diversidade genética em uma determinada raça é tão importante quanto a diversidade entre raças, para que possa ser possível a troca de material genético necessário a cruzamentos e programas de seleção. O efetivo populacional de raças em perigo de extinção ou raras necessitam do monitoramento da diversidade e programas de conservação para a manutenção desta diversidade (FAO, 1998; Hiemstra et al., 2006).

Existem diversas opções para se conservar a diversidade genética. Em geral, conservação *in situ* é o mecanismo mais utilizado na conservação de raças, pois permite que pequenas populações de uma raça sejam mantidas em seu ambiente original de adaptação (Andrabi & Maxwell, 2007). Uma raça tem que evoluir e se adaptar às mudanças do ambiente e esforços devem ser promovidos para a criação e o desenvolvimento de produtos originários desta raça. Conservação sem o devido desenvolvimento da raça ou sem expectativas futuras de uso não são estratégias desejáveis. Entretanto, estes esforços nem sempre são suficientes para a propagação de pequenas populações e a manutenção da diversidade. Além da conservação *in situ*, métodos e técnicas de manter o animal vivo fora da sua região de produção ou ambiente (*ex situ in vivo*) ou ainda a criopreservação de seu germoplasma (*ex situ in vitro*) são utilizados para a preservação de raças raras como também para a conservação de germoplasma (gametas, embriões e outras células/amostras de tecido ou DNA) de raças comerciais. A criopreservação de germoplasma é uma estratégia muito eficiente para conservar diversidade alélica existente para o uso futuro (Hiemstra et al., 2006; Andrabi & Maxwell, 2007). Programas de conservação *in situ* e *ex situ* para raças em risco de extinção podem ser beneficiados por modernas técnicas de biotecnologias da reprodução, incluindo inseminação artificial, superovulação e transferência de embriões, produção *in vitro*

de embriões, micromanipulação de gametas/embriões, sexagem de sêmen/embriões e banco de genoma (Galli et al., 2003; Andrabi & Maxwell, 2007).

Os Bancos de Germoplasma constituem um recurso fácil e de grande importância na preservação do germoplasma das raças naturalizadas. Pela criopreservação de sêmen e de embriões poder-se-á, no futuro, resgatar populações que por algum motivo possam ter se extinguido e que tenham importantes características para a pecuária nacional. Nestas coleções poder-se-á buscar a variabilidade necessária e características de adaptabilidade às intempéries da natureza, com vista a aumentar a produção ou acrescentar genes de interesse econômico às raças comerciais (Hiemstra et al., 2006). A redução da variabilidade genética e a consangüinidade vêm preocupando criadores de raças consideradas comerciais, tanto pelo uso abusivo de sêmen de poucos reprodutores, como pela utilização massiva de técnicas biotecnológicas, como é o caso da inseminação artificial, da transferência de embriões e da produção in vitro de embriões, uma vez que essas aumentam a homogeneidade dos rebanhos, em razão da redução da variabilidade genética. Este fato poderá acarretar a perda de características que poderiam vir a ser importantes no futuro (Ramos et al., 2009).

Ao longo dos últimos 25 anos, a Embrapa tem colhido sêmen e embriões de bovinos de raças adaptadas a determinadas regiões do Brasil e em risco de extinção e armazenado esse material no BBGA. Este valioso material genético pode vir a ser utilizado em diversas situações: restabelecimento de uma raça extinta, desenvolvimento de um novo grupamento genético, suporte a programas de conservação in vivo, bem como para estudos de identificação de genes de importância econômica (FAO,1998)

## **2.2 O Bovino Curraleiro/Pé-Duro**

Conhecido como gado Curraleiro nos estados de Goiás e Tocantins e como gado Pé-duro na região Nordeste, esta raça é descendente dos bovinos trazidos pelos colonizadores portugueses e espanhóis (Santiago, 1975; Mariante & de Bem, 1992, Boaventura, 2005). Acredita-se que tenha descendência direta da raça Mirandesa, a qual ainda pode ser encontrada na região de Trás-os-Montes em Portugal. Criado em regime extensivo, sem controle sanitário ideal e sem alimentação específica, o bovino Curraleiro/Pé-duro é um

animal extremamente rústico que é muito bem adaptado a ambientes desfavoráveis como as planícies do semi-árido do Nordeste brasileiro (Primo, 1992; Mariante et al., 2003, Serrano et al., 2004; Bianchini et al., 2006). Segundo Viana (1927), o Curraleiro já habitou todo o território nacional e foi responsável pela formação da raça Caracu e de outras raças naturalizadas.

A excepcional rusticidade do Curraleiro/Pé-duro e sua capacidade de sobreviver em pastagens nativas de regiões inóspitas, onde animais de outras raças não sobreviveriam, são duas características que justificam a conservação desta raça. O bovino Curraleiro/Pé-duro está em risco de extinção não somente pela supressão da raça por cruzamento com raças zebuínas, como também pela castração dos touros pelos criadores que querem “melhorar” seu rebanho com sangue zebuino, devido à afirmação de que o gado Curraleiro/Pé-duro é pequeno, pouco produtivo e tardio (Mariante & de Bem, 1992). São assim definidos os descritores desta raça: peso mínimo de 380 kg para os machos e 300 kg para as fêmeas; altura mínima de 1,38m para os machos e 1,24m para as fêmeas; pelagem de cor variada, sendo a mais comum a vermelha clara com extremidades escuras; chifres curtos e com forma de coroa; orelhas pequenas; barbela reduzida; vassoura preta; membros delgados e bem proporcionados, apresentando, especialmente os anteriores, cor escura (Boaventura, 2005). As fêmeas são boas produtoras de leite e, embora os animais sejam pequenos, são utilizados com vantagem para o corte e para o trabalho, prestando no sertão inestimáveis serviços (Athanasoff, 1957). Pela sua prolificidade e adaptabilidade talvez tenham uma melhor relação custo x benefício para a Região Nordeste do que outras raças comerciais (Egito, 2007).

Para evitar o desaparecimento deste material genético único, o Brasil criou o programa de conservação de recursos genéticos animais coordenado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária), que em conjunto com a Embrapa Meio Norte tem desenvolvido um programa de conservação específico para esta raça, através da manutenção de um núcleo de conservação em São João do Piauí (Mariante et al., 1999; Egito et al., 2002; Mariante et al., 2003). Estudos realizados no Laboratório de Genética Animal do Cenargen demonstraram que entre as raças naturalizadas, a raça Curraleira foi a que apresentou os menores índices de diversidade médios. O número médio de alelos por locos foi de  $10,64 \pm 3,26$ , sendo a riqueza alélica estimada em 8,88 alelos/loco. A heterozigosidade observada foi de 0,6702 e a

heterozigosidade esperada foi de 0,7435, indicando um excesso de homozigotos na população ( $p < 0,001$ ). O valor de  $F_{IS}$ , que indica o nível de consangüinidade na população, observado foi de 0,0948 ( $p < 0,01$ ). Quando comparada às outras quatro raças naturalizadas, analisadas pela mesma metodologia, a raça Curraleira foi a que apresentou os valores mais altos de  $F_{IS}$  e os menores índices de heterozigosidade observada. A redução significativa na heterozigosidade nesta população reflete os acasalamentos não aleatórios que ocorrem dentro dos rebanhos, onde a relação existente entre machos e fêmeas é pequena. Por estes resultados os autores sugeriram que as atividades de conservação da raça incluíssem ações envolvendo o intercâmbio de reprodutores entre propriedades, o direcionamento de acasalamentos visando manter a máxima variabilidade genética dentro da população, assim como, a expansão dos trabalhos que vêm sendo executados de coleta e criopreservação de germoplasma (Egito et al., 2007).

Egito (2007), ao estudar a diversidade genética entre diferentes grupos raciais de bovinos encontrados no Brasil (dentre eles cinco raças naturalizadas) por intermédio de análise de 22 locos de microssatélites, observou que o bovino Curraleiro/Pé-duro se apresenta muito próximo geneticamente de bovinos de raças taurinas especializadas (Jersey e Holandesa) e mais distantes de bovinos de raças zebuínas (Guzerá, Nelore e Gir). A autora mostra que a raça Curraleira/Pé-duro foi a que apresentou os maiores índices de consangüinidade, devido ao número reduzido de touros disponíveis nesta raça. Portanto, ações de conservação destes animais devem incluir a troca de touros entre as propriedades, bem como a expansão da coleta e criopreservação de sêmen e embriões (Mariante & Egito, 2002)

### **2.3 Dinâmica Folicular**

No ciclo estral bovino o folículo dominante ovula e dá início à formação de um corpo lúteo (CL). Após a ovulação inicia-se o surgimento de novos folículos, que se desenvolverão até que um se torne dominante aos outros. Portanto o ciclo estral é acompanhado de ondas foliculares que se dividem em três fases: recrutamento, seleção e dominância (Gimenes et al., 2008).

O recrutamento e o conseqüente surgimento de uma onda folicular, só é iniciado com o aumento de FSH (Hormônio Folículo Estimulante) circulante. Em bovinos assim como em outras espécies, a onda folicular é precedida ou acompanhada por uma pequena elevação de FSH, e se esta elevação for inibida ou atrasada, a emergência da onda folicular sofre o mesmo processo (Fortune et al., 2001).

