

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**DIFERENTES VIAS E MOMENTOS DE APLICAÇÃO DE  
GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA EM PROTOCOLO  
DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO PARA  
VACAS**

**MONNA LOPES DE ARAUJO**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2016**

**DIFERENTES VIAS E MOMENTOS DE APLICAÇÃO DE  
GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA EM PROTOCOLO DE  
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO PARA VACAS**

**Monna Lopes de Araujo**

Medicina Veterinária

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2014

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Produção Animal).

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Pires Barbosa

**Coorientador:** Dr. Carmo Emanuel de Almeida Biscarde

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA  
2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

A663d

Araujo, Monna Lopes de.

Diferentes vias e momentos de aplicação de gonadotrofina coriônica equina em protocolo de inseminação artificial em tempo fixo para vacas / Monna Lopes de Araujo.\_ Cruz das Almas, BA, 2016. 47f.; il.

Orientadora: Larissa Pires Barbosa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.

1.Bovino – Reprodução. 2.Bovino – Inseminação artificial. 3.Hormônios – Avaliação. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.

CDD: 636.20896

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**DIFERENTES VIAS E MOMENTOS DE APLICAÇÃO DE  
GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA EM PROTOCOLO DE  
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO PARA VACAS**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação  
Monna Lopes de Araujo

Aprovada em: 07 de Junho de 2016

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Pires Barbosa  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Orientadora

Prof. Dr. Misael Caldas Nascimento  
União Metropolitana para o Desenvolvimento da Educação e Cultura  
Examinador Externo

Prof. Dr. Rodrigo Freitas Bittencourt  
Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade Federal da Bahia  
Examinador Externo

## DEDICATÓRIA

Dedico, àqueles que me ensinaram tudo de melhor que há em mim, que sempre acreditaram nos meus sonhos e me ajudaram a nunca desistir de sonhar.

Aos meus queridos pais, amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida a mim concedido, por sempre guiar meus passos e por ter me dado forças para iniciar e finalizar mais uma importante etapa da minha vida.

À minha família, aos meus pais Mario Sérgio e Iza Maria, por todo amor e carinho, por sempre me incentivarem a seguir em frente e lutar pelos meus objetivos. Aos meus irmãos, Thiago e Izabella, por fazerem da minha vida um lugar mais feliz e ao meu namorado, Pedro, pela paciência, companheirismo e incentivo.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Pires Barbosa, por não somente me orientar em mais uma importante etapa da minha vida, mas principalmente por todo carinho e apoio ao longo desses sete anos de convivência. A senhora sempre foi e sempre será meu grande exemplo de profissional. Obrigada por sempre me ouvir, por sempre me ajudar, por sempre me incentivar, por acreditar em mim, mesmo quando nem eu achava que seria capaz. TE AMO INFINITAMENTE!

A Carmo Emanuel, meu grande amigo, por toda ajuda, não tenho palavras para te agradecer, pois só mesmo uma amizade verdadeira, faz você desmarcar viagem de férias para ir ajudar a mestrandia no experimento de campo. Serei eternamente sua fã, não somente pelo profissional fantástico que és, que me inspirou durante a graduação e me inspirará eternamente, mas também pelo ser humano fantástico que és, sempre disposto a compartilhar seus conhecimentos e dividir o peso com seu ombro amigo. Que Deus te devolva em dobro, Carminho, tudo que você já fez por mim. MUUUUITO OBRIGADA!

À Rosiléia, pela infinita paciência que sempre teve comigo me ajudando a entender o mundo misterioso da estatística, pela disposição, amizade e contribuição nas análises estatísticas.

Aos mais que colegas de mestrado, verdadeiros amigos que a vida me presenteou, Maicon, Emanuel, Mairon e Sandra, por toda ajuda ao longo desses dois anos, vocês sem dúvidas são anjos que Deus colocou na minha vida, para me ajudar a completar essa difícil etapa. Maicon e Manel, obrigada por cada noite mal dormida, me ajudado a executar meu experimento; por cada palavra de incentivo; por cada aventura vivida nas viagens Bahia a dentro; por todas as risadas e lágrimas divididas. Vocês são a prova viva, que amigos são Anjos que Deus coloca em nossas vidas para nos proteger. MUITO OBRIGADA, MEUS ETERNOS AMIGOS!

À minha irmã de alma e coração Claudinéia, por todo apoio nessa longa jornada; obrigada por nunca me deixar sozinha; por sempre acreditar em mim e me incentivar a seguir em frente; obrigada por me estender a mão nos momentos mais difíceis dessa jornada, mesmo que pra isso, tivesse que deixar o conforto do seu lar e a companhia do seu marido Bianor, o qual também agradeço pela amizade de hoje e sempre! Já que estou falando de irmã, agradeço também a minha outra irmã de coração, Mariana, que mesmo de longe sempre torceu por mim.

À todos do Núcleo de Estudos em Reprodução Animal - UFRB (NERA), pela amizade, disposição, companheirismo e ajuda em todas as etapas de execução desse trabalho, sem vocês nada disso seria possível, meu MUITÍSSIMO OBRIGADA, FAMÍLIA NERA!

À UFRB e a Fazenda Experimental, pela oportunidade e disponibilização do Setor de Bovinocultura e dos animais para realização do experimento.

Aos funcionários, Clodoaldo (Cró) e Danilo, do Setor Zootécnico da UFRB, por me ajudarem com o manejo dos animais durante o meu experimento, vocês foram peças fundamentais para que tudo desse certo.

Ao amigo, Joelmo Figueredo Junior (Fazendas JF Reunidas), por me ceder não só seus animais e estrutura, mas seu precioso tempo para me ajudar a executar uma etapa do meu experimento.

Ao senhor, Antônio Ferreira, por me ceder seus animais e funcionários em sua fazenda.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), por conceder a bolsa de estudo.

## EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer. Sempre que o homem aplicar a determinação e a persistência para um objetivo, ele vencerá os obstáculos, e se não atingir o alvo, pelo menos fará coisas admiráveis”

José Martiniano de Alencar

## DIFERENTES VIAS E MOMENTOS DE APLICAÇÃO DE GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA EM PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO PARA VACAS

**RESUMO:** O estudo teve como objetivo avaliar diferentes vias e momentos de aplicação de gonadotrofina coriônica equina (eCG) em protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) para vacas. Foram realizados dois experimentos, no experimento I, 70 vacas da raça Nelore receberam no dia zero (D0) do protocolo, dispositivos intravaginais com progesterona (PRIMER®) e 3mg de benzoato de estradiol (BE); no D9 foram retirados os dispositivos, aplicados 150µg de um análogo sintético da prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>), o d-cloprostenol e distribuídos os animais aleatoriamente em três tratamentos (T), sendo: T1 (n=22): aplicação de 300UI de eCG (100% da dose) por via intramuscular (IM); T2 (n=23): aplicação de 90UI (30% da dose) de eCG no acuponto Hou Hai e T3 (n=25): aplicação de 90UI (30% da dose) de eCG em falso acuponto (IM). No D10 todos os animais receberam 1mg de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) por via IM e foi realizada a IATF, 52 horas após a retirada dos PRIMER®. As avaliações de crescimento folicular e momento de ovulação foram realizadas em sete, sete e oito animais nos T1, T2 e T3, respectivamente, em intervalos de 24h, por meio de ultrassonografia, iniciando logo após a retirada dos dispositivos e finalizaram 24h após a ovulação. As avaliações de corpo lúteo (CL) foram feitas nove dias após a retirada do PRIMER®, por meio de avaliação ultrassonográfica. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF em todos os animais. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, os dados foram avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis quantitativas que apresentaram distribuição normal foi utilizada ANOVA, a 5% de probabilidade. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) para: o intervalo entre a retirada do dispositivo à ovulação (T1=72,36±13,62; T2=51,35±35,08 e T3=51,03±32,55h); diâmetro do maior folículo no D9 (T1=12,5±0,40; T2=8,5±0,59 e T3=8,7±0,57mm); diâmetros do folículo ovulatório (T1=15,8±0,33; T2=10,2±0,72 e T3=10,8±0,70mm) e do segundo maior folículo (T1=9,1±0,32; T2=6,0±0,55 e T3=5,0±0,46mm); taxa de crescimento folicular (T1=1,20±0,80; T2=0,50±0,50 e T3=0,80±0,80mm/dia); taxa de ovulação (%) (T1=100; T2=71 e T3=75%); área de corpo lúteo (T1=2,66±1,45; T2=2,34±1,35 e T3=1,96±1,75cm<sup>2</sup>) e taxa de gestação (68; 52 e 56%, para T1, T2 e T3, respectivamente). O custo do protocolo em dólar, por animal, foi de US\$ 10,67 (T1) e US\$ 8,50 (T2 e T3). No experimento II, 76 vacas da raça Girolando, receberam no D0 do protocolo dispositivos intravaginais com progesterona (PRIMER®) e 3mg de BE, por via IM. No D9 foram retirados os dispositivos, aplicados 150µg de d-cloprostenol e os animais foram distribuídos em três tratamentos (T), sendo: T1 (n=25): aplicação de 400UI de eCG no momento da retirada do PRIMER®; T2 (n=23): aplicação de 400UI de eCG, 48 horas antes da retirada do PRIMER® e T3 (n=25): aplicação de 400UI de eCG, 24h antes da retirada do PRIMER®. No D10 do protocolo todos os animais receberam 1mg de GnRH, todos os hormônios foram administrados por via IM. Os animais foram inseminados 52 horas após a retirada do dispositivo. Os parâmetros de crescimento folicular e momento de ovulação foram avaliados em 10 animais por tratamento. A área de corpo lúteo e taxa de gestação foram avaliados em todos os animais como descrito no experimento anterior. Foi utilizado o delineamento inteiramente

casualizado, para as variáveis com distribuição normal foram avaliadas por Análise de Variância a 5% de significância e para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade. Não houve diferença ( $P>0,05$ ) entre T1, T2 e T3, respectivamente, para intervalo entre a retirada do dispositivo à ovulação ( $77,05\pm 10,06$ ;  $70,81\pm 11,58$ ;  $69,83\pm 0,95$ h); diâmetro do maior folículo no D9 ( $9,17\pm 2,41$ ;  $11,88\pm 2,82$ ;  $11,58\pm 2,46$ mm); diâmetros do folículo ovulatório ( $13,82\pm 2,11$ ;  $15,95\pm 2,40$ ;  $15,67\pm 2,02$ mm) e do segundo maior folículo ( $8,07\pm 1,54$ ;  $7,35\pm 1,94$ ;  $7,05\pm 1,54$ mm); taxa de crescimento folicular ( $1,40\pm 0,07$ ;  $1,32\pm 0,04$ ;  $1,40\pm 0,06$ mm/dia); taxa de ovulação (100; 100 e 90%); área de corpo lúteo ( $1,78\pm 1,19$ ;  $2,44\pm 1,20$ ;  $2,58\pm 1,42$ cm<sup>2</sup>) e taxa de gestação (40, 24 e 36%). A utilização de 90UI de eCG, correspondente a 30% da dose total utilizada para bovino em protocolos de sincronização, aplicadas no acuponto Hou Hai ou em falso acuponto intramuscular foram eficientes na sincronização de estro. Desta forma, pode-se reduzir a dose, com redução do custo do protocolo e com menor dose efetiva. A aplicação da eCG 24h ou 48h antes da retirada do implante não melhorou a eficiência do protocolo, podendo ser executada no momento da retirada do dispositivo de progesterona, com menor manipulação dos animais.

