



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E COLETA DE EMBRIÕES EM SUÍNOS
NACIONAIS

PRISCILLA CRISTINE PASSONI SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO DE 2016



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

**SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E COLETA DE EMBRIÕES EM SUÍNOS
NACIONAIS**

Aluna: Priscilla Cristine Passoni Silva

Orientador: Alexandre Floriani Ramos

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 155/2016

**BRASÍLIA/DF
FEVEREIRO DE 2016**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SILVA, P. C. P. **Sincronização do estro e coleta de embriões em suínos nacionais.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 95p. 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 à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, Priscilla Cristine Passoni. **Sincronização do estro e coleta de embriões em suínos nacionais.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2016, 95p. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2016.

1. Recuperação embrionária.
2. Protocolos de sincronização.
3. Inseminação em tempo fixo
4. Reprodução

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

**SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E COLETA DE EMBRIÕES EM SUÍNOS
NACIONAIS**

PRISCILLA CRISTINE PASSONI SILVA

**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:

**DR ALEXANDRE FLORIANI RAMOS, DOUTORADO (EMBRAPA RECURSOS
GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA) (ORIENTADOR)**

**PROF DR MARCIO BOTELHO DE CASTRO, DOUTORADO (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**DRA BIANCA DAMIANI MARQUES SILVA, DOUTORADO, (EMBRAPA
RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA) (EXAMINADORA EXTERNA)**

BRASÍLIA/DF, 25 de fevereiro de 2016.

À minha mãe, Roseli, por todo apoio, incentivo, amor e carinho. Ao meu pai, Edson, pelo carinho e compreensão. À minha segunda mãe, Jeane, por todo amor, carinho, apoio e confiança em mim depositada. Aos meus irmãos Jéssyca e Wesley, pelo companheirismo e incentivo, estando ao meu lado nos piores momentos. A Deus, minha fonte de luz, coragem e perseverança. A vocês dedico.

AGRADECIMENTOS

À minha família, meus pais Roseli Passoni e Edson José da Silva, meus irmãos Jéssyca Zaylla e Wesley Alexandre e minha madrastra Jeane Morais, por todo amor, apoio e incentivo em tudo na minha vida, principalmente à minha mãe e minha irmã por serem minhas melhores amigas e companheiras, e sempre estarem ao meu lado em todos os momentos.

Ao meu orientador Dr. Alexandre Floriani Ramos, pela grande oportunidade, confiança, dedicação, paciência e ensinamentos, por exigir sempre de mim, e me engrandecer profissionalmente. Sempre te levarei com muito carinho, por tudo que fez por mim na Veterinária, obrigada por tudo.

À Pesquisadora Dra. Bianca Damiani por compartilhar comigo sua experiência em coletas de embriões de suínos.

Aos meus amigos Elvis Ribeiro, Thiago Tavares, Danilo Martins, Yasmini Eloi, Beatriz Stella, Yara Andrade, Lindcy Marçal, Mayara Raysa que me apoiaram e incentivaram nessa etapa.

A meu namorado Luis Paulo, pela paciência, carinho e atenção, por todo esforço em me ajudar, dedicação, amizade. Por sempre me apoiar.

À família do meu namorado, meus sogros Ana Lucia e Luiz César, minha cunhada Letícia pelo carinho, ajuda e apoio.

Aos amigos Nathalia, Oscar, Sávio, Ana Carolina, Felipe, Fábria, Paula, Severino Netto, Luzia, José Felipe pela amizade, apoio, companheirismo, conselhos, discussões acadêmicas, ajuda no trabalho, preocupações, e por me ajudarem a crescer profissionalmente.

Ao amigo e técnico do laboratório Normandes, pelo apoio, ajuda e paciência.

Aos funcionários da EMBRAPA do Setor Campo Experimental Fazenda Sucupira, Manoel e Japão, e todos os outros, pela amizade e ajuda no decorrer do trabalho.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pelo suporte ao trabalho realizado.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

À Universidade de Brasília (UnB) e o programa de Pós-Graduação em Ciências Animais.

E a todos que, direta ou indiretamente, tenham apoiado de alguma forma a realização deste trabalho, meu muito obrigada.

ÍNDICE

Capítulos/Subcapítulos	Página
RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACOES.....	xv
CAPÍTULO 1.....	1
1 INTRODUÇÃO.....	2
1.1 Objetivo Geral.....	5
1.2 Objetivos Específicos.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	6
2.1 Recursos genéticos de suínos localmente adaptados.....	6
2.2 Morfofisiologia reprodutiva da fêmea suína.....	7
2.2.1 Anatomia.....	7
2.2.2 Ciclo reprodutivo da porca.....	9
2.3 Comportamento estral e manejo reprodutivo da fêmea suína.....	14
2.4 Controle do ciclo estral.....	16
2.4.1 Progestágeno (Altrenogest).....	17
2.4.2 Gonadotrofina coriônica equina (eCG).....	18
2.4.3 Hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH).....	21
2.5 Coleta de embriões.....	23
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30
CAPÍTULO 2 – COLETA SERIADA DE EMBRIÕES SUÍNOS POR LAPAROTOMIA.....	38
1 RESUMO.....	39
2 ABSTRACT.....	40
3 INTRODUÇÃO.....	41
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1 Local do Experimento e animais experimentais.....	43
4.2 Detecção de estro e monta natural.....	44
4.3 Delineamento Experimental.....	44
4.4 Análise estatística.....	46
5 RESULTADOS.....	47
6 DISCUSSÃO.....	49
7 CONCLUSÕES.....	52
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
CAPÍTULO 3 – SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO E COLETA DE EMBRIÕES EM SUÍNOS.....	56
1 RESUMO.....	57
2 ABSTRACT.....	59

3 INTRODUÇÃO.....	61
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.1 Local do Experimento e animais experimentais.....	63
4.2 Delineamento experimental.....	63
4.3 Análise estatística.....	66
5 RESULTADOS.....	67
6 DISCUSSÃO.....	69
7 CONCLUSÕES.....	72
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73
CAPÍTULO 4.....	77
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78

RESUMO

SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E COLETA DE EMBRIÕES EM SUÍNOS NACIONAIS

Priscilla Cristine Passoni Silva¹, Alexandre Floriani Ramos^{1,2}.

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, Brasília-DF, ² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF.

Objetivou-se avaliar coletas de embriões consecutivas e protocolos de sincronização estral, em porcas de raças localmente adaptadas, na qualidade embrionária e recuperação de embriões. No Capítulo 2, os animais (n=30), das raças Piau (n=23) e Moura (n=7), foram submetidos a coletas de embriões, 14 foram coletados três vezes, 12 foram coletados duas vezes, e 4 foram coletadas apenas uma vez. No Capítulo 3, as doadoras de embriões Piau (n=9) foram submetidas a protocolos de sincronização de estro, todos os animais passaram nos três protocolos: GP4 = 20 mg da progesterona oral (Altrenogest), 18 dias; GGnRH = 20 mg de Altrenogest, 18 dias, após 104 horas aplicação intramuscular (IM) de 25 µg de GnRH; GeCG+GnRH = 20 mg de Altrenogest (18 dias), 24 horas após, aplicação IM de 1000 UI de eCG, após 80 horas, aplicação IM de GnRH. A partir de 24 horas após a última administração da P4, foi utilizado um cachaço para detecção de estro. A coleta de embriões nos dois experimentos foram realizadas seis dias após a primeira inseminação e todas as estruturas coletas foram analisadas. No capítulo 2, a taxa de recuperação foi similar entre os tratamentos (P>0,05). O número de CL, estruturas totais, embriões viáveis e congeláveis e grau de aderência teve diferença significativa entre os tratamentos (P<0,05). No Capítulo 3 o tempo para a manifestação do estro foi semelhantes entre os tratamentos

($P > 0,05$) O número de CL, folículos anovulatórios, estruturas totais, embriões viáveis, embriões congeláveis e a taxa de recuperação apresentaram diferença significativa entre o GeCG+GnRH e os demais tratamentos ($P < 0,05$). A técnica de coleta de embriões suínos por laparotomia mostra-se eficiente para recuperar embriões de qualidade até a segunda coleta. Todos os protocolos foram eficazes para sincronizar o estro até sete dias em marrãs. No entanto, o protocolo do GeCG+GnRH, não foi eficaz para recuperar embriões e não teve efeitos benéficos na qualidade embrionária.

Palavras-chave: Recuperação embrionária, protocolos de sincronização, inseminação em tempo fixo, reprodução.

ABSTRACT

ESTROUS SYNCHRONIZATION AND EMBRYO COLLECTION IN NACIONAL SWINE

Priscilla Cristine Passoni Silva¹, Alexandre Floriani Ramos^{1,2}.

¹School of Agronomy and Veterinary Medicine - UnB, DF, ² Embrapa Genetic Resources and Biotechnology

This study aimed to evaluate consecutive embryos collections and estrus synchronization protocols in locally adapted breed swines, in the embryos quality and embryos recovery. In Chapter 2, animals (n = 30), of *Piau* race (n = 23) and *Moura* race (n = 7) underwent embryos collections, 14 of these animals were collected three times, 12 were collected twice and 4 were collected only once time. In Chapter 3, the *Piau* embryos donors (n = 9) were subjected to estrus synchronization protocols. All animals passed in three protocols: GP4 = 20 mg of oral progesterone (Altrenogest), 18 days; GGnRH = 20 mg of Altrenogest, 18 days, after 104 hours intramuscular application (IM) of 25 µg GnRH; GeCG+GnRH = 20 mg of Altrenogest (18 days), after 24 hours, IM administration of 1000 IU eCG, after 80 hours, GnRH IM application. From 24 hours after the last administration of P4, was used a boar to estrus detection. In two experiments, the embryos collection was realized six days after the first insemination and all the collections structures were analyzed. In Chapter 2, the recovery rate was similar between treatments (P>0.05). The number of CL, total structures, viable and freezable embryos and adherence degree, was significant difference between treatments (P<0.05). In Chapter 3, the time for the estrus manifestation was similar between treatments (P>0.05). The number of CL, anovulatory follicles, total

structures, viable embryos, freezable embryos and the recovery rate showed a significant difference between the GeCG+GnRH and the other treatments ($P < 0.05$). The pig embryos collection technique by laparotomy appear to be efficient to recover quality embryos until to the twice collection. All protocols were effective for synchronizing the estrus until seven days in gilts. However, the protocol GeCG+GnRH wasn't effective to recover embryos and hadn't beneficial effect in embryonic quality.

Keywords: embryo recovery, synchronization protocols, fixed-time insemination, reproduction.

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
Capítulo 1		
Figura 1.1	Ovário (porca) apresentando folículos maduros e corpos lúteos.	8
Figura 1.2	Trato reprodutivo da porca parcialmente aberto dorsalmente. Legenda: 1 , ovário esquerdo; 2 , tuba uterina; 3 , corno uterino; 4 , corpo do útero; 5 , cérvix; 6 , proeminências mucosas; 7 , vagina; 8 , vestíbulo; 9 , vulva.	9
Figura 1.3	Concentração plasmática de 17β -estradiol e progesterona (A); FSH, LH e inibina (B); desenvolvimento folicular e CL (C) durante o ciclo estral em suínos	12
Figura 1.4	Representação esquemática do cio da fêmea suína.	15
Figura 1.5	Representação esquemática do procedimento de ressecção.	25
Figura 1.6	Útero ressecionado.	25
Figura 1.7	Representação esquemática da cateterização uterina transcervical.	25
Figura 1.8	Esquema da coleta de embriões por endoscopia.	27
Figura 1.9	Esquema do procedimento seguido na coleta de embriões por laparotomia no segundo dia	28
Capítulo 2		
Figura 2.1	Frequência do grau de aderência nas coletas	48
Capítulo 3		
Figura 3.1	Representação esquemática dos tratamentos para sincronização do estro em porcas	64
Figura 3.2	Distribuição de densidades do tempo médio da manifestação de estro em marrão submetidas a protocolos contendo P4, eCG e GNRH para posterior coleta de embriões	67

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
Capítulo 2		
Tabela 2.1	Qualidade do sêmen dos reprodutores utilizados para cobertura das marrãs	44
Tabela 2.2	Valores médios e desvio-padrão ($x \pm s$) do número de corpos lúteos (CL), estruturas totais (Estru. Totais), embriões congeláveis (Emb. Cong.), taxa de recuperação embrionária (Tx de Rec) e grau de aderência ovariana e uterina em marrãs submetidas a coletas de embriões seriadas por laparotomia.	47
Capítulo 3		
Tabela 3.2	Valores médios e desvio-padrão ($x \pm s$) do número de corpos lúteos (CL), folículos anovulatórios (Fol. Anov.), estruturas totais (Estru. Totais), embriões viáveis (Emb. Viáveis), embriões congeláveis (Emb. Cong.), taxa de recuperação embrionária (Tx de Rec) e a formação de aderência em marrãs submetidas a protocolos de sincronização contendo P4, eCG e GNRH e posterior coleta de embriões	68

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

- > - Maior
- < - Menor
- % - Porcentagem
- ° - Graus
- °C - Graus Celsius
- µg – micrograma
- ANOVA – análise de variância
- BBGA - Banco Brasileiro de Germoplasma Animal
- CEUA - Comitê de Ética no Uso Animal
- CL - corpo lúteo
- cm - centímetros
- D-Phe6-LHRH - acetato de gonadorelina
- E2 - estrógeno
- eCG - gonodotrofina coriônica equina
- Emb. Cong. – Embriões congeláveis
- Emb. Viáveis – Embriões viáveis
- Estru. Inviá. – Estruturas inviáveis
- Estru. Totais – Estruturas totais
- FSH - hormônio folículo estimulante
- Fol. Anov. – Folículo anovulatório
- GnRH - hormônio liberador de gonadotrofina
- GeCG+GnrH – Grupo gonadotrofina coriônica equina mais hormônio liberador de gonadotrofina
- GGnRH – Grupo hormônio liberador de gonadotrofina
- GP4 – Grupo progesterona
- h - horas
- hCG - gonodotrofina coriônica humana
- IA - Inseminação artificial
- IETS - Sociedade Internacional de Transferência de Embriões
- IM - intramuscular
- IV - endovenoso
- LH - hormônio luteinizante
- m – metro
- mg - miligramas
- min - minutos
- mL - mililitros
- mm - milímetros
- n° - número
- P4 - progesterona
- PGF2 α - prostaglandina F2 α
- PBS - meio tampão fosfato salina
- PVC - policloreto de povinila
- SFB - Soro Fetal Bovino
- SOV - superovulação
- sptz - espermatozoide
- TE - transferências de embriões

Tx de Rec – Taxa de recuperação embrionária
UI - unidades internacionais
V - volume

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Por mais de dez anos, o Brasil se mantém na quarta colocação mundial em tamanho de rebanho e produção de carne suína, com uma estimativa de 419 milhões de cabeças (Anualpec, 2012). Nos últimos 17 anos houve um crescimento de 42,7% na produção de carne suína, passando de 78,2 milhões de toneladas em 1998 para 111,7 milhões de toneladas em 2012. Nesse período a população mundial suína cresceu apenas 7,1%, passando de 900 para 964 milhões cabeças (ABCS, 2014).

A competitividade do mercado nacional é alcançada com dois fatores: (1) disponibilidade de insumos básicos para a produção, principalmente grãos; (2) investimentos em tecnologia para melhoramento genético, também ocorrido, pela exportação de animais exóticos (Gonçalves & Palmeira, 2006). Com a introdução dessas raças especializadas, a maior parte do rebanho suíno nacional é gerado por mestiçagem ou por animais de linhagem comercial, levando as raças localmente adaptadas ao risco de extinção (Egito et al., 2002).

No início do século XXI, vivemos uma mudança na exigência do mercado consumidor, principalmente para a produção de alimentos humanos ou animais, onde há um aumento na procura por alimentos produzidos com pouca interferência no processo natural de crescimento e terminação, sendo possível manter o bem-estar animal, reduzindo o estresse da criação, e uso indiscriminado de medicamentos. Diante disso, tem-se a oportunidade para que o material genético de raças localmente adaptadas seja utilizado na produção para obtenção de animais mais rústicos e adaptáveis ao sistema de produção ao ar livre.

No Brasil, uma parcela da população rural utiliza raças localmente adaptadas, estando em um pequeno número de propriedades rurais em todo território. Esses animais são preferíveis a esses produtores, devido suas características de adaptação e rusticidade, além de serem menos exigentes na alimentação, terem fácil manejo, e sua carne apresentar

características organolépticas particulares. Com isso, os suínos localmente adaptados têm muito a somar para a suinocultura, promovendo equilíbrio entre produtividade e adaptabilidade (Castro, 2004).

Nos últimos 10 a 15 anos, houve um aumento na preocupação com a conservação desse material genético, pois esses genes ou suas combinações podem ser importantes, tendo em vista que o desenvolvimento e o progresso da produção animal, são dependentes dessa variabilidade (Mariante & Egito, 2002). Uma ferramenta para diminuir a perda desses animais é a conservação desses recursos genéticos, pois a existência de uma espécie depende de populações mínimas viáveis, e quando há a impossibilidade de ocorrer naturalmente, o manejo das populações é necessário para que seja proporcionada a garantia mínima de variabilidade genética e sua perpetuação (Costa & Martins, 2008).

Dentre as metodologias utilizadas para a conservação de recursos genéticos estão: (1) conservação *in situ* – baseia-se na implantação de núcleos de conservação nos locais de origem das raças; (2) conservação *ex situ in vivo* – na qual os animais são conservados fora do seu *habitat* natural; (3) conservação *ex situ in vitro* – utilização de técnicas criogênicas de armazenamento de material genético (Mariante et al., 2011).

Decorrente das dificuldades para implementação e manutenção dos programas de conservação *in situ*, as técnicas *ex situ* tem ganhado espaço, devido sua praticidade (Costa & Martins, 2008). Esta conservação por meio de bancos de germoplasma tem se mostrado uma alternativa imediata para a conservação de material genético (Hiemstra et al., 2005), pois podem armazenar as mais diversas formas celulares, como, gametas, embriões e células somáticas, por um longo tempo (Costa & Martins, 2008).

Os programas de conservação *ex situ* podem ser beneficiados por modernas técnicas de biotecnologias da reprodução, incluindo inseminação artificial (IA), superovulação (SOV), transferência de embriões (TE), produção *in vitro* de embriões, micromanipulação de gametas e embriões, sexagem de sêmen e embriões, e bancos de genoma (Andrabi & Maxwell, 2007). Consequentemente, o avanço nas técnicas de congelamento de sêmen suíno, desenvolvimento de protocolos de superovulação, e o avanço na técnica de coleta e criopreservação de embriões contribuem com o sucesso dos programas de conservação *ex situ* (Mariante et al., 2008).

A coleta de embriões para o Banco Brasileiro de Germoplasma Animal (BBGA) visa assegurar a conservação do material genético a longo prazo (Mariante et al.,

2011), pois criopreservação é uma alternativa para diminuir as limitações impostas pelo tempo (Costa e Martins, 2008). O germoplasma estocado nos bancos poderá ser utilizado para o restabelecimento de uma nova raça, para o desenvolvimento de um novo grupamento genético e para suporte de programas em conservação *in vivo* e melhoramento animal (Mariante, 2011).

Atualmente, o BBGA conta com um pouco mais de 85000 doses de sêmen de seis espécies e com 451 embriões criopreservados de quatro espécies, nos quais somente 1004 doses são de sêmen suíno e nenhum embrião suíno armazenado no banco (Ramos et al, 2014). Conforme os núcleos vão sendo ampliados e novos rebanhos identificados, pretende-se melhorar a representação do material genético estocado no BBGA, para obter um maior número de indivíduos, de modo a armazenar o máximo possível de diferentes materiais genéticos das raças em conservação (Egito et al., 2002).

1.1 Objetivo Geral

Avaliar eficiência da técnica de coleta de embriões e do uso de protocolos de sincronização do estro em marrãs da raça Piau submetidas à inseminação artificial em tempo fixo e coleta de embriões.

1.2 Objetivos Específicos

Avaliar eficiência de sucessivas coletas de embriões por laparotomia em suínos.

Avaliar o efeito de diferentes protocolos de sincronização de estro sobre o momento de manifestação de estro, a resposta ovulatória e a produção embrionária de porcas Piau.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Recursos genéticos de suínos localmente adaptados

A evolução dos animais domésticos tem sido moldada pelo homem no decorrer das décadas, sendo influenciada pela exportação, importação e estabelecimento desses materiais genéticos pelos continentes. Com a colonização da América, os portugueses e espanhóis trouxeram as raças ibéricas (Mariante & Egito, 2002), sendo que os primeiros exemplares de suínos representantes das raças portuguesas (Alejanta e Bísara), espanholas (Galega e Perijordina), italiana (Napolitana) e asiática (Macau) (Castro, 2004), a partir daí essas raças sofreram influência de inúmeros fatores e se desenvolveram durante os anos, dando origem as raças localmente adaptadas (Mariante & Egito, 2002), das quais eram ambientadas as condições climáticas, de manejo e sanitárias nos mais diversos habitats, apresentando características como rusticidade e resistência a parasitas e doenças (Mariante et al., 2011).