O recrutamento do grupo de folículos contendo o futuro folículo pré-ovulatório ocorre durante uma “janela de recrutamento”, que dura 1, 2 ou 3 dias em ovinos, bovinos e eqüinos, respectivamente. Apenas folículos que são gonadotrofina-dependentes (principalmente FSH) são recrutados. A ligação entre tamanho do folículo ao recrutamento (2 e 3  $\mu$ m) e o tamanho em que os folículos adquirem dependência de gonadotrofinas (2 e 3 mm) é observado em ovinos e bovinos respectivamente (Arthur et al., 1996; Hendriksen et al., 2000; Hafez & Hafez, 2004; Jaiswal et al., 2004). Essa relação também pode ser observada em primatas (2 mm) e ratos (0.2 mm). Enquanto que o recrutamento e os folículos gonadotrofina dependentes são associados na maioria das espécies, o número de folículos recrutados parece ser altamente variável entre as espécies. Em suínos o número de folículos recrutados pode chegar a mais de 50 e em eqüinos de 1 a 4 (Driancourt et al., 2001). Enquanto que em bovinos variam de 5 a 10 folículos, sendo que fêmeas *Bos indicus* recrutam maior número de folículos por onda de crescimento folicular que fêmeas *Bos taurus* (Baruselli et al., 2007). Teoricamente todos os folículos recrutados são potencialmente capazes de ovular (Gibbons et al., 1997). Entretanto, é inegável que alguns folículos tenham uma vantagem competitiva na corrida para a ovulação (Driancourt et al., 2001)

Na seleção, o folículo dominante é escolhido e os folículos restantes do recrutamento se tornam subordinados e entram em atresia. Isto comumente é apresentado como um bloqueio na taxa de crescimento seguido por uma diminuição do tamanho dos folículos subordinados (Fortune et al., 2001). Em todas as espécies o folículo selecionado aparenta ser o primeiro a desenvolver receptores de LH (hormônio luteinizante) em suas células da granulosa, fazendo com que esse folículo adquira capacidade para se desenvolver mais do que os outros, possua capacidade de ovular e promova a atresia dos folículos subordinados (Ginther et al., 2001; Sartori et al., 2001; Sartorelli et al., 2005; Espinoza-Villavicencio et al., 2007). A atresia é induzida principalmente durante a fase de dominância folicular afetando dois grupos de folículos. O primeiro grupo consiste em 20-24 folículos (14 mm de diâmetro) que se tornam FSH-dependentes durante o processo de seleção, porém

perdem a “batalha” pela dominância. O segundo grupo consiste em folículos que alcançaram o estágio de dependência de FSH durante a fase de dominância e não tiveram suporte hormonal para crescimento posterior. Existem indícios de que folículos com atresia inicial podem ser resgatados com a administração exógena de gonadotropinas (Kaipia & Hsueh, 1997), sugerindo que a atresia inicial também possa ser revertida por um aumento endógeno de FSH. É desconhecido, entretanto, quanto tempo um folículo com seu crescimento interrompido pode esperar pelo reinício do crescimento (Hendriksen et al., 2000).

A hipótese de aquisição de receptores de LH pela granulosa como principal determinante da seleção do folículo dominante é unânime no meio científico. Entretanto, receptores de LH nas células da teca são essenciais para estimulação da produção de andrógenos precursores de estradiol sintetizado pelas células da granulosa (Fortune et al., 2004). Porém, existe um grande envolvimento do sistema IGF (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina) na seleção do folículo dominante (Velazquez et al., 2008). No ovário, o “sistema” IGF é complexo, consistindo de dois ligantes (IGF-I e -II), dois receptores (tipo 1 e 2) seis proteínas ligadoras de IGF (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 e -6), e ao menos uma IGFBP protease (Fortune et al., 2004; Neill, 2006). É conhecido que IGF promove a síntese de estradiol por folículos antrais, em contraste, algumas IGFBP's, especialmente as de peso molecular baixo IGFBP-2, -4 e -5, podem ter efeito negativo sobre as IGF's, se ligando a elas e evitando que elas se liguem aos seus receptores (Neill, 2006; Velazquez et al., 2008). Portanto, o folículo selecionado da onda folicular apresentará maior concentração de estradiol e andrógenos e maior concentração de IGF livre (Fortune et al., 2004)

Vários dias após o pico de FSH e emergência da onda folicular, os dois maiores folículos alcançam tamanho médio de 8,5 e 7,0 mm respectivamente em bovinos (Ginther, 2000). Neste ponto, inicia-se o desvio folicular, o qual é caracterizado pelo contínuo crescimento do folículo maior, que se torna dominante, e redução ou parada no crescimento do restante dos folículos, que se tornam subordinados (Ginther, 2000; Espinoza-Villavicencio et al., 2007). A diferença de diâmetro e o crescimento entre os dois maiores folículos ao início do desvio é igual por aproximadamente 8 horas. Durante este tempo, o folículo maior inicia a supressão da concentração de FSH circulante para valores abaixo das exigências necessárias para o crescimento dos folículos menores, o que causa sua regressão. O supressor de FSH produzido pelo folículo dominante aparenta ser estradiol e inibina (Ginther, 2000)

Durante a dominância folicular ocorre o crescimento e a maturação do folículo dominante. Os outros folículos provenientes do mesmo recrutamento completam sua regressão, enquanto não ocorre outro recrutamento, até a ovulação do folículo dominante ou regressão do mesmo devido à presença de progesterona (CL) (Espinoza-Villavicencio et al., 2007).

Após o pico de LH e a consequente ovulação do folículo dominante, ocorre o início da formação do corpo lúteo. O CL é a principal fonte de progesterona, e sua morfologia, bem como a concentração plasmática de progesterona são bons indicadores da síntese desse hormônio (Singh et al., 2003). A intensa angiogênese, a proliferação das células da granulosa e teca da parede do folículo ovulado, e sua diferenciação (luteinização) nos primeiros 5-6 dias após a ovulação (metaestro) resultam em um progressivo aumento da concentração da progesterona plasmática de <1ng/mL nos três primeiros dias depois da ovulação em até aproximadamente 3ng/mL no dia 6 pós-ovulação. O pico da concentração de progesterona plasmática ocorre entre o 10° e o 14° dias do ciclo (>4ng/mL), seguido do decréscimo da concentração por volta do D16 devido à luteólise (morte celular por hipóxia resultado da hialinização dos vasos sanguíneos) induzida pela PGF<sub>2α</sub> liberada pelo endométrio da vaca não prenhe (Adams et al., 2008).

Em bovinos, a maioria dos ciclos estrais é composta por duas ou três ondas foliculares, ainda mais, existem diferenças na quantidade de ondas foliculares entre *Bos taurus* e *Bos indicus* (Baruselli et al., 2007). Independente de um ciclo estral ser composto por duas ou três ondas, a emergência da primeira onda folicular ocorre no dia da ovulação (D0). A emergência da segunda onda ocorre nos dias 9 ou 10 em um ciclo com duas ondas, e nos dias 8 ou 9 em um ciclo com três ondas. A ocorrência da emergência da terceira onda, em um ciclo com três ondas foliculares, ocorre por volta dos dias 15 ou 16 do ciclo estral (Adams et al., 2008). As ondas foliculares ocorrem devido ao constante recrutamento folicular, que, sob a ação da progesterona (ex.: diestro), os folículos subordinados e o folículo dominante entram em atresia. O folículo dominante presente no momento da luteólise vem a se tornar o folículo ovulatório, e a emergência da próxima onda folicular é adiada até o momento exato da ovulação e o consequente pico de LH e FSH (Driancourt et al., 2001; Adams, et al., 2008). O corpo lúteo inicia sua regressão prematuramente em um ciclo de duas ondas (D16) em comparação à um ciclo de três ondas (D19) resultando em um ciclo estral ligeiramente mais curto, com 19-20 dias contra 22-23 dias (Bó et al., 2003; Adams et al., 2008).

## 2.4 Sincronização da Onda Folicular e Superestimulação Ovariana

A transferência de embriões bovinos, por meio da superestimulação ovariana, tem sido amplamente utilizada no mundo. Esta tecnologia aumenta o número de descendentes obtidos de uma única doadora de alto valor genético e é utilizada para disseminar material genético desejável por todo mundo (Baruselli et al., 2006)

O protocolo convencional de iniciação da superestimulação ovariana no meio do ciclo estral foi desenvolvido de forma experimental e empírica, onde uma grande resposta superovulatória era obtida de forma que o tratamento superestimulatório iniciasse entre 8º e o 12º dia após o estro (Bó et al, 1995).

Através de informações geradas por ultrassonografia, hoje se sabe que de 8 a 12 dias após o estro (7 a 11 dias após ovulação) é o tempo aproximado da emergência da segunda onda folicular em um ciclo de duas ou três ondas (Barros & Nogueira, 2001; Adams et al., 2008), e um grupo de folículos em crescimento poderia estar presente nesta época. Entretanto, o dia da emergência da segunda onda folicular pode diferir em um ciclo com duas ou três ondas, como descrito acima, como também, de animal para animal (Barros & Nogueira, 2001; Bó et al., 2002). Portanto, está claro que a resposta superovulatória é maior quando o tratamento superestimulatório é iniciado no momento da emergência da onda do que mais tarde (Nasser et al., 1993; Baruselli et al., 2006). O início do tratamento com gonadotrofinas (FSH) mesmo que um dia após o início da emergência folicular reduz significativamente a resposta superovulatória comparado com o tratamento ao início da emergência da onda (Nasser et al., 1993; Bó et al., 2002).