**Palavras chave:** Acuponto *Hou Hai*; Farmacopuntura; Sincronização de ovulação

## DIFFERENT ROUTES AND APPLICATION OF MOMENTS IN EQUINE CHORIONIC GONADOTROPIN INSEMINATION PROTOCOL ARTIFICIAL FIXED TIME FOR COWS

**ABSTRACT:** The study aimed to evaluate different routes and times of application of equine chorionic gonadotropin (eCG) in Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI) protocols for cows. Two experiments were carried out: in experiment I, 70 Nellore cows received, on day zero of the protocol (D0), intravaginal progesterone devices (PRIMER®) and 3mg of estradiol benzoate (EB); on D9 of the protocol the devices were removed, then 150µg of a synthetic analogue of prostaglandin F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) and the d-cloprostenol were applied, and the animals were randomly distributed in three treatments (T), as follows: T1 (n=22): application of 300IU of eCG (100% of dose) by intramuscular route (IM); T2 (n=23): application of 90UI (30% of dose) of eCG in acupoint *Hou Hai* and T3 (n=25): application of 90UI (30% of dose) of eCG in false acupoint (IM). On D10 all animals received 1mg of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) by intramuscular route (IM) and the FTAI was carried out, 52 hours after the removal of the PRIMER®. The evaluations of follicular growth and ovulation time were carried out in seven, seven, and eight animals in T1, T2 and T3 respectively, in intervals of 24 hours, by ultrasonography, beginning immediately after the removal of devices and ended 24 hours after ovulation. The corpus luteum (CL) evaluations were made nine days after the removal of PRIMER®, by ultrasonographic evaluation. The pregnancy diagnosis was carried out 30 days after FTAI in all animals. The completely randomized design was used, the data was assessed according to normality by Shapiro-Wilk test. For the quantitative variables that presented normal distribution, ANOVA was used, at probability of 5%. For the variables that did not present normal distribution, Kruskal-Wallis test was used, at probability of 5%. There was no difference ( $P>0.05$ ) to: the interval from device removal to ovulation (T1=72.36±13.62; T2=51.35±35.08 and T3=51.03±32,55h); diameter of the largest follicle on D9 (T1=12.5±0.40; T2=8.5±0.59 and T3=8.7±0,57mm); diameter of ovulatory follicle (T1=15.8±0.33; T2=10.2±0.72 and T3=10.8±0,70mm) and the second largest follicle (T1=9.1±0.32; T2=6.0±0.55 and T3=5.0±0,46mm); follicle growth rate (T1=1.20±0.80; T2=0.50±0.50 and T3=0.80±0,80mm/day); ovulation rate (%) (T1=100; T2=71 and T3=75%); corpus luteum area (T1=2.66±1.45; T2=2.34±1.35 and T3=1.96±1,75cm<sup>2</sup>) and pregnancy rate (68; 52 and 56% for T1, T2 and T3, respectively). The cost of the protocol in dollars, per animal, was USD 10.67 (T1) and USD 8.50 (T2 and T3). In experiment II, 76 Girolando cows received, on day zero of the protocol (D0), intravaginal progesterone devices (PRIMER®) and 3mg of estradiol benzoate (EB), by IM route. On D9 the devices were removed, then 150µg of d-cloprostenol were applied, and the animals were distributed in three treatments (T), as follows: T1 (n=25): application of 400IU of eCG at the time of removal of PRIMER®; T2 (n=23): application of 400UI of eCG, 48 hours before the removal of PRIMER® and T3 (n=25): application of 400UI of eCG, 24 hours before the removal of PRIMER®. On D10 of the protocol all animals received 1mg of GnRH, all hormones were administrated by IM route. The animals were inseminated 52 hours after the removal of the device. The parameters of follicular growth and ovulation time were evaluated in 10 animals per treatment. The corpus luteum area and pregnancy rates were evaluated in all the animals as described in the previous experiment. The completely randomized design was used, the variables with normal distribution were evaluated by Analysis of Variance at significance of 5% and for the

variables that did not present normal distribution, Kruskal-Wallis test was used, at probability of 5%. There were no differences ( $P > 0.05$ ) among T1, T2 and T3 respectively, for the interval from device removal to ovulation ( $77.05 \pm 10.06$ ;  $70.81 \pm 11.58$ ;  $69.83 \pm 0.95$ h); diameter of the largest follicle on D9 ( $9.17 \pm 2.41$ ;  $11.88 \pm 2.82$ ;  $11.58 \pm 2.46$ mm); diameters of the ovulatory follicle ( $13.82 \pm 2.11$ ;  $15.95 \pm 2.40$ ;  $15.67 \pm 2.02$ mm) and the second largest follicle ( $8.07 \pm 1.54$ ;  $7.35 \pm 1.94$ ;  $7.05 \pm 1.54$ mm); follicle growth rate ( $1.40 \pm 0.07$ ;  $1.32 \pm 0.04$ ;  $1.40 \pm 0.06$  mm/day); ovulation rate (100; 100 and 90%); corpus luteum area ( $1.78 \pm 1.19$ ;  $2.44 \pm 1.20$ ;  $2.58 \pm 1.42$ cm<sup>2</sup>) and pregnancy rate (40, 24 and 36%). The use of 90UI of eCG, corresponding to 30% of the total dose used for cattle in synchronization protocols, applied in acupoint *Hou Hai* or in false acupoint intramuscular, were efficient in the estrus synchronization. Thus, it is possible to reduce the dose, providing a reduction in the cost of the protocol as well as a lower effective dose. The application of eCG 24 hours or 48 hours prior to the removal of the implant did not improve protocol efficiency and it can be carried out at the time of removal of the progesterone device, with less handling of animals.

**Keywords:** Acupoint *Hou Hai*; Ovulation synchronization; Pharmacopuncture

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
AE	Animais em estro
a.C.	Antes de Cristo
BE	Benzoato de estradiol
cm	Centímetro
CL	Corpo lúteo
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
d.C.	Depois de Cristo
D	Dia
DMF	Diâmetro do maior folículo
DSMF	Diâmetro do segundo maior folículo
DE	Duração de estro
ECC	Escore de condição corporal
EM	Estação de monta
FD	Folículo dominante
FOPA	Folículo pré-antral
GPS	Global positioning system
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
h	Horas
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
LH	Hormônio luteinizante
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IRIO	Intervalo da retirada do implante à ovulação
IIEO	Intervalo do início do estro à ovulação
IM	Intramuscular
MTC	Medicina tradicional chinesa
µg	Micrograma
mg	Miligrama
mm	Milímetro
mim	Minuto
P <sub>4</sub>	Progesterona
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandina F <sub>2α</sub>
TCF	Taxa de crescimento folicular
TG	Taxa de gestação
T	Tratamento

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Local e ângulo de inserção da agulha no acuponto *Hou Hai*, na espécie bovina. Fonte: KOMATSU *et al.* (1998). ..... 13

### **CAPÍTULO 1**

Figura 1 Local de injeção no acuponto *Hou Hai*, na espécie bovina. Fonte: Arquivo pessoal. .... 20

## LISTA DE TABELAS

### **CAPÍTULO 1**

Tabela 1 Custo em dólar (US\$) dos hormônios utilizados para sincronização de ovulação em vacas, na cidade de Feira de Santana-BA, em junho de 2015 .....	22
Tabela 2 Crescimento folicular e momento de ovulação com aplicação de subdose de gonadotrofina coriônica equina no acuponto Hou Hai de vacas de corte submetidas a protocolo de sincronização de ovulação .....	23
Tabela 3 Área de corpo lúteo e diagnóstico de gestação com aplicação de subdose de gonadotrofina coriônica equina no acuponto Hou Hai de vacas de corte submetidas a protocolo de sincronização de ovulação .....	25
Tabela 4 Custo do protocolo de sincronização de ovulação para vacas de corte, cotação em dólar (US\$).....	26

### **CAPÍTULO 2**

Tabela 1 Crescimento folicular e momento de ovulação de vacas de leite submetidas a protocolos de sincronização de ovulação utilizando diferentes momentos da aplicação da gonadotrofina coriônica equina.....	36
Tabela 2 Área de corpo lúteo e diagnóstico de gestação de vacas de leite submetidas a protocolo de sincronização de ovulação utilizando diferentes momentos de ampliação da gonadotrofina coriônica equina.....	39

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1	Dinâmica folicular ovariana em vacas .....	3
2.2	Uso de eCG em protocolos de IATF para vacas .....	6
2.3	Acupuntura.....	9
<b>CAPÍTULO 1 – APLICAÇÃO DE SUBDOSE DE GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA NO ACUPONTO <i>HOU HAI</i> EM PROTOCOLOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO PARA VACAS DE CORTE</b> .....		<b>15</b>
<b>CAPÍTULO 2 – DIFERENTES MOMENTOS DE APLICAÇÃO DE GONADOTROFINA CORIÔNICA EQUINA EM PROTOCOLO DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO PARA VACAS DE LEITE</b> .....		<b>30</b>
<b>3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>42</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de hormônios exógenos para o controle do ciclo estral é uma das biotecnologias de maior destaque na reprodução atualmente, proporcionando uma melhora na eficiência reprodutiva, na facilidade do manejo dos animais e na redução do intervalo entre partos, além de ser pré-requisito para a adoção de outras biotécnicas (MAIA e BEZERRA, 2010), a exemplo da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que vem sendo utilizada de forma crescente como uma ferramenta importante no manejo reprodutivo de fêmeas bovinas (PALHANO et al., 2012).

Dentre os hormônios exógenos utilizados, a gonadotrofina coriônica equina (eCG) destaca-se pela sua importante ação nos protocolos de IATF. O aumento da fertilidade podendo ser promovido com administração de eCG, parece estar relacionado não somente ao padrão de crescimento folicular, como também, ao desenvolvimento do corpo lúteo (CL), onde folículos de maior tamanho darão origem a CL de melhor qualidade e conseqüentemente com maior produção de progesterona (P4) (TORTORELLA et al., 2013). Contudo, a utilização da eCG nos protocolos de IATF aumentam seus custos, promovendo uma busca pela definição da menor dose efetiva.

Nesse contexto, a farmacopuntura vem sendo uma alternativa à aplicação hormonal em protocolos de sincronização. Esse método é utilizado em animais, tendo como benefícios, reduzir os efeitos secundários indesejáveis de drogas, de resíduos em produtos de origem animal e o custo do tratamento (ALTMAN, 2006; LUNA et al., 2006; FARIA, 2007). Os principais acupontos que atuam na atividade cíclica ovariana são o Bai Hui, VG2 (Wei Ken), VG1 (Hou Hai), B23, B25 e Yan Chi. O Hou Hai, situado na depressão entre a distância média da base ventral da cauda e o ânus, é um dos acupontos indicados para tratar desordens reprodutivas, além de ser empregado em protocolos de sincronização de estro em fêmeas mamíferas (KOMATSU et al., 1998; LIN et al., 2006).

Outra forma de melhorar a eficácia dos protocolos de sincronização é por meio de estudos que indentifiquem qual o melhor momento para administração da eCG. Sendo assim, estudos relatam que o uso de eCG, 24h

ou 48h antes da retirada da fonte de progesterona, melhora a fertilidade de vacas tratadas no início do pós-parto (BARUSELLI et al., 2004b, 2005).

Desta forma, avaliou-se diferentes vias e momentos de aplicação de eCG em protocolo de IATF para vacas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Dinâmica folicular ovariana em vacas

Em animais domésticos, incluindo bovinos, o potencial máximo de produção folicular é alcançado durante a vida fetal com a formação de uma reserva de folículos primordiais quiescentes. Tal reserva inicial é formada pela migração de células germinativas primordiais do epitélio do saco vitelínico até as gônadas indiferenciadas, entre o primeiro e segundo mês de vida fetal (SMITZ e CORTVRINDT, 2008). Após a chegada nas gônadas, as células germinativas continuam a se proliferar, chegando em bovinos a um máximo estimado de 2,1 milhões de células (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e tecais). De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser divididos em: folículos pré-antrais ou não cavitários e folículos antrais ou cavitários. Os folículos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda população folicular e, desta forma, armazenam a grande maioria dos oócitos presentes nos ovários de vacas. Na categoria de folículos pré-antrais são incluídos os folículos primordiais, intermediários, primários e secundários (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Em bovinos, os primeiros folículos antrais fetais aparecem por volta de 230 dias da gestação. Durante a vida reprodutiva de uma fêmea, ocorre atresia de 99% dos folículos, que dessa forma falham em ovular (BENELLI *et al.*, 2009).

A primeira ovulação, é o marco do início da vida reprodutiva da fêmea, caracterizando o estabelecimento da puberdade, com o aumento da síntese e liberação do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo, refletindo em uma maior resposta da hipófise anterior, e amplitude e frequência dos pulsos das gonadotrofinas, dando início à exibição dos ciclos estrais (MAIA e BEZERRA, 2010).

O ciclo estral em vacas apresenta uma duração média de 21 dias, variando de 18 a 24 dias, sendo dividido em fase folicular e luteínica. Os principais hormônios que caracterizam essas fases são o estradiol-17 $\beta$  (E-17 $\beta$ ) e a progesterona (P<sub>4</sub>) (MOTOLA *et al.*, 2008).

A regulação do ciclo estral se dá por meio da relação neuroendócrina, que é constituída pelo eixo compreendido por hipotálamo, hipófise, ovário e útero. No hipotálamo é sintetizado o GnRH, o qual estimula a hipófise para que esta sintetize e libere os hormônios luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH). Estes hormônios são liberados na corrente sanguínea e irão estimular o desenvolvimento folicular, a presença de um folículo dominante e a ovulação (PALMA, 2008).

Na vaca, pelo menos três ciclos (63 dias) são necessários para que um folículo pré-antrais (cerca de 0,15mm de diâmetro) atinja o tamanho pré-ovulatório (aproximadamente 14mm de diâmetro) (FORTUNE *et al.*, 1994). Em bovinos o crescimento folicular ocorre por meio de ondas foliculares, com recrutamento de folículos antrais. Ocorrem durante o ciclo estral de 1 a 4 sucessivas ondas de crescimento folicular (GINTHER *et al.*, 2003).

Na fase de recrutamento, um grupo de pequenos folículos primordiais, de tamanho entre 3 a 5mm, responsivos às gonadotrofinas são estimulados a iniciar um crescimento progressivo (BARROS e NOGUEIRA, 2001). Como resultado da ativação, os folículos iniciam crescimento e progridem pelas fases de folículo pré-antral primário e secundário e atingem o estágio de terciário, com a formação do antro folicular. Destes, alguns sofrem atresia e outros continuam a crescer produzindo moderadas quantidades de estrógeno e inibina (GINTHER *et al.*, 2003; AERTS e BOLS, 2010).

O folículo de maior tamanho, chamado de dominante, destaca-se e passa a crescer mais rápido que os demais, produzindo altas quantidades de estrógeno e inibina. Tal crescimento folicular é caracterizado pela proliferação e diferenciação das células da granulosa, aumento do volume do oócito, e a formação e proliferação das células da teca. As concentrações de FSH são reduzidas a valores muito baixos, insuficientes para manter o desenvolvimento dos folículos subordinados, mas suficientes para o crescimento do folículo dominante, estabelecendo-se, então, o fenômeno da dominância folicular (LUCY *et al.*, 1992; GINTHER *et al.*, 2003). Para a evolução desse estágio,

ocorre inicialmente a aquisição de resposta às gonadotrofinas e posteriormente a dependência ao estímulo gonadotrófico, para manter o crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório (WEBB e CAMPBELL, 2007; AERTS e BOLS, 2010).