Essas raças foram usadas durante muito tempo, no entanto, no início do século XX, com a necessidade de aumentar a produção no Brasil houve a introdução de raças especializadas do tipo carne, como: Berkshire, Tamworth, Large White, Large Black, Wessex e Hampshire (Cavalcanti, 2000), sendo usadas em cruzamentos absorventes com as raças de suínos localmente adaptadas, em razão da sua menor produtividade. Embora as raças exóticas possuíssem boa produtividade, foram selecionadas em regiões de clima temperado, não apresentando aptidão às condições tropicais (Egito et al., 2002). Devido a impossibilidade de

criação de raças europeias em grande parte do sistema de produção, o grau de mestiçagem se tornou ainda maior (Silva Filha, 2008).

A partir desse cenário, a suinocultura brasileira pode ser dividida em três segmentos: (1) raças exóticas ou especializadas, este grupo é constituído de animais com maior interesse comercial, visto que, são empregados elevados níveis de tecnologia para obtenção de animais que atenda o mercado consumidor; (2) raças localmente adaptadas; (3) produto oriundos de cruzamentos exótico x raças localmente adaptadas, esse últimos, geralmente são criados mais em condições extensivas, na maioria das vezes, de subsistência familiar, tendo como característica animais mais rústicos e menos produtivos (Albuquerque et al., 1990).

Os suínos localmente adaptados que se encontram em risco de extinção, estão em sua maioria em propriedades para produção de carne e banha para o consumo familiar (Mariante et al., 2011).

Sendo assim, Egito et al. (2002) afirmam que as raças de suínos consideradas localmente adaptadas encontram-se em risco de extinção, entre elas as raças suínas Piau, o qual está mais concentrado na bacia do rio Parnaíba (sul de Goiás e o Triângulo Mineiro); o Nilo, de cor preta e sem cerdas; o Pirapetinga, a raça mais longilínea de todas as naturalizadas; o Canastra, do tipo ibérico, que possui, provavelmente, uma grande influência da raça portuguesa do Alentejo; o Caruncho, que apresenta pelagem semelhante ao Piau, porém de porte menor; o Canastrão, do tipo céltico, que descendem da raça portuguesa Bizarra e o suíno Moura ou Pereira, o qual originou-se provavelmente do cruzamento entre as raças Canastrão, Canastra e Duroc.

2.2 Morfologia reprodutiva da fêmea suína

2.2.1 Anatomia

Os ovários de suínos apresentam morfologia ovóide com a superfície apresentando proeminências arredondadas, parecendo um cacho de uvas, medindo entre quatro e cinco centímetros (cm) de comprimento, contendo projeções que correspondem a

grandes folículos e a corpos lúteos (Sisson et al., 1986; Upnomoor, 2000). São diferentes devido aos vários folículos e corpos lúteos em sua superfície (Figura 1.1) (Dyce et al., 2010), estando ocultos na bolsa ovariana devido ao grande tamanho da mesosalpinge (Sisson et al., 1986).

A tuba uterina mede aproximadamente 20 cm de comprimento (Figura 1.2 - 2) (Sisson et al., 1986; Dyce et al., 2010). O útero suíno apresenta várias características distintas (Sisson et al., 1986), possui um corpo curto (Figura 1.2 - 4) e cornos longos em formato de alças intestinais (Figura 1.2 - 3), medindo, respectivamente, 5 cm e entre 1 – 1,5 metro (m) de comprimento, no estado não gravídico (Sisson et al., 1986; Kobayashi et al., 1989; Dyce et al., 2010). São móveis devido à grande extensão dos ligamentos largos. Estão dispostos em várias espirais e assumem semelhança com um intestino delgado de paredes espessas (Sisson et al., 1986), o que justifica a necessidade de um maior volume de ejaculado para garantir a chegada dos espermatozoides na tuba uterina (Upnomoor, 2000).

A cérvix é distinta das demais espécies devido as suas proeminências mucosas e pelo seu comprimento, cerca de 25 cm (Figura 1.2 - 5). A vagina não apresenta alterações marcantes (Dyce et al., 2010), pode medir aproximadamente 11 cm e sua mucosa é pregueada (Figura 1.2 - 7) (Sisson et al., 1986). O vestíbulo é longo (Dyce et al., 2010), possuindo entre 7 e 12 cm de comprimento (Upnomoor, 2000).

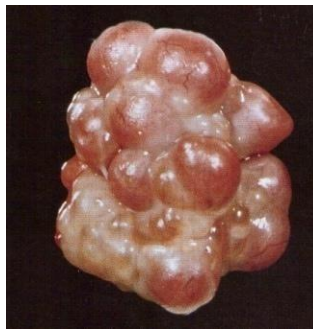


Figura 1.1: Ovário (porca) apresentando folículos maduros e corpos lúteos (Dyce et al., 2010)

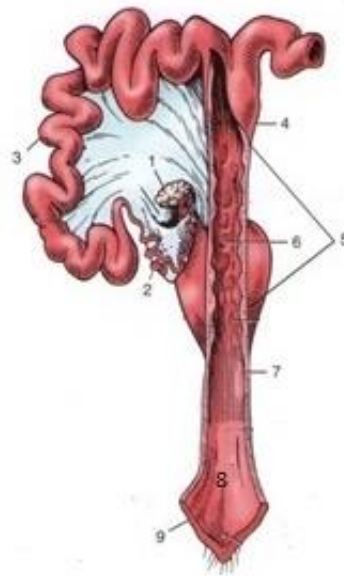


Figura 1.2: Trato reprodutivo da porca parcialmente aberto dorsalmente. Legenda: **1**, ovário esquerdo; **2**, tuba uterina; **3**, corno uterino; **4**, corpo do útero; **5**, cérvix; **6**, proeminências mucosas; **7**, vagina; **8**, vestíbulo; **9**, vulva (Dyce et al., 2010 - modificado).

2.2.2 Ciclo reprodutivo da porca

As fêmeas suínas entram na puberdade com aproximadamente 170-180 dias de idade (Upnomoor, 2000; Cassar, 2009), porém a puberdade está mais ligada ao peso corpóreo do que a idade, pois chegam a puberdade quando alcançam de 50-70% do peso da raça. Às vezes, os sinais não são aparentes, formando, assim, um estro silencioso que muitas vezes não ocorre a ovulação (Upnomoor, 2000). Elas são poliéstricas anuais, ou seja, ovulam mais de um ovócito e apresentam estro durante o ano todo, sendo que sua ciclicidade é interrompida apenas por disfunções endócrinas, gestação ou patologias (Anderson, 2004).

O ciclo reprodutivo da fêmea suína é caracterizado por uma fase lútea e uma fase folicular, durando em torno de 21 dias, podendo variar entre 19 a 23 dias (Cox, 1997; Upnomoor, 2000; Anderson, 2004; Cassar, 2009). Não há qualquer eminência de ondas foliculares em suínos durante a fase luteal, pois ocorre um crescimento contínuo dos folículos mesmo sem ter o surgimento de um folículo dominante ou de uma onda folicular (Dalín, 1987; Dalín et al., 1995; Guthrie & Cooper, 1996; Evans, 2003).

Antes da puberdade a maioria dos folículos são primordiais, onde ficam em repouso até que recebam um estímulo para continuar o seu crescimento. O crescimento inicial é controlado por fatores de crescimento ovarianos locais (Prunier & Quesnel, 2000), como o fator de crescimento epidermal, fator de crescimento semelhante à insulina, gonadotrofinas, ativina e estrógeno (17- β estradiol) (E2) (Cox, 1997).

Ao término da fase de crescimento, os folículos primordiais são ativados e iniciam o seu desenvolvimento gradativamente (Prunier & Quesnel, 2000), ou seja, quando o folículo alcança o tamanho de 0,4 mm ocorre a formação do antro, e este começa a depender de gonadotrofinas (Foxcroft & Hunter, 1985; Prunier & Quesnel, 2000).

O crescimento final do folículo (1-4 mm) ao tamanho ovulatório (6-10 mm) é muito rápido e requer cerca de quatro a seis dias, e, por conseqüente, ocorre o aumento no volume do antro, diferenciação das células foliculares e aumento na secreção de inibina e estradiol, assim como o aparecimento de receptores de hormônio luteinizante (LH) nas células da granulosa (Prunier & Quesnel, 2000). Durante o desenvolvimento dos folículos antrais, o oócito secreta fatores que estimulam a proliferação e a diferenciação das células da granulosa de suínos, ocasionando a diminuição da produção de progesterona (P4), o que impede a luteinização prematura (Hunter & Pardis, 2009).

O crescimento folicular é controlado por um sistema de feedback positivo e negativo dos hormônios reprodutivos que são sintetizados e liberados pelo hipotálamo – hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH); pela hipófise – hormônio folículo estimulante (FSH), LH, ocitocina e prolactina; pelos ovários – progesterona, E2, inibina e relaxina e pelo útero – prostaglandina F2 α (PGF2 α) (Soede et al., 2011).

O GnRH controla a síntese e excreção do LH pelas células hipofisárias, sendo liberado de forma pulsátil influenciado por fatores neuropeptídios (opióides endógenos, serotonina, catecolamina, aminoácidos excitatórios) de origem intra e extra-hipotalâmica, que permitem ao animal se integrar a influências fisiológicas (idade, metabolismo, saúde) e ao meio ambiente (temperatura, luz, nutrição, estresse) (Cox, 1997; Cassar, 2009).

Outro hormônio sintetizado pela hipófise é o FSH, que também está sob controle positivo do GnRH e sob efeito negativo da inibina de origem folicular sobre a hipófise. Entretanto, as variações da pulsatividade do LH e do FSH são diferentes na fêmea suína, no entanto, a concentração de FSH está alta quando os ovários se encontram quiescentes e diminuiu quando os folículos antrais tornam-se mais numerosos e diferenciados

(Prunier & Quesnel, 2000). Essa redução na concentração se dá por cerca do 15º dia do ciclo estral (Knox et al., 2003). Os padrões de FSH foram ligados a atresia folicular, em suínos, pois com a queda das concentrações de FSH há um aumento na atresia folicular (Cox, 1997).

Esteróides ovarianos exercem grande influência no eixo hipotalâmico-hipofisário, onde a progesterona interfere negativamente e o estrógeno exerce um feedback negativo sobre a secreção de FSH. Entretanto, quando as concentrações são altas, o estradiol pode exercer feedback positivo para provocar o pico de LH pré-ovulatório (Prunier & Quesnel, 2000). Esse estradiol é secretado com uma colaboração das células da teca e da granulosa do folículo (Knox, 2005; Cassar, 2009).

No início da fase lútea, logo após a ovulação, a concentração periférica de P4 e a quantidade de folículos antrais nos ovários são mínimas, devido a altas concentrações de E2 e inibina antes da ovulação, que diminuem à medida em que a ovulação ocorre. Essa diminuição faz com que o feedback negativo exercido sobre o FSH também reduza. Portanto, as concentrações periféricas de FSH aumentam nos dois primeiros dias após a ovulação, o que induz uma onda de crescimento folicular, e por consequente, o aumento dos folículos de tamanho pequeno e médio, aumentando a produção de inibina por esses folículos, o que em seguida, reduz as concentrações periféricas de FSH (Knox, 2005).

O desenvolvimento de corpos lúteos (CL) produz quantidades crescentes de P4, que atingem uma concentração máxima oito a nove dias após a ovulação, e também modulam a secreção de gonadotrofinas. O número de folículos antrais aumenta por volta do dia 9, porém o diâmetro folicular permanece pequeno, resultando em uma concentração mínima ou nenhuma concentração de E2 periférico (Knox, 2005), conforme Figura 1.3.

A fase folicular dura em torno de quatro a seis dias e é caracterizada pelo desenvolvimento de folículos antrais que são dependentes de LH e um aumento na atresia de folículos pequenos e médios, por não apresentarem receptores de LH (Lucy et al., 2001; Guthrie, 2005).

Aproximadamente no dia 12 do ciclo estral começa a luteólise e as concentrações periféricas de P4 caem (Figura 1.3 – A), seguido de um aumento no número de folículos pequenos (Figura 1.3 – C), e um aumento da produção de inibina por esses folículos. Assim, no começo da luteólise, o *pool* de folículos antrais estão sofrendo maturação, mesmo com altas concentrações periféricas de P4 (Soede et al., 2011).

Quando a luteólise é completada e as concentrações periféricas de P4 tem uma queda (aproximadamente no dia 15 do ciclo estral), os folículos grandes (>6mm) são desenvolvidos nos ovários, o que auxilia para o aumento das concentrações periféricas de E2 (Figura 1.3 – A), esse aumento de E2 tem um efeito de feedback negativo no hipotálamo, diminuindo a produção de GnRH, e por consequente, de FSH (Noguchi et al., 2010), o que leva a atresia de folículos pequenos que não desenvolveram receptores de LH e dependem do FSH para se desenvolver (Lucy et al., 2001).

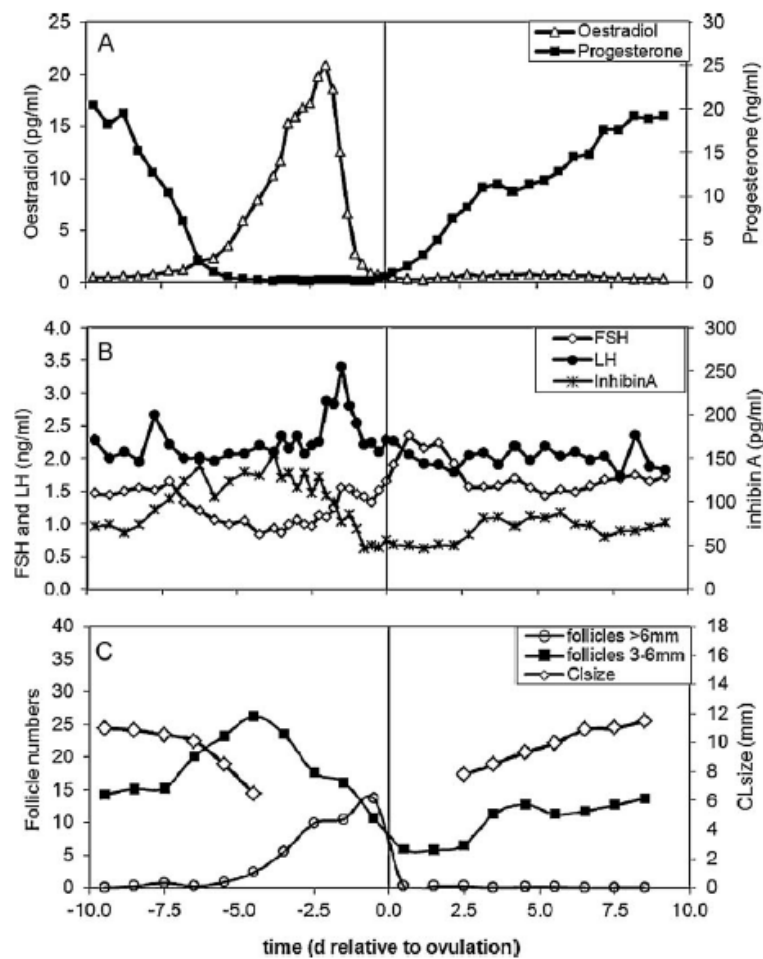


Figura 1.3 Concentração plasmática de 17β -estradiol e progesterona (A); FSH, LH e inibina (B); desenvolvimento folicular e CL (C) durante o ciclo estral em suínos (Soede et al., 2011).

Durante o período de seleção folicular, o LH pulsátil e o FSH diminuem gradativamente as suas concentrações até ficarem quase indetectáveis. Nesse período, a produção de E2 dos folículos pré-ovulatórios atingem seu máximo (Prunier et al., 1987; Noguchi et al., 2010), no entanto, esse *pool* de folículos não é homogêneo, pois consiste em

folículos pequenos e grandes com diferentes perfis endócrinos (Hunter & Wiesak, 1990). Um aumento periférico na concentração de E2 induz o surgimento do pico de LH, causado por feedback positivo do E2. O surgimento do pico de LH inicia as mudanças foliculares resultando na ovulação e luteinização da parede ovariana, resultando no aumento de P4. Após a ovulação as concentrações periféricas de E2 declinam (Soede et al., 1994).

A população de folículos aumenta seu crescimento entre os dias 14 e 17 do ciclo estral (Foxcroft & Hunter, 1985; Ryan et al., 1994; Cox, 1997). Ryan et al. (1994) relatam que a porcentagem de folículos maiores que 5 mm aumentou 6% nos dias 16-19, e 12% no dia 20. O número de folículos grandes (> 6,9 mm) aumenta a partir do dia 15, atingindo seu tamanho máximo próximo ao dia do estro (dia 0). Durante este mesmo período o número de folículos pequenos e médios vão diminuindo (Knox, 2005). Entretanto, cerca de 40 a 50% dos folículos antrais de tamanho médio morrem por atresia entre o dia 16º dia e o estro. Após este período, os folículos dominantes continuam o crescimento em direção ao estágio de folículos pré-ovulatórios (Cox, 1997).

Mudanças nos hormônios reprodutivos interferem na qualidade do folículo e posteriormente na sobrevivência embrionária, por exemplo, uma menor amplitude do pico de LH pode resultar em ovários císticos ou inadequada luteinização da parede do folículo (Soede et al., 2011).

O intervalo entre o início do estro e a ovulação é bastante variável em suínos, podendo durar entre 10 horas e 60 horas em diferentes fêmeas (Kemp et al., 1998). A ovulação geralmente ocorre no terço final do período do estro (Soede et al., 1995). Soede & Kemp (1997) realizaram um estudo em que demonstraram que a duração do estro pode variar entre 24 e 96 horas. Contudo, um estudo realizado por Benneman et al. (2005), demonstra que, em média, as porcas ovulam 42,1 horas após o início do estro. Logo, o estro não pode servir como um bom parâmetro para determinar o momento preciso da ovulação (Soede & Kemp, 1997; Upnomoor, 2000), pois as variações entre os diferentes eventos do estro (aceitação ao cachaço, pico de estrógeno e LH) propõem que o momento da ovulação pode variar (Weitze et al., 1990).

O folículo geralmente ovula quando chega a um diâmetro de 6 – 8 mm, mas esse tamanho pode ser influenciado por fatores como desmame e tratamentos com altrenogest (Van Leeuwen et al., 2010).

A fecundação ocorre na transição da ampola para o istmo da tuba uterina. O zigoto desce para o interior do corno uterino com o auxílio de movimentos ciliares da mucosa uterina, que faz com que o zigoto caia no corno uterino nos estádios de 2 a 4 células em seu desenvolvimento (Anderson, 2004).

O desenvolvimento embrionário ocorre no corno uterino, onde o embrião irá mudar morfológicamente, antes da implantação no útero (Anderson, 2004). A partir da clivagem, cerca de 48 horas após a fecundação os embriões estão na fase de quatro células (Scheid & Wentz, 1993) e ao redor do dia cinco chegam ao estágio de mórula. A formação do blastocisto ocorre entre os dias seis e oito. No sexto dia acontece a saída parcial do embrião da zona pelúcida, descrito como eclosão. Este fato se dá quando os blastocistos chegam a um tamanho de 150 células ou mais. Os embriões são distribuídos irregularmente nos dois cornos uterinos, sem sobreposição de suas membranas (Anderson, 2004).

No intervalo entre os dias 9 e 18, os fetos crescem de forma exponencial. No dia 13, eles completam o processo de alongamento para a forma filamentosa, podendo exceder 60 cm. Os blastocistos permanecem livres e migrando no corno uterino até a sua implantação, que ocorre, normalmente, entre 13º ao 18º dia de gestação (Scheid & Wentz, 1993; Anderson, 2004).

2.3 Comportamento estral e manejo reprodutivo da fêmea suína

Somente a partir de uma detecção criteriosa do estro é que podemos determinar o melhor momento para realizar a inseminação artificial ou a monta natural. O estro é o período onde a fêmea deixa ser coberta. Conforme o estro se aproxima a vulva se torna hiperêmica e aumenta o volume. Outros sinais também são característicos de estro, tais como inquietação, tentativa de montar em outra fêmea, perda de apetite, secreção mucosa e abundante e presença do reflexo de monta, isto é, ficam imóveis ao se pressionar a região lombar (Figura 1.4) (Signoret, 1970; Scheid & Wentz, 1993; Upnomoor, 2000). As porcas mantêm os membros pélvicos afastados, orelhas eretas e cabeça baixa e permanecem quietas quando pressionado a região lombar (Signoret, 1970; Scheid & Wentz, 1993; Woloszyn, 2005).

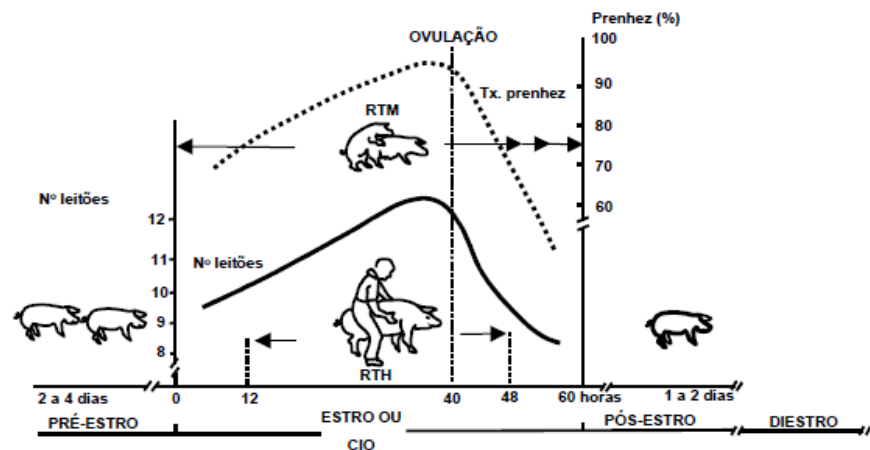


Figura 1.4: Representação esquemática do estro da fêmea suína. Legenda: RTM, Reflexo de tolerância ao macho; RTH, Reflexo de tolerância ao homem (Scheid & Wentz, 1993).