Com base na duração do desenvolvimento do folículo dominante e o intervalo interovulatório em ciclos de duas ou três ondas foliculares, existe a possibilidade de o folículo dominante não ser funcional em 6 dos 20 dias (30%) em ciclos de duas ondas em 8 dos 23 dias (35%) para ciclos de três ondas. Por outro lado, apenas 4 ou 5 dias (20%) do ciclo estral são indicados para se iniciar o tratamento superestimulatório ao início da emergência da onda folicular. Portanto, 80% do ciclo estral não conduzirá corretamente a uma resposta superestimulatória ótima. A necessidade de esperar até o meio do ciclo para iniciar o tratamento superestimulatório implica em monitoração do estro. Para se desviar destes

problemas, uma alternativa viável seria a de se iniciar o tratamento superestimulatório subsequente ao controle exógeno da emergência da onda folicular (Bó et al., 1996).

Outra alternativa para o controle do momento da emergência da onda folicular envolve o uso da ablação de todos os folículos maiores do que 5 mm guiada por ultrassom (Bergfelt et al., 1997; Bó et al., 2006; Bó et al., 2008) ou a ablação dos dois maiores folículos presentes nos ovários (Baracaldo et al., 2000), em momentos aleatórios do ciclo estral. A ablação folicular é seguida por um pico de FSH e a emergência de uma nova onda folicular em 1 ou 2 dias (Bergfelt et al., 1997), o tratamento com gonadotropina deve ser iniciado neste momento. A ablação folicular guiada por ultrassom apresentou uma melhor resposta superestimulatória, e um maior número de estruturas totais, porém uma menor quantidade de embriões transferíveis quando comparado ao tratamento superestimulatório iniciado entre o 7º e o 13º dia após o estro, como observado por Shaw & Good (2000).

A emergência da onda folicular também pode ser sincronizada por protocolos que se utilizam de GnRH ou pLH. Entretanto, pode haver uma assincronia na emergência da onda (de 3 a 5 dias), segundo Bó et al. (2003).

A alternativa mais comumente utilizada para sincronizar a emergência da onda folicular para superestimulação ovariana em vacas doadoras é a utilização de estradiol intramuscular (im) no momento da inserção do dispositivo intravaginal de progesterona/progestágeno (Bó et al., 1996; Bó et al., 2006), induzindo assim a emergência de uma nova onda folicular, podendo ser esta a mais indicada para o início do tratamento com gonadotropinas (Bó et al., 2006). A sincronização da onda neste caso também depende da fonte de estradiol utilizada, como Benzoato de estradiol (BE), Valerato de estradiol (EV) ou Cipionato de estradiol (ECP), variando de acordo com sua meia vida e metabolização. Diversos são os trabalhos que mostram uma produção de embriões de melhor qualidade quando se faz a sincronização da emergência da onda folicular com progesterona/estradiol em comparação com ablação folicular ou com observação de estro iniciando a superestimulação dos dias 8 a 12, como já foi descrito por Bó et al. (1995), Bó et al. (2002), Colazo et al. (2005), Baruselli et al. (2006).

Diversos tratamentos hormonais para indução da superestimulação folicular em bovinos têm sido estudados ao longo dos últimos 50 anos (Barros & Nogueira, 2001). Entre os agentes superestimulatórios testados está a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), administrada sozinha ou associada com soro anti-eCG (Gonzalez et al., 1994), FSH extraído

de pituitária suína, ovina ou eqüina e, mais recentemente, FSH recombinante bovino (Barros & Nogueira, 2001; Bó et al, 2008). O uso do FSH como agente superestimulatório tem sido extensivamente estudado, dentre eles, experimentos envolvendo diferentes concentrações, eficiência de produtos comerciais de diversos laboratórios e origem animal, e variação na razão de concentração entre FSH:LH (Barros & Nogueira, 2001). Novos protocolos de superestimulação folicular com FSH visam reduzir o número de aplicações e, conseqüentemente, a redução do manejo e estresse animal. Alvarez et al. (2008) compararam o uso de uma dose sub-cutânea (400 UI de FSH), com uma dose sub-cutânea (320 UI de FSH) seguida de uma sub-dose intra-muscular (80 UI de FSH), com oito aplicações intra-musculares de 12 em 12 horas (400 UI de FSH) como em protocolos convencionais e não obtiveram diferenças estatísticas para o número de corpos lúteos produzidos entre os grupos, mas obtiveram uma maior produção de embriões pelo grupo de múltiplas aplicações de FSH, devido à maior taxa de recuperação deste grupo em relação aos outros.

Mais recentemente tem se estudado a customização de protocolos, segundo a raça, subespécie e nível de produção de leite, com diferentes momentos para indução da ovulação como também o maior ou menor tempo de exposição de progesterona pelo dispositivo intravaginal sobre a quantidade e a qualidade embrionária em bovinos.

Diversos estudos têm sido realizados para determinar o melhor momento para se fazer a indução da ovulação em protocolos de superestimulação com inseminação artificial em tempo fixo. D'Occhio et al. (1997) usaram implante de Deslorelina para o bloqueio da liberação de LH em novilhas Brahman superestimuladas, e a ovulação foi induzida com 25 mg i.m. de LHp, 48, 60 e 72 horas após a aplicação de PGF $2\alpha$ . Não obtiveram aumento significativo no número de embriões transferíveis quando o LH foi administrado 60 horas após PGF em comparação com o protocolo sem agonista de GnRH. Isto corresponde a aproximadamente 12 horas após o tempo esperado para a liberação de LH em animais superestimulados, e pode ter permitido que folículos com menor grau de maturação adquirissem desenvolvimento suficiente para ovular. Entretanto, como descrito por Baruselli et al. (2006) em um experimento feito por sua equipe, que testaram a indução da ovulação com 48 e 60 horas após tratamento com PGF em vacas Nelore, observaram que em ambos os tratamentos houve um aumento do número de estruturas degeneradas, contudo constataram um maior número de estruturas transferíveis ( $P < 0,004$ ) e de estruturas congeláveis ( $P < 0,002$ ), chegando à conclusão de que para vacas Nelores (*Bos indicus*) seria mais indicado o uso da

indução da ovulação com 48 horas após a aplicação de  $\text{PGF2}\alpha$ . Os resultados obtidos em doadoras Nelore diferem dos observados em doadoras da raça Holandesa. Em vacas Holandesas de alta produção, o tratamento com LH 60 horas após a aplicação de  $\text{PGF2}\alpha$  resultam em um aumento da resposta superovulatória e em um maior número de embriões transferíveis, segundo descrito pelos mesmos autores (Baruselli et al., 2006).

Nos protocolos de superestimulação e superovulação em tempo fixo se observa a preocupação com a duração da exposição do folículo à progesterona, sendo que nos mesmos, se utiliza fontes diversas de progesterona exógena. Em diversos estudos (Barros & Nogueira, 2001; Bó et al., 2002; Baruselli et al., 2006; Bó et al., 2006; Bó et al., 2008) se observou a diferença nos resultados obtidos com protocolos onde se faz a retirada do implante de progesterona 24 (P24) ou 36 (P36) horas depois da aplicação de  $\text{PGF2}\alpha$ , sendo que os resultados apontam que para animais *Bos taurus* a retirada do implante deve ser feita com 36 horas após PGF, mais exclusivamente quando se utiliza vacas Holandesas de alta produção de leite. E em animais *Bos indicus* ainda se observa algumas contradições, sendo que em geral, podem-se utilizar ambos os protocolos, com a retirada do implante com 24 ou 36 horas depois do tratamento com  $\text{PGF2}\alpha$ .

## CAPÍTULO 2

Manuscrito de artigo a ser enviado à revista científica:

### **Diferentes protocolos com progesterona na resposta superestimulatória e produção embrionária de vacas do grupamento genético Curraleiro/Pé-duro**

Heitor Castro Alves Teixeira<sup>1,2</sup>, Arthur da Silva Mariante<sup>2</sup>, Normandes Vieira do Nascimento<sup>2</sup>, Alexandre Floriani Ramos<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária - UnB, DF, <sup>2</sup>Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – DF.