O folículo dominante na vaca é normalmente identificado quando atinge um diâmetro a partir de 10mm. Com esse tamanho, o folículo dominante adquire receptores para LH e adquire capacidade ovulatória (SARTORI *et al.*, 2001). O pico de LH desencadeia alterações estruturais e bioquímicas que levam à ruptura do folículo pré-ovulatório, resultando na expulsão do oócito e posterior desenvolvimento do corpo lúteo no local da ovulação.

Os mecanismos de seleção são controversos, mas provavelmente o folículo selecionado apresenta mais precocemente a capacidade de responder ao estímulo provido por uma outra gonadotrofina hipofisária, o LH (DRIANCOURT, 2001; SARTORI *et al.*, 2001). A taxa de crescimento do folículo dominante é maior quanto maior for a frequência de pulsos de LH, sendo está controlada diretamente pelo GnRH (KARSCH *et al.*, 1997).

A espécie bovina é classificada como monovulatórias, apenas um folículo é selecionado dentre os recrutados para continuar a crescer e diferenciar-se em folículo pré-ovulatório, enquanto os demais têm como destino a atresia (FORTUNE, 1994; GINTHER *et al.*, 2002).

A eCG, que possui afinidade aos receptores de FSH e LH, ao se ligar aos receptores do folículo, pode promover o crescimento, maturação folicular e ovulação (BARUSELLI *et al.*, 2008), podendo também se ligar aos receptores de LH do CL e assim, promover um aumento das células luteais, que são responsáveis por cerca de 80% da síntese de  $P_4$ , conferindo-lhe maior volume e maior capacidade de produção (SOUZA *et al.*, 2009), tanto que alguns autores têm apontado o uso da eCG, como ferramenta potencial para melhorar as concentrações plasmáticas de  $P_4$  em ciclos estrais subsequentes (BARUSELLI *et al.*, 2000).

Tanto vacas de leite, quanto de corte, possuem rápido retorno do crescimento folicular pós-parto, ocorrendo dentro de 7 a 10 dias, quando em bom estado de condição corporal. O destino do folículo dominante dentro da primeira onda folicular é dependente da pulsatilidade do LH. Vacas em bom estado de condição corporal, conseguem realizar a ovulação de um folículo

dominante existente em uma das três primeiras ondas de crescimento folicular pós-parto, o que ocorre em torno de 60 dias (MURPHY *et al.*, 1990).

Para a maximização do potencial reprodutivo, especialmente de fêmeas, é importante estudar a foliculogênese a fim de se compreender os mecanismos e fatores envolvidos nesse evento, que podem influenciar diretamente na eficiência dos protocolos utilizados na sincronização da ovulação e de outras biotecnologias (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

## **2.2 Uso de eCG em protocolos de IATF para vacas**

Em bovinos, protocolos hormonais que controlam o desenvolvimento folicular e a função lútea permitem a realização da inseminação artificial (IA) em momento pré-determinado, superestimulação ovariana e sincronização de receptoras para transferência de embriões (TE), potencializando a eficiência reprodutiva (PIRES *et al.*, 2004; BURATINI, 2007). A sincronização da ovulação pode ser obtida por meio da aplicação de diferentes indutores de ovulação após o fim dos tratamentos de sincronização de estro, tais como, LH, eCG, GnRH e seus análogos, e benzoato de estradiol (BE) (PURSLEY *et al.*, 1997).

Muitos são os hormônios utilizados para realização da IATF nos rebanhos de corte e leite, dentre eles destacam-se as P<sub>4</sub> e BE na fase inicial do protocolo, com a finalidade de sincronizar a emergência da onda folicular; a remoção do dispositivo de P<sub>4</sub> e a aplicação de PGF<sub>2</sub>α na fase intermediária do protocolo, para assegurar a luteólise e fase final do protocolo, a aplicação de LH e/ou FSH e do BE, 24 horas após a remoção da P<sub>4</sub>, para sincronizar e induzir a ovulação (BO *et al.*, 2002). A ovulação também pode ser induzida com GnRH ou LH, administrados 12 horas antes da IATF (MARTINEZ *et al.*, 2002). Além disso, a eCG também pode ser administrada na fase intermediária do protocolo, para estimular o crescimento final folicular até ovulação (SOUMANO *et al.*, 1997).

A eCG é uma glicoproteína produzida nos cálices endometriais do útero da égua gestante, entre o 40º ao 130º dia de gestação (MURPHY *et al.*, 1991). Ela tem capacidade de expressar atividade de FSH e LH, contudo, a base biológica para este fenômeno ainda não está totalmente elucidada, a explicação é que a atividade dupla deve ser baseada no determinante estrutural da eCG ou dos receptores para LH e FSH em espécies que não a equina (MURPHY, 2012).

A eCG, quando administrada em vacas em anestro, cria condições para estimular o crescimento folicular e a ovulação, mesmo em vacas que tenham comprometimento na liberação endógena de gonadotrofinas. Seu uso tem apresentado efeito positivo em rebanhos com baixa taxa de ciclicidade (anestro), em animais recém paridos (período pós-parto inferior a 2 meses), em animais com condição corporal comprometida ( $\leq 2,5$  na escala de 1 a 5;) (BARUSELLI *et al.*, 2004a) e em animais que apresentam comprometimento no crescimento do folículo dominante devido à altos níveis de progesterona ao final do tratamento de sincronização da ovulação, aumentando a taxa de ovulação e a taxa de prenhez ( BARUSELLI *et al.*, 2004b; MARQUES *et al.*, 2005).

Rodrigues *et al.* (2004) trabalharam com sincronização de vacas nelores em diferentes períodos pós-parto e verificaram que apenas as vacas em anestro (ausência de CL no início da sincronização) respondem positivamente ao tratamento com eCG, com taxa de gestação de 52,2% (47/90) para animais que receberam eCG e 36,5% (27/74), para animais que não receberam eCG ( $P < 0,05$ ). Já, nos animais ciclando (presença de CL no início da sincronização), não foi verificado aumento da taxa de concepção após o tratamento com eCG em protocolos de IATF.

Contudo, Baruselli *et al.* (2004a) observaram que novilhas ciclando, tratadas com eCG na retirada do dispositivo de progesterona, apresentaram aumento significativo na taxa de ovulação (sem eCG=50,0% (10/20) vs com eCG=76,2% (16/21).

Da mesma forma, Marques *et al.* (2005) verificaram que o tratamento com eCG também aumentou a taxa de prenhez de novilhas Nelore ciclando, tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona para IATF (sem eCG=15,7% (31/197) vs com eCG=34,9% (68/195);  $P < 0,05$ ).

Após estudos utilizando a eCG, Baruselli *et al.* (2008a) observaram que o aumento da taxa de concepção em animais tratados com eCG pode estar relacionado ao incremento na taxa de ovulação, principalmente em animais em anestro e ao aumento das concentrações plasmáticas de progesterona no diestro do ciclo subsequente à IATF, que pode melhorar o desenvolvimento embrionário e a manutenção da gestação.

Sales *et al.* (2011) realizaram um estudo para avaliar o crescimento folicular, a ovulação e a fertilidade em fêmeas submetidas a um protocolo para IATF. Para tanto, vacas Nelores lactantes com bezerro ao pé e em anestro pós-parto foram divididas em três grupos (controle; FSH: 10mg no momento da remoção do dispositivo intravaginal de progestágeno e eCG: 300 UI no momento da remoção do dispositivo intravaginal de progestágeno) e submetidas às avaliações ultrassonográficas do dia zero (D0) ao dia 12 (D12). Nesse estudo, os autores observaram um aumento no diâmetro do maior folículo no momento da IATF no dia 10 (D10:  $12,9 \pm 0,3$ mm,  $12,8 \pm 0,3$ mm e  $13,9 \pm 0,2$ mm,  $P=0,006$ ) e na taxa de crescimento folicular do dia oito ao dia 10 ( $0,95 \pm 0,1$ mm/dia,  $0,90 \pm 0,1$ mm/dia e  $1,40 \pm 0,1$ mm/dia,  $P=0,006$ ) nos animais tratados com eCG, em relação aos tratados com FSH e ao grupo controle, respectivamente, sendo observada diferença entre os grupos controle e tratados com eCG para ambos os parâmetros de dinâmica folicular.

Comparando o efeito de duas doses de eCG (200 e 300UI) nos protocolos de IATF para vacas Nelore com cria ao pé em relação às não tratadas com eCG (controle), Rocha *et al.* (2007) obtiveram resultados que demonstraram maiores taxas de prenhez com o uso de eCG, sendo 22,2% (controle), 42,1% (200UI eCG) e 44,0% (300UI eCG;  $P<0,05$ ) e não foi verificada diferença ( $P>0,05$ ) entre as duas doses de eCG, sendo recomendada a menor dose efetiva.

Doroteu *et al.* (2014), após avaliarem o efeito de duas diferentes doses de eCG sobre a taxa de prenhez em vacas Nelore lactantes com 35 a 75 dias de período pós-parto, observaram que não houve diferença na taxa de prenhez para os animais que receberam 200 ou 300UI de eCG no dia oito (D8) do protocolo de sincronização para IATF (200UI 62,1% e 300UI 78,4%;  $P>0,05$ ).

Prata *et al.* (2014) avaliaram o efeito do tratamento com 400UI de eCG na fertilidade de vacas mestiças lactantes (*Bos taurus* x *Bos indicus*)

submetidas à IATF e concluíram, que o uso da eCG no dia sete (D7) do protocolo (sendo a retirada do dispositivo intravaginal de P<sub>4</sub> feita no D8), ou seja, 24h antes da retirada do dispositivo, aumentou a fertilidade de vacas mestiças leiteiras submetidas à IATF, com taxa de prenhez aos 30 dias de 36,0 e 15,0% (P<0,01).

Como alternativa para estimular o crescimento folicular, as gonadotrofinas podem ser incluídas nos protocolos de sincronização que utilizam P<sub>4</sub>, com finalidade de melhorar os níveis de LH e conseqüentemente a eficiência do protocolo (SOUZA *et al.*, 2009).

### 2.3 Acupuntura

A acupuntura consiste na estimulação que pode ser feita com agulhas, com as mãos, bastão, dentre outros, em pontos específicos do corpo, com objetivo de atingir efeito terapêutico ou homeostático (PRADIPTO, 1986). É uma técnica chinesa milenar, as opiniões sobre a sua idade e origem têm divergências. Pressupõe-se, com a descoberta de agulhas de pedras, que a acupuntura humana iniciou no final do período Neolítico (16.000 - 4.000 a.C.). A descoberta concreta de agulhas de acupuntura de ouro e de prata ocorreu no túmulo de Lieu Scheng, que morreu por volta de 200 a.C.

O termo acupuntura deriva dos radicais latinos acus e pungere, podendo ter o sentido restrito de “agulhamento dos pontos de acupuntura”, ou de forma mais ampla, o estímulo do acuponto segundo as várias técnicas disponíveis (agulhamento, alterações de temperatura, pressão e outras) (SCHOEN, 2006; MACIOCIA, 2007; XIE e PREAST, 2007).

As referências sobre acupuntura veterinária podem ser encontradas por volta do ano de 900 a.C., sendo tão antiga quanto a humana (DRAEHMPAEHL e ZOHMANN, 1994). No Sri Lanka, foi encontrado um tratado de aproximadamente 3.000 anos, que fala sobre o uso da acupuntura em elefantes indianos. Por volta de 650 a.C., nasceu Sun Yang, que foi o primeiro

acupunturista dedicado somente à Medicina Veterinária, de que se tem registro (ALTMAN, 1997).

No Brasil, um dos principais precursores da acupuntura veterinária foi o Professor Tetsuo Inada, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, em meados da década de 1980 (SCOGNAMILLO e BÓ 2006). Sua regulamentação aconteceu em 1988, por meio da Resolução Nº 5/1988, da Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação-CIPLAN, tendo suas normas fixadas para o atendimento nos serviços públicos de saúde (FARIA *et al.*, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Podem exercer a especialidade de Acupuntura, enfermeiros, médicos, fisioterapeutas, psicólogos, farmacêuticos, médicos veterinários, dentre outros, além dos trabalhadores com formação na China em Medicina Tradicional Chinesa (MTC).

Os acupontos são considerados portas de entrada e saída de energia de um organismo. São áreas onde é possível a manipulação da energia para restaurar o equilíbrio do organismo. Estão distribuídos através de canais de energia que se interligam (ALTMAN, 1997) e por onde circula um fator principal responsável por associar, regular e controlar as atividades funcionais do corpo. Existem diferentes métodos para estimulação dos acupontos, dentre eles a acupressão, realizada com os dedos na forma de massagem em pontos específicos, é a mais antiga forma de acupuntura; o agulhamento simples, utiliza a estimulação com agulhas com comprimentos variados dependendo da espécie a ser tratada e tamanho do animal, bem como a localização e profundidade do acuponto; a eletroacupuntura, este método consiste na transmissão de energia elétrica sob diferentes intensidades e frequências aos acupontos, com este método, o nível de analgesia pode ser aumentado e o efeito da acupuntura prolongado pelo aumento da estimulação do ponto tratado; implantes: vários materiais podem ser implantados no tecido próximo ao acuponto para obter um estímulo mais prolongado, o material mais utilizado nestes casos é ouro em forma de cilindros milimétricos. A técnica pode ser utilizada para tratamento de osteoartrite (especialmente displasia coxo-femural), epilepsia e doença do disco intervertebral.