Uma boa observação e registro dos estros são pontos importantes para que se possa definir o melhor momento na realização da monta natural ou da inseminação artificial (Scheid & Wentz, 1993; Woloszyn, 2005). Para isto, deve-se colocar um cachaço, duas vezes ao dia, com um intervalo mínimo de 8 horas, por 20 minutos (min), e observar se apresentam características de estro e reflexo de monta. Deve-se fazer o rodízio de machos para evitar que as fêmeas criem interesse em apenas um. Não permitir contato direto ou indireto das leitoas com algum macho antes de completarem os cinco meses, e não os alojar perto das leitoas são cuidados importantes a serem tomados. Anotar o dia de estro em uma ficha para prever a data de cobrição torna-se essencial. Se não for feito, criteriosamente, podem comprometer o desempenho reprodutivo do rebanho. (Koutsotheodoros et al., 1998; Amaral et al., 2006).

Woloszyn (2005) e Amaral et al. (2006) fazem as seguintes recomendações para o manejo no acasalamento: adotar duas montas por porca. A primeira monta deve ser feita 12 horas após a detecção de estro; a segunda monta 12 horas após a anterior; e essas devem ser feitas nas horas mais frias do dia. Deve-se conduzir a fêmea e o macho para uma baia de cobrição, evitando ao máximo o estresse. Tanto a fêmea quanto o macho devem estar limpos antes de realizarem a cópula e o examinador deve acompanhar a monta do começo ao fim, auxiliando na introdução do pênis, se preciso. Após o acasalamento deve-se manter a fêmea em ambiente calmo.

2.4 Controle do ciclo estral

A sincronia do plantel facilita o manejo reprodutivo, pois uma homogeneidade no momento do estro, tem por consequente, uma sincronização do momento da inseminação e, futuramente, dos partos (Pinese, 2005; Wentz et al., 2007). O uso de fármacos no ciclo estral em suínos tem como finalidade a sincronização do estro à puberdade em marrãs, e a sincronização do estro para o emprego de inseminação artificial em tempo fixo (Kirkwood et al., 2000; Wentz et al., 2007; Tummaruk et al., 2011; Moretti et al., 2013).

Os mais conhecidos e utilizados hormônios que permitem o controle do ciclo estral são a gonadotrofina coriônica equina (eCG), a gonadotrofina coriônica humana (hCG), o GnRH e seus análogos, a PGF2 α e seus análogos e os progestágenos (Tummaruk et al., 2011; Moretti, 2013).

O controle do ciclo estral em suínos foi feito inicialmente com o uso de um inibidor de gonadotrofina pituitária (methallibure) (Brüssow et al., 1990; Brüssow et al., 1996), no entanto, foi proibido em diversos países devido ao seu efeito teratogênico (Brüssow & Wähner, 2011), e foi mais tarde substituído por altrenogest, uma progesterona, que seguiu com tratamentos com eCG, hCG e GnRH (Brüssow et al., 1990; Brüssow et al., 1996).

A aplicação hormonal pode ser feita associado com o manejo de indução, por meio do estímulo de um macho (Hughes et al., 1997). Quando o último é utilizado separadamente pode não haver eficácia, pois marrãs muito jovens não são capazes de responder rapidamente ao estímulo do macho (Hughes et al., 1997; Mellagi, 2011).

Para que a exposição a um cachaço seja eficaz tem que ser observado a idade do cachaço, o tempo e a frequência de exposição e a alternância dos reprodutores para não ocorrer predileção das fêmeas (Hughes et al., 1997; Woloszyn, 2005; Amaral et al., 2006), o mesmo deve ser mantido, pelo menos, por 30 minutos diariamente com as fêmeas (Hughes et al., 1997). Com a presença do macho os feromônios atuam aumentando as concentrações de LH, e em consequência, os ovários respondem produzindo E2 (Evans & O'Doherty, 2001).

2.4.1 Progestágeno (Altrenogest)

Em sistema de suinocultura, o estro é naturalmente sincronizado pelo desmame, porém o ciclo estral das leitoas precisam ser sincronizados quando entram no sistema da granja. Para esse efeito, protocolos de sincronização com uso de um progestágeno para supressão do desenvolvimento folicular e/ou imitando a fase lútea têm sido desenvolvidos (Brüssow & Wähner, 2011).

Um progestágeno sintético (altrenogest), de via oral, que foi testado nos anos 70, onde ficou comprovado a sua eficácia no controle do estro e ovulação (Stevenson & Davis, 1982; Wentz et al., 2007), atualmente é a única substância com efeito de progesterona que podem ser usadas em suínos na América e na Europa (Brüssow & Wähner, 2011).

Possui indicação para o controle do ciclo estral, principalmente na sincronização de estro em leitoas cíclicas e fêmeas pós-desmame. Sua administração inibe a liberação de gonadotrofinas pela hipófise, adiando o início da fase folicular e mantendo a fêmea em anestro pelo período desejado, havendo retorno a ciclicidade após suspensão do tratamento (Stevenson & Davis, 1982; Wentz et al., 2007; Sommer et al., 2007).

Tem sido utilizado em granjas suínas que utilizam o sistema de produção em grupos de cobertura e parição, facilitando as atividades de manejo relacionadas ao diagnóstico de estro e protocolos de inseminação (Wentz et al., 2007).

Os tratamentos consistem na administração de 15 a 20 miligramas (mg) do progestágeno, durante 15 ou 18 dias, e tem sido usado com sucesso para sincronizar os animais, aumentando o desempenho reprodutivo e a fertilidade em marrãs (Martinat-Botté et al., 1990; Ashworth et al., 1992; Brussow et al., 1996; Kauffold et al., 2007). O uso de Altrenogest por 15 dias é eficaz, no entanto foi observado, em estudos, que aos 15 dias, alguns animais ainda possuíam CL, não sendo o suficiente para que os hormônios endócrinos realizassem regressão do CL, quando o mesmo é administrado por 18 dias resulta numa melhor sincronização, pois os animais não apresentam mais CL (Stevenson & Davis, 1982; Martinat-Botté et al., 1990; Kauffold et al., 2007).

Quando comparado a quantidade de P4 administrada diariamente, Martinat-Botté et al. (1990) e Kauffold et al. (2007) relataram que o uso de 15 mg de P4 resulta em maior ocorrência de ovário policísticos quando comparado com administrações de 20 mg por

dia, fato esse justificado pela dosagem submínima do hormônio, podendo então ter uma falha no bloqueio do crescimento folicular, durante a administração da P4.

Estudos demonstram que após suspensão do uso do Altrenogest, os animais apresentam estro em até sete dias (Ashworth et al., 1992; Martinat-Botté et al., 1990; Martinat-Botté et al., 1995; Koutsotheodoros et al., 1998; Cassar, 2009). Martinat-Botté et al. (1990) verificaram que mais de 95% das leitoas tratadas com Altrenogest apresentaram estro entre 4 a 7 dias após o fim do tratamento, e descreve que o protocolo com Altrenogest melhorou a taxa de parição. Martinat-Botté et al. (1995) obtiveram 93% de estro e 94.2% de taxa de prenhez quando os animais foram sincronizados com o Altrenogest e Koutsotheodoros et al. (1998) afirmam que o uso de P4 exógena para sincronização aumenta o número de embriões viáveis coletados.

Apesar da sincronização do estro em marrãs cíclicas ser possível com o uso do Altrenogest, o estro é manifestado em um período de uma semana, possivelmente por diferenças no desenvolvimento folicular entre os animais. Com isso, as gonadotrofinas podem ser uma boa ferramenta para estimular o desenvolvimento folicular e conseguir uma melhor sincronização (Brüssow et al., 2009; Brüssow & Wähler, 2011).

2.4.2 Gonadotrofina coriônica equina (eCG)

As gonadotrofinas são produzidas nos lobos anteriores da hipófise e lá armazenadas. Fisiologicamente o FSH e o LH promovem o crescimento folicular e a ovulação, respectivamente. O desenvolvimento de drogas que simulam essa ação é muito antigo e sempre foi recomendado para induzir o estro em fêmeas suínas (Wentz et al., 2007). A resposta a gonadotrofinas exógenas pode depender de fatores como genótipo e nutrição (Martinat-Botté et al., 1990).

O eCG é um hormônio glicoproteico produzido pelos cálices endometriais de éguas, entre os dias 40 e 120 de gestação, com meia-vida de aproximadamente 46 horas. Possui atividade para FSH e LH, com dois sítios de ligação para os receptores de FSH (62,4%) e LH (27,2%), sendo que a sua atividade semelhante ao FSH é maior que a atividade do LH (Lecompte et al., 1998; Murphy & Martinuk, 1991; Brüssow et al., 2009). Em suínos,

é usado para auxiliar o reinício da atividade ovariana, estimulando o crescimento folicular, o estro e a ovulação (Dial et al., 1984; Wentz et al., 2007), principalmente quando é aplicado após tratamentos com progestágenos (Wentz et al., 2007).

Frequentemente o eCG é utilizado em associação com o hCG (Estienne & Hartsock, 1997; Huang et al., 2002; Rensis et al., 2003), seja uma dose única com associação dos dois hormônios (PG600® - 400 UI para eCG e 200 UI de hCG) (Estienne & Hartsock, 1997; Rensis et al., 2003) ou a aplicação do eCG e após 72 a 80 horas aplicação de hCG (Besenfelder et al., 1997; Huang et al., 2002; Fujino et al., 2006;). Essa associação, quando não se faz o uso de um progestágeno, é usada principalmente no manejo reprodutivo de porcas desmamadas (Estienne & Hartsock, 1997; Rensis et al., 2003).

Herrman et al. (1981) induziram o desenvolvimento folicular com PG600, e após 58 horas induziu a ovulação com 500 UI de hCG, e esperaram que a ovulação ocorresse entre 40 e 42 horas após. Foi observado que todos os animais manifestaram estro, obtendo um total de $15 \pm 9,1$ ovulações.

Sommer et al. (2007) também utilizaram o composto PG600 para sincronizar o estro de porcas cíclicas, sem o uso de progestágeno, porém com o dia do ciclo estral já pré-determinado. Para a sincronização foi injetado IM 4 mL de PGF2 α e após 24 horas administrado 7,5 mL PG600® mais 4 mL de PGF2 α , seguindo de 750 ou 1000 UI de hCG 24 horas após, não foi observado estro, mas todos os animais tiveram mais de uma estrutura coletada, demonstrando que os protocolos foram eficazes para sincronizar a ovulação.

Schlieper & Holtz (1997) sincronizaram porcas em miniatura com o uso de um progestágeno oral (Oxolven) por um período de duas a três semanas. Um dia após a última aplicação do progestágeno as porcas receberam meia dose de PG600® (200 UI de eCG e 100 UI de hCG), após 56 horas fez mais uma aplicação de 250 UI de hCG, para ser realizado coleta de embriões, dos 39 animais tratados, 2 apresentaram estro muito tarde e 4 não apresentaram estro, os demais apresentaram estro até 7 dias após a última dosagem do progestágeno. Os animais obtiveram uma média de ovulação de $17,3 \pm 3,9$ CL.

Besenfelder et al. (1997) sincronizaram porcas pré-púberes e marrãs cíclicas para serem coletadas embriões. Foi realizada a administração de eCG 24 horas após o último dia do uso do Altrenogest (por 15 dias) e 72 horas após injetou hCG. Duas inseminações foram realizadas num período de 24 a 36 horas após o uso do hCG. Não foi realizado a

deteção de estro, no entanto todos os animais apresentavam entre 5 e 21 CL, no momento da coleta de embriões.

Fujino et al. (2006) e Wallenhorst & Holtz (2002) sincronizaram porcas pré-púberes, para coleta de embriões, com 1500 UI de eCG e após 72 horas usou 500 UI de hCG, utilizando duas inseminações as 24 e 40 horas após a administração do hCG, enquanto Wallenhorst & Holtz (2002) inseminaram com 36 e 48 horas após a aplicação do mesmo. E mais de 90% dos animais demonstraram estro e foram inseminados.

Aleixo et al. (1995) testaram a eficiência do eCG, injetando 750 UI, para crescimento folicular em porcas em fase final de terminação, quando os animais foram abatidos. O estudo não observou a manifestação de estro nos animais, porém no abate, todos os animais em que foi aplicado o eCG apresentavam um média de $25,9 \pm 22,2$ CL.

Um estudo realizado por Baker & Coggins (1968) avaliou o efeito de diferentes doses de eCG (250, 500, 1000 ou 2000 UI) na taxa de fertilização em leitoas pré-púberes. Os animais em que foram aplicados 500, 1000 e 2000 UI apresentaram inchaço e vermelhidão na vulva 48 horas após a aplicação do hormônio, e os dois últimos também demonstraram interesse no macho no momento da inseminação. Todos os tratamentos foram eficazes em promover embriões viáveis nas fêmeas (44%, 34%, 39% e 54%, respectivamente) e sincronização de estro. As doses de 1000 e 2000 UI também resultaram em superovulação.

Kauffold et al. (2007) demonstram que uma dose de 800 UI de eCG é eficaz para estimular o crescimento folicular sem que haja superovulação, no entanto Wollenberg et al. (1990) usaram a mesma dosagem em porcas pré-púberes e obtiveram resultado de superovulação (46 ± 26 ovulações por porca).

Hazeleger et al. (2000) sincronizaram porcas doadoras de embriões com 1000 ou 1500 UI de eCG, para avaliar o desenvolvimento embrionário em embriões coletados no dia 7 de gestação. A maioria dos animais (90%) ovularam entre 36 e 48 horas. A taxa de ovulação nas porcas em que foram injetadas 1500 UI de eCG foi maior do que as porcas em que foram injetadas 1000 UI de eCG, sendo encontrados $28,5 \pm 11,7$ e $45,7 \pm 20,3$ CL, respectivamente.

Em outro estudo realizado por Rátky et al. (2001) também foram avaliadas diferentes doses de eCG (750 UI, 1000 UI, 1250 UI) na resposta ovariana. Essas doses foram aplicadas 24 horas após a última dosagem de Altrenogest (15 dias), e após 80 horas da aplicação do eCG foi aplicado 750 UI de hCG, para uso de inseminação em tempo fixo e

posteriormente coleta de embriões. Também não foi realizado o manejo de detecção de estro neste experimento, no entanto, todos os animais em que foi administrado as diferentes dosagens de eCG apresentaram mais de dez CL no momento da coleta de embriões.

2.4.3 Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH)

O GnRH pode ser dividido em dois grupos quando se fala de sua origem: GnRH natural e os análogos de GnRH (sintéticos). Alguns GnRH sintéticos são 20 vezes mais efetivos do que a gonadorelina e, possuem uma meia vida maior (Zapletal & Pavlik, 2008). O GnRH análogo agirá na glândula pituitária estimulando a liberação de LH endógeno, diferentemente do hCG que age nos receptores de LH, e assim, induzindo a ovulação (Brüssow et al., 2009; Martinat-Botté et al., 2010).

Alguns análogos de GnRH têm sido testados na indução da ovulação e são o acetato de gonadorelina (Brüssow et al., 1990; Brüssow et al., 1996; Kauffold et al., 2007; Fries, 2010a) e buserilina (Martinat-Botté et al., 2010).

A duração do estro quando usado GnRH análogo é mais curta quando comparado aos animais sem tratamento hormonal, o que gera também maior sincronia entre os animais, principalmente, 40 horas após o início do estro, onde 70,9% dos animais ovularam enquanto apenas 48,2% dos animais do grupo controle havia ovulado (Fries et al., 2010a)

Segundo Brüssow et al. (1990), leitoas tratadas com 10 µg de acetato de gonadorelina (D-Phe6-LHRH) 80h após a aplicação de 1000UI de eCG começaram a ovular $35,5 \pm 2,7$ horas após o tratamento e, em média, terminaram a ovulação $5,9 \pm 1,7$ horas mais tarde. Entretanto, os animais variaram nas respostas ao análogo de GnRH, sendo estas variações relacionadas ao intervalo entre a aplicação do hormônio e o pico de LH, pois cada marrã apresenta variação individual ao tratamento. Nesse mesmo estudo, foi avaliado a concentração de LH após a aplicação do GnRH e nota-se que em uma a duas horas após a aplicação a concentração de LH começou a elevar, tendo seu pico, duas a quatro horas após do GnRH. Essa alta concentração durou até seis a oito horas e o intervalo entre o aumento do LH e a ovulação durou entre 34,5 e 39,5 horas.

A sincronização estral e a resposta embrionária aos tratamentos com GnRH e hCG foram testados por Brüssow et al., (1996) e Kauffold et al. (2007), e não tiveram diferença significativa entre os tratamentos no número de CL. Porém o GnRH se mostrou mais eficaz quando visto a taxa de concepção. Parece haver uma melhor sincronia da ovulação quando os animais são tratados com GnRH, pois tendem a ovular mais frequentemente entre as duas inseminações (28% GnRH vs 11% hCG) (Kauffold et al., 2007), e assim, encurtando o tempo de ovulação (36 a 40 horas hCG vs $31,2 \pm 3,3$ horas GnRH) (Brüssow et al., 1996).

Martinat-Botté et al. (2010), avaliaram os diferentes momentos para aplicação do GnRH em suínos cíclicos, observaram que os animais em que o GnRH foi aplicado 104 horas após a última administração de P4 apresentaram estro e ovularam mais cedo que os animais em que foi aplicado 120 horas e do grupo em que não teve aplicação de GnRH. Esses autores ainda demonstraram que as concentrações de P4 plasmático aumentam após 144 horas quando os animais são tratados com promotores de crescimento como eCG e GnRH.

Em outro estudo realizado por Brüssow et al. (1996) avaliou as concentrações plasmáticas de LH em leitoas sincronizadas com Altrenogest + eCG + GnRH. O sangue foi coletado 1, 2, 3, 4, 6, 8,10, 12,14,16 e 22 h após a aplicação do GnRH. A ovulação foi detectada por exame laparoscópio com intervalo de 6 horas de cada exame. O tratamento resultou no aumento nas concentrações de LH, durando por 4,96 horas, e um pico de 11.09 ng/mL.

Os análogos de GnRH são efetivos na indução da ovulação (Fries et al., 2010b). Com o uso do GnRH os animais costumam a ovular em média 38 horas após a aplicação (Brüssow et al., 1990; Tummaruk et al., 2011), no entanto, há um número considerável de fêmeas que ovulam 48 horas após a aplicação do GnRH, o que pode não ser desejável na adequação de um protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (Fries et al., 2010b).

O uso de GnRH análogo, sem a associação com outro promotor de crescimento, pode fazer com que a duração do estro e a fertilidade seja menor, do que quando comparado com animais que foram sincronizados associando eCG. (Martinat-Botté et al., 2010).

2.5 Coleta de embriões

No útero, os embriões se desenvolvem rapidamente e mudam de forma antes da implantação. Estes podem ser coletados em diferentes estádios de desenvolvimento, no qual embriões de uma ou duas células podem ser coletados na tuba uterina um a três dias após a ovulação e embriões em estágio de mórula ou blastocisto podem ser coletados no corno uterino entre o dia seis a oito de gestação (Kobayashi et al., 1988; Pereira et al., 1991; Brüßow et al., 2000; Dobrinsky, 2001; Medeiros, 2005; Paula et al., 2008). Estudo demonstra que quando os animais são coletados 140 horas após a primeira inseminação, embriões no estágio com 8 células ou mórulas são mais frequentes, e quando a coleta é realizada 144 horas após a primeira inseminação há um aumento de 28,9% no número de blastocistos em seus estádios iniciais. Após 144 horas esses blastocistos progridem o seu crescimento, chegando a 82,3% destes estarem no estágio entre blastocisto e blastocisto expandido às 164 horas (Fujino et al., 2006).

O método de coleta mais simples é a retirada do útero da doadora após o abate. Há como vantagem a alta taxa de recuperação e, se os embriões forem colhidos imediatamente após a sangria, a qualidade será equivalente ao conseguido pelo método cirúrgico. Em contraste, a doadora só pode ser utilizada uma vez (Brüßow et al., 2000; Hazeleger & Kemp, 2001). Logo após o abate os tratos reprodutivos são retirados e transportados para o laboratório, por no máximo 30 min em caixa térmica a 37°C, para ser realizada a inspeção dos ovários e coleta de embriões. A técnica consiste em remover os ligamentos largos do útero, para desfazer as sinuosidades dos cornos, e assim seja possível esticar o útero, posteriormente, faz uma incisão no útero perto da bifurcação (Koutsotheodoros et al., 1998) e injeta de 20 a 60 mililitros (mL) de meio tampão fosfato salina (PBS) e o conteúdo de cada corno uterino é diretamente colocado em uma placa de Petri (Herrman et al., 1981; Nicola et al., 1999; Brüßow et al., 2000; Silva, 2013).

