



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

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRACORNIAL COM PROTOCOLOS DE IATF  
EM FÊMEAS DA RAÇA NELORE**

**VILTON FRANCISCO DE ASSIS JÚNIOR**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**BRASÍLIA/DF**

**JANEIRO DE 2018**



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

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRACORNIAL COM PROTOCOLOS DE IATF  
EM FÊMEAS DA RAÇA NELORE**

**VILTON FRANCISCO DE ASSIS JÚNIOR**

**ORIENTADOR: PROF. DR. IVO PIVATO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

**PUBLICAÇÃO 196/2018**

**BRASÍLIA/DF**

**JANEIRO DE 2018**

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

ASSIS JÚNIOR, V. F. **Inseminação artificial intracornual com protocolos de iatf em fêmeas da raça nelore.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília. 2018, 43 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo 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 orientado. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

FIN59i	Francisco de Assis Júnior, Vilton Inseminação artificial intracornual com protocolos de iatf em fêmeas da raça nelore / Vilton Francisco de Assis Júnior; orientador IVO PIVATO. -- Brasília, 2018. 43 p.  Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciência Animal) -- Universidade de Brasília, 2018.  1. inseminação intracornual. 2. estação de monta. 3. iatf. I. PIVATO, IVO , orient. II. Título.
--------	--

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

**INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRACORNUAL COM PROTOCOLOS DE IATF  
EM FÊMEAS DA RAÇA NELORE**

**VILTON FRANCISCO DE ASSIS JÚNIOR**

**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:**

---

**Prof. Dr. IVO PIVATO -UnB (ORIENTADOR)**

---

**Profa. Dra. Carolina Madeira Lucci**

---

**Profa. Dra. Fernanda Paulini**

**BRASÍLIA/DF, 30 de janeiro de 2018.**

Dedico a Deus, por nunca me abandonar.

À minha família, minha maior riqueza.

## AGRADECIMENTOS

À minha esposa, Cristiane, pelo companheirismo e apoio irrestrito.

À minha filha, Júlia, mesmo com tão pouca idade, motiva-me a buscar novos horizontes.

Aos meus pais, por terem me ensinado os princípios de uma vida justa e digna.

Ao meu irmão João Paulo, pelo apoio nessa minha caminhada e à minha cunhada Ana Paula, pelo suporte acadêmico que me proporcionou durante o Mestrado.

Ao meu tio Ismael, que cedeu sua propriedade e animais para a condução de meu experimento.

Ao José Aparecido, gerente da Fazenda Santo Agostinho, sempre tão prestativo para com meus trabalhos.

Ao meu amigo e orientador, professor Dr. Ivo Pivato, que por longa data me instrui, ensina e orienta, contribuindo intensamente para meu progresso profissional e pessoal.

Muito obrigado!

## ÍNDICE

RESUMO .....	vii
ABSTRACT .....	ix
CAPÍTULO 1 .....	1
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1.1 Objetivos .....	3
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Panorama geral.....	4
2.2 Inseminação Artificial.....	5
2.3 Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).....	7
CAPÍTULO 2 .....	12
1 RESUMO .....	12
2 ABSTRACT .....	14
3 INTRODUÇÃO .....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	18
4.1 Delineamento experimental .....	18
4.2 Análise estatística.....	21
5 RESULTADOS .....	22
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	27

## RESUMO

### **INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRACORNIAL COM PROTOCOLOS DE IATF EM FÊMEAS DA RAÇA NELORE.**

Vilton Francisco de Assis Júnior<sup>1</sup>, Ivo Pivato<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Médico Veterinário/ Mestrando em Ciências Animais – PPG/UnB- Brasília- DF

<sup>2</sup>Médico Veterinário/ Doutor – UnB – Brasília-DF

A pecuária de corte moderna dispõe de diversas ferramentas a serem utilizadas na busca de maior eficiência econômica. Tal eficiência pressupõe uma maior produtividade de bezerras desmamadas por hectare, além, da busca incessante de agregar um maior número de arrobas produzidas por hectare, para que a pecuária se torne tão competitiva quanto a agricultura. A fim de buscar um incremento nos índices de prenhez dentre as fêmeas bovinas trabalhadas com protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), o uso da Inseminação Artificial Intracornial pode ser utilizado como uma ferramenta para este fim. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência do uso desta técnica em vacas Nelore pluríparas não lactantes e suas correlações com as respectivas taxas de prenhez. Foram sincronizadas 400 fêmeas para o trabalho, sendo divididas em 2 grupos com 200 animais cada (grupo 1 e grupo 2). O grupo 1 foi trabalhado em um dia e o grupo 2 no dia seguinte, seguindo esta ordem em todos os manejos do protocolo hormonal. Todos os animais do experimento receberam o mesmo protocolo; no dia 0 foi inserido um dispositivo intravaginal novo com 1 g de progesterona (Sincrogest®, Ouro Fino, Brasil) e aplicação por via intramuscular de 2 mg de Benzoato de Estradiol (Sincrodiol®, Ouro Fino, Brasil). No dia 8 os dispositivos foram retirados e aplicado simultaneamente 1 mg de cipionato de estradiol (SincroCP®, Ourofino, Brasil); 0,526 mg de Cloprostenol Sódico (Sincrocio®, Ouro Fino, Brasil), 300 UI de eCG (SincroECG®, Ourofino, Brasil). A inseminação foi realizada a partir de 48 horas após a retirada do dispositivo intravaginal. Antes da realização da inseminação, os ovários das vacas foram avaliados por meio de ultrassom (Sonoscape A5VET, transdutor linear 7MHz, China); fêmeas com folículo pré-ovulatório menor que 11,0 mm ou sem folículo dominante foram descartadas do trabalho. Fêmeas com folículos maiores ou iguais a 11,0 mm eram inseminadas alternadamente, no corpo ou corno uterino, de modo que cada lote ficou composto por 50 fêmeas inseminadas no corpo e 50 no corno uterino, perfazendo um total de 100 animais para o grupo 1 e 100 animais para o grupo 2. O diagnóstico de gestação foi

realizado 30 dias após a inseminação artificial. Utilizou-se a estatística descritiva seguida pelo teste de normalidade D' Agostino-Pearson omnibus, seguido do teste Chi-quadrado para comparação entre dois grupos no programa GraphPad Prism ® 6. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média, e  $P \leq 0.05$  considerado significativo. Entre as fêmeas que foram inseminadas no método convencional (inseminação no corpo do útero logo após a passagem da cérvix), a taxa média de gestação foi de 59,0% e no método experimental (deposição do sêmen dentro do corno uterino), a taxa média de gestação foi de 54,0%, não havendo diferença estatística entre os grupos ( $P > 0,05$ ).

Palavras chave: estação de monta, inseminação intracornual, alternativas para inseminação.

## ABSTRACT

### INTRACORNIAL INSEMINATION USING TIMED FIXED ARTIFICIAL INSEMINATION PROTOCOLS WITH NELORE BREED COWS

The modern herd livestock has several tools to be used in the search for greater economic efficiency. Such efficiency presupposes a higher productivity of weaned calves per hectare, in addition to the incessant search to aggregate a larger number of kilograms per hectare, so that livestock farming becomes as competitive as agriculture. In order to increase the pregnancy rates among bovine females treated with IATF protocols, the use of Intracornial Artificial Insemination can be used as a tool for this purpose. The objective of the present study was to evaluate the efficiency of the use of this technique in non-lactating pluriparous Nelore cows and their correlations with the respective pregnancy rates. 400 females were synchronized for the work; divided into 2 groups with 200 animals each (group 1 and lot 2). Group 1 was worked on one day and group 2 the next day, following this order in all managements of the hormonal protocol. All animals in the experiment received the same protocol; on day 0 a new intravaginal device with 1 g of progesterone was inserted (Sincrogest®, Ouro Fino, Brazil) and intramuscular application of 2 mg of Estradiol Benzoate (Sincrodiol®, Ouro Fino, Brazil). On day 8 the devices were removed and simultaneously applied 1 mg of estradiol cypionate (SincroCP®, Ourofino, Brazil); 0.526 mg Cloprostenol Sodium (Sincrocio®, Ouro Fino, Brazil), 300 IU of eCG (SincroECG®, Ourofino, Brazil). Insemination was performed 48 hours after the removal of the intravaginal device. Prior to insemination, cow ovaries were evaluated by ultrasound (Sonoscape A5VET, 7MHz linear transducer, China); females with preovulatory follicles smaller than 11.0 mm or without dominant follicle were discarded from work. Females with a follicle greater than or equal to 11.0 mm were inseminated alternately in the uterine body or horn, so that each group was composed of 50 cows inseminated in the body and 50 in the uterine horn, making a total of 100 cows for group 1 and 100 cows for group 2. The diagnosis of gestation was performed 30 days after artificial insemination. Descriptive statistics were used followed by the D'Agostino-Pearson omnibus normality test, followed by the Chi-square test for comparison between two groups in the GraphPad Prism® program. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of the mean, and  $P \leq 0.05$  considered significant. Among the females that were inseminated in the conventional method (insemination in the body of the uterus shortly after the passage of the cervix), the mean pregnancy rate was 59.0% and in the experimental method (deposition of semen within the

uterine horn), the rate mean of gestation was 54.0%, there being no statistical difference between the groups.