## 1 RESUMO

O Brasil tem uma enorme experiência na reprodução assistida de seu rebanho bovino comercial, e dois protocolos de superestimulação ovariana foram desenvolvidos, para animais *Bos taurus* (P36) e *Bos indicus* (P24). Tendo em vista que o Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) possui um número reduzido de embriões estocados de bovinos naturalizados brasileiros, torna-se necessário o estudo da resposta desses animais a programas de superovulação para coleta de embriões. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a resposta superestimulatória, a produção e a qualidade embrionária de matrizes do grupamento genético Curraleiro/Pé-duro utilizando os protocolos P24 e P36, visando promover o incremento de embriões desta população no BBGA. Doze vacas Curraleiras, originárias do rebanho de conservação da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais: Controle, P24 e P36, em um delineamento experimental cross-over. Todas as doadoras tiveram o estro sincronizado e no quinto dia do ciclo estral as doadoras dos grupos P24 e P36 receberam implante intravaginal de progesterona e 2mg de benzoato de estradiol. A partir do nono dia do ciclo estral todas as doadoras receberam 133 mg de FSHp em oito doses decrescentes de 12 em 12 horas, com duas doses de 150µg de D-cloprostenol junto com a quinta e a sexta doses de FSH. Os tratamentos P24 e P36 diferiram em relação ao momento da retirada do implante de progesterona, 24h ou 36h após a primeira aplicação de D-cloprostenol. Todas as doadoras receberam 25µg de leirelina no décimo terceiro dia do ciclo estral, com as inseminações

realizadas 12 e 24 horas após. A coleta dos embriões foi feita sete dias após a primeira inseminação artificial. A avaliação dos ovários foi realizada, por ultrassonografia, no momento da administração da primeira e oitava doses de FSH, dois dias após a inseminação artificial e no momento da coleta dos embriões. Não houve diferença ( $P>0,05$ ; Anova; Duncan) para resposta superestimulatória e superovulatória (folículos na emergência da onda, folículos ao fim da SOV, folículos não ovulados, corpos lúteos na coleta) entre os tratamentos. O número de estruturas totais foi maior ( $P<0,05$ ) no P24 do que no Controle e o número de estruturas viáveis foi maior ( $P<0,05$ ) no P24 e no P36 do que no Controle. O número de estruturas congeláveis e de estruturas inviáveis e a taxa de recuperação foram semelhantes entre os tratamentos ( $P>0,05$ ). As vacas do grupamento genético Curraleiro/Pé-duro se apresentaram fisiologicamente mais próximas de animais taurinos quanto à resposta superovulatória e produção embrionária. Os resultados sugerem que seria mais indicado o uso dos protocolos de superovulação P24 ou P36 do que protocolos sem utilização de implante de progesterona em vacas Curraleiras/Pé-duro. Entretanto, devido à maior proporção entre estruturas congeláveis e totais alcançada com o uso do protocolo P36, sugere-se que este protocolo pode ser o mais indicado quando se visa o enriquecimento de bancos de germoplasma.

Palavras Chave: SOV, Conservação, Recursos genéticos animais, Embriões bovinos, Reprodução animal.

## 2 ABSTRACT

Brazil has an enormous experience in the attended reproduction of its commercial cattle breeds, and two protocols of ovarian superstimulation were developed: one for *Bos taurus* (P36) and another for *Bos indicus* (P24) animals. The Brazilian Animal Gene Bank (BAGB) counts with a small number of stored embryos of local cattle breeds, for this reason it is necessary to study the response of those animals to superovulation and embryo transfer programs. The objective of this work was to evaluate superestimulatory response, embryo production and embryonic quality of Curraleiro/Pé-duro cows, using the protocols P24 and P36, seeking to promote the increase of cryopreserved embryos of this population in BAGB. Twelve cows Curraleiro/Pé-duro, from the Conservation nucleus of Embrapa Genetic Resources and Biotechnology, were divided in three experimental groups: Control, P24 and P36, in a crossover experimental design. All cows had the estrus synchronized and in the fifth day of the estrus cycle, the cows of the groups P24 and P36 received an intravaginal progestogen implant and 2mg of estradiol benzoate. Starting from the ninth day of the estrus cycle all cows received 133 mg of FSHp in eight decreasing in 12 hours interval, with two doses of 150µg of D-cloprostenol with the fifth and the sixth doses of FSH. Treatments P24 and P36 differed in the moment of the progestogen implant removal, that occurred 24 or 36 hours after the first application of D-cloprostenol. All cows received 25µg of lecireline in the thirteenth day of the estrus cycle, with the inseminations accomplished 12 and 24 hours after. The embryo collection was done seven days after the first artificial insemination. The

evaluation of the ovaries was done through ultrasound scanning, in the moment of the administration of the first and eighth doses of FSH, two days after the artificial insemination and in the moment of the embryo collection. There was no difference ( $P>0,05$ , Anova Duncan) for superestimulatory and superovulatory response (follicles in the wave emergency, follicles in the end of SOV, follicles not ovulated and corpora lutea) among treatments. The number of total structures was greater ( $P>0.05$ ) in P24 than in the Control and the number of viable structures was greater ( $P>0,05$ ) in P24 and in P36 than in the Control. The number of frozen structures, unviable structures and recovery tax were not different ( $P>0,05$ ) among treatments. The curraleiro/Pé-duro cows presented physiological behavior common to *Bos taurus* when superestimulatory response and embryo production were evaluated. The results suggest that the use of P24 or P36 superstimulation protocols were better than the use of protocols without progestogen implant in Curraleiro/Pé-duro cows. However, a greater proportion of frozen structures related to the total structures was reached with the use of the P36 protocol, what suggests that this is the one that should be used when the enrichment of germplasm bank is sought.

Keywords: SOV, Conservation, Animal genetic resources, Bovine embryos, Animal reproduction.

### 3 INTRODUÇÃO

Em sistemas de alta produção, raças especializadas para a produção de leite e carne foram desenvolvidas através de extensa seleção, e seu material genético foi vastamente disseminado (FAO, 1998; FAO, 2007). Os recursos genéticos animais enfrentam um duplo desafio. Por um lado a demanda por produtos de origem animal aumenta em países desenvolvidos, por outro lado, as raças consideradas locais estão desaparecendo rapidamente em todo o mundo. Nos últimos 15 anos, 300 das mais de 6000 raças identificadas pela FAO são consideradas extintas (Cardellino, 2005).

Em animais domésticos, o aumento da diversidade genética em uma determinada raça é tão importante quanto à diversidade entre raças, para que possa ser possível a troca de material genético necessário a cruzamentos e programas de seleção (Hiemstra et al., 2006). Existem diversas opções para se conservar a diversidade genética. Em geral, conservação *in situ* é o mecanismo mais utilizado na conservação de raças, pois permite que pequenas populações de uma raça sejam mantidas em seu ambiente original de adaptação (Andrabi & Maxwell, 2007). Além da conservação *in situ*, métodos de manter o animal vivo fora da sua região de produção (*ex situ in vivo*) ou ainda a criopreservação de seu germoplasma (*ex situ in vitro*) são utilizados para a preservação de raças raras ou em risco de extinção. A criopreservação de germoplasma é uma estratégia muito eficiente para conservar diversidade alélica existente para o uso futuro (Hiemstra et al., 2006; Andrabi & Maxwell, 2007).

O gado Curraleiro, também conhecido como gado Pé-duro, é um grupamento racial descendente dos bovinos trazidos pelos colonizadores portugueses e espanhóis, e apresenta uma população pequena e em crescente declínio, apresentando baixa diversidade genética (Santiago, 1975; Mariante & de Bem, 1992, Boaventura, 2005). Criado em regime extensivo e sem suplementação, o bovino Curraleiro é um animal extremamente rústico que é muito bem adaptado a ambientes desfavoráveis como as planícies do semi-árido do Nordeste brasileiro (Primo, 1992; Mariante et al., 2003, Serrano et al., 2004; Bianchini et al., 2006). A excepcional rusticidade do Curraleiro e sua capacidade de sobreviver de pastagens nativas de regiões inóspitas são duas características que justificam a conservação desta raça. (Mariante & de Bem, 1992).

Programas de produção in vivo de embriões bovinos, por meio da superestimulação ovariana, têm sido amplamente utilizados no mundo. Esta tecnologia aumenta o número de descendentes obtidos de uma única doadora e é utilizada para disseminar material genético desejável por todo mundo (Baruselli et al., 2006), assim como também, pode ser utilizada para produção em massa de embriões para criopreservação e enriquecimento de bancos de germoplasma (Hiemstra et al., 2006).

A alternativa mais comumente utilizada para sincronizar a emergência da onda folicular para superestimulação ovariana em vacas doadoras é a utilização de estradiol intramuscular (im) associado à inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona/progestágeno (Bó et al., 1996; Bó et al., 2006). O que induz a emergência de uma nova onda folicular, sendo esta a mais indicada para o início do tratamento com gonadotropinas para superestimulação ovariana (Bó et al., 2002; Colazo et al., 2005; Bó et al., 2006).

Com o uso de implantes de progesterona em protocolos de superestimulação ovariana observa-se a preocupação com a duração da exposição dos folículos à progesterona. Em diversos estudos (Barros & Nogueira, 2001; Bó et al., 2002; Baruselli et al., 2006; Bó et al., 2006; Martins et al., 2007; Bó et al., 2008) se observou a diferença nos resultados obtidos com protocolos onde se faz a retirada do implante de progesterona 24 (P24) ou 36 (P36) horas depois da aplicação de  $PGF_{2\alpha}$ , sendo que os resultados apontam que para animais *Bos taurus* a retirada do implante deve ser feita com 36 horas após  $PGF_{2\alpha}$ , mais exclusivamente quando se utiliza vacas Holandesas de alta produção de leite. Em animais *Bos indicus*, no entanto,

observa-se algumas contradições, sendo que em geral, pode se utilizar ambos os protocolos, com a retirada do implante com 24 ou 36 horas depois do tratamento com  $\text{PGF}_{2\alpha}$ .

Diante disto, este trabalho teve como objetivo avaliar diferentes protocolos com progesterona (P24 e P36) na produção e qualidade embrionária de vacas do grupamento genético Curraleiro/Pé-duro em programas de produção in vivo de embriões.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local do Experimento e Animais

O Experimento foi executado no Campo Experimental Sucupira, de propriedade de Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, localizado a Sudoeste da cidade de Brasília - DF (15°52' a 15°56'S e 48°00' a 48°02'W), com altitudes que variam de 1.050 a 1.250 m. O clima predominante é o Koppen Aw, indicando inverno seco e verão chuvoso. A fazenda conta com uma área total de 1.763 ha, distribuídos em áreas de cerrado, pastagem e agricultura (Walter & Sampaio, 1998).