Herrman et al. (1981) coletaram embriões de duas células, de 30 leitoas pré-púberes previamente abatidas, 42h após a primeira inseminação. O trato reprodutivo foi coletado 30 min após a abertura da carcaça e foi transportado ao laboratório em caixa a vácuo a 37°C. A tuba uterina foi lavada com 15 mL de PBS em torno de 1,5 - 2,5 horas após o abate. E obtiveram uma taxa de recuperação de 73,8%, adquirindo uma média de 11 embriões por porca.

Esse método também foi utilizado por Wollenberg et al. (1990) que coletaram embriões de porcas sincronizadas com eCG e hCG, 84 horas após a segunda inseminação, ou seja, quatro dias após a primeira inseminação. Foi lavado as tubas e cornos uterinos para ser realizada a coleta, num intervalo entre três minutos e 2 horas, após o abate. Sendo recuperado uma média de 74% dos embriões ovulados.

Schlieper & Holtz (1997) também coletaram embriões de uma célula de porcas previamente abatidas para ser utilizado em transferências de embriões, e obtiveram uma taxa de recuperação de 83,7%.

Em estudo realizado por Nicola et al. (1999) as porcas foram abatidas 7 dias após a primeira inseminação, e o trato reprodutivo foi coletado e transportado em caixa térmica a 37°C. A coleta foi realizada 80 min após a retirada do útero da cavidade abdominal, injetando-se próximo a junção útero-tubárica 60-80 mL de solução salina fosfatada acrescida de 1% de soro fetal bovino (SFB) à 37°C, e recuperaram 13 mórulas, 32 blastocistos e 39 blastocistos expandidos.

Hazeleger et al. (2000) coletaram embriões de porcas abatidas após tratamento hormonal, 7 dias após a primeira inseminação, os embriões foram coletados, e lavados no próprio local onde foi feito o abate, após foram colocados em tubo Falcon com solução PBS a 39°C e deixado e posteriormente colocados em caixa térmica, e levados à laboratório. E obteve uma taxa de recuperação de $83 \pm 17\%$, sendo desses $56 \pm 31\%$ viáveis.

Wallenhorst et al. (2002), fizeram coleta de embriões em porcas previamente abatidas com sete dias de gestação. Os cornos uterinos foram lavados com 40 mL de PBS suplementado com 1000 mg de glucose/litro, 350 mg/litro de piruvato de sódio e 2% de SFB. Após coleta os embriões foram mantidos em uma incubadora com temperatura a 38°C. Foi recuperado 19 embriões por animal abatido, no entanto, 53% encontravam-se inviáveis.

No final da década de 80, o procedimento para coleta de embriões sem cirurgia foi desenvolvido para porcas (Hazeleger & Kemp, 2001). Essa técnica consistia na lavagem do útero com o uso de um cateter transcervical, após ressecção dos cornos uterinos (Figura 1.5 e Figura 1.6), e no segundo estro após cirurgia os animais eram inseminados. Para a coleta é inserido intracervical, após a abertura da cérvix com o auxílio de barras de policloreto de povinila (PVC) (Figura 1.7A e 1.7B), um tubo de polietileno (Figura 1.7C) e através desse tubo é inserido um cateter (diâmetro interno 3,5 mm; diâmetro externo 4,5 milímetros) com vários furos na extremidade (Figura 1.7E), e sendo realizada a lavagem com o auxílio de uma seringa, foram introduzidos 10 ou 20 mL de PBS várias vezes através do cateter (Hazeleger et al., 1989).

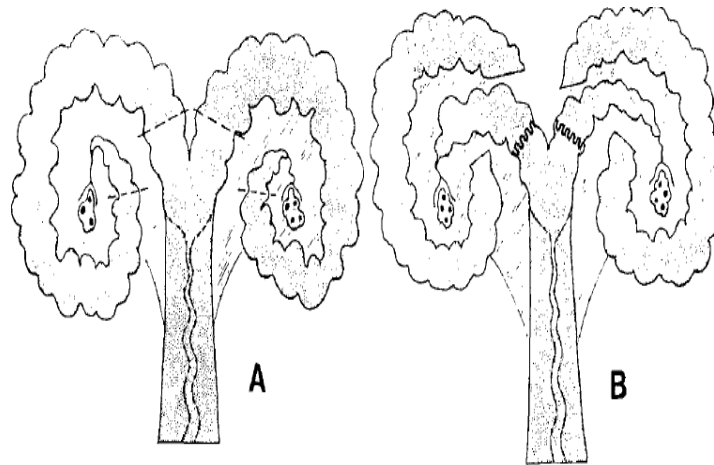


Figura 1.5: Representação esquemática do procedimento de ressecção (Hazeleger et al., 1989)



Figura 1.6: Útero ressecionado (Hazeleger et al., 1989)

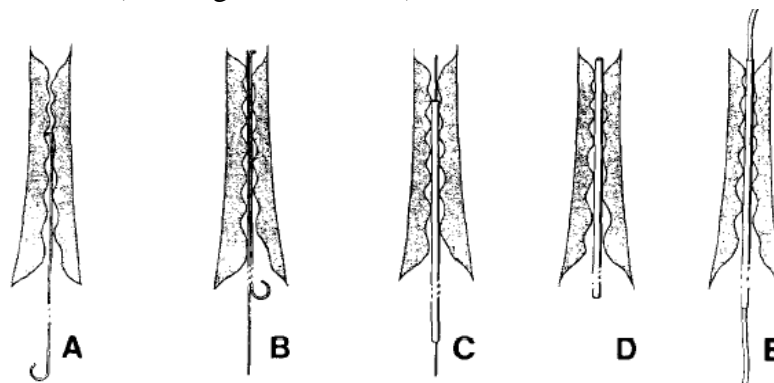


Figura 1.7: Representação esquemática da cateterização uterina transcervical (Hazeleger et al., 1989).

Hazeleger et al. (1989), fizeram ressecção do útero para posteriormente ser realizado coleta de embriões por coleta transcervical em quatro porcas, cinco ou seis dias após a primeira inseminação, e em duas porcas foi realizado a coleta de embriões por abate, logo após a coleta transcervical, para verificar se ainda seria possível recuperar estruturas que não

foram coletas transcervicalmente. O primeiro animal que foi realizado cirurgia apresentou várias aderências quando comparado aos demais animais. A taxa de recuperação embrionária foi de 45%, e ainda foram coletadas seis estruturas nos dois animais que foram abatidos.

Em outro estudo, foram removidas porções de 69 a 112 cm de corno uterino, pelo método de ressecção para ser realizado coleta de embriões por lavagem com a introdução de um cateter transcervical, após as mães apresentarem pelo menos um ciclo estral. Os animais não foram sincronizados para o estudo, sendo inseminados duas a três vezes após apresentarem estro em data pré-determinada. Os embriões foram coletados nos dias quatro a seis de gestação, com 60 mL de meio de manutenção (Eagle's MEM[®]), contendo canamicina (60 µg/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e penicilina (100 UI/mL), sendo repetido o procedimento de coleta de 4 a 10 vezes na mesma porca. Foi coletado uma média de 6,5 embriões por porca (Kobayashi et al., 1989).

Besenfelder et al. (1997) coletaram embriões, por endoscopia e por abate, três a seis dias após a primeira inseminação. Onde os animais que foram coletados cirurgicamente foram lavados a tuba uterina, e os animais em que foram coletados por abate, foram lavados os cornos uterinos. A técnica por endoscopia é realizada com o animal em uma mesa cirúrgica com ângulo de 45°C para que as vísceras deslizassem cranialmente. Foram inseridos três trocartes na musculatura abdominal, os quais foram colocados num triângulo com 8 a 10 cm de distância, sendo dois trocartes posicionados lateralmente e um na linha média. O trocarce cranial foi utilizado para o endoscópio, e os demais para pinças. Um cateter venoso foi acoplado em um cateter de metal de 105 mm e inserido com o auxílio da pinça ipsilateral na ampola através do infundíbulo, e fixada com a pinça. Os cornos uterinos foram fixados pela pinça caudal para fornecer acesso intra-uterino para um tubo flexível com furos na extremidade acoplado em um cateter de 155 mm, após este ser passado por dentro do corno uterino, também foi fixado com a pinça. Com uma seringa de 20 mL, acoplada no cateter de 105 mm, foram introduzidos 60-80 mL de PBS. O líquido era recuperado com o auxílio de uma seringa de 20 mL acoplada no cateter de 155 mm (Figura 1.8). Neste estudo, foi possível coletar um total de 114 estruturas, dos quais 102 eram fertilizados, sendo desses $20 \pm 11,6$ e $14,1 \pm 9,1$, coletados por endoscopia e abate, respectivamente.

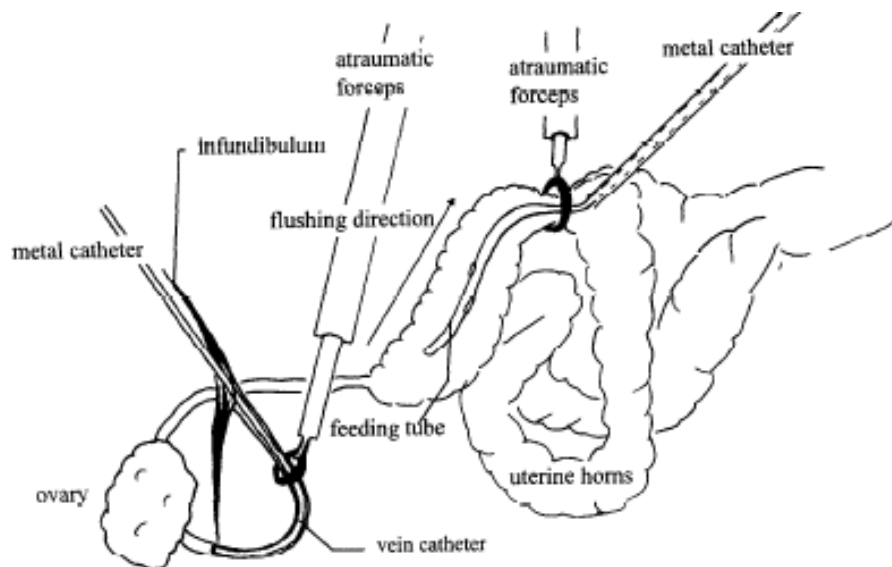


Figura 1.8: Esquema da coleta de embriões por endoscopia (Besenfelder et al., 1997)

Na coleta cirúrgica de embriões, é feito uma incisão na linha alba, na parte caudal do abdômen e, com o auxílio de uma sonda ou um tubo, respectivamente, os cornos uterinos ou tubas uterinas são lavados. Porém se limita a dois ou três procedimentos repetidos, pois geram formação de aderência (Hazeleger & Kemp, 2001).

Em um estudo realizado por Herrman & Holtz (1981) foram realizadas coletas por meio de abate e cirúrgica, na coleta por abate foram utilizadas 9 leitoas que tiveram o trato reprodutivo retirado por uma incisão na cavidade abdominal, e transportados para o laboratório em uma caixa a vácuo a 37°C. Foi realizada uma incisão na junção útero-tubárica e lavado com 15 mL de DPBS. Para o método de coleta por laparotomia, foi feita a lavagem da tuba uterina e cornos uterinos. Foram utilizadas 11 leitoas anestesiadas com uma injeção intravenosa de pentobarbital, e após incisão na linha alba, o útero foi exteriorizado e os ovários inspecionados. A Figura 1.9 mostra esquematicamente a técnica utilizada. Uma abraçadeira intestinal foi colocada no corno uterino a 15 cm da junção útero-tubárica (C₁) e uma agulha ligada a uma seringa contendo 20 mL de DPBS a 37°C foi introduzida no infundíbulo (A₁), evitando o refluxo do líquido ao pressionar a agulha com os dedos (B₁), fazendo uma lavagem uterina na direção da tuba uterina para o corno uterino. Em seguida, outra abraçadeira foi colocada 2-3 cm da junção útero-tubárica (C₂), prendendo o fluído no útero, enquanto um tubo de vidro de 5 milímetros (mm), com ponta afunilada foi inserido (E) por uma pequena incisão feita na ponta do corno uterino (D) e fixada em uma placa para cultura de células Falcon (10 mm de diâmetro) (F). Então uma seringa foi colocada na

abraçadeira com 15 cm de distância da junção útero-tubárica (A₂) e mais 20 mL de DPBS foi inserido para a lavagem do corno uterino, caindo na placa. Obteve-se uma taxa de recuperação de 80% para o método de abate, sendo coletados 61 embriões, na coleta por laparotomia a taxa de recuperação foi de 88,7%, e foram coletados 63 embriões,

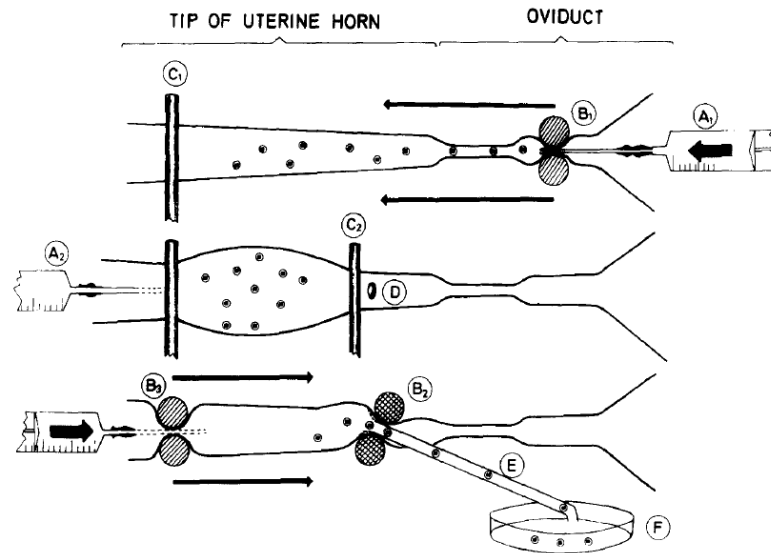


Figura 1.9: Esquema do procedimento seguido na coleta de embriões por laparotomia no segundo dia (Herrmann & Holtz, 1981).

Schlieper & Holtz (1986) fizeram coleta por abate e por laparotomia no segundo dia após a primeira inseminação. Foram abatidas 87 porcas que tiveram sua temperatura corporal medidas antes do abate. Retiraram o trato reprodutivo com uma incisão na linha alba imediatamente após a sangria. Dentro de 1-3 min após remoção do trato reprodutivo os cornos uterinos foram lavados com 20 mL de DPBS, e transferidos para uma placa estéril, com SFB, penicilina (100 UI/mL) e sulfato de estreptomicina, na mesma temperatura do meio usado para lavagem. A laparotomia foi realizada 42-46h após a primeira inseminação e foram utilizados 39 animais e a técnica utilizada foi a mesma realizada por Herrmann & Holtz (1981). Alcançaram em média uma taxa de recuperação de 79,6% para os dois métodos.

Sommer et al. (2007) também realizaram coleta por laparotomia, no primeiro dia após a inseminação, lavando a tuba uterina para obtenção de embriões unicelulares. Foi obtido uma média de 11,2 embriões por porca.

Em pequenos ruminantes, para obtenção de embriões no estágio de mórula ou blastocisto o método de coleta mais utilizado é a laparotomia. A técnica consiste em anestésiar o animal, fazer assepsia da região abdominal, caudal e ventral, e incisão na linha

alba, para exteriorização do útero. É introduzido uma sonda de Foley próximo a bifurcação uterina, acoplada a uma placa de petri e um cateter endovenoso próximo a junção útero-tubárica. A lavagem é realizada utilizando 40-50 mL de DPBS a 37°C, para cada corno uterino, na direção da junção útero-tubárica para a bifurcação uterina (Pereira et al., 1991; Medeiros, 2005; Paula et al., 2008).

Seguindo a técnica em pequenos ruminantes, Fujino et al. (2006) realizaram coleta de embriões por laparotomia nos dias seis e sete de gestação, onde o número de CL foi contado no ovário, para estipular número de ovulações, e uma sonda de Foley nº 16 foi inserida na luz do corno uterino, próximo a bifurcação uterina, e um cateter introduzido próximo a junção útero-tubárica e injetado 50 mL de PBS, sendo recuperado em um tubo de ensaio e levado para banho maria a 37°C. Obteve-se uma taxa de recuperação de 92,18%.

Rátky et al. (2001) realizaram coletas de embriões por laparotomia e por endoscopia, no quinto dia. Na coleta por endoscopia foi utilizado o mesmo método utilizado por Besenfelder et al. (1997), na coleta por laparotomia foi inserida uma sonda de Foley a 15 cm da junção útero-tubárica, inserido um cateter endovenoso próximo a junção útero-tubárica e injetado 70 mL de PBS a 37°C por um cateter endovenoso acoplado em uma seringa, após a lavagem foi inserido 30 mL de ar para recuperar o líquido residual. A taxa de recuperação foi maior nos animais em que foi realizada a laparotomia do que nos animais em que foi realizada a endoscopia ($91,5 \pm 4.4\%$ vs. $71,4 \pm 12,7$).

Silva (2013) comparou a coleta de embriões por laparotomia com a coleta por abate, sendo ambas realizadas seis dias após a primeira monta natural. Para a coleta por abate, os animais foram abatidos e os tratos reprodutivos coletados e levados para laboratório para lavagem uterina. Na coleta por laparotomia foi lavado o corno uterino, para isto, uma sonda de Foley foi fixada no terço final do corno uterino, e um cateter endovenoso acoplado a uma seringa foi introduzido na junção útero-tubárica. Foi coletado um total de 104 estruturas, sendo a taxa de recuperação de 79,03% para o método por abate, e 57,29% para o método de laparotomia.

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBURQUERQUE, M. S. M.; MARIANTE, A.S.; CASTRO, S.T.R.; TROVO, J.B.F. **Identificação e caracterização de grupamentos de suínos nacionais**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1990.

ALEIXO, J. A. G.; PIMENTEL, C. A.; DESCHAMPS, J. C.; BORDIGNON, V.; MORAES, J. C. F. Gonadotrofina Coriônica equina. Purificação. Caracterização e resposta ovariana em ovinos e suínos. **Ciência Rural**, v.25, n.1, p.111-114, 1995.

AMARAL, A. L.; DA SILVEIRA, P. R. S.; DA LIMA, G. J. M. M. Boas práticas de produção em suínos. **Embrapa – Circular técnica 50**. Concórdia, 2006, p. 11-14.

ANDERSON, L. L. Suínos In: HAFEZ, E. S.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7 ed. Barueri: Manole, 2004, p.183-192.

ANDRABI, S. M. H; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.223-243, 2007.

ANUALPEC. **Anuário estatístico da pecuária de corte**. São Paulo: FNP Consultoria e Comércio Ltda., 2012, p.115-138.

ASHWORTH, C. J.; HALEY, C. S.; WILMUT, I. Effect of regumate on ovulation rate, embryo survival and conceptus growth in meishan and Landrace x Large White gilts. **Theriogenology**, v.37, n.2, p.433-443, 1992.

ABCS. **Produção de suínos teoria e prática**. 1 ed. Brasília, 2014, p.23-24.

AX, R.L.; DALLYB, M. R.; DIDION, R. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; HAFEZ, B.; BELLIN, M. E. Inseminação artificial. In: HAFEZ, E. S.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7 ed. Barueri: Manole, 2004. p.381-394.

BAKER, R. D.; COGGINS, E. G. Control of ovulation rate and fertilization in prepuberal gilts. **J Anim Sci**, v.27, p.1607-1616, 1968.

BENNEMAN, P. E.; KOLLER, F. L.; BERNARDI, M. L. et al. Desempenho reprodutivo de fêmeas suínas submetidas à inseminação artificial intrauterina ou à tradicional. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.6, p.1735-1739, 2005.

BESSENFELDER, U.; MÖDH, J.; MTILLER, M.; BREM, G. Endoscopic embryo collection and embryo transfer into the oviduct and the uterus of pigs. **Theriogenology**, v.47, p.1051-1060, 1997.

BRÜSSOW, K. P.; RATKY, J.; KANITZ, W.; BECKER, F. The relationship between the surge of LH induced by exogenous Gn-RH and the duration of ovulation in gilts. **Reproduction in Domestic Animals**, v.25, p.255-260, 1990.

BRÜSSOW, K. P.; JÖCHLE, W.; HÜHN, U. Control of ovulation with a GnRH analog in gilts and sows. **Theriogenology**. v.46, p.925-934, 1996.

BRÜSSOW, K. P.; TORNER, H.; KANITZ, W.; RÁTKY, J. In vitro technologies related to pig embryo transfer. **Reprod. Nutr. Dev**, v.40, p.469–480, 2000.

BRÜSSOW, K. P.; SCHNEIDER, F.; KANITZ, W.; RÁTKY, J.; KAUFFOLD, J.; WÄHNER, M. Studies on fixed-time ovulation induction in the pig. In: Rodriguez-MARTINEZ H., VALLET J.L. & ZIECIK A.J. **Control of Pig Reproduction VIII**. Nottingham: Nottingham University Press, 2009, p.187-195.

BRÜSSOW, K. P.; WÄHNER, M. Biological and technological background of estrus synchronization and fixed-time ovulation induction in the pig. **Biotechnology in Animal Husbandry**. v. 27, n. 3, p 533-545, 2011.