**Key words:** Breeding season, Intracornual insemination, Alternatives to insemination

## **CAPÍTULO 1**

### **1 INTRODUÇÃO**

A economia brasileira tem passado por rápidas transformações nos últimos anos. Nesse contexto, ganham espaço novos conceitos, ações e atitudes em que produtividade, controle dos custos de produção e eficiência se impõem como regras básicas de sobrevivência em um mercado cada vez mais globalizado. A sincronia entre pesquisadores, técnicos e produtores rurais envolvidos na cadeia produtiva é primordial para a competitividade da atividade pecuária.

Desta forma, o mundo precisa de soluções que busquem o aumento da produção de alimentos, sem, no entanto, comprometer mais ainda o meio ambiente, garantindo à população maior segurança alimentar e condições de igualdade (Nascimento & Gomes, 2009). Neste cenário, a cadeia produtiva da carne bovina, um produto com alto grau de consumo em todo o mundo, vem estudando e desenvolvendo várias tecnologias na tentativa de aumentar a produção, sem causar maiores impactos ao meio ambiente, investindo em pesquisas que aprimoram o manejo, sanidade, nutrição e reprodução. No Brasil, os esforços estão cada vez mais concentrados para que haja uma interrupção ao desmatamento e ocorra uma intensificação dos índices produtivos e reprodutivos dentro das áreas disponíveis para exploração de atividade econômica.

De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2014), o rebanho bovino global está estimado em 1,03 bilhões de cabeças, sendo que o Brasil se encontra em primeiro lugar ao deter o maior rebanho comercial do mundo e segundo lugar em relação à produção de carne. A previsão é que, em 2017, seja responsável por 47,5% da participação no mercado mundial da carne bovina.

Para que o Brasil possa atender essa perspectiva de mercado, há uma necessidade constante em aumentar os níveis de produção, contudo, sem descuidar dos aspectos ligados à sustentabilidade. Uma das formas de aprimorar os resultados é implementando técnicas que resultem em melhores índices, dentre eles reprodutivos, como por exemplo a exigência da produção de um bezerro / ano / matriz (Guerreiro et al., 2014).

Atualmente, contamos com aproximadamente 72 milhões de fêmeas em idade reprodutiva (acima de 24 meses), gerando aproximadamente 50 milhões de bezerros / ano, com uma taxa de nascimento de 70%; sendo assim, 22 milhões de fêmeas estão sem bezerro. Considerando a média brasileira de 1 vaca / hectare, tem-se 22 milhões de hectares sem produzir durante todo o ano (Gimenes et al., 2015);

A eficiência econômica da pecuária de corte está vinculada à produção de bezerros, sendo estes destinados à produção de carne ou reposição do rebanho. (Sá Filho et al., 2010). Usando os índices reprodutivos e produtivos como indicadores de desempenho do rebanho é possível antecipar, calcular, organizar e melhorar os eventos ligados à reprodução (Torres Junior et al., 2009).

As biotecnologias da reprodução ocupam um papel de destaque como ferramentas capazes de aumentar esses índices, melhorando a eficiência reprodutiva e a genética dos rebanhos, por meio do desenvolvimento de tecnologias como a Inseminação Artificial (IA), Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), Transferência de Embriões (TE) e a Produção In Vitro de Embriões (PIV), sendo que a IATF e a PIV são as biotecnologias mais desenvolvidas e utilizadas no cenário nacional (Palhano, 2008).

A inseminação artificial (IA) consagrou-se mundialmente ao comprovar os potenciais técnicos e econômicos, acelerando o ganho genético e retornos financeiros à cadeia produtiva. Atualmente, os protocolos de sincronização da ovulação estão estabelecidos e apresentam resultados satisfatórios e previsíveis quando aplicados em propriedades com adequado manejo nutricional e sanitário. As taxas de ovulações sincronizadas são superiores a 80% e o maior desafio é aumentar a prenhez e manutenção da gestação (Baruselli et al., 2012).

De acordo com o relatório da ASBIA (2014), o mercado de venda de sêmen é extremamente crescente; no período de 2009 a 2014 ocorreu um aumento de 58,5% na venda de sêmen para a pecuária de corte. Tal incremento nas vendas reflete os avanços das técnicas de inseminação artificial, principalmente dos avanços com a IATF. Porém, ainda segundo a ASBIA, o potencial de crescimento de utilização da inseminação artificial na pecuária

nacional é muito grande, visto que aproximadamente somente 12% das fêmeas em idade reprodutiva são inseminadas.

Diante deste cenário de contínuo crescimento e ao mesmo tempo de grande potencial para crescer com a utilização destas ferramentas, desafios ainda existem, pois os resultados de prenhez têm oscilado bastante, devido a diversas variáveis e adversidades encontradas no campo. E, seguindo nessa lógica, a inseminação artificial intrauterina profunda (IAIP) é uma ferramenta que pode ser utilizada na tentativa de alavancar os índices de prenhez nos trabalhos de reprodução bovina, principalmente quando se utiliza os protocolos de IATF.

### **1.1.1 Objetivos**

Verificar e comparar a eficiência da técnica de Inseminação Artificial Intracornual em fêmeas Nelore submetidas ao protocolo de sincronização de ovulação e inseminadas em tempo fixo (IATF) com sêmen convencional (não sexado).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Panorama geral da pecuária no Brasil

A pecuária bovina de corte registrou significativa evolução no decorrer das últimas décadas. De acordo com o histórico, como o País viveu um ambiente de “hiperinflação”, decorrente do descontrole fiscal e monetário, os agentes econômicos buscavam ativos para usar como reserva para suas economias. No meio agro, o boi e suas categorias – bezerro, garrote, boi magro etc. – eram os preferidos, ao lado do café. Com a estabilidade econômica, os produtores passaram a se profissionalizar na atividade e tratar a produção de boi como investimento, o que demanda planejamento refinado.

De acordo com Zen (2017), durante muitos anos a pecuária cedeu suas terras mais férteis e com melhor infraestrutura às atividades agrícolas, cujo valor gerado por unidade de área era maior. O segmento de cria foi visto, injustamente, como o grande culpado pelo desmatamento de áreas. Porém, a nova consciência e a força dos mercados externos em especial – muito mais que mudanças de postura de governos e governantes – reverteu essa visão. Com isso, ocorre o “surto” modernizador da pecuária de cria. Em 2003, pesquisas do Cepea, em parceria com a CNA (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil), mostravam que eram necessários cerca de 250 hectares para manter 100 vacas. Essas vacas geravam 45 bezerros, cada um com 170 kg de peso vivo. Em 2016, por outro lado, 100 vacas ocupavam 140 ha e produziam 65 bezerros de 200 kg. Apesar de estar muito longe de atingir seu máximo, a produtividade/ha cresceu 283% e por vaca, 172%, devido a um enorme investimento do produtor para atingir esse resultado.

A pecuária bovina é um dos grandes pilares econômicos do Brasil, empregando mais de 1,5 milhão de pessoas na cadeia produtiva. Oferece carne de qualidade a preços

acessíveis para um País de 207 milhões de habitantes e gera excedentes exportáveis que chegam a mais de 170 países.

Como resultado desse período de alta na pecuária, o setor passa por uma revolução tecnológica e organizacional. A modernização e intensificação da produção bovina é um processo dinâmico, que deve incluir a melhoria da qualidade do produto gerado (genética), aumento da escala de produção de produtos de qualidade e aceleração do processo produtivo (precocidade). Segundo Galli e Lazzari (2004), a reprodução é uma das principais ferramentas na criação animal, pois, além da multiplicação do rebanho, potencializa o ganho genético dos animais. Para Neves et al. (1999), do ponto de vista econômico, o desempenho reprodutivo é um dos principais pilares da pecuária, sendo cinco vezes mais importante que o ganho de peso e até dez vezes mais importante que o rendimento de carcaça.

Segundo César (2001), a produção de um bezerro com custo elevado (devido à baixa eficiência reprodutiva) leva o produtor à perda de competitividade, diminuição na capacidade de investimento e depreciação da atividade como um todo. O preço do produto produzido na propriedade (ex. bezerros) é determinado pelo mercado e não pelo seu custo de produção, portanto, o produtor deve ter o cuidado de desenvolver atividades que conduzam a um melhor desempenho econômico do seu sistema de produção. A tomada de decisões seguras deve ser fundamentada no conhecimento e controle do desenvolvimento do seu rebanho por meio da determinação dos índices zootécnicos do rebanho, como exemplo as taxas de prenhez e natalidade. Inúmeras vezes, produtores são assediados por empresas que vendem biotecnologia para implantação de programas inovadores em suas propriedades, porém, sem possuir conhecimento ou condições suficientes, aplicar a técnica é condenar ao insucesso a realização da prática e conseqüente frustração do produtor.

## **2.2 Inseminação Artificial (IA)**

O primeiro marco histórico da inseminação artificial é de autoria de Lazzaro Spallanzani (1780), que obteve produtos vivos e normais a partir da coleta do sêmen de um cão e inseminação de uma cadela. O veterinário e pesquisador Elias Ivanov teve um papel importante na evolução da técnica, demonstrando que a inseminação era possível a partir da diluição do sêmen com soro artificial, além de estudos esclarecedores sobre o papel do frio

na conservação do sêmen.