Doze fêmeas Curraleiras/Pé-duro originárias do núcleo de Conservação do Campo Experimental Sucupira foram selecionadas por meio de exame ginecológico, palpação retal e ultrassonografia antes do início do experimento para constatação da ciclicidade e ausência de enfermidades ou anormalidades no aparelho reprodutivo. Os animais foram mantidos a pasto (*Brachiaria brizantha*) com mineralização e água à vontade.



FSH (D13) foram administrados 75mcg de leirelina (GnRH – Gestran<sup>5</sup>), com as inseminações sendo realizadas 12 e 24 horas após. As coletas foram realizadas em D20 à tarde (Figura 2.2).

Nos grupos P24 e P36 foi inserido um implante de P<sub>4</sub> (CIDR) e administrado 2mg de BE no D5 e o tratamento superestimulatório iniciou no D9, semelhante ao grupo Controle (133mg de FSHp em oito doses decrescentes de 12 em 12 horas). Junto com a quinta e sexta dose de FSH (D11 pela manhã e pela tarde) foram administrados 150µg de D-Cloprostenol (PGF<sub>2α</sub> - Veteglan). O Grupo P24 teve o implante de P<sub>4</sub> removido junto com a sétima dose de FSH (D12 pela manhã), 24 horas após a primeira aplicação de PGF<sub>2α</sub>; enquanto que o Grupo P36 teve o implante removido juntamente com a oitava dose de FSH (D12 pela tarde), 36 horas após a primeira aplicação de PGF<sub>2α</sub>. Doze horas após a oitava dose de FSH (D13) foram administrados 75mcg de leirelina e as inseminações foram realizadas 12 e 24 horas após, com as coletas ocorrendo no D20 pela tarde (Figura 2.2).

---

<sup>5</sup> Gestran – Tecnopec, São Paulo-SP, Brasil.

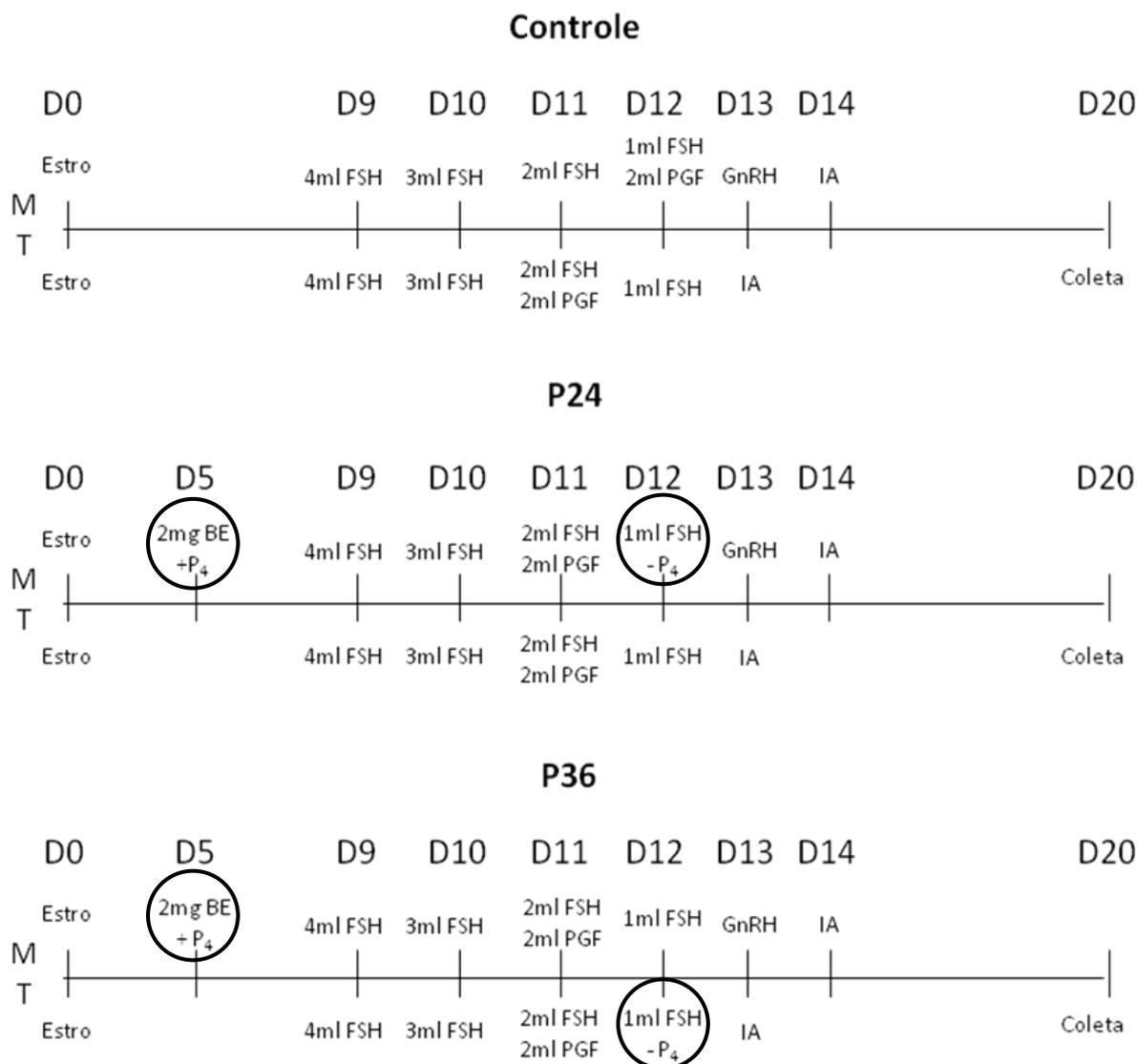


Figura 2.2 – Tratamentos superovulatórios a que as vacas Curraleiras/Pé-duro foram submetidas, protocolos convencional (Controle), com implante de P<sub>4</sub> removido 24 (P24) e 36 horas após a administração de PGF<sub>2α</sub> (P36). Círculos sinalizam a inserção e a remoção dos implantes de P<sub>4</sub>.  
M=manhã e T=tarde

### 4.3 Avaliações Ultrassonográficas

Para avaliação da resposta superestimulatória e superovulatória foram feitos exames ultrassonográficos para contagem de folículos e corpos lúteos. Foi utilizado um

ultrassom scanner B Aloka SSD-500Vet<sup>6</sup> com um transdutor linear transretal de 7,5 MHz: no D5, para a contagem de folículos na emergência da onda folicular (folículos de 3 a 5 mm); no D12, para a contagem de folículos superestimulados (folículos  $\geq 8$  mm); no D15, para a contagem de folículos não ovulados (folículos  $> 8$  mm); e no D20, para a contagem do número de corpos lúteos antes da coleta dos embriões.

#### 4.4 Coleta e Avaliação dos Embriões

Ao início do procedimento de coleta, as fezes foram removidas do reto e a área perineal foi lavada com água, sabão, álcool iodado e álcool 70%. Antes da coleta dos embriões, cada animal foi submetido à anestesia epidural com 3-5 ml de lidocaína a 2%.

Os embriões foram coletados por meio não cirúrgico via transcervical com sonda de Foley. A lavagem uterina foi feita com 1 litro de solução salina fosfatada modificada (DMPBS<sup>7</sup>). Ao fim da coleta, as doadoras permaneceram com 80-100 ml de DMPBS intra-uterino por 30-40 minutos para posterior recoleta de embriões, segundo, Castro Neto et al., (2005).

Os embriões recuperados foram avaliados em microscópio estereoscópico e classificados de acordo com as normas da Sociedade Internacional de Transferência de Embrião (IETS, 1998), segundo o estágio de desenvolvimento (Mórula, Mórula Compacta, Blastocisto Inicial, Blastocisto, Blastocisto Expandido, Blastocisto em Eclosão e Blastocisto Eclodido) e segundo a qualidade (Graus 1, 2, 3, Degenerado e Não-fecundado). Admitiu-se que estruturas viáveis, seriam classificadas como Graus 1, 2 e 3, estruturas congeláveis Graus 1 e 2, e estruturas inviáveis aquelas classificadas como Degeneradas ou Não-fecundadas.

---

<sup>6</sup> Aloka CO. – Tóquio, Japão.

<sup>7</sup> DMPBS Flush – Nutricell, Campinas-SP, Brasil.

#### 4.5 Análise Estatística

Os resultados de resposta superestimulatória e da coleta dos embriões foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Lilliefors e à homoscedasticidade pelo teste de Cochran e analisados por meio de análise de variância e pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%. Os resultados de qualidade embrionária foram avaliados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis ao nível de significância de 5%. Foi utilizado o programa estatístico SAEG<sup>8</sup> como ferramenta de auxílio para análise dos dados.

---

<sup>8</sup> Sistema para Análises Estatísticas 9.1/2007 – Fundação Arthur Bernardes, UFV, Viçosa-MG, Brasil.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve diferença ( $P>0.05$ ) entre os tratamentos quanto ao número de folículos na emergência da onda folicular, de folículos ao fim da superovulação, de folículos não ovulados, de corpos lúteos no momento da coleta dos embriões, bem como na taxa de ovulação (Figura 2.3).