A injeção de substâncias no acuponto, denominada de farmacopuntura, é uma opção interessante para acupuntura em animais, pois requer um curto

período de tratamento e poucos materiais, dentre eles o principal seria a agulha hipodérmica, podendo ser aplicado hormônios e medicações. Este método é bastante útil em animais que não toleram a permanência das agulhas por muito tempo (gatos) ou como complemento ao agulhamento (FARIA *et al.*, 2008).

Os acupontos se localizam próximos a nervos, vasos sanguíneos, tendões, periosteos e cápsulas articulares (WU, 1990), podem ser estimulados por vários agentes de estresse, tais como: agulha metálica, calor, massagem e gota de ácido. O importante é criar um sinal que será transmitido aos centros nervosos para ser decodificado, analisado, memorizado, integrado em outros sistemas e causar, conforme sua intensidade, local e natureza, uma resposta benéfica orientada e específica (RUBIN, 1983).

A inserção da agulha no ponto de acupuntura altera a carga elétrica da hipoderme gerando uma corrente com objetivo de igualar a diferença de potencial existente entre a pele e a agulha (ALTMAN, 1997).

Na filosofia da MTC, o organismo é constituído pela matéria que obedece a teoria do Yin-Yang e pelo Qi, que representa energia. A matéria é caracterizada pela estrutura orgânica do corpo, e a energia, que está agregada à matéria, promove o dinamismo da parte material/orgânica (YAMAMURA, 2001). Este fator é denominado Qi, considerado a energia vital circulante. Os manuais de acupuntura iniciam por esquemas e estudos de sinapses, neurônios, arcos reflexos, repartição metamérica dos nervos periféricos, de potenciais evocados nas diversas áreas corticais e subcorticais e de fenômenos de facilitação ou inibição interneurônios (RUBIN, 1983).

Os pontos de acupuntura são localizados através de um referência de medida, o Tsun, também denominado cun, que é descrito como uma medida individual, que determina a distância entre duas estruturas anatômicas fixas. Várias estruturas podem ser utilizadas para determinar o Tsun, uma é com base nos dedos do paciente, na largura do polegar ao nível dos ângulos da unha (uma polegada), ou no comprimento do antebraço dividindo-o em 12 partes, ou a distância entre os mamilos, dividindo-a em 8 partes (CRICENTI, 2001). Entretanto estas medidas são de difícil aplicação nos animais, usando-se para estes, em alguns casos, como para encontrar a localização do meridiano de bexiga no dorso do paciente, a medida da largura de uma costela deste mesmo animal (FARIA *et al.*, 2008).

Os estímulos provocados aos acupontos ligados à reprodução promovem alterações nos níveis plasmáticos de LH, FSH, E<sub>2</sub> e P<sub>4</sub>. Desse modo, foram criadas duas teorias para explicar os mecanismos da acupuntura na reprodução. A primeira teoria sugere que o estímulo promova a liberação e ação da endorfina no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, promovendo uma depressão temporária na secreção de LH, onde após cessar o estímulo a hipófise se torne mais reativa ao GnRH e retorna ao equilíbrio. A segunda se refere em estimular a produção e liberação de adrenalina, catecolaminas, estrogênios e fatores de crescimento, provocando efeitos diretos sobre o controle gonadal parácrino e autócrino da esteroidogênese (LIN *et al.*, 2006).

Alguns autores chineses afirmam que em muitas situações o uso de subdoses, produz um efeito longo e similar à dose convencional, com a vantagem de causar menos efeitos colaterais (WANG *et al.*, 2007). A técnica tem sido usada com sucesso, especialmente em grandes animais. Seu uso traz grandes benefícios, pois reduz a dose dos medicamentos. A utilização de hormônios, vitaminas, anti-inflamatórios e anestésicos nos acupontos têm bons resultados com doses ínfimas, além de poucos efeitos colaterais (LUNA *et al.*, 2008).

O *Hou Hai*, também conhecido como Vaso Governador 1 (VG1), *Chang Qiang* ou Mar Caudal, um dos acupontos com ação no sistema reprodutor, tem sido referido para tratar anestro, ovários císticos, corpo lúteo cístico ou persistentes, estros silenciosos e pseudociese. O acuponto *Hou Hai* está localizado na depressão situada entre a distância média da base ventral da cauda e o ânus (LIN *et al.*, 2006). Anatomicamente, o *Hou Hai* localiza-se entre o músculo coccígeo e o esfíncter anal e com a inervação do nervo retal caudal. No seu acesso a agulha deve ser inserida em posição angular em bovinos e na perpendicular em pequenos animais, com profundidade variando de três a 18cm, conforme o porte do animal (HWANG e LIMEHOUSE, 2006).

Figura 1 Local e ângulo de inserção da agulha no acuponto *Hou Hai*, na espécie bovina.

Fonte: KOMATSU *et al.* (1998).



Alguns estudos avaliaram a utilização desse acuponto, com resultados interessantes. Quick (2010) utilizou protocolos de sincronização em ovelhas com implantes intravaginais retirados no sétimo dia após a sua inserção (D7) e aplicação de eCG (Novormon®). O G1 (Dose Total) recebeu a dose de 1mL de eCG, que equivale a 200UI por via intramuscular e os demais tratamentos receberam 20UI, porém diluído de tal forma que tivesse os mesmo 1mL de volume, sendo o G2 (*Hou Hai*) e o G3 (*Bai Hui*). Obteve taxa de estro de 72,73% (G1), 36,36% (G2) e 54,55% (G3).

Souza *et al.* (2012) avaliaram o comportamento estral de cabras submetidas a protocolos de sincronização de estro, com aplicação de 30% das doses utilizadas rotineiramente de  $\text{PGF}_2\alpha$  e eCG no acuponto *Bai Hui* e concluíram que 0,0375mg de cloprostenol e 90UI de eCG aplicados nesse acuponto foram eficientes na sincronização de estro. Biscarde *et al.* (2012) avaliaram o crescimento folicular e a ovulação de cabras submetidas a protocolos de sincronização com aplicação de 30% da dose de  $\text{PGF}_2\alpha$  e eCG no acuponto *Bai Hui* e não obtiveram diferença significativa quando compararam com o protocolo tradicional para caprinos, demonstrando eficiência na ovulação e sincronização.

Relatos anteriores demonstram o quanto à aplicabilidade da acupuntura em tratamento de distúrbios reprodutivos tem sido efetiva, no entanto o acuponto *Hou Hai* ainda foi pouco explorado na reprodução animal, sobretudo no controle do ciclo estral associado a protocolos hormonais. Levando em consideração que sua localização anatômica facilita a sua abordagem na prática a campo, podendo ser considerada uma vantagem para implementação

dessa técnica após sua eficácia ser aprovado com mais estudos (LIN *et al.*, 2006).

**CAPÍTULO 1 – Aplicação de subdose de gonadotrofina coriônica equina no acuponto *hou hai* em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo para vacas de corte**

*[Application of low doses of equine chorionic gonadotropin in acupoint hou hai in fixed-time artificial insemination protocols for beef cows]*

Artigo a ser submetido ao Periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Qualis B1 na Área de Zootecnia/Recursos Pesqueiros.

Monna Lopes de Araújo<sup>1</sup>, Claudinéia Silva Mendes<sup>1</sup>, Emmanuel Emydio Gomes Pinheiro<sup>2</sup>, Maicon Pereira Lents<sup>1</sup>, Fernando Henrique Almeida Biscarde<sup>1</sup>, Carmo Emanuel Almeida Biscarde<sup>1</sup>, Rosiléia Silva Souza<sup>2</sup>, Larissa Pires Barbosa\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia -UFRB

<sup>2</sup>Universidade Federal da Bahia - UFBA

\*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

**RESUMO**

Avaliou-se a aplicação de subdose de gonadotrofina coriônica equina (eCG) no acuponto *Hou Hai* em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) para vacas de corte. Setenta vacas receberam no dia zero (D0) do protocolo, dispositivos intravaginais com progesterona e 3mg de benzoato de estradiol; no D9 foram retirados os dispositivos, aplicados 150µg de prostaglandina F<sub>2α</sub> e distribuídos os animais aleatoriamente em três tratamentos (T), sendo: T1 (n=22): 300UI de eCG (100% da dose) por via intramuscular (IM); T2 (n=23):

90UI (30% da dose) de eCG no acuponto *Hou Hai* e T3 (n=25): 90UI de eCG em falso acuponto (IM). No D10 todos os animais receberam 1mg de hormônio liberador de gonadotrofina por via IM e foi realizada a IATF, 52 horas após a retirada dos dispositivos. Para as variáveis quantitativas que apresentaram distribuição normal foi utilizada ANOVA, a 5% de probabilidade. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade. Não houve diferença para: o intervalo entre a retirada do dispositivo à ovulação (T1=72,36±13,62; T2=51,35±35,08 e T3=51,03±32,55h); diâmetro do maior folículo no D9 (T1=12,5±0,40; T2=8,5±0,59 e T3=8,7±0,57mm); diâmetros do folículo ovulatório (T1=15,8±0,33; T2=10,2±0,72 e T3=10,8±0,70mm) e do segundo maior folículo (T1=9,1±0,32; T2=6,0±0,55 e T3=5,0±0,46mm); taxa de crescimento folicular (T1=1,20±0,80; T2=0,50±0,50 e T3=0,80±0,80mm/dia); taxa de ovulação (%) (T1=100; T2=71 e T3=75%); área de corpo lúteo (T1=2,66±1,45; T2=2,34±1,35 e T3=1,96±1,75cm<sup>2</sup>) e taxa de gestação (68; 52 e 56%, para T1, T2 e T3, respectivamente). O custo do protocolo em dólar, por animal, foi de US\$ 10,67 (T1) e US\$ 8,50 (T2 e T3). A utilização de 90UI de eCG, correspondente a 30% da dose total utilizada, aplicadas no acuponto *Hou Hai* ou em falso acuponto foram eficientes na sincronização de estro, podendo-se reduzir a dose, com redução do custo do protocolo e com menor dose efetiva.

**Palavras-chave:** corpo lúteo, dinâmica folicular, farmacopuntura

## ABSTRACT

In the following work, the application of low doses of equine chorionic gonadotropin (eCG) in acupoint Hou Hai in Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI) protocols for beef cows was evaluated. On day zero of the protocol (D0) seventy cows received intravaginal progesterone devices and 3mg of estradiol benzoate. On D9 of the protocol the devices were removed, 150µg of prostaglandin F2α were applied and the animals were distributed randomly into three treatment groups (T), as follows: T1 (n=22): 300IU of eCG (100% of dose)

by intramuscular route (IM); T2 (n=23): 90UI (30% of dose) of eCG in acupoint Hou Hai and T3 (n=25): 90UI of eCG in false acupoint (IM). On D10 all animals received 1mg of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) by intramuscular route (IM) and the FTAI was carried out, 52 hours after the removal of the devices. For the quantitative variables that presented normal distribution, ANOVA was used, at probability of 5%. For the variables that did not present normal distribution, Kruskal-Wallis test was used, at probability of 5%. There was no difference to: the interval from device removal to ovulation (T1=72.36±13.62; T2=51.35±35.08 and T3=51.03±32,55h); diameter of the largest follicle on D9 (T1=12.5±0.40; T2=8.5±0.59 and T3=8.7±0,57mm); diameter of ovulatory follicle (T1=15.8±0.33; T2=10.2±0.72 and T3=10.8±0,70mm) and the second largest follicle (T1=9.1±0.32; T2=6.0±0.55 and T3=5.0±0,46mm); follicle growth rate (T1=1.20±0.80; T2=0.50±0.50 and T3=0.80±0,80mm/day); ovulation rate (%) (T1=100; T2=71 and T3=75%); corpus luteum area (T1=2.66±1.45; T2=2.34±1.35 and T3=1.96±1,75cm<sup>2</sup>) and pregnancy rate (68; 52 and 56% for T1, T2 and T3, respectively). The cost of the protocol in dollars, per animal, was USD 10.67 (T1) and USD 8.50 (T2 and T3). The use of 90UI of eCG, corresponding to 30% of the total dose used, applied in acupoint Hou Hai or in false acupoint, were efficient in estrus synchronization, enabling the reduction of the dose, also reducing the cost of the protocol and with a lower effective dose.

**Keywords:** corpus luteum, follicular dynamics, pharmacopuncture

## INTRODUÇÃO

O uso de protocolos hormonais que controlam o desenvolvimento folicular e ovulação, comumente conhecido como protocolos de IATF, tem a vantagem de realizar a inseminação sem a necessidade de detecção de estro. Os protocolos mais comuns de sincronização de ovulação para espécie bovina utilizam GnRH e estradiol (E<sub>2</sub>), em ambos os casos associados com dispositivos liberadores de P<sub>4</sub> (Bó e Baruselli, 2014).

Como alternativa para estimular o crescimento folicular, as gonadotrofinas podem ser incluídas nos protocolos de sincronização no momento da remoção da fonte exógena de P<sub>4</sub>, incluindo a eCG (Baruselli *et al.*, 2004; Souza *et al.*, 2009). A melhora na fertilidade de vacas tratadas com essa gonadotrofina pode ser explicada por três efeitos: a eCG pode aumentar o diâmetro do folículo pré-ovulatório no momento da IATF, melhorar a taxa de ovulação e aumentar as concentrações plasmáticas de progesterona durante a fase luteal subsequente (Sá Filho *et al.*, 2010a).