A prática da inseminação cresceu rapidamente na Europa. Somente na antiga União Soviética, em 1938, foram inseminadas 1.200.000 vacas. Estudos posteriores permitiram melhorias dos meios de conservação do sêmen, além da descoberta científica dos ingleses Polge, Smith e Parkes, em 1949, possibilitando o congelamento do sêmen com redução dos danos às células, o que favoreceu de maneira decisiva sua comercialização. O primeiro bezerro, produto de sêmen congelado, é referido por Stewart (1951) (Mies Filho, 1987).

A IA constitui uma ferramenta amplamente utilizada em programas de reprodução nas explorações pecuárias e, resumidamente, consiste num processo de coleta de sêmen do macho, posterior processamento, armazenagem, introdução instrumental no aparelho reprodutivo da fêmea seguida da deposição do sêmen, com o objetivo da concepção (Morrel, 2011).

Dados da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA, 2014) registraram valores de 12.035.332 doses de sêmen vendidas aos pecuaristas brasileiros. Levando-se em consideração que no respectivo ano o rebanho nacional de fêmeas em idade de reprodução era estimado em 56.160.000 cabeças, percebeu-se que apenas 11,9% das fêmeas eram inseminadas (índice ajustado). Com isso, é notório e bastante expressivo o potencial de crescimento para esta biotecnologia e tal crescimento vem ocorrendo de forma ascendente; a título de comparação, segundo a ASBIA (2007), houve um aumento de 11,3% na venda geral de sêmen entre 2006 e 2007. Naquela ocasião, apenas 7% do rebanho das fêmeas aptas à reprodução no rebanho brasileiro eram inseminadas.

A inseminação artificial (IA) é uma técnica amplamente utilizada para melhorar a eficiência na produção de bovinos, apresentando melhores resultados quando se pretende realizar a seleção e o melhoramento genético de um rebanho.

A IA permite ao criador alcançar características que não são acessíveis através do serviço natural e que podem ser atingidas com a utilização do sêmen de touro testado, como por exemplo, facilidade ao parto ou maior índice de crescimento (Gordon, 1996). Desta forma, uma maior produtividade através do melhoramento genético é possível através desta técnica, quando se usa sêmen de touros com elevado mérito genético em fêmeas superiores (Costa et al., 2011). Ainda de acordo com este autor, a IA também permite o cruzamento entre animais em diferentes localizações geográficas e em diferentes registros temporais (mesmo após a morte do reprodutor).

É relevante também os benefícios trazidos pela IA com a substancial redução

da propagação de doenças infectocontagiosas e venéreas como por exemplo a campilobacteriose, provocada por *Campylobacter fetus* ssp. *venerealis* (vibriose) e a tricomoníase (Verberckmoes et al., 2004; Costa et al., 2011).

De acordo com Galina et al. (1996) em todo o mundo há relatos que indicam oscilação na taxa de concepção em bovinos inseminados artificialmente, principalmente em decorrência de comprometimentos na detecção do cio. Quando poucas vacas são detectadas em cio ocorrem significativas perdas na eficiência reprodutiva do rebanho, e comprometimento do programa de IA. Esse comprometimento é ainda maior em rebanhos *Bos indicus*, cujo comportamento reprodutivo apresenta particularidades - cio de curta duração com elevado percentual de manifestação durante o período da noite (Pinheiro et al., 1998).

Os estudos do perfil da duração de cio foram confirmados com o sistema de radio telemetria (Heat-watch) em vacas Nelore, Angus e Nelore x Angus criadas a pasto nas mesmas condições de manejo (Mizuta, 2003). Os resultados são indicativos de que o cio das vacas Nelore (*Bos indicus*) e Nelore x Angus tem cerca de 4 horas a menos de duração que o cio das vacas Angus (*Bos taurus*). (Baruselli et al, 2006).

Ainda, em outro estudo para avaliar o momento de ocorrência do cio ao longo do dia, verificou-se que 53,8% dos cios começam durante a noite, e que 30,7% começam e terminam durante a noite (Barros et al., 1998).

Desta forma, apesar de ser a biotecnologia mais utilizada na bovinocultura, consagrada mundialmente, a inseminação artificial vem sendo aprimorada frente às demandas crescentes de intensificação dos indicadores, dentre eles, os índices de gestação das fêmeas bovinas.

### **2.3 Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)**

É consenso entre a comunidade científica e os criadores que a técnica de inseminação artificial (IA) é uma importante ferramenta para acelerar a evolução genética dos rebanhos. Um dos maiores entraves para o amplo uso desta biotécnica é a detecção do estro (cio), por requerer tempo e pessoal adequadamente treinado. Em fêmeas bovinas a curta duração (em torno de 11 horas) associada à incidência de estro noturno (Pinheiro et al., 1998),

dificulta a detecção do mesmo e prejudica a implantação de programas convencionais de IA (Barros et al., 1995; Pinheiro et al., 1998, Mizuta, 2003).

A partir do conhecimento detalhado da dinâmica folicular (Pierson & Ginther, 1987; Savio et al., 1988; Sirois & Fortune, 1988) tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, viabilizando a inseminação artificial em tempo fixo (IATF, ou seja, IA com tempo pré-determinado, sem a necessidade de observar cio) em taurinos (Twagiramungu et al., 1992a,b; Thatcher et al., 1993; Pursley et al., 1994) e zebuínos (Barros et al., 1998; Fernandes et al., 2001).

O principal mecanismo de regulação do ciclo estral é a regressão do corpo lúteo (CL), que normalmente ocorre nas fêmeas bovinas ao redor do dia 16 a 18 do ciclo. Assim sendo, o CL é um fator chave em vários processos reprodutivos, tais como a ovulação e a duração do ciclo estral (Milvae et al., 1996). De acordo com Odde (1990), a responsividade do CL à PGF2 $\alpha$  inicia-se no 5.<sup>o</sup> dia do ciclo estral, aumenta até o 12.<sup>o</sup> e permanece em fase de platô até o 17.<sup>o</sup> dia, quando inicia a regressão pela prostaglandina endógena. As formas de controle do ciclo estral em bovinos estão baseadas na extensão ou redução da fase luteínica, utilizando progestágenos ou prostaglandinas, e na alteração da onda folicular, utilizando estrógeno ou hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). (Burke et al., 1996).

Utilizando-se as tecnologias do protocolo de sincronização, consegue-se maior precisão sobre o momento e mecanismos da ovulação dos animais tratados, ou seja, pela aplicação de hormônios os quais possam promover um mecanismo de “feedback” positivo para LH no momento final do crescimento folicular (Moreira, 2002)

Nesse sentido, os protocolos de sincronização da ovulação podem ser usados para eliminar a necessidade da detecção do estro e maximizar a taxa de concepção durante o período de serviço das fêmeas maximizando com isso, a possibilidade de atingir o objetivo de um intervalo entre partos de 365 dias (Lane, Austin & Crowe, 2008).

Como no Brasil as fêmeas bovinas em reprodução possuem prevalência de 80% de sangue zebu (*Bos indicus*), criadas, na sua grande maioria a pasto, ocorrem significativos comprometimentos na taxa de detecção de cio e na eficiência dos programas de inseminação artificial. Desta forma, protocolos de inseminação artificial em tempo fixo sem a necessidade de detecção de estro colaboram para o aumento da eficiência reprodutiva e do emprego dessa técnica (Baruselli et al., 2004a).

Protocolos de sincronização para IATF objetivam induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular; controlar a duração do crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório; induzir a ciclicidade em animais que estão em anestro e induzir a ovulação em todas as fêmeas de forma sincronizada (Baruselli et al., 2002).

## **2.4 Inseminação Artificial Intracornual**

Quanto às técnicas atualmente disponíveis para inseminação artificial, um melhor entendimento da anatomia e fisiologia da reprodução, como o transporte e sobrevivência dos gametas, além de processos envolvidos na fertilização, permitem aos pesquisadores ousar intervenções mais eficientes na inseminação (Hunter e Greve, 1998). A vantagem da deposição de sêmen no corpo uterino em comparação à deposição na cérvix não gera mais dúvidas. Entretanto, dúvidas são levantadas quanto ao melhor local para deposição do sêmen após a cérvix (López-Gatius, 2000).

Embora a inseminação artificial com sêmen congelado promova um progresso genético no rebanho de corte e leite, ela pode promover uma redução da fertilidade se os técnicos depositarem erroneamente o sêmen no trato reprodutivo da fêmea. Por exemplo, a inseminação dentro da cérvix pode ocasionar uma redução de até 60% na viabilidade espermática, quando comparada com a mesma técnica realizada corretamente, dentro do corpo uterino (Gallagher et al., 1989).

A manipulação do sêmen e os procedimentos da inseminação são dois importantes elementos no sucesso do programa de inseminação artificial em rebanhos bovinos (Graham, 1966; Seguin, 1986); em fêmeas bovinas, os técnicos são treinados para aplicar o sêmen na junção entre o corpo do útero e o óstio interno da cérvix. Porém, começou-se a observar que alguns técnicos, por imprudência ou imperícia, depositavam o sêmen em algum dos cornos uterinos (Peters et al., 1984) e que isso resultava em menor retorno de cio (Marshall, 1979; Pallares et al., 1986).

Segundo Hawk et al. (1983), Larsson et al. (1985), Nelson et al. (1987) e Seidel Jr et al. (1999) o sêmen depositado perto da junção útero-tubárica diminuirá as perdas de espermatozoides pelo fluxo retrógrado no muco cervical e perdas por fagocitose durante a migração uterina, além de proporcionar um acréscimo na sobrevivência do espermatozoide.