CASSAR, G. Hormonal control of pig reproduction. In: London Swine Conference, 2009, Londres **Anais...** Londres: University of Guelph, p.137-139, 2009.

CASTRO, S. T. R. Produção orgânica de suínos poderá usar raças naturalizadas em risco de extinção. **SOS Suino**. 2004.

CAVALCANTI, S. S. **Suinocultura Dinâmica**. Rome: FEP – MVZ. Ed. Contagem. 2000, p. 494.

COSTA, P. M.; MARTINS, C. F. Conservação de recursos genéticos animais através de técnicas de reprodução. **Universidade de Ciência e Saúde**, Brasília, v.6, n.1, p.39-55, 2008.

COX N. M. Control of follicular development and ovulation rate in pigs. **J Reprod Fertil Suppl**, v.52, p.31-46, 1997

DALIN A. M.; NANDA T.; HULTEN F.; EINARSSON S. Ovarian activity at naturally attained estrus in the sow - an ultrasonographic and LH study. **Acta Vet Scand**, v.36, p.377-382, 1995.

DALIN A. M. Ovarian follicular activity during the luteal phase in gilts. **J Vet Med A**, v.34, p.592-601, 1987.

DIAL, G. D.; DIAL, O. K.; WILKINSON, R. S.; DZIUK, P. J. Endocrine and ovulatory responses of the gilt to exogenous gonadotropins and estradiol during sexual maturation. **Bio. Reprod**, v.30, p. 289-299, 1984.

DOBRINSKY, J.R. Cryopreservation of swine embryos: a chilly past with a vitrifying future. **Theriogenology**, v.56, p.1333-1344, 2001.

DYCE, K. M.; SACK, W.O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier 2010, p.772-774.

EGITO, A. A.; MARIANTE, A. S.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. **Archivos de zootecnia**, Brasília, v.51, n.193-194, p.39-52, 2002.

ESTIENNE, M. J.; HARTSOCK, T. G. Effect of exogenous gonadotropins on the weaning-to-estrus interval in sows. **Theriogenology**, v.49, p.823–828, 1998.

EVANS, A. C. O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. **Reprod Domest Anim**, v.38, p.240-246, 2003.

EVANS, A. C. O.; O'DOHERTY, J.U. Endocrine changes and management factors affecting puberty in gilts. **Livest Prod Sci**, v.68, p.1-12, 2001.

FOXCROFT G. R.; HUNTER M. G. Basic physiology of follicular maturation in the pig. **J Reprod Fertil Suppl**, v.33, p.1-19, 1985.

FRIES, H. C. C.; SOUZA, L. P.; FACCIN, J. E. G.; RECKZIEGEL, M. V.; HERNIG, L.; MARIMON, B. T.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P. Induction and synchronization of ovulation in sows using a Gonadotropin-releasing Hormone Analog (Lecirelin). **Anim. Reprod**, v.7, n.4, p.362-366, 2010a.

FRIES, H. C. C.; MELLAGI, A. P. G.; BERNARDI, M. L.; WENTZ, I.; BORTOLOZZO, F. P. Inseminação artificial em momento fixo em suínos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.38 (Supl 1), p.83-104, 2010b.

FUJINO, Y.; NAKAMURA, Y.; KOBAYASHI, H.; KIKUCHI, K. Relationship between time elapsed after human chorionic gonadotropin administration and developmental stage in porcine embryos collected from prepubertal gilts. **J. Reprod. Dev**, v.52, p.267–275, 2006.

GONÇALVES, R.G.; PALMEIRA, E.M. Suinocultura brasileira. **Revista Acadêmica de Economia**, n.71, p.1-11, 2006.

GUTHRIE H. D.; COOPER B. S. Follicular atresia, follicular fluid hormones, and circulating hormones during the midluteal phase of the estrous cycle in pigs. **Biol Reprod**, v.55, p.543-547, 1996.

GUTHRIE, H.D., The follicular phase in pigs: follicle populations, circulating hormones, follicle factors and oocytes. **J. Anim. Sci**, v.83, p.79–89, 2005.

HAZELEGER, W.; VAN DER MEULEN, J.; VAN DER LENDE, T. A method for transcervical embryo collection in the pig. **Theriogenology**, v.32, p.727-734, 1989.

HAZELEGER, W.; BOUWMAN, E. G.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; KEMP, B. Effect of superovulation induction on embryonic development on day 5 and subsequent development and survival after nonsurgical embryo transfer in pigs. **Theriogenology**, v.53, p.1063–1070, 2000.

HAZELEGER, W.; KEMP, B. Recent developments in pig embryo transfer. **Theriogenology**, v.56, p.1321-1331, 2001.

HERRMAN, H.H.; SCHAFER, B.; HOLTZ, W. Collection of two-cell pig embryos and their culture in media containing different protein components. **Animal Reproduction Science**, v.4, p.137-142, 1981.

HERRMAN, H. H.; HOLTZ, W. Culture of pig embryos collected in situ or after slaughter. **Animal Reproduction Science**, v.4, p.143—147, 1981.

HIEMSTRA, S.J.; VAN DER LENDE, T.; WOELDERS, H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. **The Role Of Biotechnology**, v.5 n.7, p.25-36, 2005.

HUANG, W.; WALLENHORST, C. K.; WALLENHORST, S. HOLTZ, W. Transfer of porcine embryos through mini-laparotomy. **Theriogenology**, v.57, p.1533–1537, 2002.

HUGHES, P. E.; PHILIP, G.; SISWADI, R. The effects of contact frequency and transport on the efficacy of the boar effect. **Anim Reprod Sci**, v.46, p.159-165, 1997.

HUNTER, M.G., WIESAK, T., Evidence for and implications of follicular heterogeneity in pigs. **J. Reprod. Fertil**, v.40, p.163–177, 1990.

HUNTER M. G.; PARADIS F. Intra-follicular regulatory mechanisms in the porcine ovary. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v.66, p.149-164, 2009.

KAUFFOLD, J.; BECKJUNKER, J.; KANORA, A.; ZAREMBA, W. Synchronization of estrus and ovulation in sows not conceiving in a scheduled fixed-time insemination program. **Animal Reproduction Science**, v.97, p.84–93, 2007.

KEMP, B.; STEVERINK, D. W. B.; SOEDE, N. M. Herd management in sows: Optimising insemination strategies. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33, p.159-64, 1998.

KNOX R. V. Recruitment and selection of ovarian follicles for determination of ovulation rate in the pig. **Domest Anim Endocrinol**, v.29, p.385-397, 2005.

KNOX, R. V.; VATZIAS, G.; NABER, C. H.; ZIMMERMAN, D. R. Plasma gonadotropins and ovarian hormones during the estrous cycle in high compared to low ovulation rate gilts. **J Anim Sci**, v.81, p.249-260, 2003.

KIRKWOOD, R. N.; AHERNE, F. X.; MONAGHAN, P. G. Breeding gilts at natural or a hormone-induced estrus: effects on performance over four parities. **J Swine Hlth Prod**, v.8, p.177-179, 2000.

KOBAYASHI K.; HAYASHI, S.; OHTUBO, Y.; HONDA, A.; MIZUNO, J.; HIRANO, S. Nonsurgical embryo collection from sows with surgically shortened uteri. **Theriogenology**, v.32, n.1, p.123-129, 1989.

KOUTSOTHEODOROS, F.; HUGHES, P. E.; PARR, R. A.; DUNSHEA, F. R.; FRY, R. C.; TILTON, J. E. The effects of post-weaning progestagen treatment (Regumate) of early-weaned primiparous sows on subsequent reproductive performance. **Animal Reproduction Science**, v.52, p.71-79, 1998.

LAMBERSON, W.R.; SAFRANSKI, T.J. A model for economic comparison of swine insemination programs. **Theriogenology**, v.54, p.799-808, 2000.

LECOMPTE, F.; ROY, F.; COMBARNOUS, Y. International collaborative calibration of a preparation of equine chorionic gonadotropin (eCG) proposed as a new standard. **Jornal of Reproduction and Fertility**, v.113, p.145-150, 1998.

LUCY, M.C.; LIU, J.; BOYD, K.; BRACKEN, C.J. Ovarian follicular growth in sows **Reproduction**, v.58, p. 31-45, 2001.

MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Animal genetic resources in brazil: result of five centuries of natural selection. **Theriogenology**, v.57, p.223-235, 2002.

MARIANTE, A. S.; PAIVA, S. R.; ALBUQUERQUE, M. S. M. et al., Visão estratégica da conservação de recursos genéticos animais para os próximos vinte anos. In: Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos, 2, 2008, Brasília, **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 91. 2008

MARIANTE, A.S.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; RAMOS, A.F. Criopreservação de recursos genéticos animais brasileiros. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.64-68, 2011.

MARTINAT-BOTTÉ, F.; BARITEAU, F.; FORGERIT, Y.; MACAR, C.; MOREAU, A.; TERQUI, M.; SIGNORET, J.P. Control of oestrus in gilts II. Synchronization of oestrus with a progestagen, altrenogest (Regumate): effect on fertility and litter size. **Anim. Reprod. Sci**, v.22, p.227-233, 1990.

MARTINAT-BOTTÉ, F.; BARITEAU, F.; FORGERIT, Y.; MACAR, C.; POIRIER, P.; TERQUI, M. Synchronization of oestrus in gilts with altrenogest: effects on ovulation rate and foetal survival. **Animal Reproduction Science**, v.39, p.267-274, 1995.

MARTINAT-BOTTÉ, F.; VENTURI, E. GUILLOUET, P.; DRIANCOURT, M. A.; TERQUI, M. Induction and synchronization of ovulations of nulliparous and multiparous sows with an injection of gonadotropin-releasing hormone agonist (Receptal). **Theriogenology**, v.73, p.332-342, 2010.

MEDEIROS, C. H. N. **Efeito de sucessivos tratamentos superovulatórios com Pfsh sobre a resposta ovulatória e produção de embriões de Cabras boer e posterior sobrevivência embrionária após transferência em receptoras sem raça definida.** 2005 52p. Dissertação (Mestrado em Reprodução e Sanidade Animal), Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2005.

MELLAGI, A.P.G. Protocolos de detecção de estro e inseminação artificial em suínos. In: Simpósio Brasil Sul de Suinocultura, 4, 2011, Chapecó. **Anais...** Chapecó: Núcleo Oeste de Médicos Veterinários e Zootecnistas, p.26-39, 2011.

MORETTI, A. S.; MARTINS, S. M. M. K.; ANDRADE, A. F. C.; PARAZZI, L. J.; OLIVEIRA, M. L. Controle farmacológico do ciclo estral **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v.37, n.2, p.213-219, 2013.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotrophin. **Endocrine Rev**, v.12, p.27-44, 1991.

NICOLA, E. S.; DESCHAMPS, J. C.; MACEDO JÚNIOR, M. et al. Criopreservação de embriões de suínos adicionando trealose aos crioprotetores etilenoglicol ou glicerol. **Ciência Rural**, v.29, n.1, p.111-115, 1999.

NOGUCHI, M., YOSHIOKA, K., ITOH, S., SUZUKI, C., ARAI, S., WADA, Y., HASEGAWA, Y., KANEKO, H. Peripheral concentrations of inhibin A, ovarian steroids, and gonadotropins associated with follicular development throughout the estrous cycle of the sow. **Reproduction**, v.139, p.153–161, 2010.

PAULA N. R. O.; CARDOSO J. F. S.; OLIVEIRA M. A. L.; FREITAS V. J. F. Embriões caprinos produzidos in vivo ou in vitro: técnicas, problemas e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução**, Animal Belo Horizonte. v.32, n.1, p.21-35, 2008.

PEREIRA, R. J. T. A.; LIMA, P. F., SILVA, M. A. V.; WISCHRAL, A.; OLIVEIRA, M. A. L. Colheita de embriões caprinos por via transcervical. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal 9. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. p.314 (abstract), 1991.

PINESE, M. E. **Puberdade em marrãs: I- Efeito das gonadotrofinas na indução e sincronização do estro à puberdade. II - Efeito do “flushing” alimentar no ciclo anterior à primeira concepção. III- Avaliação da eficiência produtiva e reprodutiva das marrãs até o 1º parto.** 2005. 93p. Dissertação (Mestre em Ciência) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, SP, 2005.

PRUNIER, A.; MARTINAT-BOTTÉ, F.; RAVAUULT, J.P.; CAMOUS, S. Perioestrous patterns of circulating LH FSH, prolactin and oestradiol-17[beta] in the gilt. **Anim. Reprod. Sci**, v.14, p.205–218, 1987.

PRUNIER A.; QUESNEL H. Nutritional influences on the hormonal control of reproduction in female pigs. **Livest Prod Sci**, v.63, p.1-16, 2000.

RAMOS, A. F.; MARIANTE, A. S.; A. M. S. M.; CASTRO, S. T. R.; PAIVA, S. R.; NETO, M. A. P.; NASCIMENTO, N. V. Banco Brasileiro de Germoplasma Animal: Quantitativo do

material estocado até 2013. In: Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 3, 2014, Santos. **Resumo...** Santos: 2014.

RÁTKY, J.; BRÜSSOW, K. P.; SOLTI, L.; TORNER, H.; SARLÓS, P. Ovarian response, embryo recovery and results of embryo transfer in a hungarian native pig breed. **Theriogenology**, v.56, p.969-978, 2001.

RENSIS, F.; BENEDETTI, S.; SILVA, P.; KIRKWOOD, R. N. Fertility of sows following artificial insemination at a gonadotrophin-induced estrus coincidente with weaning. **Animal Reproduction Science**, v.76, p.245–250, 2003.

RYAN D. P.; YAAKUB H.; HARRINGTON D.; LYNCH P. B.; Follicular development during early pregnancy and the estrous cycle of the sow. **Theriogenology**, v.42, p.623-632, 1994.

SCHEID, I. R.; WENTZ, I. Diagnóstico do cio e manejo da cobertura: tarefas importantes na criação. **Embrapa – Suinocultura dinâmica**, Concórdia: nº11, p.1-5, 1993.

SCHILIEPER, B.; HOLTZ, W. Transfer of pig embryos collected by laparotomy or slaughter. **Animal Reproduction Science**, v.12, p.109-114, 1986.

SCHILIEPER, B.; HOLTZ, W. Embryo collection from sows of the Goettingen miniature pig breed after synchronization with an oral progestin followed by gonadotropins. **Theriogenology**, v.47, n.1, p.178-178, 1997.

SIGNORET, J. P. Reproductive behaviour of pigs. **J Reprod Fertil**, v.11, p.105–117, 1970.

SILVA, P. C. P. **Coleta de embriões em suínos nacionais**. 2013. 33p. TCC (graduação em veterinária), Faculdades Integradas da União Educacional do Planalto Central, Brasília, 2013.

SILVA FILHA, O. L. S. Experiências Brasileiras na criação de suínos locais. **Revista Computadorizada de Produccion Porcina**, v.15, n.1, p.41-53, 2008.

SISSON, S. Sistema urogenital do suíno. In: Getty R. **Anatomia dos animais domésticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986, p.1220-1221.

SOEDE, N. M.; HELMOND, F.A.; KEMP, B., Perioovulatory profiles of oestradiol LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. **J. Reprod. Fertil**, v.101, p.633–641, 1994.

SOEDE, N. M.; WETZELS, C. C. H.; ZONDAG, W. et al. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. **Jornal of Reproduction and Fertility**, v.104, p.99-106, 1995.

SOEDE N. M.; KEMP B. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. **J Reprod Fertil Suppl**, v.52, p.91-103, 1997.

SOEDE, N. M.; HAZELEGER, W.; KEMP, B. Follicle size and the process of ovulation in sows as studied with ultrasound. **Reprod. Domest. Anim**, v.33, p.239–244, 1998.

SOEDE, N. M.; LANGENDIJK, P.; KEMP, B. Reproductive cycles in pigs **Animal Reproduction Science**, v.124, p.251–258, 2011.

SOEDE, N. M.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; KEMP, B. The duration of ovulation in pigs, studied by transretal ultrasonography, is not related to early embryonic diversity. **Theriogenology**, v.38, p.653-666, 1992.

SOMMER, J. R.; COLLINS, E. B.; ESTRADA, J. L.; PETTERS, R. M. Synchronizacion and superovulation of mature cycling gilts for the collection of pronuclear stage embryos. **Animal Reproduction Science**, v.100, p.402–410, 2007.

STEVENSON, J. S.; DAVIS, D. L. Estrous synchronization and fertility in gilts after 14 or 18 day feeding of altrenogest beginning at estrus or diestrus, **J. Anim. Sci.**, v.55, n.1, p.199-123, 1982.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. **IETS**, p. 112-113, Illinois, 1998.

TUMMARUK P.; ROONGSITTHICHAI, A.; RENSIS, F. Ovulation Induction in Sows. **Thai J Vet Med**, v.41, p.19-23, 2011.

UPNOMOOR, I. **Produção de suínos: a matriz** vol.4 Guaíba: Agropecuária, 2000, p.25-72.

VIANA, J. H. M. Classificação de embriões bovinos produzidos in vivo. **Comunicado Técnico 59** – Embrapa, Juiz de Fora, 2009, p. 1-4.

WALLENHORST, S.; HOLTZ, W. Embryo collection in prepubertal gilts and attempts to develop an improved embryo transfer technique. **Veterinary Record**, v. 150, p.749-751, 2002.

WEITZE K. F.; LOTZ J. H.; EVERWAND A. Interaction between inseminate, uterine and ovarian function in the sow. II. Investigations into the influencing of ovulation by the use of sperm free media. **Reprod Domest Anim**, v.25, p.197-204, 1990.

WENTZ, I.; GAVA, D.; BORTOLOZZO, F. P. Hormonioterapia como ferramenta no manejo reprodutivo de suínos, 13, 2007, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, p.156-171, 2007.

WOLLENBERG, C.; WENTZ, I.; BLUM, B.; HOLTZ, W. Survival of pig embryos flushed from the reproductive tract immediately or two hours after slaughter of donors. **J. Anim. Sci.**, v.68, p.2023-2026, 1990.

WOLOSZYN, N. Procedimentos básicos para a produção de suínos nas fases de reprodução, maternidade e creche. **Documentos 100 - Embrapa**, Concórdia, 2005, p.26-36.

ZAPLETAL, D.; PAVLIK, A. The effect of lecorelin (GnRH) dosage on the reproductive performance of nulliparous and lactating rabbit does. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.306-315, 2008.

CAPÍTULO 2

COLETA SERIADA DE EMBRIÕES SUÍNOS POR LAPAROTOMIA

1 RESUMO

Este estudo objetivou avaliar a produção embrionária de marrãs submetidas a três coletas de embriões seriadas por laparotomia, a fim de se verificar a eficácia da técnica quando realizada mais de uma coleta e otimizar o uso do animal como doadora de embriões. Foram utilizados 30 animais, clinicamente saudáveis. Trinta marrãs Piau (23) e Moura (7) iniciaram o Experimento e foram submetidas a coleta de embriões por laparotomia (ColetaI). Dessas, 26 marrãs foram submetidas a segunda coleta (ColetaII) e 14 submetidas a terceira coleta (ColetaIII), com intervalo de 60 dias entre as coletas. Para cada procedimento, as marrãs tiveram o estro observado diariamente, duas vezes ao dia, e foram acasaladas por monta natural a cada 12 horas após a detecção de estro. A coleta foi realizada seis dias após a cobertura, onde os animais foram submetidos a laparotomia e tiveram seus cornos uterinos lavados com PBS com o auxílio de uma sonda de Foley. O número de corpos lúteos ($8,8 \pm 1,7$ vs $7,2 \pm 2,4$ vs $6,5 \pm 1,88$) e estruturas totais ($5,1 \pm 2,5$ vs $5,1 \pm 3,0$ vs $3,3 \pm 2,1$) foram menores na ColetaIII do que nas demais coletas ($P < 0,05$). O número de embriões viáveis ($4,6 \pm 2,6$ vs $4,0 \pm 2,7$ vs $2,6 \pm 2,3$) e de embriões congeláveis ($4,1 \pm 2,8$ vs $3,3 \pm 2,6$ vs $2,1 \pm 2,5$) foi maior na ColetaI do que na ColetaIII ($P < 0,05$). A taxa de recuperação ($63,6 \pm 21,80$ vs $65,0 \pm 28,7$ vs $58,0 \pm 32,8$) foi similar entre os tratamentos ($P > 0,05$). O grau de formação de aderência maior a medida que as coletas foram realizadas ($P < 0,05$). A técnica de coleta de embriões em suínos por laparotomia mostra-se eficiente para ser usada em programas de conservação de recursos genéticos animais. Duas coletas consecutivas foram eficazes para recuperar embriões próprios para criopreservação, no entanto, o aumento no número de coletas sucessivas pode intervir na saúde reprodutiva dos animais.

Palavras-chave: Conservação, suínos nacionais, recursos genéticos, Moura, Piau.