Na literatura há divergência sobre a melhor dose a ser utilizada da eCG em protocolos de IATF para vacas. Estudos relatam diferentes doses de eCG que variam de 300UI a 800UI de eCG (Souza *et al.*, 2009; Bryan *et al.*, 2010; Rostami *et al.*, 2011; Garcia-Ispierto *et al.*, 2012; Kenyon *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2013). No entanto, a menor dose efetiva de eCG para sincronização de IATF em vacas ainda é incerta.

Alguns protocolos hormonais associados à farmacopuntura, com o objetivo de reduzir as doses dos hormônios e por consequência o custo dos protocolos, apresentam pelo menos o mesmo nível de eficácia dos protocolos tradicionais (Matinez *et al.*, 2007; Simplício, 2008). A farmacopuntura tem sido usada na prática veterinária para promover a redução do uso indiscriminado de medicamentos, diminuir os efeitos colaterais, os resíduos nos animais de consumo e o custo dos tratamentos (Wynn *et al.*, 2001).

Komatsu *et al.* (1998) demonstram a capacidade do acuponto *Hou Hai* em induzir o estro de vacas através do estímulo de agulhamento. Quick (2010), também demonstrou a eficácia, através da farmacopuntura com hormônios neste acuponto, para a indução e sincronização do estro de ovelhas.

Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da aplicação de subdose de eCG no acuponto *Hou Hai* em protocolos de sincronização para realização de IATF em vacas.

## MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado em duas etapas experimentais aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), protocolado sob número 342015.

A primeira etapa experimental foi conduzida nos meses de outubro a novembro de 2015, compreendendo a estação da primavera, na Fazenda Boa Esperança situada na cidade de Nova Soure-Bahia, localizada a 38°29'36.9" Latitude Sul e 11°14'00" de Longitude Oeste, com altitude de 169m acima do nível do mar e clima tropical úmido.

Foram utilizadas 48 vacas nelores adultas, não lactantes, com escore de condição corporal média de  $3,62 \pm 0,5$ , segundo Nicholson e Butterworth (1986), previamente selecionadas por meio de avaliação ginecológica com ultrassonografia via transretal (Pie Medical, modelo ÀquilaVet®, transdutor linear de 6MHz). Os animais foram mantidos em regime extensivo de criação, em pasto de *Brachiaria* (*Brachiaria decumbens*), com fornecimento de água e sal mineral *ad libitum*.

Todas as vacas receberam dispositivos intravaginais com liberação lenta de progestágeno (PRIMER®, Tecnopec, Brasil) e 3mg de BE (Estrogin®, Biofarm, Brasil) no dia 0 (D0) do protocolo, no D9 foram retirados os dispositivos e os animais foram distribuídos aleatoriamente em três tratamentos (T), sendo: T1 (n=15): aplicação de 150µg de um análogo sintético de PGF<sub>2</sub>α, o d-cloprostenol (Prolise®, Arsa, Argentina) e 300UI (100% da dose) de eCG (Novormon®, Syntex, Argentina), ambos por via intramuscular (IM); T2 (n=16): aplicação de 150µg de d-cloprostenol, por via IM e 90UI (30% da dose) de eCG, aplicada no acuponto *Hou Hai* e T3 (n=17): aplicação de 150µg de d-cloprostenol e 90UI (30% da dose) de eCG, aplicados em falso acuponto (IM). No D10, todos os animais receberam 1mg de GnRH (Gestran Plus®, Argentina), por via IM e foi realizada a IATF, 52 horas após a retirada do dispositivo de P<sub>4</sub>.

As aplicações dos hormônios no acuponto *Hou Hai* foram realizadas com uso de cateter intravenoso 16G (DESCARPACK®), com diâmetro interno de 1,3mm, diâmetro externo de 1,7mm, comprimento de 45mm, com ângulo de

inserção da agulha de 45°, perpendicular ao ponto de inserção e profundidade completa do canhão do cateter (Fig. 1), segundo Hwang e Limehouse (2006). Antes das aplicações foi feita a antissepsia do local com iodopovidona (PVPI) (RIODEINE®).

Figura 2 Local de injeção no acuponto *Hou Hai*, na espécie bovina. Fonte: Arquivo pessoal.



Foram avaliados nessa etapa experimental os parâmetros de área de corpo lúteo (CL), tipos de CL (normal e cavitário) e taxa de gestação. A avaliação do CL foi realizada nove dias após a retirada do dispositivo intravaginal por meio de avaliação ultrassonográfica. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF, por meio de ultrassonografia. As imagens dos ovários e úteros foram obtidas por ultrassonografia via transretal (Pie Medical, modelo ÁquilaVet®, transdutor linear de 6,0 MHz).

A segunda etapa experimental foi realizada no Setor de Bovinocultura de Corte da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB), no campus de Cruz das Almas-Bahia, localizado a 12°39'54.9" de Latitude Sul, 39°04'36.9" de Longitude Oeste, com altitude de 195m acima do nível do mar e clima tropical úmido, no período de novembro a dezembro de 2015, durante a estação da primavera.

Foram utilizadas 22 vacas nelores adultas, não lactantes, com escore de condição corporal média de  $3,56 \pm 0,58$ , segundo Nicholson e Butterworth (1986), previamente selecionadas por meio de avaliação clínica-ginecológica com ultrassonografia via transretal (Pie Medical, modelo ÀquilaVet®, transdutor linear de 6MHz). Os animais foram mantidos em regime extensivo de criação, em pasto de Aruana (*Panicum maximum cv. Aruana*) e com fornecimento de água e sal mineral *ad libitum*.

As vacas foram distribuídas aleatoriamente em três tratamentos (T) e as aplicações hormonais foram realizadas respeitando a dose e local de aplicação conforme os tratamentos descritos na etapa anterior, sendo: T1 (n=7); T2 (n=7) e T3 (n=8).

Foram avaliados o intervalo entre a retirada do dispositivo intravaginal à ovulação (h); tamanho do maior folículo no D9 do protocolo (mm); tamanho do maior folículo na ovulação (mm); tamanho do segundo maior folículo na ovulação (mm); taxa de crescimento folicular do folículo dominante (mm/d); área de corpo lúteo (cm<sup>2</sup>); porcentagem de corpo lúteo normal (%) e corpo lúteo cavitário (%). Para isto, após a retirada do dispositivo, os ovários dos animais foram monitorados, por meio de avaliações ultrassonográficas por via transretal, a cada 24 horas, até 24h após a detecção da ovulação. As avaliações de área e tipos de CL foram realizadas dezoito dias após a retirada do dispositivo intravaginal, por meio de avaliação ultrassonográfica.

A avaliação da eficiência do protocolo de sincronização de ovulação foi feita por meio da taxa de gestação. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF, por meio de ultrassonografia.

Para determinação dos custos dos protocolos, a taxa de câmbio entre as moedas real (R\$) e o dólar americano (US\$) foi realizada conforme a cotação do dólar comercial divulgada pelo Banco Central do Brasil e calculada sobre o valor de varejo dos hormônios para a cidade de Feira de Santana-Ba (Tab. 1).

**Tabela 1 Custo em dólar (US\$) dos hormônios utilizados para sincronização de ovulação em vacas, na cidade de Feira de Santana-BA, em junho de 2015**

Hormônios	P <sub>4</sub>	BE	PGF <sub>2</sub> α	GnRH	eCG
Preço por caixa/pacote (US\$)	45,16	9,16	11,30	35,48	54,50
Preço por dose (US\$)	4,51	0,37	0,75	1,77	T1=3,27 T2 e T3=1,10

Cotação e conversão do real (R\$) para o dólar do EUA (US\$) realizado no site do Banco Central do Brasil. Valor de um dólar no mês de junho de 2015 = 3,10 reais.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC). Foi avaliado o efeito fazenda entre as duas etapas experimentais e à normalidade dos dados por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis quantitativas que apresentaram distribuição normal foi utilizada ANOVA, a 5% de probabilidade. Para as variáveis que não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade (SPSS versão 21 (1989-2012)).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observado efeito fazenda entre os dados das duas etapas experimentais, desta forma, foram avaliados conjuntamente. Não houve diferença para os parâmetros de crescimento folicular e momento de ovulação entre os tratamentos ( $P > 0,05$ ) (Tab. 2).

O valor médio encontrado para intervalo da retirada do dispositivo à ovulação foi de  $58,20 \pm 12,21$  ( $P > 0,05$ ; Tab. 2). A avaliação deste parâmetro é importante em programas de IATF, para determinar o melhor momento para realizar a IA, com recomendação de 52 horas após a retirada dos dispositivos.

**Tabela 2 Crescimento folicular e momento de ovulação com aplicação de subdose de gonadotrofina coriônica equina no acuponto Hou Hai de vacas de corte submetidas a protocolo de sincronização de ovulação**

Parâmetros	T1 (controle)	T2 ( <i>Hou Hai</i> )	T3 (Falso Acuponto)	Média Total
IRO (h) <sub>1</sub>	72,3±13,6	51,3±35,0	51,0±32,5	58,2±12,2
TMFD9 (mm) <sub>1</sub>	12,5±0,4	8,5±0,5	8,7±0,5	9,9±2,2
TMF (mm) <sub>1</sub>	15,8±0,3	10,2±0,7	10,8±0,7	12,2±3,0
TSMF (mm) <sub>1</sub>	9,1±0,3	6,0±0,5	5,0±0,4	6,7±2,1
TCF (mm/d) <sub>1</sub>	1,2±0,8	0,5±0,5	0,8±0,8	0,8±0,3
Tx Ovulação (%) <sub>2</sub>	7/7 (100%)	5/7 (71%)	6/8 (75%)	82,0±15,7

T1 (n=7), T2 (n=7), T3 (n=8), IRO=intervalo da retirada a ovulação, TMFD9=tamanho do maior folículo do dia 9 do protocolo, TMF=tamanho do maior folículo pré ovulatório, TSMF=tamanho do segundo maior folículo, TCF=taxa de crescimento folicular, Tx Ovulação= taxa de ovulação, TCF= Taxa de crescimento folicular. Não houve diferença entre os tratamentos, <sup>1</sup>ANOVA (P>0,05) e <sup>2</sup>Kruskal Wallis (P>0,05).

A média do tamanho do maior folículo no D9 foi de 9,90±2,25mm (P>0,05; Tab. 2). Esse parâmetro é importante, pois sabe-se que a capacidade ovulatória em animais *B. indicus* está relacionada ao diâmetro do folículo no momento que se inicia sua dominância, tornando-se responsivo ao pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH). Gimenes *et al.* (2008) encontraram valores de tamanho de folículo no D9 de 8,4mm, para vacas do grupo controle e 10,0mm, para vacas tratadas com LH, valores próximos aos encontrados no presente estudo. Morotti *et al.* (2013) utilizaram 300UI de eCG em protocolos de IATF, obtiveram um diâmetro do folículo no D9 de 11,7±2,0mm. Sá Filho *et al.* (2010) encontraram 11,1±0,3mm, em vacas submetidas a protocolos de IATF e Edwards *et al.* (2014) também relataram dados semelhantes em vacas *Bos taurus*, que obtiveram diâmetro folicular de 10,5±0,1mm. Demonstrando que os valores encontrados no presente trabalho corroboram com os encontrados na literatura.

O diâmetro do folículo dominante tem correlação positiva com um aumento da taxa da ovulação e conseqüentemente de gestação após IATF em fêmeas *B. indicus* (Sá Filho *et al.*, 2010). Em um estudo realizado por Gimenes *et al.* (2008), foi constatado que 33% das fêmeas *Bos indicus* ovularam com diâmetros entre 7,0 e 8,4mm e que a responsividade ao LH aumentou quando os folículos alcançaram diâmetros entre 8,5 e 10,0mm (80%) e superiores a

10,0mm (90%). Em *Bos indicus*, os diâmetros relatados para o folículo dominante foram de 13 e 14mm para duas ondas; 13,0; 10,6 e 13,2mm para três ondas (Borges *et al.*, 2004) e 10,75; 9,75; 9,0 e 13,25 para quatro ondas (Viana *et al.*, 2000). No presente trabalho observou-se que o tamanho do maior folículo por tratamento foi de  $15,8\pm 0,33$ mm (T1);  $10,2\pm 0,72$ mm (T2) e  $10,8\pm 0,70$ mm (T3) e as taxas de ovulação foram de 7/7(100%); 5/7(71%); 6/8(75%), respectivamente. Apesar dos dados não terem apresentando diferença, pode-se observar uma tendência de maior taxa de ovulação para o tratamento com maior tamanho folicular.

Não houve diferença para o tamanho do maior folículo ( $12,27\pm 3,07$ mm) e do segundo maior folículo ( $6,70\pm 2,14$ mm) no momento da ovulação, para taxa de crescimento folicular ( $0,08\pm 0,35$ mm/dia) e para taxa de ovulação (82%) ( $P>0,05$ ; Tab. 2), o que sugeri a eficácia de subdoses aplicadas no acuponto *Hou Hai* e em falso acuponto, em desencadear os processos endócrinos no eixo hipotálamo-hipófise-ovário para o crescimento folicular e ovulação.

Oliveira *et al.* (2008) também não encontraram diferenças nestes parâmetros em vacas, quando avaliou o uso da eCG ou de FSH em protocolos de IATF, com médias de  $9,63\pm 1,54$ mm para o diâmetro do maior folículo e de  $7,20\pm 1,14$ mm para o segundo maior folículo; para a taxa de crescimento do folículo ovulatório ( $0,07\pm 0,04$  mm/h) e taxa de ovulação (83,33%).