Vários estudos já foram desenvolvidos para determinar o melhor local de deposição do sêmen na inseminação artificial (López-Gatius e Camom, 1988; Mackenna, 1990; López-Gatius, 2000; Andersson et al., 2004), porém, não há um consenso entre os autores quanto à inseminação intracornual profunda.

Alguns experimentos obtiveram maiores taxas de prenhez quando a inseminação era realizada no corno uterino ipsilateral à ovulação em comparação com a inseminação no corpo do útero e no corno contralateral à ovulação (Senger et al., 1988; López-Gatius, 2000). Entretanto, Hawk e Tanabe (1986), Momont et al. (1989) e Andersson et al. (2004) não obtiveram diferença significativa na taxa de prenhez comparando as mesmas técnicas.

A razão da discrepância entre os resultados desses estudos ainda não foi totalmente esclarecida, porém é sabido que uma série de fatores pode influenciar na prenhez (López-Gatius, 2000); acredita-se que a alta concentração de espermatozoides possa mascarar os resultados, uma vez que o aumento da concentração da dose de sêmen contribui para aumentar a taxa de prenhez em uma correlação dependente da fertilidade do touro utilizado (Den Daas et al., 1998; Andersson et al., 2004; Kurykin et al., 2006).

Outras variáveis devem ser analisadas, como: inseminação unicornual ou bicornual, observação de estro ou indução, período pós-parto, manejo e experiência do inseminador. Todos esses fatores dificultam a comparação dos resultados.

O sucesso da fertilização *in vivo* depende do transporte coordenado dos gametas viáveis tanto do macho quanto da fêmea dentro do oviduto (Hunter and Wilmut, 1984; Hawk, 1987). O objetivo final do espermatozoide viável é alcançar um ou mais gametas femininos no sítio de fecundação. Esta região do trato genital é localizada na junção istmo-ampola da trompa de falópio ou tuba uterina.

Em bovinos de leite, foi observado que o touro deposita bilhões de espermatozoides na vagina após a ejaculação enquanto que, na inseminação artificial, são depositado 5-20 milhões de espermatozoides no corpo do útero (Foote and Kaproth, 1997; Vishwanath, 2003). O tempo de deslocamento do espermatozoide através do corpo uterino está relacionado ao estágio do estro e à proximidade da ovulação; ambas as variáveis influenciam a quantidade e viscosidade do muco e também, as contrações naturais do endométrio (Hunter, 2001).

Diversos pesquisadores (Hunter and Wilmut, 1984; Hunter, 1991; Pollard et al., 1991; Hunter, 1995; Lefebvre et al., 1997; Suarez et al., 1997; Hunter and Greve, 1998; Revah et al., 2000) descreveram o fenômeno da reserva espermática; de acordo com a

literatura, os espermatozoides se deslocam através do corpo do útero e corno uterino, sentido à tuba uterina, mais especificamente à junção útero-tubárica. Uma vez alcançada a região do istmo da tuba uterina, é formada a reserva espermática, que consiste em um acúmulo de espermatozoides viáveis que se aderem ao epitélio do istmo formando esta reserva, onde permanecem ligados neste sítio até o período pré-ovulatório, a partir do qual são liberados gradativamente sentido a ampola da tuba uterina, com o objetivo de fertilizar o ovócito recém ovulado.

Hunter e Wilmut (1984) e Senger et al. (1988) perceberam que modificações nos procedimentos da inseminação artificial podem levar a formações mais efetivas da reserva espermática no istmo; à luz destas considerações, um dos procedimentos que podem ser adotados é a inseminação artificial intra-cornual profunda.

De acordo com Senger et al. (1988), a proximidade de deposição do sêmen junto ao istmo da tuba uterina pode resultar por exemplo, em benefícios aos espermatozoides de touros com menor fertilidade, propiciando com isso melhores resultados em prenhez.

Diversos estudos utilizando doses de sêmen com quantidade menor de espermatozoides tem sugerido que a redução nas taxas de prenhez pode ser evitada depositando-se o sêmen próximo ao sítio de fertilização (ipsilateral ao folículo pré-ovulatório), utilizando-se da IATF (Hunter and Greve, 1998; Hunter, 2001).

Inseminação uterina profunda com sêmen descongelado com metade da dose da palheta depositada em cada corno uterino resultou em altas taxas de prenhez (65%) quando comparadas com as taxas da inseminação no corpo uterino (45%), de acordo com Senger et al. (1988). Em outro estudo, Lopez-Gatius and Camon-Urgel (1988) depositaram o sêmen no corno uterino ipsilateral ao folículo pré-ovulatório e obtiveram 71% de prenhez, contrastando aos 60% obtidos com a inseminação no corpo do útero.

Porém, alguns trabalhos divulgados por Hawk and Tanabe (1986), Williams et al (1988) e McKenna et al (1990) demonstraram não haver diferença na taxa de fertilização, concepção e retorno de cio, respectivamente, para inseminação no corpo do útero e no corno uterino. Resultados variáveis e contrastantes também foram encontrados por Diskin et al., (2004), Pursley, (2004), Sá Filho et al. (2012), e Meirelles et al. (2012).

Assim, diante de todas as exposições científicas, percebe-se a necessidade de experimentos que venham testar a técnica da inseminação artificial intracornual, frente à demanda crescente de melhores resultados que viabilizem a produção de bezerros com maior valor agregado.

## CAPÍTULO 2

### 1 RESUMO

#### **INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRACORNIAL COM PROTOCOLOS DE IATF EM FÊMEAS DA RAÇA NELORE.**

Vilton Francisco de Assis Júnior<sup>1</sup>, Ivo Pivato<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Médico Veterinário/ Mestrando em Ciências Animais – PPG/UnB- Brasília- DF

<sup>2</sup> Médico Veterinário/ Doutor – UnB – Brasília-DF

A pecuária de corte moderna dispõe de diversas ferramentas a serem utilizadas na busca de maior eficiência econômica. Tal eficiência pressupõe uma maior produtividade de bezerras desmamados por hectare, além, da busca incessante de agregar um maior número de arrobas produzidas por hectare, para que a pecuária se torne tão competitiva quanto a agricultura. A fim de buscar um incremento nos índices de prenhez dentre as fêmeas bovinas trabalhadas com protocolos de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), o uso da Inseminação Artificial Intracornial pode ser utilizada como uma ferramenta para este fim. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência do uso desta técnica em vacas Nelore pluríparas não lactantes e suas correlações com as respectivas taxas de prenhez. Foram sincronizadas 400 fêmeas para o trabalho, sendo divididas em 2 grupos com 200 animais cada (grupo 1 e grupo 2). O grupo 1 foi trabalhado em um dia e o grupo 2 no dia seguinte, seguindo esta ordem em todos os manejos do protocolo hormonal. Todos os animais do experimento receberam o mesmo protocolo; no dia 0 foi inserido um dispositivo intravaginal novo com 1 g de progesterona (Sincrogest®, Ouro Fino, Brasil) e aplicação por via intramuscular de 2 mg de Benzoato de Estradiol (Sincrodiol®, Ouro Fino, Brasil). No dia 8 os dispositivos foram retirados e aplicado simultaneamente 1 mg de cipionato de estradiol (SincroCP®, Ourofino, Brasil); 0,526 mg de Cloprostenol Sódico (Sincrocio®, Ouro Fino, Brasil), 300 UI de eCG (SincroECG®, Ourofino, Brasil). A inseminação foi realizada a partir de 48 horas após a

retirada do dispositivo intravaginal. Antes da realização da inseminação, os ovários das vacas foram avaliados por meio de ultrassom (Sonoscape A5VET, transdutor linear 7MHz, China); fêmeas com folículo pré-ovulatório menor que 11,0 mm ou sem folículo dominante foram descartadas do trabalho. Fêmeas com folículos maiores ou iguais a 11,0 mm eram inseminadas alternadamente, no corpo ou corno uterino, de modo que cada lote ficou composto por 50 fêmeas inseminadas no corpo e 50 no corno uterino, perfazendo um total de 100 animais para o grupo 1 e 100 animais para o grupo 2. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a inseminação artificial. Utilizou-se a estatística descritiva seguida pelo teste de normalidade D' Agostino-Pearson omnibus, seguido do teste Chi-quadrado para comparação entre dois grupos no programa GraphPad Prism ® 6. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média, e  $P \leq 0.05$  considerado significativo. Entre as fêmeas que foram inseminadas no método convencional (inseminação no corpo do útero logo após a passagem da cérvix), a taxa média de gestação foi de 59,0% e no método experimental (deposição do sêmen dentro do corno uterino), a taxa média de gestação foi de 54,0%, não havendo diferença estatística entre os grupos ( $P > 0,05$ ).

Palavras chave: estação de monta, inseminação intracornual, alternativas para inseminação.