2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate the embryonic production of gilts submitted to three serial embryos collection by laparotomy in order to verify the efficiency of the technical when performed more than one collection and optimize the use of animal as embryos donor. Thirty clinically healthy animals were used in experiment. Thirty gilts *Piau* (23) and *Moura* (7) started the experiment and they were submitted to embryos collection by laparotomy (CollectionI). These animals, 26 gilts were submitted to the second collection (CollectionII) and 14 were submitted to the third collection (CollectionIII), with interval of the 60 days between collections. For each procedure, the gilts estrus were observed daily, twice time, and they were mated by natural mount every 12 hours after estrus detection. The collection was performed six days after the natural breed, where the animals were submitted to laparotomy and they had their uterine horns washed with PBS with the aid of a Foley catheter. The number of lutea bodies ($8,8 \pm 1,7$ vs $7,2 \pm 2,4$ vs $6,5 \pm 1,88$) and total structures ($5,1 \pm 2,5$ vs $5,1 \pm 3,0$ vs $3,3 \pm 2,1$) were lower in CollectionIII than in order collections ($P < 0,05$). The number of viable embryos ($4,6 \pm 2,6$ vs $4,0 \pm 2,7$ vs $2,6 \pm 2,3$) and frozen embryos ($4,1 \pm 2,8$ vs $3,3 \pm 2,6$ vs $2,1 \pm 2,5$) were higher in the CollectionI than the CollectionIII ($P < 0,05$). The recovery rate ($63,6 \pm 21,80$ vs $65,0 \pm 28,7$ vs $58,0 \pm 32,8$) was similar between treatments ($P > 0,05$). The degree of adhesion formation was higher as the data was collected ($P < 0,05$). Swine Embryo collection technical by laparotomy showed efficient to be used in genetic resource conservation programs. Twice consecutive collection was effective to embryo recovery to cryopreservation, however, increasing the number of successive collection can interfere in reproduction health animals.

Keywords: Conservation, national swine, genetic resources, *Moura*, *Piau*.

3 INTRODUÇÃO

A TE é uma técnica que possibilita coletar embriões de uma doadora e transferi-los para uma receptora com finalidade de concluir o período de gestação. Sua importância para a produção animal baseia-se na possibilidade de uma fêmea produzir maior número de proles do que seria possível fisiologicamente durante sua vida reprodutiva (Reichenbach et al., 2002).

A coleta de embriões é possível em todas as espécies de mamíferos (Hiemstra et al., 2005). Em suínos, tem sido realizada por décadas (Hazeleger & Kemp, 1999), porém existem fatores que contribuem para que seu uso seja menor quando comparado com as demais espécies (Youngs, 2001; Dalcin & Lucci, 2010), como particularidades anatômicas e fisiológicas (Dalcin & Lucci, 2010), a ocorrência de puberdade precoce, período curto de gestação e a alta taxa de prolificidade (Youngs, 2001). A falta de sucesso também contribui para que a prática de coleta de embriões, e por consequente, a TE seja minimizada em suínos (Youngs, 2001). No entanto, o sucesso na técnica de coleta e na transferência de embriões em outras espécies, estimulou o desenvolvimento de técnicas semelhantes para suínos (Hazeleger & Kemp, 1999).

Dentre essas metodologias temos a coleta por abate que é o método mais comumente usado para obter embriões de porcas (Herrman et al., 1981; Brüssow et al., 2000; Dobrinsky, 2001). No entanto possui a desvantagem da limitação do uso do animal, ou seja, a doadora de embriões só pode ser utilizada uma vez (Brüssow et al., 2000; Hazeleger & Kemp, 2001; Dobrinsky, 2001), tendo em vista que a conservação de recursos genéticos visa assegurar que o material genético esteja disponível a longo prazo, sem que haja perda de

genes, a técnica de coleta de embriões por abate se torna restrita para tal finalidade (Costa & Martins, 2008; Silva, 2013).

Outra metodologia para obtenção de embriões no estágio de mórula ou blastocisto é a coleta de embriões pelo uso de um cateter transcervical (Hazeleger et al., 1989). No entanto devido a necessidade da técnica em se fazer ressecção dos cornos uterinos, as doadoras de embriões ficam impossibilitadas de serem usadas para reprodução posteriormente (Kobayashi et al., 1989).

Decorrente disso, uma possibilidade para recuperar embriões em estágio de blastocisto para conservação de recursos genéticos tem sido a técnica de coleta de embriões por laparotomia, devido a possível reutilização da doadora para coleta de embriões e/ou ser utilizada na reprodução animal. No entanto, a técnica se limita entre dois a quatro procedimentos, pois formam depósitos de tecido fibroso, decorrente da cicatrização do manuseamento, denominadas aderências (Hazeleger & Kemp, 2001).

O objetivo do presente estudo foi o de avaliar a eficiência da técnica de coleta de embriões sucessivas por laparotomia a fim de ser utilizada como ferramenta de programas de conservação de recursos genéticos para enriquecimento de bancos de germoplasma.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local do Experimento e animais experimentais

O Experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília sob protocolo UnBDOC n°.150682/2012.

O Experimento foi realizado entre os meses de novembro de 2012 e agosto de 2014, no Setor de Campo Experimental Fazenda Sucupira da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília – DF, situado 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 1050 a 1250m. O clima predominante é tropical chuvoso, indicando inverno seco e verão chuvoso. A fazenda conta com uma área total de 1.800 hectares, distribuída em áreas de cerrado, pastagem e agricultura (Walter, 1998).

Foram utilizadas 30 fêmeas suínas das raças Moura (7) e Piau (23), clinicamente saudáveis, cíclicas, nulíparas. Todos animais já haviam apresentado estro anteriormente ao experimento.

4.2 Detecção de estro e monta natural

Foram utilizados dois cachaços para o auxílio na observação de estro, o qual foi feito a cada 12 horas. Em cada observação os cachaços foram mantidos com as fêmeas por 30 min. Ao apresentarem reflexo de tolerância ao cachaço, a data foi anotada em uma ficha específica para poder estipular futuro estro, data de cobertura e coleta de embriões (Hoghes et al., 1997; Woloszyn, 2005; Amaral et al., 2006).

Em data pré-determinada os animais que apresentaram estro foram submetidos à monta natural, onde foram usados quatro cachaços, das raças Moura (2) e Piau (2), com parâmetros seminais aceitáveis para a espécie suína comprovado por exame andrológico (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 – Qualidade do sêmen dos reprodutores utilizados para monta natural das marrãs

Animal	Volume Fração Rica	Vigor	Exame Andrológico		Concentração
			Motilidade Total	Motilidade Progressiva	
Piau 01	14,5 mL	3,3	74,2%	40,9%	1526,9 x 10 ⁶ sptz/mL
Piau 02	21,25 mL	2,6	76,2%	45,4%	1133,8 x 10 ⁶ sptz/mL
Moura 01	14,5 mL	2,6	82,5%	54,2%	1308,1 x 10 ⁶ sptz/mL
Moura 02	22,0 mL	2,8	80,9%	62,1%	777,5 x 10 ⁶ sptz/mL

A monta natural foi realizada conforme indicado por Woloszyn (2005) e Amaral et al. (2006).

4.3 Delineamento experimental

Trinta marrãs iniciaram o Experimento e foram submetidas a coleta de embriões por laparotomia (ColetaI). Dessas, 26 marrãs foram submetidas a segunda coleta (ColetaII) e 14 submetidas a terceira coleta (ColetaIII) com intervalo de 60 dias cada.

A coleta de embriões foi realizada seis dias após a primeira cobertura.

Os animais foram tranquilizados com azaperona (2mg/kg/IM) e anestesiados com cetamina (15mg/kg/IV) (Oliveira et al., 2003; Comassetto et al., 2014), e colocados em maca cirúrgica em posição de *Trendelenburg*. No campo cirúrgico destinado aos procedimentos de laparotomia, foi feita a tricotomia e antissepsia com tintura de iodo 2% e álcool 70%, seguida por anestesia local infiltrativa com cloridrato de lidocaína, e posterior incisão de aproximadamente 8 cm da parede abdominal. Posteriormente foi realizado a identificação, tracionamento cuidadoso e exposição dos cornos uterinos e ovários, onde foi realizada a contagem de CL nos ovários, para mensurar as ovulações, e a lavagem do corno uterino.

Para o procedimento de lavagem, uma sonda de Foley nº 10, 12 ou 14, de acordo com o tamanho do útero, foi introduzida no terço final de cada corno uterino. Próximo à junção útero-tubárica foi colocado um cateter nº 16G, por onde o PBS suplementado com 1% de SFB, previamente aquecido a 37°C foi introduzido. Foi usado um volume total de 60 mL de meio de lavagem por corno uterino. O líquido recuperado foi armazenado em placas de Petri e em seguida realizada a avaliação das estruturas recuperadas. Nas coletas que apresentavam aderência foram classificadas quanto ao grau de aderência, em: 0 = nenhuma aderência; 1 = pouca aderência; 2 = múltiplas aderências, mas não interfere na coleta; 3 = múltiplas aderências que interferem na coleta.

As estruturas recuperadas foram avaliadas em aumento de 20 a 50X em estéreo-microscópio. Quando encontradas foram transferidas para gotas de meio de manutenção (Holding plus™, 0,4% BSA, Embriocare, Cultilab, Brasil) para posterior avaliação. As estruturas coletadas foram classificadas de acordo com o estágio de desenvolvimento e qualidade seguindo os parâmetros morfológicos preconizados pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

4.4 Análise estatística

As variáveis foram testadas quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto a homocedasticidade pelo teste de Bartlett. As variáveis CL, estruturas totais e taxa de recuperação, que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e suas médias comparadas pelo teste de Duncan. As variáveis embriões viáveis, embriões congeláveis, e grau de aderência, que não apresentaram distribuição normal e/ou homocedasticidade, foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e suas médias submetidas ao teste t-Student.

5 RESULTADOS

Foram coletadas um total de 154 nas marrãs submetidas a primeira coleta (ColetaI), 133 nas submetidas a segunda coleta (ColetaII) e 46 estruturas totais nas submetidas a terceira coleta (Coleta III); sendo dessas 138, 104 e 37 embriões viáveis e 124, 86 e 30 embriões congeláveis, na primeira, segunda e terceira coleta, respectivamente.

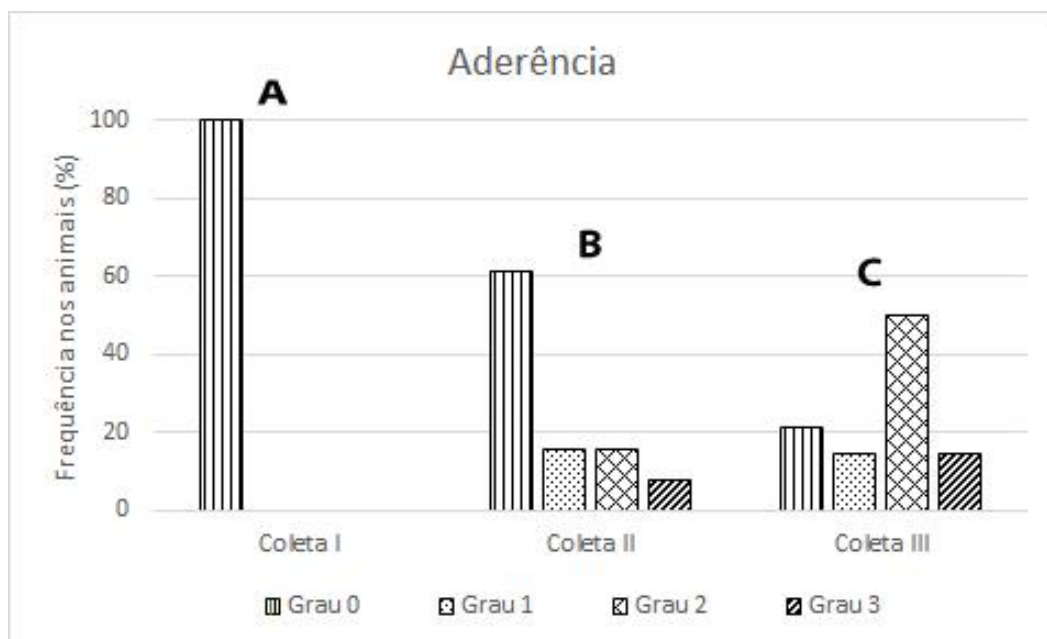
Houve uma redução no número de CL, de estruturas totais recuperadas, de embriões viáveis e congeláveis quando realizada a terceira coleta ($P<0,05$) (Tabela 2.2). Houve um aumento nas formações de aderência à medida que foram realizadas as coletas sucessivas. Na ColetaII 38,5% dos animais apresentaram aderências nos ovários e/ou no útero enquanto que na ColetaIII 78,6% dos animais apresentaram aderência ($P<0,05$) (Figura 2,1).

A taxa de recuperação embrionária não sofreu influência ($P>0,05$) da série de coletas (Tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Valores médios e desvio-padrão ($\bar{x}\pm s$) da resposta ovulatória e recuperação embrionária em diferentes coletas seriadas por laparotomia.

	CL	Estrut. Totais	Emb. Viáveis	Emb. Cong.	Tx de Rec (%)
ColetaI (n=30)	8,0 \pm 2,9 ^a	5,1 \pm 2,5 ^a	4,6 \pm 2,6 ^a	4,1 \pm 2,8 ^a	63,6 \pm 21,8
ColetaII (n=26)	8,0 \pm 3,0 ^a	5,11 \pm 3,0 ^a	4,0 \pm 2,7 ^{ab}	3,3 \pm 2,6 ^{ab}	65,0 \pm 28,7
ColetaIII (n=14)	5,8 \pm 1,8 ^b	3,3 \pm 2,1 ^b	2,6 \pm 2,3 ^b	2,1 \pm 2,5 ^b	58,0 \pm 32,8

^{a,b}Letras distintas na mesma coluna ($P<0,05$).



^{A,B,C} Letras distintas diferem entre os tratamentos ($P < 0,05$) pelo teste de Kruskal Wallis

Figura 2.1: Frequência do grau de aderência nas coletas

6 DISCUSSÃO

A criopreservação de embriões é uma ferramenta indispensável para o estabelecimento de bancos de germoplasma animal (Andrabi & Maxwell, 2007), sendo assim, a coleta de embriões se torna necessária para a conservação de genes de interesse (Mariante et al., 2008).

Não existe uma técnica completamente eficaz para coletar embriões cirurgicamente em suínos. Um dos motivos para a dificuldade da coleta de embriões cirúrgica em suínos é devido a anatomia do trato reprodutivo, mais precisamente, devido ao tamanho dos cornos uterinos e sua forma de alças intestinais (Hazeleger et al., 1989; Brüssow et al., 2000).

A taxa de recuperação embrionária é uma forma de verificar a eficácia dos tratamentos para recuperação de embriões. A taxa do presente estudo se mostra inferior aos estudos realizados por Herrman et al. (1981); Herrman e Holtz (1981); Schlieper e Holtz (1986); Wollenberg et al. (1990); Schlieper & Holtz (1997); Hazeleger et al. (2000). No entanto, os resultados alcançados neste Experimento são considerados satisfatórios devido à dificuldade de aplicação da técnica, principalmente quando comparada com técnicas de coleta por abate e laparotomia para lavagem da tuba uterina. Além disso, a técnica utilizada apresenta boa utilidade para programas de conservação uma vez que não implica do abate das doadoras e nem na utilização de sistemas de cultivo *In vitro* para concluir o desenvolvimento embrionário até o estágio de desenvolvimento que permita a criopreservação dos embriões. A taxa de recuperação embrionária, neste estudo, também se demonstrou menor as alcançadas por Rátky et al. (2001) e Fujino et al. (2006), no entanto, as taxas então em consonância com as encontradas em outros trabalhos que utilizam a técnica cirúrgica de coleta de embriões

em ovinos (Dattena et al., 1994; Cordeiro, 2003), caprinos (Senlis, 1990) e suínos (Silva, 2013). Ainda assim na terceira coleta, em que o presente estudo apresentou a menor taxa de recuperação, foi superior ao demonstrado por Hazeleger et al. (1989) e por Besenfelder et al. (1997). Os autores citam entre um dos problemas, a perda de líquido no interior do útero, devido ao não manuseamento dos cornos uterinos, o que poderia implicar na maior perda de embriões durante o procedimento, e conseqüentemente, menor taxa de recuperação embrionária quando comparada com a laparotomia.

Não se tem evidências que a diferença significativa do número de CL ($P < 0,05$) entre os tratamentos, tenha correlação com a quantidade de coletas realizadas entre os tratamentos, uma vez que a quantidade de ovulações nos ovários de cada animal depende de fatores fisiológicos e endócrinos de cada indivíduo. Entretanto, é possível que o estresse causado pelos procedimentos cirúrgicos consecutivos possa ter influenciado a liberação de gonadotrofinas pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, reduzindo o desenvolvimento folicular e conseqüentemente o número de ovulações. Outro fator que pode ter contribuído para a diminuição no número de CL na terceira coleta é devido a maior formação de aderência presente nesta, o que poderia dificultar a mensuração de CL na superfície ovariana.

Os resultados de quantidade e qualidade de embriões alcançados entre as coletas na laparotomia são semelhantes ao encontrado por Herrman e Holtz (1981), Schlieper e Holtz (1986) e Kobayashi et al. (1989) e diferiram estatisticamente entre os tratamentos ($P < 0,05$). No entanto, esta diferença, possivelmente, está mais ligada a menor quantidade de folículos ovulados na terceira coleta do que a redução na recuperação embrionária na terceira coleta, uma vez que a taxa de recuperação, embora numericamente menor na ColetaIII, não diferiu entre os tratamentos. Em consequência da redução na quantidade de estruturas totais na ColetaIII, o número de embriões viáveis e congeláveis também reduziram ($P < 0,05$). Esse resultado também pode ter tido influência da presença de aderência na ColetaIII, uma vez que as aderências podem atrapalhar a captação ovocitária pelas fímbrias.

Notou-se aumento das aderências decorrentes da coleta anterior a medida que as coletas sucessivas eram realizadas possivelmente devido a técnica utilizada ser um procedimento invasivo, causando deposição de tecido fibroso de origem cicatricial

nas regiões mais manipuladas. Essa deposição de tecido fibroso de cicatrização se dá devido manipulação cirúrgica dos cornos uterinos e ovários, seja por extravasamento de sangue, por contaminação, ou pelo próprio procedimento.

Os resultados mostram que a ColetaI e ColetaII são eficientes se coletar embriões em estágio de mórula ou blastocisto. A escolha entre a realização de uma ou de duas coletas consecutivas deverá considerar a necessidade de enriquecimento dos bancos de germoplasma e o risco à saúde reprodutiva da fêmea. A realização de três coletas consecutivas mostrou ser menos indicada devido a redução da produção embrionária e ao aumento de aderências decorrentes do procedimento anterior.

7 CONCLUSÃO

Duas coletas consecutivas foram eficazes em recuperar embriões para criopreservação. No entanto, a realização de coletas sucessivas aumenta o grau de aderência do aparelho reprodutivo podendo comprometer a saúde reprodutiva das mães.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMARAL, A. L.; DA SILVEIRA, P. R. S.; DA LIMA, G. J. M. M. Boas práticas de produção em suínos. **Embrapa – Circular técnica 50**. Concórdia, 2006, p.11-14.

ANDRABI, S. M. H; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.223-243, 2007.

BESSENFELDER, U.; MÖDH, J.; MTILLER, M.; BREM, G. Endoscopic embryo collection and embryo transfer into the oviduct and the uterus of pigs. **Theriogenology**, v.47, p.1051-1060, 1997.

BRÜSSOW, K. P.; TORNER, H.; KANITZ, W.; RÁTKY, J. In vitro technologies related to pig embryo transfer. **Reproduction Nutrition Development**, v.40, p.469–480, 2000.

COMASSETTO, F.; BEIER, S. L.; FARIAS, F. H.; MENEGASSO, R. B.; REGALIN, D.; TOCHETO, R.; OLESKOVICZ, N. Avaliação analgésica e sedativa de dois protocolos em suínos submetidos à orquiectomia. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.42, p.1212, 2014.

CORDEIRO, M. F.; LIMA-VERDE, J. B.; LOPES-JÚNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FARIAS, L. N.; SALLES, H. O.; SIMPLÍCIO, A. A., RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with Pfs. **Small Ruminant Research**. v.49, p.19–23, 2003.

COSTA, P. M.; MARTINS, C. F. Conservação de recursos genéticos animais através de biotécnicas de reprodução. **Universidade de Ciência e Saúde**, Brasília, v.6, n.1, p.39–55, 2008.