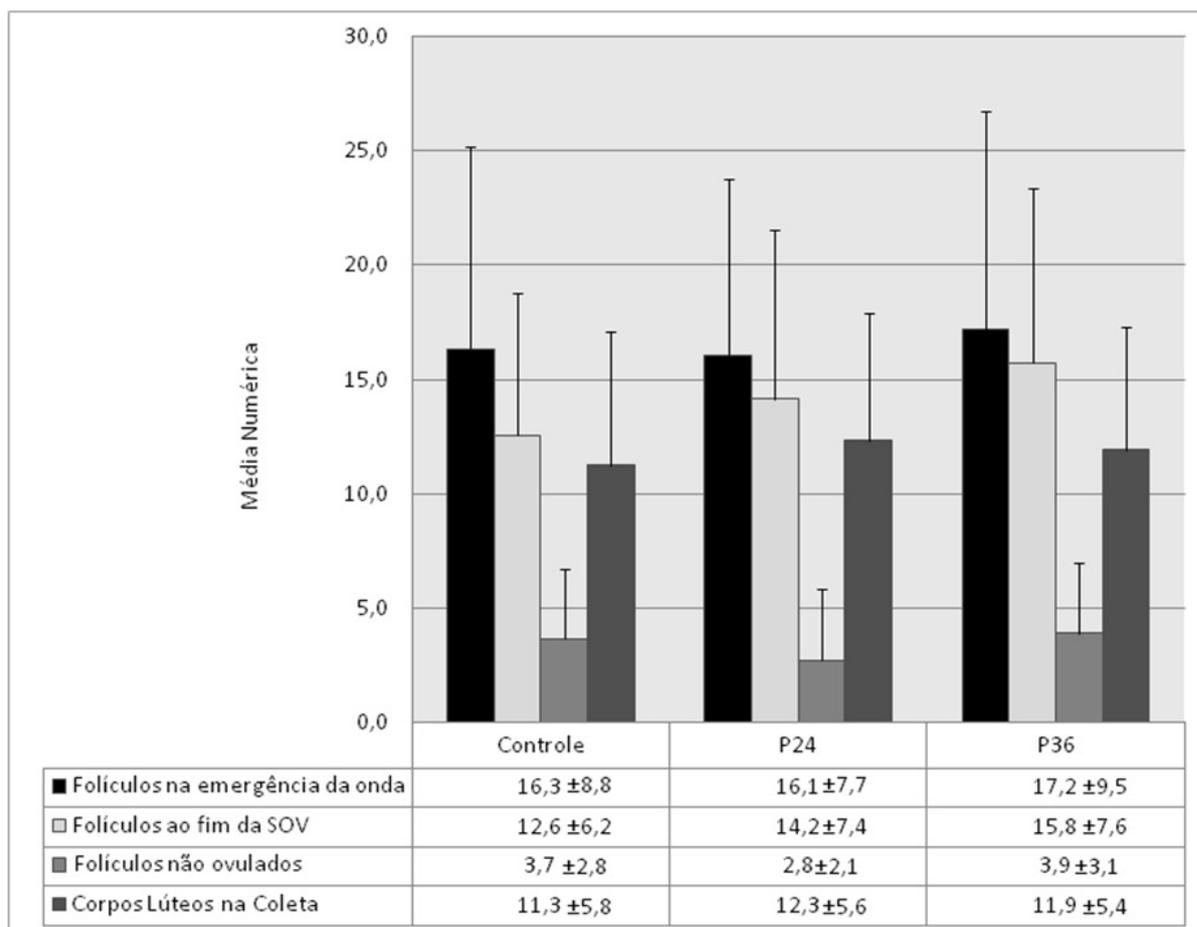


Figura 2.3 – Média e Desvio Padrão do número de folículos na emergência da onda folicular, de folículos ao fim da superovulação, de folículos não ovulados e de corpos lúteos no momento da coleta dos embriões em vacas Curraleiras/Pé-duro submetidas aos tratamentos superovulatórios convencional (Controle), com implante de P4 removido 24 (P24) e 36 horas após a administração de PGF<sub>2α</sub> (P36).

O número de folículos na emergência da onda folicular (Controle 16,3±8,8; P24 16,1±7,7 e P36 17,2±9,5) observado em vacas Curraleiras/Pé-duro nesse Experimento foi similar entre os tratamentos. Em geral, animais *Bos taurus* e *Bos indicus* apresentam diferença na quantidade de folículos recrutados (Baruselli et al., 2007), onde vacas *Bos indicus* recrutam um número maior de folículos, como descrito por Carvalho et al. (2008). Nossos resultados assemelham-se com os resultados encontrados por Bó et al. (1996) ao estudarem novilhas meio sangue Hereford versus Angus (14,6±2,2) e por Martins (2007) com vacas Holandesas (13,4±1,4) e foram diferentes dos encontrados por Singh et al. (2004) em vacas Hereford (30,7±9,0) e Carvalho (2004) em vacas Gir (26,5±3,1) e Nelore (39,7±4,9), sugerindo que

vacas Curraleiras/Pé-duro possuem um número de folículos no momento da emergência da onda similar ao de vacas *Bos taurus* de raças comerciais. Uma provável explicação seria uma maior concentração plasmática de IGF-I e menor concentração de FSH em vacas zebuínas do que em vacas taurinas (Alvarez et al., 2000; Bó et al., 2003). Apesar desses hormônios não terem sido dosados neste experimento, esta pode ser uma possível explicação para a menor quantidade de folículos na emergência da onda para vacas taurinas quando comparadas com zebuínas, ademais, mais estudos devem ser conduzidos com o objetivo de caracterizar a dinâmica folicular de vacas Curraleiras/Pé-duro.

A quantidade de folículos ao fim da superovulação foi semelhante entre os grupos, possivelmente devido ao uso da mesma dose de FSHp (133 mg) e pela semelhança do modo de administração. O número de folículos ao fim da superovulação foi de  $12,6 \pm 6,2$ ;  $14,2 \pm 7,4$  e  $15,8 \pm 7,6$  nos grupos Controle, P24 e P36 respectivamente, sugerindo que a resposta superestimulatória poderia ser maior, como descrito por Nasser et al. (1993) e Nasser (2006) em vacas *Bos indicus* ( $18,4 \pm 3,4$  e  $23,0 \pm 3,7$ , respectivamente) e por Bó et al. (1996) utilizando animais *Bos taurus* ( $18,6 \pm 2,5$ ). O grupamento genético Curraleiro/Pé-duro originário das raças Mirandesa em Portugal (Rodrigues, 1981) e Alistana-Sanabresa na Espanha (Belda, 1984), que passaram por seleção natural, apresentam alta eficiência reprodutiva, de 1 bezerro/vaca/ano (Belda, 1984; Mariante et al., 1999), entretanto, não se conhece a resposta fisiológica destes animais a tratamentos superestimulatórios, seja do Curraleiro/Pé-duro, ou das raças de origem. Talvez seja possível que estes animais apresentem resposta distinta do que animais comerciais aos hormônios administrados, sendo diferente o limiar de ação hormonal, quantidade de folículos recrutados por onda folicular, tamanho dos folículos dominantes ao fim da superestimulação e etc. Seja por sua origem (*Bos taurus ibericus*, segundo Serrano et al., 2004), ou pela distância genética que estes animais apresentam de animais taurinos e zebuínos. Portanto, existe a necessidade de mais estudos visando à adaptação de doses e protocolos de superovulação em vacas de raças naturalizadas.

A quantidade de folículos não ovulados, de corpos lúteos no momento da coleta, bem como a taxa de ovulação foram semelhantes entre os tratamentos, possivelmente devido à indução da ovulação com análogo de GnRH ter sido realizada no mesmo momento em todos os grupos experimentais. O número de corpos lúteos no momento da coleta dos embriões obtido neste Experimento com vacas Curraleiras/Pé-duro foi de  $11,3 \pm 5,8$ ;  $12,3 \pm 5,6$  e  $11,9 \pm 5,4$  nos grupos Controle, P24 e P36 respectivamente, sugerindo que esta resposta

superovulatória, assim como a resposta superestimulatória, poderia ser otimizada. Carvalho (2004) e Bó et al. (1996), obtiveram  $22,4 \pm 0,5$  e  $16,6 \pm 3,4$  corpos lúteos, respectivamente, mostrando que poderíamos conseguir um número maior de corpos lúteos ao fim da superovulação, haja visto que a literatura descreve resposta superior seja em *Bos indicus* como em *Bos taurus*. Entretanto, por se tratar de animais naturalizados brasileiros, pode-se especular que esta realmente seja a resposta superovulatória e superestimulatória ideal para estes animais, talvez, devido à alimentação deficiente que esses animais tiveram.

A taxa de ovulação foi semelhante ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos Controle (88,6%); P24 (90,4%) e P36 (77,8%). Diferentemente de Martins (2007) que ao utilizar os protocolos P24 e P36 em vacas Holandesas de alta produção, obteve taxa de ovulação de 49,9% e 60,9% em P24 e P36 respectivamente reduzindo assim a quantidade de corpos lúteos. Porém, como discutido pelo autor, o protocolo P36 apresentou taxa de ovulação superior, justificada pela manutenção da correta modulação dos pulsos de LH, concentrando assim as ovulações no período correto.