**INTRACORNIAL INSEMINATION USING TIMED FIXED ARTIFICIAL  
INSEMINATION PROTOCOLS WITH NELORE BREED COWS**

The modern herd livestock has several tools to be used in the search for greater economic efficiency. Such efficiency presupposes a higher productivity of weaned calves per hectare, in addition to the incessant search to aggregate a larger number of kilograms per hectare, so that livestock farming becomes as competitive as agriculture. In order to increase the pregnancy rates among bovine females treated with IATF protocols, the use of Intracornial Artificial Insemination can be used as a tool for this purpose. The objective of the present study was to evaluate the efficiency of the use of this technique in non-lactating pluriparous Nelore cows and their correlations with the respective pregnancy rates. 400 females were synchronized for the work; divided into 2 groups with 200 animals each (group 1 and lot 2). Group 1 was worked on one day and group 2 the next day, following this order in all managements of the hormonal protocol. All animals in the experiment received the same protocol; on day 0 a new intravaginal device with 1 g of progesterone was inserted (Sincrogest®, Ouro Fino, Brazil) and intramuscular application of 2 mg of Estradiol Benzoate (Sincrodiol®, Ouro Fino, Brazil). On day 8 the devices were removed and simultaneously applied 1 mg of estradiol cypionate (SincroCP®, Ourofino, Brazil); 0.526 mg Cloprostenol Sodium (Sincrocio®, Ouro Fino, Brazil), 300 IU of eCG (SincroECG®, Ourofino, Brazil). Insemination was performed 48 hours after the removal of the intravaginal device. Prior to insemination, cow ovaries were evaluated by ultrasound (Sonoscape A5VET, 7MHz linear transducer, China); females with preovulatory follicles smaller than 11.0 mm or without dominant follicle were discarded from work. Females with a follicle greater than or equal to 11.0 mm were inseminated alternately in the uterine body or horn, so that each group was composed of 50 cows inseminated in the body and 50 in the uterine horn, making a total of 100 cows for group 1 and 100 cows for group 2. The diagnosis of gestation was performed 30 days after artificial insemination. Descriptive statistics were used followed by the D'Agostino-Pearson omnibus normality test, followed by the Chi-square test for comparison between two groups in the GraphPad Prism® program. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of the mean, and  $P \leq 0.05$  considered significant. Among the females that were inseminated in the conventional method

(insemination in the body of the uterus shortly after the passage of the cervix), the mean pregnancy rate was 59.0% and in the experimental method (deposition of semen within the uterine horn), the rate mean of gestation was 54.0%, there being no statistical difference between the groups.

**Key words:** Breeding season, Intracornual insemination, Alternatives to insemination

### 3 INTRODUÇÃO

A necessidade de se desenvolver sistemas de criação que possibilitassem o melhoramento do potencial produtivo e reprodutivo das diversas espécies domésticas fez surgir várias biotécnicas. A inseminação artificial (I.A.), dentre essas, foi a primeira biotécnica a ser utilizada, revolucionando os sistemas de produção animal.

A fim de difundir o uso da inseminação artificial, diversos trabalhos têm sido realizados tendo como base o controle hormonal do ciclo estral das fêmeas bovinas e o emprego da I.A. em tempo fixo (IATF), desobrigando a detecção do estro. Estes sistemas tornam o manejo mais eficiente, otimizando o custo da mão de obra, além de possibilitar a priorização de outras tarefas de manejo dentro de uma propriedade, devido a não necessidade da detecção diária do cio (Baruselli et al., 2012).

A fertilidade ocasionalmente comprometida, associada à inseminação com sêmen congelado, vem sendo atribuída à técnica de congelamento do sêmen que produz danos nos espermatozoides que podem ser ultraestruturais, físicos, bioquímicos e funcionais, e que levam as membranas espermáticas a apresentarem uma quebra da assimetria (Senger et al., 1988).

A Inseminação Artificial Intracornual tem sido apontada como uma possível ferramenta para alavancar os índices de prenhez nos trabalhos da reprodução bovina, principalmente quando se utiliza os protocolos de sincronização para IATF (López-Gatius, 2000).

A inseminação intracornual vem sendo estudada por vários pesquisadores com a finalidade de se utilizar menor concentração de espermatozoides sem culminar em uma queda na taxa de prenhez ou melhorar os resultados obtidos com um sêmen menos fértil (Hunter e Greve, 1998, Kurykin et al., 2006).

Dentro deste contexto, destaca-se o procedimento utilizando-se a inseminação intracornual profunda direcionada ao corno uterino ipsilateral ao folículo pré-ovulatório; assim, previamente à inseminação, faz-se a avaliação por meio de ultrassom, a fim de detectar qual o lado em que provavelmente ocorrerá a ovulação e, em seguida, procede-se com a inseminação guiada para o respectivo lado, no qual ocorre a deposição do sêmen.

Tendo em vista esses aspectos, o presente estudo teve como objetivo avaliar e comparar a técnica de inseminação artificial convencional e a técnica de inseminação artificial intracornual, utilizando-se protocolos de IATF em fêmeas bovinas da raça Nelore.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental

O presente estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso animal (CEUA) da Faculdade de Ciências da Saúde de Unaí / MG nº 003/2017.

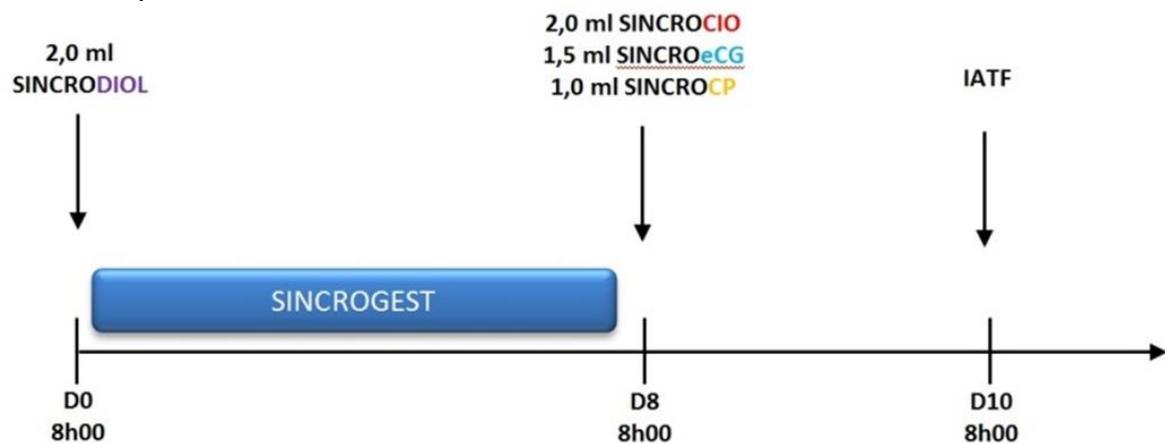
O experimento foi realizado na fazenda Santo Agostinho situada no município da São Domingos de Goiás – GO, nordeste goiano, (coordenadas: 13°37'5.89" S / 46°31'52.85" O), entre os meses de janeiro a março de 2017. Foram utilizadas 400 vacas, devidamente identificadas, da raça Nelore (*Bos indicus*) pluríparas não lactantes. Todos os animais foram mantidos sob pastejo (*Brachiaria brizantha*, cultivar Marandú) suplementadas com sal mineral reprodução (Zooflora) e acesso livre a água, por meio de bebedouros artificiais. O escore corporal médio dessas fêmeas foi de 3,0 (escala de 1 a 5; 1= muito magra e 5= muito gorda).

Foi realizado o exame ultrassonográfico no mês de dezembro / 2016, utilizando-se o ultrassom Sonoscape (A5VET, transdutor linear 7MHz, China). Tal exame teve por objetivo confirmar se todas as fêmeas não estavam prenhas e/ou se havia alguma patologia que comprometesse o experimento. No decorrer da respectiva avaliação, as fêmeas aptas foram separadas aleatoriamente em grupo 1 e 2, de modo que ao final do trabalho, haviam 2 grupos com 200 animais cada.

No início do protocolo da IATF (dia zero = D0), as vacas do grupo 1 receberam um dispositivo intravaginal novo de 1 g de progesterona (Sincrogest®, Ouro Fino, Brasil) e 2 mg de Benzoato de Estradiol (Sincrodiol®, Ouro Fino, Brasil) por via intramuscular (IM). Os dados referentes à data do serviço, etapa do cronograma, identificação

do animal e observações eram anotados em uma planilha de campo. Oito dias depois (D8) os dispositivos foram retirados e aplicados simultaneamente 1 mg de Cipionato de Estradiol (SincroCP®, Ourofino, Brasil); 0,526 mg de Cloprostenol Sódico (Sincrocio®, Ouro Fino, Brasil) e 300 UI de eCG (SincroECG®, Ourofino, Brasil) pela via IM. Todas as fêmeas foram inseminadas 48 horas após a retirada do dispositivo intravaginal (dia 10 = D10). No dia da inseminação, foram coletadas as seguintes informações na planilha de acompanhamento reprodutivo: número do animal, ovário com folículo pré-ovulatório, touro, presença de muco na IA e observações.

**Figura 1:** Protocolo de sincronização de onda folicular para inseminação artificial em tempo fixo utilizado no experimento



Para as vacas do grupo 2, foi utilizado o mesmo protocolo hormonal do grupo 1, porém, os manejos das 3 etapas do protocolo (D0, D8 e D10) foram realizados 1 dia após cada etapa do grupo 1, para que não ocorressem conflitos de manejo. Todos os manejos dos dois grupos trabalhados ocorreram no período da manhã.