Cardoso *et al.* (2014), em trabalho com cabras, utilizaram aplicação de 30% da dose de eCG no acuponto *Hou Hai*, para sincronização de estro e ovulação e obtiveram taxa de crescimento folicular de  $2,14\pm 0,09$ mm/dia, diâmetro médio do maior folículo foi de  $7,39\pm 0,16$ mm e diâmetro médio do segundo maior folículo de  $5,83\pm 1,56$ mm, estando estes dentro dos limites para a espécie caprina. Biscarde *et al.* (2012) obteve taxa de crescimento folicular de  $0,8\pm 0,4$ mm/dia e  $1,3\pm 1,3$ mm/dia, utilizando também aplicação de subdoses hormonais no acuponto *Bai Hui* e falso acuponto, respectivamente em ovinos.

Não houve diferença para área de corpo lúteo e diagnóstico de gestação entre os tratamentos ( $P>0,05$ ; Tab. 3), com valores médios para área do corpo lúteo (CL) de  $2,32\pm 0,35$  e taxa de gestação de 58,67%.

**Tabela 3 Área de corpo lúteo e diagnóstico de gestação com aplicação de subdose de gonadotrofina coriônica equina no acuponto Hou Hai de vacas de corte submetidas a protocolo de sincronização de ovulação**

Parâmetros	T1 (Controle)	T2 ( <i>Hou Hai</i> )	T3 (Falso Acuponto)	Média Total
ACL (cm <sup>2</sup> ) <sub>1</sub>	2,66±1,45	2,34±1,35	1,96±1,75	2,32±0,35
CLN (%) <sub>2</sub>	13/22 (60%)	19/23 (82%)	10/25 (40%)	60,67±21,01
CLCV (%) <sub>2</sub>	5/22 (23%)	1/23 (4%)	7/25 (28%)	18,33±12,66
DG (%) <sub>2</sub>	15/22 (68%)	12/23 (52%)	14/25 (56%)	58,67±8,33

T1 (n=22), T2 (n=23), T3 (n=25); ACL=área do corpo lúteo, CLN=corpo lúteo normal, CLCV=corpo lúteo cavitário, DG=diagnóstico de gestação. Não houve diferença entre os tratamentos, <sup>1</sup>ANOVA (P>0,05) e <sup>2</sup>Kruskal Wallis (P>0,05). Não foi observada a presença de CL em 4 animais de T1, 3 animais do T2 e 8 animais do T3.

Gênova *et al.* (2006) estudaram a relação entre o diâmetro do folículo ovulatório, área do corpo lúteo e taxa de gestação em vacas de corte submetidas a IATF, obtiveram uma taxa de prenhez de 94,74% (18/19), folículos com diâmetro de 1,21cm e corpos lúteos com área média de 3,34cm<sup>2</sup>, para os animais Nelore-Red Angus, valores esses superiores ao do presente trabalho. Em um estudo com vacas Nelore sincronizadas para IATF, Silveira *et al.* (2012) relataram taxas de prenhez de 53%, semelhante aos encontrados nesse estudo.

Cavidades luteais podem ser observadas em corpos lúteos de animais gestantes (86%) e não-gestantes (77%) (Kastelic *et al.*, 1990). Borges *et al.* (2003) encontraram, para animais Nelore, 46,7% de cavidades luteais. Valores maiores que o encontrado no presente estudo que teve uma média entre os tratamentos do CL cavitário de 18%, comparado os de CL sem cavidade, de 60% (Tab. 3).

Morrito *et al.* (2013), utilizando protocolo convencional para IATF obtiveram taxa de gestação de 45,4% (10/22), valor inferior ao encontrado em ambos os tratamentos do presente estudo que utilizaram apenas 30% da dose de eCG (Tab. 3), obtendo 52%, para T2 e 56%, para T3.

Também utilizando 30% da dose no acuponto *Hou Hai* ou IM, porém em protocolo de sincronização de cabras, Cardoso *et al.* (2014) obtiveram 70,6% e 85,7%, respectivamente para taxa de gestação e Araujo *et al.* (2014), utilizando

o acuponto *Bay Hui* ou IM na mesma dose, obtiveram taxa de gestação de 73,6% e 75,0%, respectivamente. Valores esses superiores aos do presente trabalho quando comparados com os mesmos tratamentos, que obtiveram 52%, para o acuponto *Hou Hai* e 56%, para via IM.

O custo dos protocolos por animal apresentou os valores de US\$ 8,50, para o T2 e T3 e de US\$ 10,67, para o T1 (Tab. 4), com uma redução de 20,34% no valor do grupo 100% da dose, comparado aos grupos que usaram 30% da dose total de eCG.

**Tabela 4 Custo do protocolo de sincronização de ovulação para vacas de corte, cotação em dólar (US\$)**

Parâmetro	T1 (n=22)	T2 (n=23)	T3 (n=25)
<b>Custo/Protocolo por animal (US\$)</b>	10,67	8,50	8,50

T1=100% IM; T2=30% acuponto *Hou Hai*; T3=30% falso acuponto

A aplicação de subdoses hormonais de eCG (90UI), correspondendo à 30% da dose normalmente utilizada em protocolos de IATF para vacas de corte, aplicadas no acuponto *Hou Hai* e em falso acuponto foi eficiente em induzir o crescimento folicular e ovulação, mediante o acompanhamento do crescimento folicular, momento de ovulação, área de corpo lúteo e taxa de gestação. Podendo assim, utilizar o falso acuponto para aplicação da dose utilizada, por apresentar maior praticidade.

Sugere-se mais estudos utilizando doses ainda menores de eCG, já que os resultados encontrados mostram que as doses tradicionais usadas em vacas de corte estão superestimadas.

## REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, R.C.A.; BARBOSA, L.P.; MACHADO, W.M. et al. Aplicação hormonal no acuponto Bai Hui em protocolos de sincronização de estro em caprinos. CPNA, *Anais...* Ilheus-Ba, 2014.
- BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H.; MARQUES, M.O. et al. Efeito do tratamento com eCG na taxa de concepção de vacas Nelores com diferentes escores de condição corporal inseminadas em tempo fixo (análise retrospectiva). *Acta Sci. Vet.*, v.32, p. 228, 2004.
- BISCARDE, C. E. A.; BARBOSA, L. P.; SOUZA, D. O. de; et al. Crescimento folicular e ovulação de cabras com aplicação hormonal no acuponto Bai Hui. *In: Congresso Brasileiro de Zootecnia*, Cuiabá, Mato Grosso, *Anais...* Zootec, v.22, p 1-3, 2012.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal*, v.8:s1, p.144–150, 2014.
- BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.M. et al. Desenvolvimento luteal e concentrações plasmáticas de progesterona em vacas das raças Gir e Nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.32, n.2, p.276-283, 2003.
- BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; ROCHA JÚNIOR, V.R. Dinâmica folicular e momento da ovulação em vacas não lactantes das raças Gir e Nelore durante duas estações do ano. *Arq. Bra. Med. Vet. Zoot.*, v.56, n.3, p.346-354, 2004.
- BRYAN, M.A., BO, G.A., HEUER, C., EMSLIE, F.R. Use of equine chorionic gonadotrophin in synchronised AI of seasonal-breeding, pasture- based, anoestrous dairy cattle. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.22, p.126–131, 2010.
- CARDOSO, R.C.; BARBOSA, L.P.; ARAÚJO, R.C.S.A. et al. *Crescimento folicular e momento de ovulação com aplicação de subdoses hormonais no acuponto Hou Hai em protocolos de sincronização de estro em cabras*.2014. 74f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas.
- DIAS, E.A.R.; DE ARRUDA, R.P.; VIDESCHI, R.A. et al. O uso de ECG influencia a taxa de concepção em vacas Nelore de diferentes condições corporais submetidas ao mesmo protocolo de IATF. *Boletim de Indústria Animal*, v.70, n.3, p.215-220, 2013.
- EDWARDS, S.A.A.; ATKINSON, P.C.; SATAKE, N. et al. Ovarian dynamics in response to two modified intravaginal progesterone releasing device and oestradiol benzoate based ovulation synchronisation protocols designed for use in Brahman heifers. *Animal Reproduction Science*, v.148, p.18–25, 2014.
- GARCIA-ISPIERTO, I.; LÓPEZ-HELGUERA, I.; MARTINO, A.; LÓPEZ-GATIUS, F. Reproductive performance of anoestrous high-producing dairy cows improved by adding equine chorionic gonadotrophin to a progesterone-based oestrous synchronizing protocol. *Reprod. Domest. Anim.*, v.47, p.752–758, 2012.
- GÊNOVA, L.G.; DELBONI, M.I.; SENEDA, M.M. Relação entre o diâmetro do folículo ovulatório, área do corpo lúteo e taxa de concepção em vacas de corte de raças compostas submetidas a inseminação artificial em tempo fixo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, n.1, p.356, 2006.
- GIMENES, L.U.; SA, M.F.; CARVALHO, N.A.T. et al. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v.69, p.852–858, 2008.
- HWANG, Y.C.; LIMEHOUSE, J.B. Atlas de acupuntura canina. In: SCHOEN, A. M. *Acupuntura veterinária: da arte antiga à moderna*, São Paulo: ROCA. 2006.

KENYON, A.G.; LOPES JR, G.; MENDONC, L.G.D. et al. Ovarian responses and embryo survival in recipient lactating Holstein cows treated with equine chorionic gonadotropin. *Theriogenology*, v.77, p.400–411, 2012.

KOMATSU, S.; SAITO, S.; EGAWA, D. Research of acupuncture point (Hou Hai) in bovine on the index value of reproductive efficiency and puncture method. The Tohoku. *Jornal Veterinary Clinics*, v.21, n.1, p.01-05, 1998.

MARTINEZ, A.C.; OLIVEIRA, F.S.; CADAMURO, V.A.H. et al. Uso de baixa dose de cloprostenol sódico administrado pelo ponto *Bai Hui* de acunpuntura em ovelhas. *Archives of Veterinary Science*, v.12, 2007.

MOROTTI, F., CAMPOS, J. T., SENEDA, M. M. Fixed-time artificial insemination using injectable progesterone: ovarian follicular dynamics and pregnancy rates of Nelore cows (*Bos indicus*) with and without a corpus luteum. *Semina: Ciências Agrárias*, v.34, n.6, p.386-387, 2013.

NICHOLSON, M.J.; BUTTERWORTH, M.H. A guide to condition scoring of zebu cattle. Addis Ababa: *International Livestock for Africa*, 1986.

OLIVEIRA, F.A.; NASCIMENTO, V.A.; TORRES, C.A.A. et al. Dinâmica folicular na sincronização de ovulação associado à administração de FSH-p em vacas da raça Nelore. *Anais... 45° SBZ Lavras- MG*, 2008.

QUICK, F. S. de S. *Comparação da indução de estro pelo método convencional e aplicação de 10% da dose de prostaglandina e eCG em pontos de acunpuntura em ovelhas da raça Santa Inês*. 2010. 25f. Monografia (Especialização em acunpuntura veterinária) - Instituto Jacqueline Peker, Belo Horizonte.

ROSTAMI, B.; NIASARI-NASLA, J.I.A.; VOJGANI, M. et al. Effect of eCG on early resumption of ovarian activity in postpartum dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.128, p.100–106, 2011.

SÁ FILHO, M.F.; CRESPILO, H.; SANTOS, J.E.P. et al. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.120, p.23–30, 2010.

SÁ FILHO, M.F.; AYRES, H.; FERREIRA, R.M. et al. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. *Theriogenology*, v.73, p.651-658, 2010a.

SIMPLÍCIO, A.A. Estratégias de manejo reprodutivo como ferramenta para prolongar o período de oferta de carnes caprina e ovina no Brasil. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, v.2, n.3, p.29-39, 2008.

SILVEIRA, E. C.; BORTOLLOTTI, L. A.; MOROTTI, F.; SENEDA, M.M. Plasmatic level of progesterone and pregnancy rate in Nelore bovine synchronized with new intravaginal progesterone device (Biocowgest®). *Ver. Acad. Ciências Agrárias e Ambientais*, v.10, p.79, 2012.

SOUZA, A.H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F.A. et al. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. *Theriogenology*, v.72, p.10–21, 2009.

SOUZA, R.S.; BARBOSA, L.P.; AGUIAR, C.S. et al. Sincronização da ovulação utilizando FSH em substituição à eCG em cabras. *Arq. Bra. Med. Vet. Zoot.*, v.63, n.3, p.753-756, 2011.

TORTORELLA, D.R.; FERREIRA, R.; TONELLOTTO, S.J.; et al. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. *Theriogenology*, v.79, p.1204–1209, 2013.

WYNN, S.G.; LUNA, S.P.L.; LIU, H. et al. Global acupuncture research: previously untranslated studies. Studies from Brazil. In: SCHOEN, A. M. (Ed.). *Veterinary acupuncture: ancient art to modern medicine*. St. Louis: Mosby. p.53-7, 2001.

**CAPÍTULO 2 – Diferentes momentos de aplicação de gonadotrofina coriônica equina em protocolo de inseminação artificial em tempo fixo para vacas de leite**

*[Different times of application of equine chorionic gonadotropin in fixed-time artificial insemination protocols for dairy cows]*

Artigo a ser submetido ao Periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Qualis B1 na Área de Zootecnia/Recursos Pesqueiros.