DALCIN, L.; LUCCI, C.M. Criopreservação de embriões de animais de produção: princípios criobiológicos e estado atual. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.149-159, 2010

- DATTENA, M.; VESPIGNANI, S.; BRANCA, A.; GALLUS, M.; LEDDA, S.; NAITANA, S.; CAPPALÀ, P. Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. **Theriogenology**, v.42, p.235-239, 1994.
- DOBRINSKY, J.R. Cryopreservation of swine embryos: a chilly past with a vitrifying future. **Theriogenology**, v.56, p.1333-1344, 2001.
- FUJINO, Y.; NAKAMURA, Y.; KOBAYASHI, H.; KIKUCHI, K. Relationship between time elapsed after human chorionic gonadotropin administration and developmental stage in porcine embryos collected from prepubertal gilts. **Journal Reproduction Development**, v.52, p.267-275, 2006.
- HAZELEGER, W.; VAN DER MEULEN, J.; VAN DER LENDE, T. A method for transcervical embryo collection in the pig. **Theriogenology**, v.32, p.727-734, 1989.
- HAZELEGER, W.; KEMP, B. State of the art in pig embryo transfer. **Theriogenology**, v.51, p.81-90, 1999.
- HAZELEGER, W.; KEMP, B. Recent developments in pig embryo transfer. **Theriogenology**, v.56, p.1321-1331, 2001.
- HERRMAN, H.H.; SCHAFER, B.; HOLTZ, W. Collection of two-cell pig embryos and their culture in media containing different protein components. **Animal Reproduction Science**, v.4, p.137-142, 1981.
- HERRMAN, H. H.; HOLTZ, W. Culture of pig embryos collected in situ or after slaughter. **Animal Reproduction Science**, v.4, p.143-147, 1981.
- HIEMSTRA, S.J.; VAN DER LENDE, T.; WOELDERS, H. The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. **The Role of Biotechnology**, v.5 n.7, p.25-36, 2005.
- KOBAYASHI K.; HAYASHI, S.; OHTUBO, Y.; HONDA, A.; MIZUNO, J.; HIRANO, S. Nonsurgical embryo collection from sows with surgically shortened uteri. **Theriogenology**, v.32, n.1, p.123-129, 1989.
- MARIANTE, A. S.; PAIVA, S. R.; ALBUQUERQUE, M. S. M. et al., Visão estratégica da conservação de recursos genéticos animais para os próximos vinte anos. In: Simpósio Brasileiro de Recursos Genéticos, 2, 2008, Brasília, **Anais...** Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 91. 2008
- NICOLA, E. S.; DESCHAMPS, J. C.; MACEDO JÚNIOR, M. et al. Criopreservação de embriões de suínos adicionando trealose aos crioprotetores etilenoglicol ou glicerol. **Ciência Rural**, v.29, n.1, p.111-115, 1999.
- OLIVEIRA, L. C. R.; MARQUES, J. A.; SANTOS, D. A. S.; FERNANDES, C. H. C. Efeitos da associação de cetamina e midazolam em suínos (sus scrofa) pré-tratados com azaperona ou acepromazina. **Ars Veterinaria**, v.19, n.3, p.235-240, 2003.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONSALVES, P. D. B. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002, p.127-178.

SCHILIEPER, B.; HOLTZ, W. Transfer of pig embryos collected by laparotomy or slaughter. **Animal Reproduction Science**, v.12, p.109-114, 1986.

SCHILIEPER, B.; HOLTZ, W. Embryo collection from sows of the Goettingen miniature pig breed after synchronization with an oral progestin followed by gonadotropins. **Theriogenology**, v.47, n.1, p.178-178, 1997.

SENLIS, Y. Fécondation in vitro chez les caprins: effect de la race et de la saison. Mémoire de fin d'Etudes, **ENSAIA**, p.35. 1990.

SILVA, P. C. P. **Coleta de embriões em suínos nacionais**. 2013. 33p. TCC (graduação em veterinária), Faculdades Integradas da União Educacional do Planalto Central, Brasília, 2013.

SOMMER, J. R.; COLLINS, E. B.; ESTRADA, J. L.; PETTERS, R. M. Synchronizacion and superovulation of mature cycling gilts for the collection of pronuclear stage embryos. **Animal Reproduction Science**, v.100, p.402-410, 2007.

WALTER, B.M.; SAMPAIO, A.B., A vegetação da fazenda sucupira. 1998. 110p. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Brasília, 1998.

WOLLENBERG, C.; WENTZ, I.; BLUM, B.; HOLTZ, W. Survival of pig embryos flushed from the reproductive tract immediately or two hours after slaughter of donors. **Journal Animal Science**, v.68, p.2023-2026, 1990.

WOLOSZYN, N. Procedimentos básicos para a produção de suínos nas fases de reprodução, maternidade e creche. **Documentos 100 – Embrapa**. Concórdia, 2005, p.26-36.

YOUNGS, C. R. Factors influencing the success of embryo transfer in the pig, **Theriogenology**, Iowa, v.56, p.1311-1320, 2001.

CAPÍTULO 3

SINCRONIZAÇÃO DE ESTRO PARA COLETA DE EMBRIÕES EM SUÍNOS

1 RESUMO

Objetivou-se avaliar a resposta embrionária e o comportamento estral de marrãs submetidas a três protocolos de sincronização de estro contendo P4, eCG e GnRH para posterior coleta de embriões. Foram utilizados 9 marrãs da raça Piau, clinicamente saudáveis, com idade entre 12 e 24 meses. Os animais foram submetidos a 18 dias de progesterona (Altrenogest) (Grupo P4); com associação de 25 µg de GnRH 104 horas após a última administração de P4 (Grupo GnRH); e associação de 1000 UI de eCG 24 horas após a última aplicação da P4 (Grupo eCG+GnRH). O delineamento experimental foi em modelo *cross over* onde todos animais passaram pelos três tratamentos. Todos os animais tiveram o estro observado a partir de 24 horas, após a última administração oral de P4. A inseminação artificial foi realizada após 12 e 24 horas da manifestação de estro no GP4, e após 128 e 144 horas no GGnRH e GeCG+GnRH. Os animais foram levados para coleta de embriões por laparotomia seis dias após a primeira inseminação artificial. Todos os animais apresentaram estro entre quatro e sete dias, não havendo diferença significativa entre os tratamentos ($P>0,05$). O número de CL ($8,6\pm 3,9$; $8,3\pm 2,1$; $26,7\pm 15,0$), folículos anovulatórios ($4,3\pm 3,7$; $3,9\pm 3,9$; $17,2\pm 9,5$), estruturas totais ($5,2\pm 3,6$; $5,1\pm 3,1$; $1,7\pm 2,7$), embriões viáveis ($5,0\pm 3,5$; $4,8\pm 3,3$; $0,4\pm 0,7$), embriões congeláveis ($3,6\pm 3,4$; $3,3\pm 3,8$; $0,1\pm 0,3$) e a taxa de recuperação ($63,70\pm 38,90$; $58,64\pm 24,7$; $5,38\pm 9,5$) apresentaram diferença significativa entre o GeCG+GnRH e os demais tratamentos ($P<0,05$). O grau de formação de aderência ($1,4\pm 0,7$; $1,7\pm 1,0$; $1,2\pm 0,4$) foram semelhantes entre os tratamentos ($P>0,05$). Todos os protocolos foram eficazes para sincronizar o estro no período de quatro a sete dias em marrãs. Os protocolos GP4 e GGnRH foram eficazes na produção e recuperação de embriões para enriquecimento do Banco Brasileiro de Germoplasma Animal. No entanto, o uso de

uma dosagem de 1000 UI de eCG, 24 horas após o fim da alimentação com P4, embora tenha superovulado os animais, não foi eficaz para a produção embrionária.

Palavras-chave: Altrenogest, eCG, GnRH, manutenção do ciclo estral, recursos genéticos, Piau.

2 ABSTRACT

The study aimed to evaluate the embryonic answer and estrous behavior of gilts submitted to three estrus synchronization protocols containing P4, eCG e GnRH for posterior embryos collection. Nine gilts Piau breed were used, clinically healthy, aged between 12 and 24 months. The animals were submitted to 18 days of progesterone (Altrenogest) (Group P4), with association of 25 µg of GnRH 104 hours after the last administration of P4 (Group GnRH); and association of 1000 UI de eCG 24 hours after last application of P4 (Group eCG+GnRH). The experimental design was in cross over model, when all animals passed through three treatments. All animals had the estrus observed from 24 hours, after the last oral administration of P4. The artificial insemination was performed after 12 and 24 hours of the estrus manifestation, in GP4, and after 128 and 144 hours in GGnRH and GeCG+GnRH. The animals were brought for embryos collection by laparotomy six days after the first artificial insemination. All animals showed estrus between four and seven days, hadn't significant difference between treatments ($P>0,05$). The number of CL ($8,6\pm3,9$; $8,3\pm2,1$; $26,7\pm15,0$), anovulatory follicles ($4,3\pm3,7$; $3,9\pm3,9$; $17,2\pm9,5$), total structures ($5,2\pm3,6$; $5,1\pm3,1$; $1,7\pm2,7$), viable embryos ($5,0\pm3,5$; $4,8\pm3,3$; $0,4\pm0,7$), frozen embryos ($3,6\pm3,4$; $3,3\pm3,8$; $0,1\pm0,3$) and the recovery rate ($63,70\pm38,90$; $58,64\pm24,7$; $5,38\pm9,5$) showed significant difference between GeCG+GnRH and other treatments ($P<0,05$). The degree of adhesion formation ($1,4\pm0,7$; $1,7\pm1,0$; $1,2\pm0,4$) was similar between treatments ($P>0,05$). All protocols were effective for estrus synchronization in period of four to seven days in gilts. The protocols GP4 and GGnRH were effective for embryos production and embryos recuperation to enrichment of Brazilian Animal Germplasm Bank. However, the use of a dosage of 1000 UI eCG, 24 hours after the end feeding

with P4, though had superovulated the animals, wasn't effective to embryonic production.

Keywords: Altrenogest, eCG, GnRH, estrous cycle maintenance, genetic resources, Piau.

3 INTRODUÇÃO

A alta variabilidade e o tempo de duração de estro dificultam a realização de ações como inseminação no tempo fixo, e a coleta de embriões (Tummaruk et al., 2011).

A sincronia do plantel facilita o manejo reprodutivo, pois uma homogeneidade no momento do estro, tem por consequente, uma sincronização do momento da inseminação e, futuramente, dos partos (Pinese, 2005; Wentz et al., 2007).

Estudos demonstram que a ovulação pode ocorrer entre 10 a 60 horas após o início do estro (Kemp et al., 1998), logo essa variabilidade entre o início do estro com a ovulação é exacerbada se tornando mais difícil a prática de técnicas reprodutivas no rebanho (Tummaruk et al., 2011). Na prática as porcas são inseminadas várias vezes durante o estro na tentativa de obter o momento ótimo para inseminação, ou seja, o momento exato para depositar espermatozoides próximo a ovulação (Scheid & Wentz, 1993).

Sendo assim, tem sido desenvolvido protocolos para sincronizar o estro das porcas, contribuindo para as tecnologias reprodutivas (Tummaruk et al., 2011). Logo, o uso de fármacos no ciclo estral em suínos tem como finalidade a sincronização do estro em marrãs, e a sincronização do estro para o emprego de inseminação artificial em tempo fixo (Kirkwood et al., 2000; Wentz et al., 2007; Moretti et al., 2013). Os mais conhecidos e utilizados hormônios que permitem o controle do ciclo estral em suínos são o eCG, o hCG, o GnRH e seus análogos, a PGF2 α e seus análogos e os progestágenos (Moretti, 2013; Tummaruk et al., 2011). O protocolo mais utilizado para sincronizar o estro em porcas é a associação do ecG com o hCG, seja em

dose única ou por horas após, é usado, principalmente, para sincronizar porcas de desmama e estimular o estro em porcas pré-púberes (Estienne & Hartsock, 1997; Rensis et al., 2003).

No entanto, para sincronizar porcas cíclicas existe o uso de um progestágeno oral (Altrenogest), oferecido diariamente na ração em quantidades de 15 a 20 mg, por um período de 15 a 18 dias. Sua administração inibe a liberação de gonadotrofinas pela hipófise, adiando o início da fase folicular e mantendo a fêmea em anestro pelo período desejado, havendo retorno a ciclicidade após suspensão do tratamento (Stevenson & Davis, 1982; Wentz et al., 2007; Sommer et al., 2007). Seguindo o tratamento com progestágeno, para sincronizar as ovulações podem ser usados promotores de crescimento como o eCG e o GnRH (Brüssow et al., 1990; Brüssow et al., 1996).

Um dos principais problemas enfrentado ao coletar embriões de marrãs cíclicas, é a grande dispersão dos momentos em que o estro é manifestado, tendo que observar estro com o auxílio de um cachão por períodos muito longos, ou até mesmo durante um ciclo estral completo para se obter o melhor momento para inseminar e, posteriormente, realizar a coleta de embriões. A sincronização do estro auxilia no manejo reprodutivo e no manejo para coleta de embriões, pois uma homogeneidade no momento do estro, tem por consequência uma padronização no momento da inseminação e nas coletas de embriões.

O presente estudo tem por objetivo testar protocolos de sincronização de estro e indução da ovulação contendo P4, eCG e GnRH em marrãs cíclicas para ser realizada a coleta de embriões.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local do Experimento e animais experimentais

Este Experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Recursos Genéticos e Biotecnologia sob protocolo nº. 21195003479/2014-80.

O experimento foi realizado entre os meses de Maio e Setembro de 2015, no Setor de Campo Experimental Fazenda Sucupira da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Foram utilizadas 9 marrãs suínas da raça Piau, clinicamente saudáveis, cíclicas, com 12 a 24 meses de idade, pesando entre 60-110 kg.

4.2 Delineamento experimental

O experimento foi realizado em modelo de cross-over, onde todos os nove animais foram submetidos aos três protocolos de sincronização de estro: Grupo P4 (GP4) – administração oral de 20 mg (5 mL) de progestágeno (Altrenogest, Regumate®, Intervet Schering -Plough Animal Health) durante 18 dias; Grupo GnRH (GGnRH) – administração oral de 20 mg de progestágeno oral (Altrenogest)

associado a 25 µg GnRH (Gestran®, União Química Farmacêutica Nacional S.A.) após 104 horas da última administração de P4; Grupo eCG + GnRH (GeCG+GnRH) – administração oral de 20 mg de progestágeno oral (Altrenogest), associado a 1000 UI de eCG (Novormon®, Intervet Schering-Plough do Brasil S.A.) após 24 horas da última administração de P4 e a 25µg de GnRH 104 horas após a administração do progestágeno (Figura 3.1).

Durante e após o protocolo de sincronização as porcas permaneceram em baias coletivas, alimentadas com ração de manutenção com 14% de proteína bruta, oferecida de manhã e à tarde, e água a vontade através de bebedouro automático tipo chupeta. A progesterona (Altrenogest) era oferecida individualmente, com o auxílio de um pão em formato de cesta, junto à ração matutina, para facilitar a absorção do fármaco.

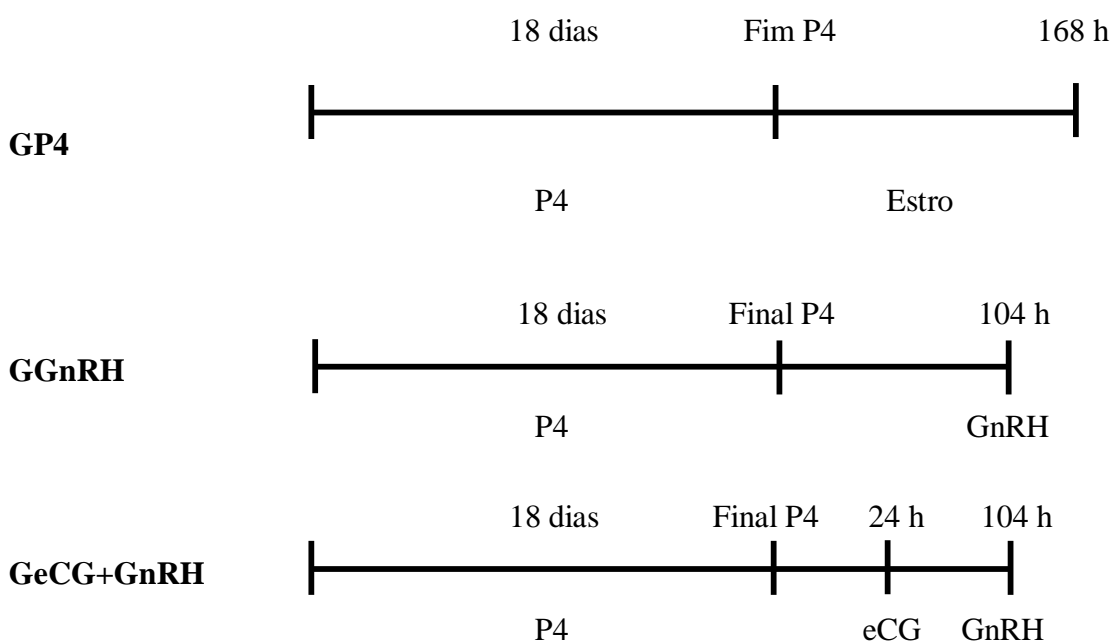


Figura 3.1 Representação esquemática dos tratamentos para sincronização do estro de marrãs para a coleta de embriões.

Nos animais do GP4 e GGnRH, foi aplicado 1 mL de solução fisiológica no momento da aplicação de eCG e GnRH, quando necessário, para que o estresse pelo manejo fosse o mesmo nos três grupos.

Em todos os animais, a observação de estro foi iniciada 24 horas após a retirada da P4. Para isto, foi utilizado 3 cachacos que eram colocados nas baias

coletivas, por 30 minutos. Os animais que apresentavam estro eram anotados em ficha específica (Woloszyn, 2005; Amaral et al., 2006).

Os animais do GP4 foram inseminados 12 horas após a manifestação de estro e repetida a inseminação com 24 horas (Woloszyn, 2005; Amaral et al., 2006). Os animais do GGnRH e GeCG+GnRH foram inseminados em tempo fixo 128 horas e 144 horas após a última administração de progesterona (Martinat-Botté et al., 1990; Brüßow et al., 1996; Martinat-Botté et al., 2010). Os animais foram inseminados com sêmen refrigerado de *pool* de três cachos, com concentração de 3×10^9 spz/mL, motilidade de 45%, vigor 3.

No quinto dia após a primeira inseminação artificial os animais foram colocados em jejum hídrico e alimentar por 24 horas.

Os animais foram tranquilizados com azaperona (2mg/kg/IM) e anestesiados com cetamina (15mg/kg/IV) (Oliveira et al., 2003; Comassetto et al., 2014), e colocados em maca cirúrgica em posição de *Trendelenburg*. No campo cirúrgico destinado aos procedimentos de laparotomia, foi feita a tricotomia e antissepsia com tintura de iodo 2% e álcool 70%, seguida por anestesia local infiltrativa de 0,2 mg de cloridrato de lidocaína, e posterior incisão de aproximadamente 8 cm da parede abdominal. Posteriormente foi realizada a identificação, tracionamento cuidadoso e exposição dos cornos uterinos e ovários, onde foi realizada a contagem de CL nos ovários, para representar as ovulações, e a lavagem do corno uterino.

Foi introduzido uma sonda de Foley nº 10, 12 ou 14, de acordo com o tamanho do útero, no terço distal de cada corno uterino, tendo o balão inflado para evitar refluxo e passagem de líquido. Próximo a junção útero-tubárica foi colocado um cateter endovenoso nº 16, por onde foi introduzido 60 mL de PBS suplementado com 1% de SFB, previamente aquecido a 37°C. O líquido recuperado foi armazenado em placas de Petri e, em seguida, levados para laboratório para avaliação das estruturas recuperadas.

As estruturas recuperadas foram avaliadas em aumento de 20 a 50X em estéreo-microscópio. Quando encontradas foram transferidas para gotas de meio de manutenção (Holding plus™, 0,4% BSA, Embriocare, Cultilab, Brasil) para posterior avaliação. Os embriões coletados foram classificados de acordo com o estágio de

desenvolvimento e qualidade seguindo os parâmetros morfológicos preconizados pela IETS.

Foi dado um período de descanso de 60 dias entre o fim de um tratamento e o início do próximo tratamento.

4.3 Análise estatística

As variáveis foram testadas quanto a normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e quanto a homocedasticidade pelo teste de Bartlett. Todas as variáveis avaliadas não apresentaram distribuição normal e/ou homoscedasticidade e foram analisadas pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e suas médias submetidas ao teste t-Student. As variáveis da amplitude para manifestação de estro, foram analisadas pelo teste F.

5 RESULTADOS

Foram considerados sincronizados todos os animais que manifestaram sinais clínicos de estro dentro de 168 horas após a última administração de P4. Sendo assim, foi positiva a resposta aos tratamentos, visto que, a ocorrência de estro se deu nesse período em todos os animais de todos os protocolos. Os animais manifestaram comportamento de estro no período entre 96 e 152 horas, 96 e 128 horas, 72 e 104 horas, para o GP4, GGnRH e GeCG+GnRH respectivamente (Figura 3.2). A distribuição na manifestação de estro foi semelhante entre os tratamentos ($P>0,05$), pois a amplitude dos tratamentos não mostrou diferença significativa (Tabela 3.1).

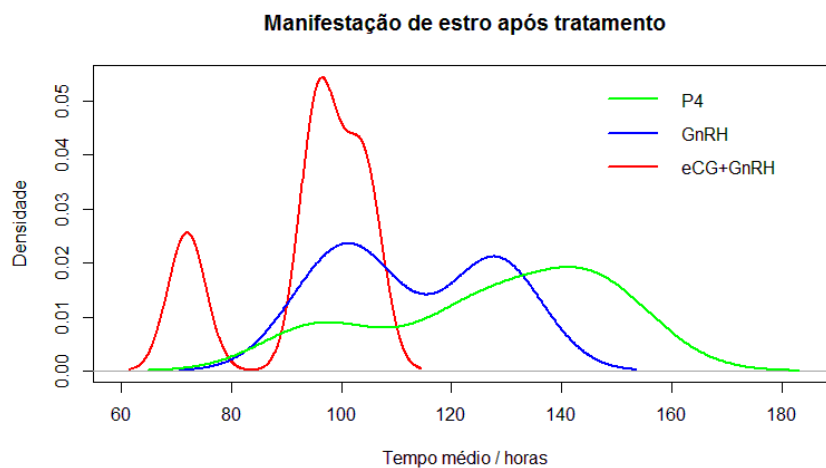


Figura 3.2: Distribuição de densidades do tempo médio da manifestação de estro em marrãs submetidas a protocolos contendo P4, eCG e GNRH para posterior coleta de embriões.