A semelhança entre os tratamentos para todas as variáveis da resposta superestimulatória estudadas neste Experimento também foi observado em outros experimentos como apresentado por Nasser et al. (1993), Carvalho (2004), Nasser (2006) e Martins (2007). Sugerindo que o comportamento fisiológico à protocolos de superovulação em vacas Curraleiro/Pé-duro não se distancia do que é observado na literatura em animais de raças comerciais, mostrando assim, a eficiência reprodutiva de animais naturalizados.

Quanto à produção embrionária, o número de estruturas totais foi maior ( $P < 0,05$ ) nas vacas superovuladas com o protocolo P24 do que nas superovuladas com o protocolo de cio base (Controle) e o número de estruturas viáveis foi maior ( $P < 0,05$ ) nos tratamentos P24 e P36 do que no Controle. Contudo, não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na taxa de recuperação; no número de estruturas congeláveis e no número de estruturas inviáveis entre os diferentes tratamentos, como apresentado na Figura 2.4.

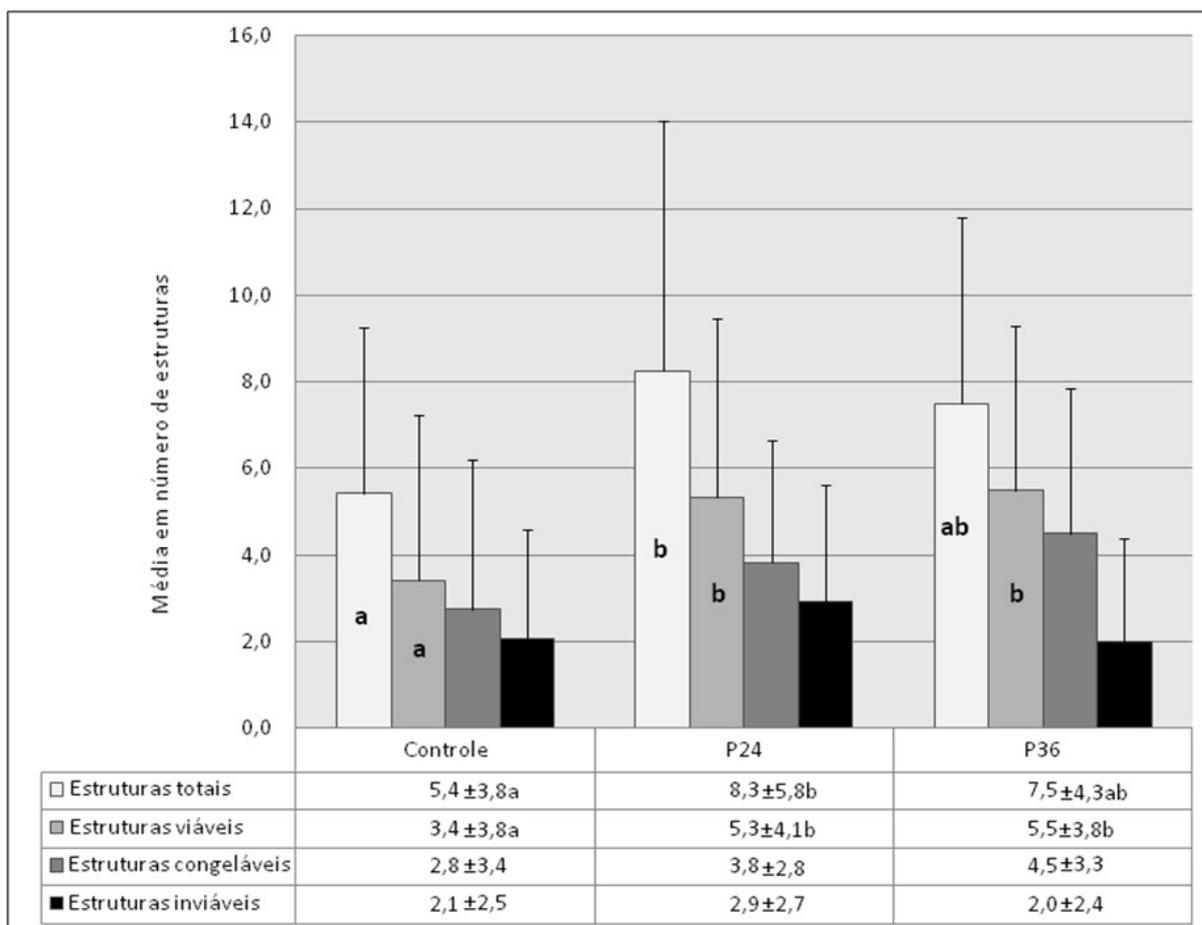


Figura 2.4 – Média e Desvio Padrão de estruturas totais, estruturas viáveis, estruturas congeláveis e estruturas inviáveis em vacas Curraleiras/Pé-duro submetidas aos tratamentos superovulatórios convencional (Controle), com implante de P4 removido 24 (P24) e 36 horas após a administração de PGF<sub>2α</sub> (P36).  
<sup>a,b</sup> – Letras diferentes na mesma variável apresentam diferença (P<0,05) para teste de Duncan.

Diferentes estudos mostram respostas de produção embrionária distintas quando se utilizam protocolos P24 e P36 para animais *Bos taurus* ou *Bos indicus* (Martins et al., 2005; Baruselli et al., 2006; Barros et al., 2007; Martins, 2007). Independente disto, ambos os tratamentos foram melhores que o grupo Controle, seja estatisticamente ou em uma pequena diferença numérica, comprovando que os protocolos P24 e P36, sem observação de estro, são capazes de produzir mais embriões em vacas Curraleiras/Pé-duro, assim como em vacas zebuínas (Nasser, 2006) e taurinas (Bó et al., 1996).

Apesar da taxa de recuperação embrionária ter sido menor para o grupo Controle (48,8±26,6%) do que para os grupos P24 e P36 (60,9±30,5% e 58,2±26,7%

respectivamente), não houve diferença ( $P > 0,05$ ) para esta variável entre os tratamentos. Contudo, a menor taxa de recuperação do grupo Controle pode explicar a menor quantidade de estruturas totais e viáveis deste grupo. Além disso, a menor quantidade de estruturas viáveis apresentada pelo grupo Controle pode estar ligada à concentração de progesterona (Silva et al., 2002) que foi menor neste grupo, suportada apenas pelo CL formado na Pré-sincronização, diferentemente dos grupos P24 e P36 que além do CL da pré-sincronização, também tinham liberação de progesterona exógena pelo implante. Silva et al. (2002) mostraram a clara relação do efeito da maior concentração plasmática de progesterona e a maior produção e qualidade embrionária em animais *Bos taurus*. Mesmo não tendo sido feita a dosagem plasmática de  $P_4$  neste Experimento, o provável aumento de  $P_4$  devido à presença do implante, pode ser uma causa das vacas superovuladas com P24 e P36 terem apresentado uma produção embrionária maior do que as superovuladas com o protocolo considerando o cio base. Ademais, Carvalho et al. (2008) ao estudarem o efeito da concentração de progesterona em tratamentos de inseminação artificial em tempo fixo (com base em implante de progesterona) em animais *Bos taurus*, *Bos indicus* e *Bos taurus* x *Bos indicus*, observaram que animais *Bos indicus* possuem concentração sérica de  $P_4$  maior do que animais taurinos e mestiços. Os autores discutiram que animais *Bos indicus* possuem menor velocidade para metabolizar a  $P_4$ . Portanto, o protocolo P24 seria mais indicado para animais *Bos indicus*, pois estes manteriam a concentração de progesterona elevada por mais tempo, de acordo com seu metabolismo, razão para a antecipação da retirada do implante de  $P_4$  nesses animais, permitindo que os pulsos de LH se mantenham mais frequentes e não prejudiquem o desenvolvimento dos folículos (Baruselli et al., 2007). Por outro lado, o protocolo P36 seria mais indicado para animais *Bos taurus*. Por terem o metabolismo mais acelerado, estes animais metabolizam a progesterona mais rapidamente. Desta forma, mantendo-se o implante de  $P_4$  por mais tempo, a influência da progesterona sobre a modulação dos pulsos de LH seria suficiente para evitar que ocorra ovulação antes do momento ideal de maturação do folículo/ovócito (Barros & Nogueira, 2001, Baruselli et al., 2006, Martins, 2007, Baruselli et al., 2007; Carvalho et al., 2008).

A distribuição da qualidade dos embriões (teste não paramétrico de Kruskal-Wallis) foi semelhante ( $P > 0,05$ ) para ambos os tratamentos (Figura 2.5). Entretanto, a proporção entre o número de embriões viáveis e totais foi de 63,6% para o Grupo Controle, 63,8% para P24 e 73,3% para P36, sugerindo um possível efeito benéfico do maior tempo de

exposição à progesterona sobre a qualidade dos embriões produzidos por vacas Curraleiras/Pé-duro, semelhante ao que ocorre com animais taurinos.