Monna Lopes de Araújo<sup>1</sup>, Claudinéia Silva Mendes<sup>1</sup>, Emmanuel Emydio Gomes Pinheiro<sup>2</sup>, Maicon Pereira Lents<sup>1</sup>, Caline Santana da França<sup>1</sup>, Isabella de Matos Brandão Carneiro<sup>1</sup>, Carmo Emanuel Almeida Biscarde<sup>1</sup>, Larissa Pires Barbosa\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB

<sup>3</sup>Universidade Federal da Bahia - UFBA

\*e-mail: larissa@ufrb.edu.br

**RESUMO**

Avaliou-se diferentes momentos de aplicação da gonadotrofina coriônica equina (eCG) em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) para vacas de leite. Foram utilizados 76 animais que receberam no dia zero (D0) do protocolo dispositivos intravaginais de progesterona e 3mg de benzoato de estradiol. No D9 do protocolo foram retirados os dispositivos e os animais foram distribuídos em três tratamentos (T), sendo: T1 (n=25): aplicação de 150µg de um análogo sintético da PGF<sub>2</sub>α, o d-cloprostenol e 400UI de eCG

no momento da retirada dos dispositivos; T2 (n=26): 150µg de d-cloprostenol e 400UI de eCG, aplicados 48 horas antes da retirada do dispositivo e T3 (n=25): 150µg de d-cloprostenol e 400UI de eCG, aplicada 24h antes da retirada do dispositivo. No D10 do protocolo todos os animais receberam 1mg de GnRH e a IATF foi realizada 52 horas após a retirada do implante. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado, os dados com distribuição normal foram avaliados por Análise de Variância a 5% de probabilidade e os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis. Não houve diferença entre os tratamentos para os parâmetros avaliados: intervalo entre a retirada do implante à ovulação ( $72,56 \pm 3,92$ h), diâmetro do maior folículo do D9 ( $10,88 \pm 1,49$ mm), diâmetros do folículo ovulatório ( $15,15 \pm 1,16$ mm) e do segundo maior folículo ( $7,49 \pm 0,52$ mm), taxa de crescimento folicular ( $1,38 \pm 0,04$ mm/dia), taxa de ovulação ( $96,67 \pm 5,77\%$ ), intervalo entre diâmetro final menos inicial do folículo dominante ( $73,49 \pm 3,84$ h), área de corpo lúteo ( $2,27 \pm 0,43$ cm<sup>2</sup>), porcentagem de CL no ovário direito (53,00%) e esquerdo (26,33%) e taxa de gestação (33,33%). Desta forma, o momento da aplicação da eCG não influenciou positivamente a taxa de eficiência do protocolo, sendo então recomendado a utilização da eCG no momento da retirada do implante por uma questão de otimização do manejo.

**Palavras-chave:** inseminação artificial, reprodução, sincronização da ovulação

## ABSTRACT

In the following work, different times of application of equine chorionic gonadotropin (eCG) in Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI) protocols for dairy cows were evaluated. 76 animals were used. On day zero of the protocol (D0) they received intravaginal progesterone devices and 3mg of estradiol benzoate. On D9 of the protocol the devices were removed and the animals were distributed in three treatments (T), as follows: T1 (n=25): application of 150µg of a synthetic analogue of PGF<sub>2</sub>α, the d-cloprostenol and 400UI of eCG at the moment of removal of the devices; T2 (n=26): 150µg of d-cloprostenol

and 400UI of eCG, applied 48 hours before the removal of the device and T3 (n=25): 150µg of d-cloprostenol and 400UI of eCG, applied 24 hours before the device was removed. On D10 of the protocol all animals received 1mg of GnRH and the FTAI was carried out 52 hours after the removal of the implant. The completely randomized design was used, the data with normal distribution were evaluated by Analysis of Variance at probability of 5% and the nonparametric data were analyzed by Kruskal-Wallis test. There was no difference among treatments for the evaluated parameters: interval from implant removal to ovulation ( $72.56 \pm 3,92$ h), diameter of the largest follicle of D9 ( $10.88 \pm 1,49$ mm), diameters of ovulatory follicle ( $15.15 \pm 1,16$ mm) and of the second largest follicle ( $7.49 \pm 0,52$ mm), follicle growth rate ( $1.38 \pm 0,04$ mm / day), ovulation rate ( $96.67 \pm 5.77$  %), interval between final diameter minus initial diameter of dominant follicle ( $73.49 \pm 3,84$ h), corpus luteum area ( $2.27 \pm 0,43$ cm<sup>2</sup>), percentage of CL in right ovary (53.00%) and in left ovary (26.33%) and pregnancy rate (33.33%). Thus, the time of the application of eCG did not influence positively the efficiency rate of the protocol, therefore, it is recommend the use of eCG at the moment of the removal of the implant, for management optimization purposes.

**Keywords:** artificial insemination, reproduction, ovulation synchronization

## INTRODUÇÃO

Entre as biotecnologias utilizadas na reprodução animal, a inseminação artificial (IA) é uma importante ferramenta para acelerar o melhoramento genético (Vishwanath, 2003). No entanto, o principal obstáculo para a utilização da IA em bovinos é a detecção de estro, que exige tempo e mão de obra especializada. Além disso, a curta duração do comportamento estral (~11 h) e a alta incidência de estro à noite (30-50%) tornam difícil a detecção de estro, dificultando a utilização dos programas convencionais de IA (Pinheiro *et al.*, 1998).

Os estudos sobre dinâmica folicular ovariana em bovinos (Pierson *et al.*, 1988; Sirois *et al.*, 1988) possibilitou a utilização de tratamentos hormonais que controla o crescimento folicular ovariano e a sincronização da ovulação, possibilitando a utilização de inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

Marques *et al.* (2003), trabalhando com vacas mestiças *Bos taurus indicus* primíparas pós-parto, mostraram claramente que o tratamento com gonadotrofina coriônica equina (eCG) aumentou as concentrações plasmáticas de progesterona ( $P_4$ ) aos 12 dias após o término de tratamento (76% ovulação pós-IATF+eCG), sem aumentar significativamente o diâmetro do folículo ovulatório dominante e a área do corpo lúteo. Estes dados indicaram que o tratamento com eCG aumentou a produção de  $P_4$  pelo corpo lúteo (CL) e pode ser uma alternativa para melhorar o desempenho reprodutivo de vacas em anestro pós-parto, submetidas à IATF.

A eCG estimula a produção de estradiol por meio das células da granulosa e  $P_4$  pelo CL (Baruselli *et al.*, 2004). O aumento na produção de estradiol folicular induzido pela eCG parece estar ligado a um aumento na produção de RNAm para citocromo P450 e receptores de hormônio luteinizante (LH) (Soumano *et al.*, 1998). Considerando o tempo de meia-vida e a afinidade para os receptores de hormônio folículo estimulante (FSH) e LH (Murphy *et al.*, 1991), a administração de eCG dois dias antes de retirada da fonte exógena de  $P_4$  pode ser uma estratégia para aumentar o tamanho do folículo dominante no momento da ovulação em bovinos submetidos a protocolos de IATF (Tortorella *et al.*, 2013).

Tortorella *et al.* (2013) sugerem que o tamanho do folículo dominante foi maior quando a eCG é administrada um dia antes da retirada do CIDR, com uma taxa de ovulação superior à dos protocolos padrão. Este achado demonstra a possibilidade de se investigar novos protocolos com diferentes momentos de aplicação da eCG, afim de certificar qual o melhor momento trará melhor eficiência aos protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) para vacas. Por estas razões, o estudo teve como objetivo avaliar diferentes momentos de aplicação da eCG em protocolos de IATF para vacas de leite.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas duas etapas experimentais aprovadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Bahia (UFBA), protocolado sob número 342015.

A primeira etapa experimental foi conduzida no Setor de Bovinocultura de Leite da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia-UFRB, no campus de Cruz das Almas-Bahia, localizado a 12°39'54.9" de Latitude Sul, 39°04'36.9" de Longitude Oeste, com altitude de 195m acima do nível do mar, no período de junho a agosto, compreendendo o período de inverno (IBGE, 2016; INMET, 2015).

Foram selecionadas 39 vacas adultas meio sange Girolando, com escore de condição corporal de  $3,56 \pm 0,6$  segundo Edmonson *et al.*, (1989), previamente selecionadas por avaliação ginecológica com ultrassonografia (Pie Medical, modelo ÀquilaVet®, transdutor linear de 6MHz). Os animais foram mantidos em regime extensivo de criação, em pasto de Aruana (*Panicum maximum* cv. Aruana), com água e sal mineral *ad libitum*.

As vacas foram distribuídas aleatoriamente em três tratamentos (T) e as aplicações hormonais foram realizadas por via intramuscular no membro posterior. No dia zero (D0) do protocolo, todas as vacas receberam dispositivos intravaginal impregnados com progestágenos (PRIMER®, Tecnopec, Brasil) e 3mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Biofarme, Brasil). No D9 do protocolo foram retirados os dispositivos e os animais foram distribuídos nos tratamentos (T), sendo: T1 (n= 13): aplicação de 150µg de um análogo sintético da  $PGF_{2\alpha}$ , o d-cloprostenol (Prolise®, Arsa, Argentina) e 400UI de eCG (Novormon®, Syntex, Argentina) no momento da retirada do dispositivo; T2 (n=13): aplicação de 150µg de d-cloprostenol e 400UI de eCG aplicada 48horas antes da retirada do dispositivo e T3 (n=13): aplicação de 150µg de d-cloprostenol e 400UI de eCG, aplicada 24h antes da retirada do dispositivo. No D10 do protocolo todos os animais receberam 1mg de GnRH (Gestran Plus, Tecnopec®, Brasil) e a IATF foi realizada 52 horas após a retirada do implante. O sêmen utilizado na inseminação foi proveniente de banco de sêmen de

centrais de congelamento certificadas, sendo utilizada uma palheta de 0,25ml por vaca.

Após a retirada do implante, uma amostra por tratamento dos animais (T1=10; T2=10; T3=10), foram monitorados para determinação do momento da ovulação, por meio de avaliações ultrassonográficas por via transretal, a cada 24 horas, até 24h após a detecção da ovulação, para determinar o intervalo entre a retirada do implante à ovulação (h); tamanho do maior folículo do dia 9 do protocolo (mm); tamanho do folículo ovulatório (mm); tamanho do segundo maior folículo (mm); taxa de crescimento folicular (mm/d); intervalo entre o diâmetro final e o inicial folicular (h). As imagens dos ovários foram obtidas por ultrassonografia via transretal (Pie Medical, modelo ÀquilaVet®, transdutor linear de 6,0 MHz).

Avaliação do corpo lúteo (CL) foi realizada nove dias após a retirada do dispositivo intravaginal por meio de avaliação ultrassonográfica, onde os parâmetros avaliados foram; área de corpo lúteo (cm<sup>2</sup>); porcentagem de corpo lúteo no ovário direito e esquerdo (%).

A segunda etapa experimental foi realizada na Fazenda JF Reunidas, no distrito de Tanquinho-Bahia, localizado a 11°58'43" de Latitude Sul, 39°06'14 de Longitude Oeste, altitude de 248m acima do nível do mar, que apresenta clima tropical quente úmido, compreendendo os meses de julho a agosto, período de inverno (IBGE, 2015; INMET, 2015).

Foram utilizados 37 animais da raça Girolando adultas, com escore de condição corporal de  $3,45 \pm 0,31$ , segundo Edmonson *et al.*, (1989), previamente selecionadas por meio de avaliação ginecológica com ultrassonografia (Pie Medical, modelo ÀquilaVet®, transdutor linear de 6MHz). Os animais foram mantidos em regime extensivo de criação, em pasto de Aruana (*Panicum maximum* cv. Aruana), com água e sal mineral *ad libitum*.

As vacas foram distribuídas aleatoriamente em três tratamentos (T) e o protocolo hormonal foi realizado igualmente o da etapa anterior respeitando o protocolo correspondente a cada tratamento, sendo T1 (n=12); T2 (n=13); T3 (n=12). Foram avaliados nessa etapa experimental os parâmetros do corpo lúteo (CL) e taxa de gestação. A avaliação do CL foi realizada nove dias após a retirada do dispositivo intravaginal por meio de avaliação ultrassonográfica. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a IATF, por meio de

ultrassonografia. As imagens dos ovários e úteros foram obtidas por ultrassonografia via transretal (Pie Medical, modelo ÀquilaVet®, transdutor linear de 6,0 MHz).

Para ambas etapas experimentais foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) e avaliado o efeito fazenda entre os dados das duas etapas experimentais. Os dados foram inicialmente avaliados quanto à normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilk. As variáveis que apresentaram distribuição normal foram analisadas por ANOVA a 5% de probabilidade e as variáveis não paramétricas foram analisadas por meio do teste de Kruskal-Wallis (SPSS versão 21 (1989-2012)).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observado efeito fazenda entre os dados das duas etapas experimentais, desta forma, foram avaliados conjuntamente.