Com relação ao dia da inseminação (D10), foram feitos os procedimentos delineados para o experimento. De acordo com o cronograma, grupo 1 foi o primeiro a ser inseminado. Inicialmente, fez-se a avaliação ultrassonográfica com o aparelho Sonoscape (A5VET, transdutor linear 7 MHz, China). De acordo com o diâmetro folicular, a fêmea era inseminada ou liberada, de acordo com o seguinte critério:

Fêmeas com folículo pré-ovulatório menor que 11,0 mm ou sem folículos pré-ovulatórios eram liberadas, ou seja, não foram inseminadas.

Fêmeas com folículo pré-ovulatório maior ou igual a 11,0 mm eram inseminadas.

Esse critério de seleção baseado no diâmetro folicular levou em consideração a probabilidade de ovulação, ou seja, fêmeas zebuínas multíparas com folículo maior que 11,0 mm tem maiores chances de ovular e vir a conceber. Partindo do pressuposto que tais fêmeas estariam em condição de igualdade, o comparativo da possível superioridade de resultados no grupo experimento seria mais facilmente detectado.

Para as fêmeas aptas ao experimento (folículo maior ou igual a 11,0 mm), procedia-se com a inseminação no corpo ou corno uterino, de forma alternada e aleatória. Todos os equipamentos (descongelador automático, aplicadores de IA, bainhas, camisinha sanitária) eram da marca WTA. Um detalhe importante está no aplicador de sêmen utilizado; o experimento foi realizado com o aplicador de transferência de embriões, em virtude de seu maior comprimento e menor diâmetro, permitindo com um acesso mais eficiente ao corno uterino.

Ao atingir um total de 50 fêmeas do grupo controle e 50 do grupo experimento, o trabalho era encerrado e os animais excedentes eram liberados. Para o grupo 2, foram adotados os mesmos procedimentos descritos para o grupo 1, sem nenhuma variação técnica, de equipes, sêmen, manejo e/ou equipamentos.

Com relação às fêmeas do experimento, de acordo com o protocolo a ser seguido, a deposição do sêmen deveria ser o mais próximo possível da junção útero/tubárica. Porém, nas situações em que o corno uterino se encontrava fortemente contraído em virtude do tônus causado pelo cio, o sêmen era depositado na curvatura média do respectivo corno. Também, em situações que houvesse o crescimento folicular bilateral (nos dois ovários), optou-se por realizar a inseminação ipsilateral ao folículo de maior desenvolvimento.

Para o respectivo experimento, foi utilizado o sêmen de um touro da raça Nelore, armazenado em palheta fina (0.25 ml), que apresentou os seguintes padrões pós descongelamento (mediante análises pelo CASA):

- Concentração espermática: 37,5 milhões / ml
- Motilidade inicial: 75,0%
- Vigor: 4
- Morfologia espermática: 90,0 espermatozoides normais

Os animais inseminados mantiveram-se separados em seus respectivos grupos por 30 dias, nas condições de nutrição e ambiência descritas no início deste capítulo. Ao completar 1 mês pós inseminação, os dois grupos foram trazidos ao curral para o diagnóstico de gestação.

Para tal procedimento foi utilizado o aparelho de ultrassom Sonoscape (A5VET, transdutor linear 7 MHz, China). De acordo com a ordem previamente estabelecida, o grupo 1 foi o primeiro a ser diagnosticado, porém as fêmeas foram analisadas aleatoriamente, na medida que entravam no brete. De acordo com o resultado, tomava-se anotação na planilha de campo específica; em situações de prenhez confirmada, era cortado o cabelo da extremidade da cauda das fêmeas, aparando-se em sua totalidade.

Ao final do trabalho, os animais foram dispensados em conjunto de acordo com o status reprodutivo (prenhas ou vazias) e o experimento na respectiva propriedade foi dado por encerrado.

## **4.2 Análise estatística**

Para se analisar a associação entre a ocorrência ou não de prenhez de acordo com o local da inseminação no útero da fêmea (corpo do útero ou corno uterino), utilizou-se a estatística descritiva seguida pelo teste de normalidade D'Agostino-Pearson Omnibus, seguido do teste Chi-Quadrado para comparação entre dois grupos no programa GraphPad Prism® 6. Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão da média, e  $P \leq 0.05$  considerado significativo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

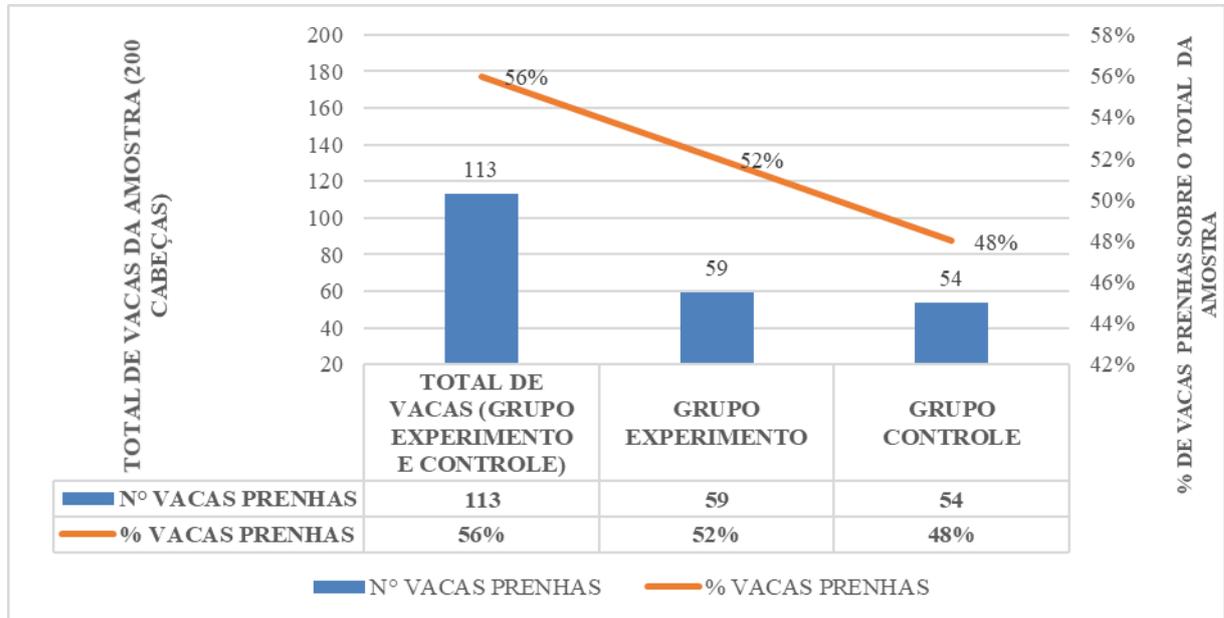
Os animais do grupo experimento que foram submetidos à técnica da Inseminação Artificial Intracornual não apresentaram diferença estatística na taxa de prenhez quando comparados ao grupo controle.

Em ambos os lotes, o grupo experimento apresentou uma superioridade numérica frente ao grupo que foi inseminado nos moldes convencionais da IATF. No lote 1, o grupo experimento apresentou uma taxa de prenhez 6,67% maior que o grupo controle. Já no lote 2, as fêmeas do grupo experimento apresentaram uma taxa de prenhez 10,65% superior que as fêmeas do grupo controle. Porém, após os dados serem compilados e submetidos à análise estatística, não houve diferença estatística entre os grupos (P value = 0,4575);

**Tabela 1** – Índice de prenhez em fêmeas Nelore submetidas à inseminação intracornual e inseminação convencional

	<b>TOTAL VACAS PRENHAS</b>	<b>GRUPO EXPERIMENTO</b>	<b>GRUPO CONTROLE</b>
GRUPO 1	58 (58%)	30 (60%)	28 (56%)
GRUPO 2	55 (55%)	29 (58%)	26 (52%)
TOTAL	113 (56%)	59 (52%)	54 (47%)

**Figura 2** - Comparativo entre o total de fêmeas prenhas e a composição de prenhez referentes aos grupos experimento e controle, com seus respectivos percentuais.



No experimento testado, percebeu-se que mesmo não havendo diferença estatística entre os grupos, numericamente houve uma pequena superioridade no percentual de prenhez para o grupo das vacas experimento (4 e 6% para os grupo 1 e 2, respectivamente). Sabemos que, ao utilizar a técnica intracornual, estaremos depositando uma maior quantidade de sêmen mais próximo ao sítio de fecundação, visto que o sêmen estará sendo injetado dentro do corno uterino. Senger et al. (1998) afirmam que a deposição do sêmen dentro do corno uterino favorece os espermatozoides, devido à menor exposição destes às adversidades do epitélio uterino (pH vaginal, reações imunológicas da vagina e útero, barreira física /cérvix, muco cervical e uterino).

Na prática, a diferença numérica obtida contribui significativamente na viabilidade da atividade de cria; traduzindo em números, considerando-se um rebanho de 100 vacas no qual obtém-se 4 a 6 bezerros a mais através com uso da inseminação intracornual, no final do processo estima-se um retorno financeiro de aproximadamente R\$ 6.000,00. Com tal aporte financeiro, os custos com honorários veterinários, hormônios e sêmen certamente seriam quase ou totalmente quitados com os benefícios da técnica em questão, expressando com isso seu potencial de aplicabilidade prática com viabilidade.

É sabido que muitos espermatozoides são perdidos no trato genital feminino devido aos movimentos retrógrados (Mulins and Saake, 1989; Sartori, R., 2004). Pelo fato do sítio de deposição do sêmen na inseminação artificial intracornual ser próximo à junção útero-

tubárica (istmo), os espermatozóides sofrem menos influência das adversidades do ambiente uterino, quando comparados àqueles depositados na vagina ou corpo do útero.