Os protocolos de sincronização influenciaram significativamente ($P < 0,05$) a quantidade de CL, quantidade de folículos anovulatórios, estruturas totais, embriões viáveis, embriões congeláveis e na taxa de recuperação embrionária (Tabela 3.2). Os animais que foram estimulados com eCG tiveram um aumento no número de CL e folículos anovulatórios, porém uma queda quanto a produção embrionária.

Tabela 3.2 – Valores médios e desvio-padrão ($\bar{x} \pm s$) da resposta ovulatória e recuperação embrionária em diferentes protocolos de sincronização.

	CL	Fol. Anov.	Estru. Totais	Emb. Viáveis	Emb. Cong.	Tx de Rec (%)
GP4 (n=9)	$8,6 \pm 3,9^b$	$4,3 \pm 3,7^b$	$5,2 \pm 3,6^a$	$5,0 \pm 3,5^a$	$3,6 \pm 3,4^a$	$63,7 \pm 38,9^a$
GGnRH (n=9)	$8,3 \pm 2,1^b$	$3,9 \pm 3,9^b$	$5,1 \pm 3,1^a$	$4,8 \pm 3,3^a$	$3,3 \pm 3,8^a$	$58,6 \pm 24,7^a$
GeCG+GnRH (n=9)	$26,7 \pm 15,0^a$	$17,2 \pm 9,5^a$	$1,7 \pm 2,7^b$	$0,4 \pm 0,7^b$	$0,1 \pm 0,3^b$	$5,4 \pm 9,5^b$

^{a,b}Letras distintas na mesma coluna ($P < 0,05$).

6 DISCUSSÃO

A manifestação de estro é uma ferramenta eficaz de avaliar a responsividade dos animais aos tratamentos de sincronização. Neste Experimento, 100% dos animais manifestaram estro no período pré-determinado nos três tratamentos, demonstrando que todos os protocolos foram eficazes em sincronizar o estro (Tabela 3.1).

O tempo médio para a manifestação de estro no GP4 foi de $128 \pm 20,78$ horas, no GGnRH de $112,88 \pm 14,66$ e no GeCG+GnRH $93,33 \pm 12,64$, onde todos os animais apresentaram estro no período de sete dias após a última administração de progesterona. O que está de acordo com o resultado encontrado por Martinat-Botté et al. (2010), Martinat-Botté et al. (1995) e Ashworth et al. (1992). Devido os animais tenderem a manifestar estro até 7 dias a partir da remoção da progesterona oral e conseqüentemente do aumento fisiológico do estradiol (Ashworth et al., 1992; Martinat-Botté et al., 1990; Martinat-Botté et al., 1995; Koutsotheodoros et al., 1998; Cassar, 2009), a manifestação estral no presente estudo e nos estudos citados provavelmente é mais influenciada pela condição folicular no momento da remoção do progestágeno do que da estimulação folicular com eCG ou da indução da ovulação com GnRH.

Foram considerados superovulados os animais que possuíam mais de 10 ovulações, visto que raças de suínos localmente adaptadas, normalmente, ovulam entre 7 e 8 folículos, quantidade menor quando comparado com raças comerciais (12 a 15 ovulações). No presente estudo quando foi aplicado eCG nos animais, os mesmos apresentaram quantidade de ovulações bastante superior aos demais grupos ($P < 0.05$) (Tabela 3.2). O número alto de ovulações utilizando eCG também foi encontrado por Baker & Coggins (1968), Besenfelder et al. (1997), Hazeleger et al. (2000), Rátky et al.

(2001), Wallenhorst & Holtz (2002), Fujino et al. (2006), Kauffold et al. (2007), Sommer et al. (2007) e Martinat-Botté et al. (2010) com médias superiores a 20 ovulações em porcas de raças comerciais, quando aplicadas doses iguais ou superiores a 1000 UI. Devido a atividade do eCG ser semelhante ao FSH e LH (Lecompte et al., 1998; Murphy e Martinuk, 1991; Brüssow et al., 2009), uma dosagem de 1000 UI, desencadeia maior crescimento folicular, estimulando maiores quantidades de folículos a crescerem e desenvolverem receptores de LH, e posteriormente, ovularem, resultando num maior número de CL. No entanto, a quantidade de CL também é influenciada quando o eCG é associado ao GnRH, tendo em vista que o número de CL nos animais que são sincronizados com os dois hormônios aumenta.

Estudos em ovinos evidenciam que uma elevada dose de eCG pode causar desenvolvimento de folículos anovulatórios, devido, provavelmente, a longa meia-vida desta gonadotrofina (Jabbour & Evans, 1991). No entanto, estudos com doses de 1000 UI em suínos têm se mostrado eficiente para superovular os animais, sem a ocorrência de folículos anovulatórios (Brüssow et al., 1990; Hazeleger et al., 2000; Rátky et al., 2001; Fujino et al., 2006;). Todos esses resultados divergem do encontrado neste estudo, onde os animais que receberam 1000 UI de eCG (GeGC+GnRH) obtiveram maior quantidade de folículos anovulatórios do que os que não receberam (GP4 e GGnRH) ($P < 0,05$) (Tabela 3.2). A utilização de uma raça localmente adaptada ao invés de raça comercial, como nos demais estudos, pode ser a grande responsável por essa divergência de resultados, uma vez que raças locais possuem menor porte e conseqüentemente menor demanda metabólica que raças comerciais, fazendo com que a dose de 1000 UI de eCG possa ter sido excessiva. Outro aspecto relevante é que a dosagem de GnRH utilizada neste experimento foi inferior aos demais estudos e pode não ter sido suficiente para estimular o eixo hipotalâmico-hipofisário havendo uma falha no mecanismo de liberação do LH, e conseqüentemente, não havendo ovulação de todos os folículos estimulados. Brüssow e Wähler, (2011) descreve que o risco de formação de folículos anovulatórios é evidente na adição de diferentes combinações do eCG com gonadotrofinas.

A proporção de embriões viáveis no grupo de animais que o desenvolvimento folicular foi estimulado com eCG foi significativamente menor ($P < 0,05$) que nos demais grupos. Wollenberg et al., 1990 e Wallenhorst & Holtz, 2002 obtiveram resultados similares ao encontrado. Os resultados do presente estudo e dos

estudos observados sugerem que a pequena proporção de embriões viáveis e, conseqüentemente, de embriões congeláveis no GeCG+GnRH é devido a maiores elevações na concentração plasmática de E2 decorrente do grande número de folículos anovulatórios, o que poderia acarretar em uma alteração no ambiente da tuba uterina e do útero prejudicando a fecundação e a qualidade dos embriões.

A taxa de recuperação é calculada pelo total de estruturas coletadas em relação ao número de CL. No presente estudo a taxa de recuperação dos animais do GeCG+GnRH apresentou-se menor aos estudos realizados por Herrman et al. (1981); Herrmann & Holtz, (1981); Schlieper e Holtz, (1986); Wollenberg et al., (1990); Hazeleger et al.; (2000); Fujino et al. (2006), e menor aos demais grupos deste experimento ($P < 0,05$), fato que pode ter ocorrido devido a maior quantidade de CL e, principalmente, de folículos anovulatórios, o que conseqüentemente, aumentou também a área da superfície ovariana, fazendo com que as fímbrias não conseguissem cobrir o ovário por completo, e assim, resultando numa menor captação ovocitária e menor número de estruturas no lúmen uterino.

Os resultados mostram que todos os tratamentos foram capazes de induzir a ovulação e sincronizar o estro, não tendo influência na formação de aderência. O protocolo com uso de 1000 UI de eCG obteve uma maior resposta ovariana, mostrando uma diferença significativa no número de CL e folículos anovulatórios, e uma menor resposta na quantidade e qualidade embrionária produzida, apresentando diferença significativa no número de estruturas totais, embriões viáveis e congelados, também se mostrou inferior para recuperar embriões, em vista que a taxa de recuperação do GeCG+GnRH foi inferior quando comparados ao grupo GP4 e GGnRH. É provável que se ajustar a dose de eCG e GnRH ocorra uma melhora na qualidade embrionária e na taxa de recuperação desses embriões.

7 CONCLUSÃO

Todos os protocolos foram eficazes para sincronizar o estro no período de quatro a sete dias em marrãs cíclicas. Os protocolos GP4 e GGnrH foram eficazes na produção e recuperação de embriões e a utilização dos mesmos possibilitará uma melhor programação dos programas de coleta de embriões suínos para o enriquecimento de bancos de germoplasma. O protocolo GGnrH ainda possibilita o uso de inseminação artificial em tempo fixo, otimizando o manejo reprodutivo.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALEIXO, J. A. G.; PIMENTEL, C. A.; DESCHAMPS, J. C.; BORDIGNON, V.; MORAES, J. C. F. Gonadotrofina Coriônica equina. Purificação. Caracterização e resposta ovariana em ovinos e suínos. **Ciência Rural**, v.25, n.1, p.111-114, 1995.

AMARAL, A. L.; DA SILVEIRA, P. R. S.; DA LIMA, G. J. M. M. Boas práticas de produção em suínos. **Embrapa – Circular técnica 50**. Concórdia, 2006, p.11-14.

ASHWORTH, C. J.; HALEY, C. S.; WILMUT, I. Effect of regumate on ovulation rate, embryo survival and conceptus growth in meishan and Landrace x Large White gilts. **Theriogenology**, v.37, n.2, p.433-443, 1992.

BAKER, R. D.; COGGINS, E. G. Control of ovulation rate and fertilization in prepuberal gilts. **Journal Animal Science**, v.27, p.1607-1616, 1968.

BESENFELDER, U.; MÖDH, J.; MTILLER, M.; BREM, G. Endoscopic embryo collection and embryo transfer into the oviduct and the uterus of pigs. **Theriogenology**, v.47, p.1051-1060, 1997.

BRÜSSOW, K. P.; RATKY, J.; KANITZ, W.; BECKER, F. The relationship between the surge of LH induced by exogenous Gn-RH and the duration of ovulation in gilts. **Reproduction in Domestic Animals**, v.25, p.255-260, 1990.

BRÜSSOW, K. P.; JÖCHLE, W.; HÜHN, U. Control of ovulation with a GnRH analog in gilts and sows. **Theriogenology**. v.46, p.925-934, 1996.

BRÜSSOW, K. P.; SCHNEIDER, F.; KANITZ, W.; RÁTKY, J.; KAUFFOLD, J.; WÄHNER, M. Studies on fixed-time ovulation induction in the pig. In: Rodriguez-MARTINEZ H., VALLET J.L. & ZIECIK A.J. **Control of Pig Reproduction VIII**. Nottingham: Nottingham University Press, 2009, p.187-195.

BRÜSSOW, K. P.; WÄHNER, M. Biological and technological background of estrus synchronization and fixed-time ovulation induction in the pig. **Biotechnology in Animal Husbandry**. v. 27, n. 3, p 533-545, 2011.

CASSAR, G. Hormonal control of pig reproduction. In: London Swine Conference, 2009, Londres **Anais...** Londres: University of Guelph, p.137-139, 2009.

COMASSETTO, F.; BEIER, S. L.; FARIAS, F. H.; MENEGASSO, R. B.; REGALIN, D.; TOCHETO, R.; OLESKOVICZ, N. Avaliação analgésica e sedativa de dois protocolos em suínos submetidos à orquiectomia. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.42, p.1212, 2014.

ESTIENNE, M. J.; HARTSOCK, T. G. Effect of exogenous gonadotropins on the weaning-to-estrus interval in sows. **Theriogenology**, v.49, p.823–828, 1998.

FUJINO, Y.; NAKAMURA, Y.; KOBAYASHI, H.; KIKUCHI, K. Relationship between time elapsed after human chorionic gonadotropin administration and developmental stage in porcine embryos collected from prepubertal gilts. **Journal of Reproduction and Development**, v.52, p.267–275, 2006.

HAZELEGER, W.; BOUWMAN, E. G.; NOORDHUIZEN, J. P. T. M.; KEMP, B. Effect of superovulation induction on embryonic development on day 5 and subsequent development and survival after nonsurgical embryo transfer in pigs. **Theriogenology**, v.53, p.1063–1070, 2000.

HERRMAN, H.H.; SCHAFER, B.; HOLTZ, W. Collection of two-cell pig embryos and their culture in media containing different protein components. **Animal Reproduction Science**, v.4, p.137-142, 1981.

HERRMAN, H. H.; HOLTZ, W. Culture of pig embryos collected in situ or after slaughter. **Animal Reproduction Science**, v.4, p.143—147, 1981.

HOLTZ, W.; SCHMIDT-BAULAIN, R.; WELP, C.; WALLENHORST, K. Effect of insemination of estrus-induced prepuberal gilts on ensuing reproductive performance and body weight. **Animal Reproduction Science**, v.57, p.177–183, 1999.

JABBOUR, H. N.; EVANS, G. Ovarian and endocrine responses of merino ewes following treatment with PMSG and GnRH or PMSG antiserum. **Animal Reproduction Science**. v. 24, p.259-270, 1991.

KAUFFOLD, J.; BECKJUNKER, J.; KANORA, A.; ZAREMBA, W. Synchronization of estrus and ovulation in sows not conceiving in a scheduled fixed-time insemination program. **Animal Reproduction Science**, v.97, p.84–93, 2007.

KEMP, B.; STEVERINK, D. W. B.; SOEDE, N. M. Herd management in sows: Optimising insemination strategies. **Reproduction in Domestic Animals**, v.33, p.159-64, 1998.

KIRKWOOD, R. N.; AHERNE, F. X.; MONAGHAN, P. G. Breeding gilts at natural or a hormone-induced estrus: effects on performance over four parities. **Journal Swine Health Production**, v.8, p.177-179, 2000.

KOBAYASHI K.; HAYASHI, S.; OHTUBO, Y.; HONDA, A.; MIZUNO, J.; HIRANO, S. Nonsurgical embryo collection from sows with surgically shortened uteri. **Theriogenology**, v.32, n.1, p.123-129, 1989.

LECOMPTE, F.; ROY, F.; COMBARNOUS, Y. International collaborative calibration of a preparation of equine chorionic gonadotropin (eCG) proposed as a new standard. **Jornal of Reproduction and Fertility**, v.113, p.145-150, 1998.

MARTINAT-BOTTÉ, F.; BARITEAU, F.; FORGERIT, Y.; MACAR, C.; MOREAU, A.; TERQUI, M.; SIGNORET, J.P. Control of oestrus in gilts II. Synchronization of oestrus with a progestagen, altrenogest (Regumate): effect on fertility and litter size. **Animal Reproduction Science**, v.22, p.227–233, 1990.

MARTINAT-BOTTÉ, F.; BARITEAU, F.; FORGERIT, Y.; MACAR, C.; POIRIER, P.; TERQUI, M. Synchronization of oestrus in gilts with altrenogest: effects on ovulation rate and foetal survival. **Animal Reproduction Science**, v.39, p.267-274, 1995.

MARTINAT-BOTTÉ, F.; VENTURI, E. GUILLOUET, P.; DRIANCOURT, M. A.; TERQUI, M. Induction and synchronization of ovulations of nulliparous and multiparous sows with an injection of gonadotropin-releasing hormone agonist (Receptal). **Theriogenology**, v.73, p.332–342, 2010.

MORETTI, A. S.; MARTINS, S. M. M. K.; ANDRADE, A. F. C.; PARAZZI, L. J.; OLIVEIRA, M. L. Controle farmacológico do ciclo estral **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.2, p.213-219, 2013.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine chorionic gonadotrophin. **Endocrine Rev**, v.12, p.27-44, 1991.

OLIVEIRA, L. C. R.; MARQUES, J. A.; SANTOS, D. A. S.; FERNANDES, C. H. C. Efeitos da associação de cetamina e midazolam em suínos (sus scrofa) pré-tratados com azaperona ou acepromazina. **Ars Veterinaria**, v.19, n.3, p.235-240, 2003.

PINESE, M. E. **Puberdade em marrãs: I- Efeito das gonadotrofinas na indução e sincronização do estro à puberdade. II - Efeito do “flushing” alimentar no ciclo anterior à primeira concepção. III- Avaliação da eficiência produtiva e reprodutiva das marrãs até o 1º parto.** 2005. 93p. Dissertação (Mestre em Ciência) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, SP, 2005.

RÁTKY, J.; BRÜSSOW, K. P.; SOLTI, L.; TORNER, H.; SARLÓS, P. Ovarian response, embryo recovery and results of embryo transfer in a hungarian native pig breed. **Theriogenology**, v.56, p.969-978, 2001.

RENSIS, F.; BENEDETTI, S.; SILVA, P.; KIRKWOOD, R. N. Fertility of sows following artificial insemination at a gonadotrophin-induced estrus coincidente with weaning. **Animal Reproduction Science**, v.76, p.245–250, 2003.

SCHEID, I. R.; WENTZ, I. Diagnóstico do cio e manejo da cobertura: tarefas importantes na criação. **Embrapa – Suinocultura dinâmica**, Concórdia: nº11, p.1-5, 1993.

SCHILIEPER, B.; HOLTZ, W. Transfer of pig embryos collected by laparotomy or slaughter. **Animal Reproduction Science**, v.12, p.109-114, 1986.

SOMMER, J. R.; COLLINS, E. B.; ESTRADA, J. L.; PETTERS, R. M. Synchronizacion and superovulation of mature cycling gilts for the collection of pronuclear stage embryos. **Animal Reproduction Science**, v.100, p.402-410, 2007.

STEVENSON, J. S.; DAVIS, D. L. Estrous synchronization and fertility in gilts after 14 or 18 day feeding of altrenogest beginning at estrus or diestrus, **Journal Animal Science**, v.55, n.1, p.199-223, 1982.

TUMMARUK P.; ROONGSITTHICHAI, A.; RENSIS, F. Ovulation Induction in Sows. **Thai Journal of Veterinary Medicine**, v.41, p.19-23, 2011

WENTZ, I.; GAVA, D.; BORTOLOZZO, F. P. Hormonioterapia como ferramenta no manejo reprodutivo de suínos, 13, 2007, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos, p.156-171, 2007.

WALLENHORST, S.; HOLTZ, W. Embryo collection in prepubertal gilts and attempts to develop an improved embryo transfer technique. **Veterinary Record**, v. 150, p.749-751, 2002.

WOLLENBERG, C.; WENTZ, I.; BLUM, B.; HOLTZ, W. Survival of pig embryos flushed from the reproductive tract immediately or two hours after slaughter of donors. **Journal Animal Science**, v.68, p.2023-2026, 1990.

WOLOSZYN, N. Procedimentos básicos para a produção de suínos nas fases de reprodução, maternidade e creche. **Documentos 100 – Embrapa**. Concórdia, 2005, p.26-36,

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de biotecnologias reprodutivas, como, a sincronização do estro e a coleta de embriões exercem grande influência nos programas de conservação *Ex situ*. Além de que, a sincronização estral é uma ferramenta para os sistemas de produção de suínos, onde o principal objetivo é o aumento da produtividade animal.

Um dos principais problemas enfrentado ao coletar embriões de marrãs cíclicas é a grande dispersão dos momentos em que o estro é manifestado, tendo que observar estro com o auxílio de um cachão por períodos muito longos, ou até mesmo durante um ciclo estral completo, para obter o melhor momento para inseminar e, posteriormente, realizar a coleta de embriões.

Mais estudos devem ser realizados tanto na avaliação de consecutivas coletas de embriões, e otimização da técnica para minimizar a formação de aderências, quanto para melhores protocolos de sincronização para coleta de embriões em marrãs de suínos nacionais. Deve-se avaliar se o efeito de um antibiótico intra-cavitário poderia minimizar a formação de aderências, e assim, melhorar a taxa de recuperação embrionária na terceira coleta. Avaliar diferentes dosagens de eCG para obter melhores resultados na taxa de recuperação e qualidade embrionária. E assim elaborar protocolos com melhor desenvolvimento embrionário e estimular a ovulação num maior número de ovócitos.

A taxa de recuperação, por mais que tenha sido inferior quando comparado a outros estudos, duas coletas de embriões se mostraram eficazes para recuperar embriões com a finalidade para a conservação de recursos genéticos, devido a possibilidade de maior utilização da doadora de embriões, no entanto deve-se avaliar a necessidade do uso

consecutivo da técnica, em virtude do aumento da formação de aderência presente na segunda coleta para reprodução. Não é recomendado o uso de três coletas, em vista que houve uma diminuição na produção embrionária e possivelmente um aumento na presença de aderência após a terceira coleta.

O emprego dos protocolos de sincronização ajuda a otimizar o uso desses animais, a fim de obter uma padronização no momento da ovulação para que, posteriormente, seja possível o uso da inseminação artificial em tempo fixo, minimizando o manejo reprodutivo de inseminação ou cobrição, e ainda assim, ser realizado no momento ideal para aumentar a taxa de fertilidade dos animais, sem que ocorra aumento no estresse e interferência na qualidade embrionária.