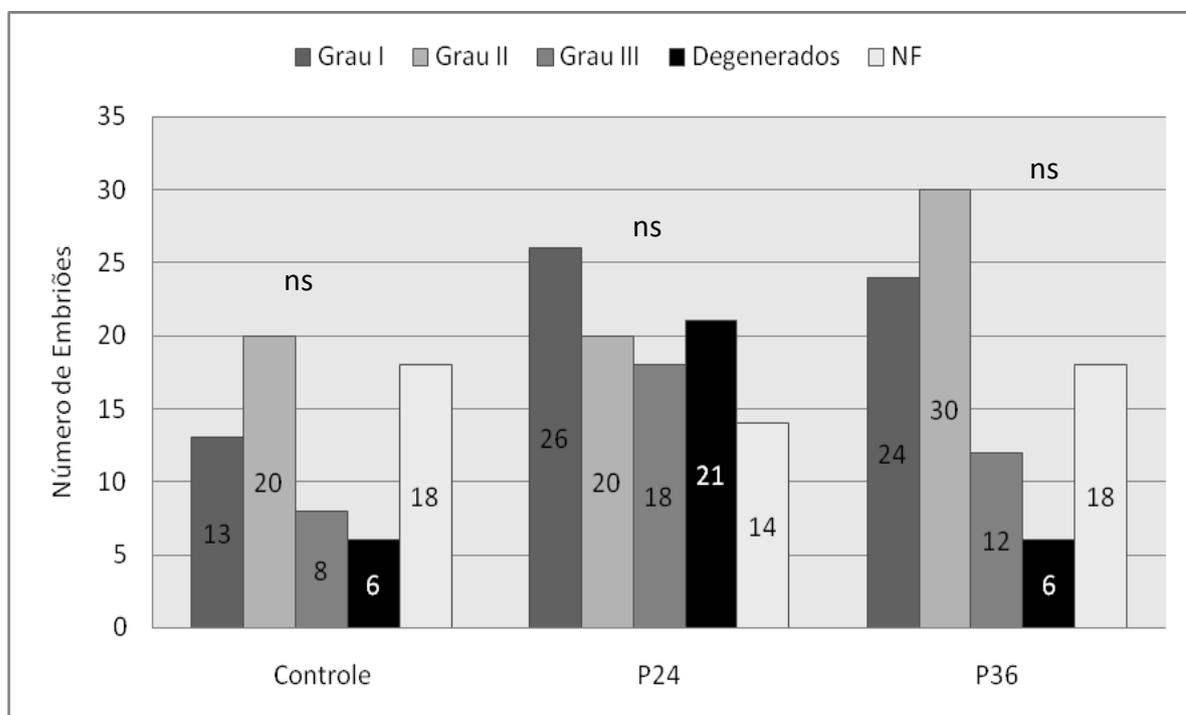


Figura 2.5 – Distribuição (em valores absolutos) da qualidade dos embriões coletados de vacas Curraleiras/Pé-duro submetidas aos tratamentos superovulatórios convencional (Controle), com implante de P<sub>4</sub> removido 24 (P24) e 36 horas após a administração de PGF<sub>2α</sub> (P36).

<sup>ns</sup> Não significativo para teste de Kruskal-Wallis (P>0,05)

De uma maneira geral, os animais *Bos taurus* e *Bos indicus* respondem de forma distinta a estes diferentes protocolos de superestimulação, onde P24 ou P36 seriam os protocolos mais indicados para animais *Bos indicus* e P36 para animais *Bos taurus* (Baruselli et al., 2006; Barros et al., 2007), principalmente quando se trata de vacas Holandesas de alta produção (Martins et al., 2005; Martins, 2007). Segundo Egito et al. (2007), o grupamento Curraleiro/Pé-duro encontra-se geneticamente entre as raças Jersey e Holandesa (*Bos taurus*) e as raças Nelore, Gir e Guzerá (*Bos indicus*), mas com maior proximidade das raças taurinas. Os resultados de resposta superestimulatória e de produção embrionária obtidos neste Experimento revelaram que fisiologicamente as vacas Curraleiras apresentaram uma resposta mais próxima a de animais taurinos do que zebuínos.

## 6 CONCLUSÕES

As vacas do grupamento genético Curraleiro/Pé-duro tiveram um comportamento fisiológico comum a bovinos de raças taurinas quanto à resposta superovulatória e produção embrionária. Nesse aspecto, poder-se-á direcionar estudos visando à adaptação de protocolos de produção in vivo de embriões em raças localmente adaptadas visando o enriquecimento de bancos de germoplasma.

Os protocolos P24 e P36 se mostraram superiores ao protocolo com cio base (Controle) quanto à produção e qualidade embrionária. Portanto, os resultados sugerem que seria mais indicado o uso dos protocolos de superovulação P24 ou P36 do que protocolos sem utilização de implante de progesterona em vacas Curraleiras/Pé-duro. Entretanto, devido à maior proporção entre estruturas congeláveis e totais alcançada com o uso do protocolo P36 sugere-se que este protocolo seja o mais indicado quando se visa o enriquecimento de bancos de germoplasma.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, G.P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p.72–80, 2008.
- ALVAREZ, P.; SPICER, L.J.; CHASE JUNIOR, C.C.; PAYTON, M.E.; HAMILTON, T.D.; STEWART, R.E.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; WETTEMAN, R.P. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, v.78, p.1291-1302, 2000.
- ALVAREZ, R.H.; MARTINEZ, A.C.; PIRES, RML. Superovulatory Response of Zebu Cows Treated with pFSH in a Single Subcutaneous Injection Followed by an Additional Intramuscular Sub-Dose 48 h Later. **Reproduction of Domestic Animals**, doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01209.x, 2008.
- ANDRABI, S.M.H.; MAXWELL, W.M.C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, n.99, p.223–243, 2007.
- ARTHUR, G.H.; NOAKES, D.E.; PEARSON, H.; PARKINSON, T.J. **Veterinary Reproduction and Obstetrics**. 7 ed. W. B. Saunders, 1996. 726p.
- ATHANASSOF, N. **Manual do criador de bovinos**. Ed. Melhoramentos. 1957. 818 p.
- BARACALDO, M.I.; MARTINEZ, M.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. **Theriogenology**, v.53, p.1239–1250, 2000.
- BARROS, C.M. & NOGUEIRA, M.F.G. Embryo Transfer in *Bos indicus* Cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1463-1496, 2001.

- BARROS, C.M.; BARCELOS, A.C.Z.B.; NOGUEIRA, F.G. Tratamentos superestimulatórios utilizados em protocolos para transferência de embriões bovinos. In: XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2007. **Anais... Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre, v. 35, n. 3, p. s759-s766, 2007.
- BARUSELLI, P.S.; FILHO, M.S.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BÓ, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.65, p.77–88, 2006.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.2, p.205-211, 2007.
- BELDA, A.S. **Razas Bovinas Españolas**. Madrid: Corazón de Maria, 1984. 878p.
- BERGFELT, D.R.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J.; ADAMS, G.P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.49, p.1–12, 1997.
- BIANCHINI, E.; MCMANUS, C.; LUCCI, C. M.; FERNANDES, M. C. B.; PRESCOTT, E.; MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Características corporais associadas com a adaptação ao calor em bovinos naturalizados brasileiros. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 9, p. 1443-1448, 2006.
- BÓ G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, v.43, p.31–40, 1995.
- BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Effect of progestogen plus E-17b treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, v.45, p.897–910, 1996.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; CHESTA, P.M.; MARTINS, C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v.65, p.89–101, 2006.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.307–326, 2003.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R.J. The Control of Follicular Wave Development for Self-Appointed Embryo Transfer Programs in Cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53-72, 2002.
- BÓ, G.A.; GUERRERO, D.C.; ADAMS, G.P. Alternative approaches to setting up donor cows for Superstimulation. **Theriogenology**, v.69, p.81–87, 2008.
- BOAVENTURA, V.M. **Gado Curraleiro: relação dos criadores e aspectos gerais da raça**. Goiânia: Sebrae - GO, 2005. 80p.

- CARDELLINO, R.A. Status of the world's livestock genetic resources. Preparation of the first report on the state of the world's animal genetic resources. In: The role of biotechnology for the characterization and conservation of crop, forestry animal and fishery genetic resources, International Workshop, 2005, Torino, **Anais...** Torino: FAO, p.1-6, 2005.
- CARVALHO, J.B.P. **Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) em novilhas *B. indicus*, *B. indicus* x *B. taurus* e *B. taurus*.** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2004, 122f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Reprodução Animal, 2004.
- CARVALHO, J.B.P.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* × *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, n.2, p.167-175, 2008.
- CASTRO NETO, A.S.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M.; SENEDA, M.M.; PERRI, S.H.; GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. **Theriogenology**, v. 63, p.1249-1255, 2005.
- COLAZO, M.G.; MARTÍNEZ, M.F.; SMALL, J.A.; KASTELIC, J.P.; BURNLEY, C.A.; WARD, D.R.; MAPLETOFT, R.J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. **Theriogenology**, v.63, p.1454–1468, 2005.
- EGITO, A.A. **Diversidade genética, ancestralidade individual e miscigenação nas raças bovinas no Brasil com base em microsatélites e haplótipos de DNA mitocondrial: subsídios para a conservação.** Brasília: Departamento de Biologia Celular do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, 2007, 246f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Instituto de Biologia da Universidade de Brasília, 2007.
- EGITO, A.A.; MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M. Programa Brasileiro de Conservação de Recursos Genéticos Animais. **Archivos de Zootecnia**, v.51, p.39-52, 2002.
- EGITO, A.A.; PAIVA, S.R.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; MARIANTE, A.S.; ALMEIDA, L.D.; CASTRO, S.R.; GRATTAPAGLIA, D.. Microsatellite based genetic diversity and relationships among ten creole and commercial cattle breeds raised in Brazil. **BMC Genetics**, v. 8, p. 83, 2007.
- FAO. **Secondary Guidelines for Development of National Farm Animal Genetic Resources Management Plans: Management of small populations at risk.** Roma, 1998. 210p.