De acordo com Dalton et al. (1999), um maior aporte seminal sendo depositado próximo à região do istmo pode resultar em correlações positivas na formação da reserva espermática e posteriormente na taxa de concepção e prenhez, visto que a fertilidade reduzida associada a inseminação com sêmen congelado vem sendo atribuída à técnica de congelação do sêmen que produz danos nos espermatozoides, que podem ser ultra-estruturais, físicos, bioquímicos e funcionais, e que levam a perda de motilidade, alterações na cromatina e na morfologia do espermatozoide, desestabilização das membranas e geração de espécies reativas de oxigênio.

De acordo com Kodithuakku et al. (2007) os espermatozóides são capazes de estimular a biossíntese e secreção de prostaglandinas através do aumento da expressão gênica COX2, PGES e PGFS, sugerindo que o espermatozoide estimula o aumento da motilidade do oviduto, facilitando seu transporte para o local de fecundação. Adicionalmente, Georgiou et al. (2007) demonstraram que a presença dos gametas masculinos no oviduto alteraram 32 proteínas, resultando em alterações fisiológicas locais que favoreçam a capacitação espermática e posterior fecundação. Deste modo, acredita-se que quanto maior a quantidade de células espermáticas na região do istmo, mais intensas e favoráveis serão as reações que beneficiem o encontro dos gametas masculino e feminino, resultando em uma melhor taxa de concepção.

Andersson et al. (2004) nos trazem alguns dados que vão de encontro com este trabalho; perceberam que para a inseminação no corno uterino, não houve diferença estatística para as duas concentrações de sêmen testadas (2 e 15 milhões), porém, houve diferença numérica de quase 4% mais prenhez para o sêmen de maior concentração; outro número que nos chama a atenção, é o índice de prenhez do sêmen de baixa concentração quando comparado os dois locais de inseminação; as vacas inseminadas no corno uterino tiveram quase 8% a mais de prenhez em relação ao grupo que foi inseminado na forma convencional (corpo do útero). Percebe-se com isso que, para touros de baixa fertilidade, a inseminação artificial intracornual pode ser uma alternativa viável em busca de melhores taxas de concepção.

Meirelles et al. (2012) utilizando sêmen de baixa concentração (4 milhões) em vacas Nelore também obtiveram resultados significativos comparando as duas técnicas de inseminação. O grupo inseminado no corpo do útero obteve uma taxa de prenhez de 48,8% e

as vacas inseminadas através da técnica intracornual resultaram em 67,4% de prenhez, o que foi estatisticamente significativo.

O efeito do local de deposição do sêmen em vacas foi muito bem demonstrado por Lopez-Gatiuz (2000); Taxas maiores de prenhez são registradas quando o sêmen é depositado no corno uterino ipsilateral ao ovário que contem o folículo pré-ovulatório, quando comparado à inseminação no corpo do útero ou no corno contralateral à ovulação. Entretanto Hawk and Tanabe (1986) e Momont et al. (1989) não encontraram diferenças entre o sítio de deposição do sêmen e as respectivas taxas de prenhez.

Sendo assim, percebe-se que há diversos trabalhos demonstrando viabilidade quanto ao uso da inseminação intracornual, especialmente quando se usa sêmen de baixa concentração, devido a problemas de fertilidade dos touros ou processo de sexagem espermática; há também trabalhos demonstrando não haver diferença estatística significativa entre as técnicas de inseminação, ficando clara a necessidade de mais experimentos, na tentativa de elucidar melhor os pontos favoráveis que envolvem tais procedimentos.

## 7 CONCLUSÃO

De acordo com o presente estudo, não houve diferença estatística significativa quanto à taxa de prenhez, onde foi comparado as técnicas de inseminação no corpo do útero e no corno uterino, utilizando-se protocolo de Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF).

Percebe-se uma perspectiva de aplicação da técnica principalmente em situações com utilização de sêmen de baixa concentração espermática ou baixa fertilidade, porém, mais estudos devem ser conduzidos para a comprovação científica de tais possibilidades.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIEC – Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne. 2015. Disponível em <[www.abiec.com.br](http://www.abiec.com.br)>. Acesso em: 17/09/2017.

ANDERSSON, M.; TAPONEMA, J.; KOSKINEM, E.; DAHLBOM, M. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology**, v.61, p.1583-88. 2004.

ASBIA – Associação Brasileira de Inseminação Artificial. 2017 Disponível em <[www.asbia.org.br](http://www.asbia.org.br)> Acesso em: 17/09/2017.

BARROS, C. M., FIGUEIREDO, R. A., PINHEIRO, O. L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 19, p.9-22, 1995.

BARROS, C. M.; MOREIRA, M. B. P.; FERNANDES, P. **Pharmacological manipulation of the estrous cycle to improve artificial insemination or embryo transfer programs.** Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS, v.26, n.1, p.179-198, 1998.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N. A. T.; NADUREIRA, E. H.; CAMPOS FILHO, E. P. Efeito de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de corte lactantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** v. 26, p. 218-221, 2002.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; MARQUES, M. O.; RODRIGUES, C. A.; NASSER, L. F.; SILVA, R. C. P.; REIS, E. L.; SÁ FILHO, M. F. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas Nelore com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae** v.32 (suplemento), p. 228, 2004a.

BARUSELLI, P. S.; AYRES, H.; SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Lodrina, p. 113-132. 2006.

- BARUSELLI, P. S.; SALES, J. N.; SALA, R. V.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F. History evolution and perspectives of timed artificial insemination programs in Brazil. **Anim. Reprod.** 9:139-52. 2012.
- BURKE, C. R.; MACMILLAN, K. L.; BOLAND, M. P. Oestradiol potentiates a prolonged progesterone- induced suppression of LH release in ovariectomised cows. **Animal of Reproduction Science**, v. 45, p. 13-28, 1996.
- CÉZAR, I. M. Racionalização de investimentos em pastagens: uma abordagem sistêmica no processo decisório. In: Simpósio sobre Manejo de Pastagens, 18, 2001, Piracicaba. **Anais...Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários "Luis de Queiroz"**, p.351-369. 2001.
- COSTA, A. N. L., Airton, A. A.; Feitosa, J. V. Particularities of bovine artificial insemination. In: ARTIFICIAL INSEMINATION IN FARM ANIMALS (pp. 153 – 167). Rjeka, Croatia: InTech. 2011.
- DALTON, J. C.; NADIR, S.; BAME, J. H.; SAACKE, R. G. Effect of a deep uterine insemination on spermatozoa accessibility to the ovum in cattle: a competitive insemination study. **Theriogenology** 1999 5: 883 – 890. 1999.
- DEN DAAS, J. H. G. The relationship between the number of spermatozoa Inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. **Journal of Dairy Science**. v.81, p.1714–1723. 1998.
- DISKIN, M. G.; PURSLEY, J. R.; KENNY, D. A.; MEE, J. F.; SREENAN, J. M. The effect of deep intrauterine placement of semen on conception rate in dairy cows. **J. Dairy Science** 87 (Suppl 1): 257 (Abstract). 2004.
- FERNANDES, P.; TEIXERIA, A B.; CROCCI, A.J.; BARROS, C.M. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist. PGF2alpha and estradiol benzoate. **Theriogenology**. v.55, p.1521–1532, 2001.
- FOOTE, R, H.; KAPROTH, M. T. Sperm numbers inseminated in dairy cattle and nonreturn rates revisited. **Journal Dairy Science** 80: 3072 – 3076. 1997.
- GALLAHER, G. R.; SENGER, P. L. Concentrations of spermatozoa in the vagina of heifers after deposition of semen in the uterine horns, uterine body or cervix. **J. Reprod. Fertil** 86: 19 – 25. 1989.
- GALLI, C.; LAZZARI, G. Nuevas Tecnologias de La Reproduccion. In: **Proceedings of the 7th World Conference of the brown swiss cattle breeders**, Verona, Italia, s.1, p. 225-229. 2004.
- GALINA, C. S.; ORIHUELA, A.; BUBIO, I. Behavioural trends affecting oestrus detection in Zebu cattle. **Anim. Repr. Sci.**, V. 42, P. 465-470, 1996.
- GRAHAM, E. F. Use of dye indicator for testing, training and evaluating technicians in artificial insemination. Proc. First NAAB Tech. **Conf. AI Reprod.** Pages 57 – 60. 1966.

GEORGIU, A. S.; SNIJDERS, A. P.; SOSTARIC, E.; AFLATOONIAN, R.; VAZQUEZ, J. L.; VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E. A.; WRIGHT, P. C.; FAZELI, A. Modulation of the oviductal environment by gametes. **J Proteome Res**, 6 4656-4666. 2007.

GORDON, I. Factors affecting fertility of the beef cow. In: **GORDON, I.** Controlled Reproduction in Farm Animals Series. Vol.1 Department of Animal Science and Production. pp. 35 - 39). New York - USA: CAB International. November 1996.

HAWK, H.W. et al. Fertilization rates in superovulating cows after deposition of semen on the infundibulum, near the uterotubal junction or after insemination with high number of sperm. **Theriogenology**, v.29, p.1131-1143. 1983.

HAWK, H. W.; TANABE, T. Y. Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single ovulating cattle. **Journal of Animal Science** 63: 551-560. 1986.

HAWK, H. W. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle. **Journal of Dairy Science** 70: 1487 – 1503. 1987.

HUNTER, R. H.; WILMUT, I. Sperm transport in the cow: peri-ovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. **Reprod. Nutr. Dev.**, 24: 597 – 608, 1984

HUNTER, R. H. F. Behavior of spermatozoa in the oviduct of farm animals. **Arch. Biol. Med. Exp** pages 349 – 359. 1991.

HUNTER, R. H. F. Ovarian endocrine control of sperm progression in the Fallopian tubes. Oxford. **Rev. Reprod. Biol** 17: 85-125. 1995.

HUNTER, R. H. F. New breeding opportunities with deep cornual insemination: exploiting modern sperm technologies in cattle. **Reproduction Domestic Animals** 36: 217 – 222. 2001.

HUNTER, R. H. F.; GREVE, T. Deep uterine insemination in cattle: a fruitful way forward with small numbers of spermatozoa. **Acta Vet Scand** 39: 149-163. 1998.

KODITHUWAKKU, S. P.; MIYAMOTO, A.; WIJAYAGUNAWARDANE, M. P. Spermatozoa stimulate prostaglandin synthesis and secretion in bovine oviductal epithelial cells. **Reproduction**, 133 1087-1094. 2007.

KURYKIN, J.; JAAKMA, U.; MAJAS, L.; JALAKAS, M.; AIDNIK, M.; WALDMANN, A.; et al. Low semen dose intracornual insemination of cows at fixed time after PGF<sub>2</sub> $\alpha$  treatment or at spontaneous estrus. **Animal Reproduction Science**. v.95, p.116–124. 2006.

LANE, E. A., AUSTIN, E. J. & CROWE, M. A. Oestrous synchronisation in cattle -current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food-producing animals: a review. **Animal Reproduction Science**, 109(1-4), 1–16. 2008.

LARSSON, B.; LARSSON, K. Distribution of spermatozoa in the genital tract of artificially inseminated heifers. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.26, p.385-395. 1985.

- LEFEBVRE, R.; LO, M.C.; SUAREZ, S. Bovine sperm binding to oviductal epithelium involves fucose recognition. **Biol. Reprod** 56: 1198 – 1204. 1997.
- LOPEZ-GATIUS, F.; CAMON-URGEL, J. Increase of pregnancy rate in dairy cattle after preovulatory follicle palpation and deep corneal insemination. **Theriogenology** 29: 1099-1103. 1988.
- LÓPEZ-GATIUS, F. Site of semen deposition in cattle: a review. **Theriogenology**, v.53, p.1407-1414. 2000.
- MARSHALL, C. Use care when depositing semen. **The Hoard's Dairyman**. Pages 124 – 138. 1979.
- MAXWEEL, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v.52, p.1353–1362. 1999.
- McKENNA, T.; LENZ, R.; FENTON, S. E.; AX, R. L. Non-return rates of dairy cattle following uterine body or cornual insemination. **Journal of Dairy Science** 73: 1779 – 1783. 1990.
- MEIRELLES, C.; KOZICKI, L. E.; WEISS, R. R.; SEGUI, M. S.; SOUZA, A.; SANTOS, I. W. Comparison between deep intra cornual artificial insemination (dIAI) and conventional artificial insemination (AI) using low concentration of spermatozoa in beef cattle. **Braz Arch Biol Technol** 55: 371 – 374. 2012.
- MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. 6 ed, volume 2. Porto Alegre: Editora Sulina, 1987
- MILVAE, R. A., HINCKLEY, S. T., CARLSON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, p.1327-1349, 1996.
- MIZUTA, K. Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*). 2003. 98 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- MOMONT, H. W.; SEGUIN, B. E.; SINGH, G.; STASIUKYNAS, E. Does intrauterine site of insemination in cattle really matter? **Theriogenology**. v.32, p.19–26. 1989.
- MOREIRA, R.J.C. Uso do protocolo Crestar® em tratamentos utilizando Benzoato de Estradiol, PGF2 $\alpha$ , PMSG e GnRH para controle do ciclo estral e ovulação em vacas de corte. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP. 2002. 48p.
- MORREL, J. M. Artificial insemination: corrent e future trends. In *Artificial Insemination in Farm Animals* (1 st ed., pp. 1 – 25) Rjeka, Croatia. 2011.
- MULLINS, K.J.; SAAKE, R.G. Study of the functional anatomy of bovine cervical mucosa with special reference to mucus secretion and sperm transport. **Anatomy and Record**, v. 225, p. 106-117. 1989.

NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, J. F. C. Fatores que afetam a eficiência reprodutiva na vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.99- 106. 1999.

NELSON, V. E. et al. Sperm discharge and distribution within the cow reproductive tract and after A.I. **Journal of Animal Science**, v.65, p.401. 1987.

ODDE, K. G. A review of synchronization of estrus in postpartum cattle. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 817-830, 1990.

PALLARES, A.; ZAVOS, P. M.; HEMKEN, R. W. Fertilization rates and embryonic development in superovulated cattle inseminated in different sites within the reproductive tract. **Theriogenology** 26: 709 – 719. 1986.

PETERS, J. L.; SENGER, P. L.; ROSENBERGER, J. L.; O'CONNOR, M. L. Radiographic evaluation of bovine artificial inseminating technique among professional and herdsman-inseminators using .5 and .25-ml french straws. **Journal of Animal Science**. 59: 1671 – 1683. 1984.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Follicular populations during the estrous cycle in heifers. I. Influence of day. **Animal Reproduction Science**, v.26, n.1-4, p.649-659, 1987.

PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEREDO, R. A.; VALLE, E. R. DO, ENCARNAÇÃO, R. O.; PADOVANI, C. R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2alpha or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v.49, p.667-81, 1998.

POLLARD, J. W.; PLANTE, C.; KING, W. A.; HANSEN, P. J.; BETTERIDGE, K. J.; SUAREZ, S. S. Fertilizing capacity of bovine sperm may be maintained by binding to oviductal epithelial cells. **Biol. Repro.** 44: 102-107. 1991.

PURSLEY., J.R., MEE, M.O., BROWN, M.D., WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cattle using GnRH and PGF2 $\alpha$ . **J. Anim. Sci.**, v.72, p.230, 1994.

REVAH, I.; GADELLA, B. M.; FLECH, F. M.; COLENBRANDER, B.; SUAREZ, S. S. Physiological state of bull sperm affects fucose and mannose binding properties. **Biol. Reprod** 62: 1010 – 1015. 2000.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P. et al. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.83, n.2, p.663-671, 1988

SÁ FILHO, M. F.; GIROTTO, R.; ABE, E. K.; PENTEADO, L.; CAMPOS FILHO, E. P.; MORENO, J. F. E. T. Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. **Journal of Animal Science** 90: 1816 – 1823. 2012.

SEGUIN, B. Evaluating artificial inseminators placement of semen in cattle. **Current Therapy in Theriogenology**. Pages 174 – 175. 1986.

SARTORI, R. Fertilização e morte embrionária em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32 (Suplemento), p. 35-50. *In*: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de

- Embriões, 18. 26 a 29 de agosto de 2004. Barra Bonita, SP, Brasil. Porto Alegre: UFRGS. 2004.
- SEIDEL Jr, G.E. et al. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, v.52, p.1407-1420. 1999.
- SENGER, P. L.; BECKER, W. C.; DAVIDGE, S. T.; HILLERS, J. K.; REEVES, J. J. Influence of cornual insemination on conception in dairy cattle. **Journal of Animal Science** 66:3010–3016. 1988.
- SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. **Biol. Reprod.**, v.39, p.308-317, 1988.
- SUAREZ, S. S.; BROCKMAN, K.; LEFEBVRE, R.; Distribution of mucus and sperm in bovine oviducts after artificial insemination: the physical environment of the oviductal sperm reservoir. **Biol. Reprod** 56: 447 – 453. 1997
- THATCHER, W. W.; DROST, M.; SAVIO, J. D.; MACMILLAN, K. L.; ENTWISTLE, K. W.; SCHIMITT, E. J.; DE LA SOTA, R. L.; MORRIS, G. R. New clinical uses of GnRH and its analogues in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v.33, p.27-49, 1993.
- TWAGIRAMUNGU, H.; GUIBAULT, L.A.; PROULX, J.; VILLEUVE, P.; DUFOUR, J. J. Synchronization of estrus and fertility in beef cattle with two injections of buserelin and prostaglandin. **Theriogenology**, v.38, p.1131-44, 1992a.
- TWAGIRAMUNGU, H.; GUIBAULT, L.A.; PROULX, J.; VILLEUVE, P.; DUFOUR, J. J. Influence of an agonist of Gonadotropin-Releasing Hormone (Buserelin) on estrus synchronization and fertility in beef cows. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.1904-10, 1992b.
- VERBERCKMOES, S. et al. Assessment of a new utero-tubal junction insemination device in dairy cattle. **Theriogenology**. v.61, p.103–115, 2004.
- VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology** 59: 571 – 584. 2003.
- WILLIAMS, B. L.; GWAZDAUSKAS, F. C.; WHITTIER, W. D.; PEARSON, R. E.; NENEL, R. L. Impact of site of inseminate deposition and environmental factors that influence reproduction of dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 71: 2278 – 2283. 1988.