**Tabela 5 Crescimento folicular e momento de ovulação de vacas de leite submetidas a protocolos de sincronização de ovulação utilizando diferentes momentos da aplicação da gonadotrofina coriônica equina**

Parâmetros	T1 (controle)	T2 (48h antes)	T3 (24h antes)	Média Total
IRO (h) <sub>1</sub>	77,05±10,06	70,81±11,58	69,83±0,95	72,56±3,92
TMFD9 (mm) <sub>1</sub>	9,17±2,41	11,88±2,82	11,58±2,46	10,88±1,49
TMF (mm) <sub>1</sub>	13,82±2,11	15,95±2,40	15,67±2,02	15,15±1,16
TSMF (mm) <sub>1</sub>	8,07±1,54	7,35±1,94	7,05±1,54	7,49±0,52
TCF (mm/d) <sub>1</sub>	1,40±0,07	1,32±0,04	1,40±0,06	1,38±0,04
Taxa Ovulação (%) <sub>2</sub>	10/10 (100%)	10/10 (100%)	9/10 (90%)	96,67±5,77
IDFDI(h) <sub>1</sub>	77,47±9,76	73,18±7,27	69,81±0,92	73,49±3,84

T1 (n=10); T2 (n=10); T3 (n=10); IRO=intervalo da retirada a ovulação, TMFD9=tamanho do maior folículo do dia 9 do protocolo, TMF=tamanho do folículo ovulatório, TSMF=tamanho do segundo maior folículo, TCF=taxa de crescimento folicular, IDFDI= intervalor entre diâmetro final menos inicial. Não houve diferença entre os tratamentos por meio de <sup>1</sup>ANOVA (P>0,05) e <sup>2</sup>Kruskal Wallis (P>0,05).

Kiya *et al.* (2014), trabalhando com ovinos submetidos a protocolos de sincronização para IATF, com aplicação de eCG, 24h ou 48h antes da retirada da fonte de progesterona, também não obtiveram diferença entre seus tratamentos, com  $52,50 \pm 7,55$ h e  $51,00 \pm 6,00$ h, para intervalo da retirada da fonte de progesterona a ovulação;  $6,60 \pm 0,35$ mm e  $8,57 \pm 2,47$ mm, para tamanho do maior folículo e  $0,65 \pm 0,30$ mm/dia e  $1,25 \pm 0,63$ mm/dia, na taxa de crescimento folicular para aplicação 24 e 48h antes da remoção do dispositivo de progesterona, respectivamente.

Em contraposição, Ali (2007) observou que a antecipação da eCG resultou na redução precoce do número de folículos menores, acompanhada pelo aparecimento de folículos médios e grandes, possibilitando melhores taxas de ovulação e fecundação.

O tamanho do folículo no dia nove do protocolo, ou seja, no momento da retirada do implante foi de:  $9,17 \pm 2,41$ (T1);  $11,88 \pm 2,82$  (T2);  $11,58 \pm 2,46$  (T3) ( $P > 0,05$ ) (Tab. 1), apesar de não ter havido diferença estatística, numericamente observa-se que os tratamentos com antecipação da aplicação da eCG obtiveram valores numéricos maiores para o tamanho do folículo no D9, comparado ao grupo tratado com eCG no momento da retirada. O mecanismo pelo qual a eCG pode ser considerada eficiente nos protocolos de sincronização, pode ser justificado por um aumento da taxa de crescimento folicular, levando o folículo à categoria de folículos médios e diminuindo a ocorrência de atresia natural desses folículos, melhorando o seu crescimento (Bister *et al.*, 1999; Mandiki *et al.*, 2000).

Dentre as particularidades fisiológicas que diferenciam vacas *Bos indicus* de *Bos taurus* pode-se citar o diâmetro folicular na divergência e o diâmetro no qual o folículo atinge capacidade ovulatória, sendo que em fêmeas *Bos indicus* o diâmetro folicular é inferior (10mm), do que fêmeas *Bos taurus* (12mm) (Gimenes *et al.*, 2008). O que explica o valor médio do folículo pré-ovulatório encontrado, ser de  $15,14 \pm 1,15$ mm (Tab. 1).

O tamanho médio do segundo maior folículo foi de  $7,49 \pm 0,52$ mm e a taxa de crescimento folicular média entre os tratamentos foi de  $1,38 \pm 0,04$ mm/dia; ( $P > 0,05$ ) (Tab. 1). Ali (2007) observou que a antecipação da eCG resultou na redução precoce do número de folículos menores, acompanhada pelo aparecimento de folículos médios e grandes, possibilitando

melhores taxas de ovulação e fecundação. Mostrando a importância da utilização da eCG dentro dos protocolos de sincronização afim de melhorar sua eficiência.

Ali (2007) utilizou eCG dois dias antes da retirada da esponja em ovelhas, obteve maior taxa de ovulação ( $P < 0,05$ ) no grupo com aplicação antecipada de eCG, comparado ao controle. Divergindo do presente trabalho que não obteve diferença ( $P > 0,05$ ) (Tab. 1), para taxa de ovulação (10/10; 10/10; 9/10), para T1, T2 e T3, respectivamente, com média 96,66% entre os tratamentos. No entanto Tortorelle *et al.* (2013) trabalhando com vacas de leite, comparando a aplicação de eCG 48h antes da retirada do implante (G1), com um grupo que recebeu eCG no momento da retirada (G2) obtiveram taxa de ovulação maior para o G1 (6/7), do que para o G2 (3/6).

Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) para os valores encontrados de área de corpo lúteo e taxa de gestação entre os tratamentos (Tab. 2).

Sartori *et al.* (2002) relataram uma correlação positiva entre o CL e o volume de produção de  $P_4$  em 7 dias após a ovulação em novilhas e vacas leiteiras. No entanto, a correlação entre a  $P_4$  sérica e o tamanho do CL parece existir somente durante a formação inicial do CL (Mann, 2009). Tendo em vista este conhecimento, o protocolo de IATF descrito por Tortorelle *et al.* (2013), com aplicação da eCG 48h antes da retirada do implante de  $P_4$ , foi projetado com intuito de aumentar o tamanho do folículo pré-ovulatório e conseqüentemente o volume do CL inicial, aumentando assim as concentrações de  $P_4$  após a ovulação. Entretanto os resultados de área de CL do presente estudo não diferiram entre si, com valor médio entre os tratamentos de  $2,27 \pm 0,43 \text{cm}^2$  (Tab. 2), não corroborando com a hipótese levantada por Tortorelle *et al.* (2013).

**Tabela 6 Área de corpo lúteo e diagnóstico de gestação de vacas de leite submetidas a protocolo de sincronização de ovulação utilizando diferentes momentos de ampliação da gonadotrofina coriônica equina**

Parâmetros	T1 (Controle)	T2 (48h antes)	T3 (24h antes)	Média Total
ACL (cm <sup>2</sup> ) <sub>1</sub>	1,78±1,19	2,44±1,20	2,58±1,42	2,27±0,43
CLOD (%) <sub>2</sub>	10/22 (45%)	14/23 (60%)	12/22 (54%)	53,00±7,55
CLOE (%) <sub>2</sub>	7/22 (31%)	5/23 (21%)	6/22 (27%)	26,33±5,03
DG (%) <sub>2</sub>	10/25 (40%)	6/26(24%)	9/25 (36%)	33,33±8,33

T1 (n=25); T2 (n=26); T3 (n=25); ACL=área do corpo lúteo; CLOD=corpo no ovário direito; CLOE=corpo lúteo ovário esquerdo; DG=diagnóstico de gestação. Não houve diferença entre os tratamentos por meio de 1ANOVA (P>0,05) e <sup>2</sup>Kruskal Wallis (P>0,05). Treze animais não apresentaram CL no momento da avaliação (cinco do T1, quarto do T2, quatro do T3).

Vianna *et al.* (1999), estudando animais da raça Gir, encontraram 57,14% de incidência de CL no ovário direito, no entanto Neves *et al.* (2006), analisando ovários de vacas Nelore encontraram maior incidência do corpo lúteo no ovário esquerdo, mostrando uma diferença da frequência da incidência de CL entre as raças. Esses dados corroboram com os achados do presente trabalho que obtiveram um índice numérico de CL no ovário esquerdo maior que no ovário direito (Tab. 2), levando em consideração que os animais estudados foram meio sangue Girolando.

Não houve diferença (P>0,05) (Tab. 2) para a taxa de gestação observada no presente trabalho, obtendo valores de 40%; 24%; 36%, para T1, T2 e T3, respectivamente. Divergindo de Tortorelle *et al.* (2013), que após a administração de eCG, obteve maior a taxa de gestação no grupo com aplicação da eCG 48h antes da retirada do implante (27,27%) do que no grupo que aplicou a eCG no momento da retirada (16,0%).

A antecipação da aplicação da eCG não melhorou os índices de crescimento folicular, ovulação, o tamanho do CL formado e taxa de prenhez em vacas de leite submetidas à protocolos de sincronização de ovulação em programas de IATF, sendo então recomendado a utilização da eCG no momento da retirada do implante por uma questão de otimização do manejo.

## REFERÊNCIAS

- ALI, A. Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossime ewes. *Small Ruminant Research*, v.72, p.33 – 37, 2007.
- BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O. et al. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Anim. Reprod. Sci.*, v.82, n.3, p.479–486, 2004.
- BISTER, J.L.; NOEL, B.; PERRAD, B. et al. Control of ovarian follicles activity in the ewe. *Domest. Anim. Endocrinol.* v.17, p.315–328, 1999.
- EDMONSON, A.J.; LEAN, I.J.; WEAVER, L.D. et al. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* v.72, p.68-78, 1989.
- GIMENES, L.U.; CARVALHO, N.A.T.; SÁ FILHO, M.F. et al. Capacidade ovulatória em novilhas *Bos indicus*. *Acta Sci. Vet.*, v.33, p.209, 2008.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Pecuaria/Producao\\_da\\_Pecuaria\\_Municipal/2013/tabelas\\_pdf/ta\\_b04.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2013/tabelas_pdf/ta_b04.pdf)>. Acesso em: 9 de abril de 2016.
- INMET, Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em: <[http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede\\_estacoes\\_conv\\_graf](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/page&page=rede_estacoes_conv_graf)>. Acesso em: 02 de maio de 2016.
- KIYA, C.K.; BISCARDE, C.E.A.; SILVA, L.F.M.C. et al. Diferentes momentos de administração de eCG associada ou não à hCG em protocolo curto para IATF em ovelhas deslanadas do semiárido. *Magistra*, v.26, n.4, p.535 – 542, 2014.
- MANDIKI, S.N.; NOEL, B.; BISTER, J.L. et al. Pre-ovulatory follicular characteristics and ovulation rates in different breed crosses, carriers or non-carriers of the Booroola or Cambridge fecundity gene. *Anim. Reprod. Sci.*, v.63, p.77–88, 2000.
- MANN, G.E. Corpus luteum size and plasma progesterone concentration in cows. *Anim. Reprod. Sci.*, v.115, p.296–299, 2009.
- MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; CAMPOS FILHO, E.P.; BARUSELLI, P.S. Efeitos da administração de eCG e de Benzoato de Estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. In *Proceedings 5 Simposio Internacional de Reproducción Animal*, June, p.27-29, 2003.
- MURPHY, B.D.; MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Ver.*, v.12, p.27–44, 1991.
- NEVES, M.M.; MARQUES JÚNIOR, A.P. Proporção volumétrica dos constituintes do corpo lúteo de Nelore. *Arq. Bra. Med. Vet. Zoot.*, v.58, n.5, p.944-946, 2006.
- PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. *Theriogenology*, v.29, p.21–37, 1988.
- PINHEIRO, O.L.; BARROS, C.M.; FIGUEREDO, R.A. et al. Estrus behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v.49, p.667– 681, 1998.

SARTORI, R.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J. Dairy Sci.*, v.85, n.2, p.813–822, 2002.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrus cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biol. Reprod.*, v.39, p.308–317, 1988.

SOUMANO, K.; LUSSIER, J.G.; PRICE, C.A. Levels of messenger RNA encoding ovarian receptors for FSH and LH in cattle during superovulation with equine chorionic gonadotrophin versus FSH. *J. Endocrinol.*, v.156, p.373–378, 1998.

TORTORELLA, R.D.; FERREIRA, R.; SANTOS, J.T.; et al. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. *Theriogenology*, v.79, p.204–209, 2013.

VIANA, J. H.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, n.3, p.251-256, 1999.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. *Theriogenology*, v.59, n5, p71–84, 2003.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação de subdoses hormonais de eCG (90UI), correspondendo à 30% da dose normalmente utilizada em protocolos de IATF para vacas de corte, aplicadas no acuponto *Hou Hai* e em falso acuponto foi eficiente em sincronizar a ovulação, mediante o acompanhamento do crescimento folicular, momento de ovulação, área de corpo lúteo e taxa de gestação. Podendo assim, utilizar o falso acuponto para aplicação da dose utilizada, por apresentar maior praticidade. Sugere-se mais estudos utilizando doses ainda menores de eCG, já que os resultados encontrados mostram que as doses tradicionais usadas em vacas de corte estão superestimadas.

A antecipação da aplicação da eCG não melhorou os índices de crescimento folicular, ovulação, o tamanho do CL formado e conseqüentemente não aumentou a taxa de prenhez em vacas de leite submetidas à protocolos de sincronização de ovulação em programas de IATF, sendo então recomendado a utilização da eCG no momento da retirada do implante por uma questão de otimização do manejo.

## REFERÊNCIAS

- AERTS, J.M.J.; BOLS, P.E.J. 2010. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Pre-antral Follicle Development. **Reproduction in domestic animals** 45: 1-171-179.
- ALTMAN, S. 1997. The compendium in continuing education. Acupuncture therapy in **Small animal practice** 19: 11-1233-45.
- ALTMAN, S. 2006 Técnica de instrumentação. In: SCHOEN, A. M. 2006. Acupuntura veterinária: da arte antiga à moderna, São Paulo: **ROCA**, cap. 7, p. 91-108.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. 2001. Embryo transfer in Bos indicus cattle. **Theriogenology** 56: 483-1496.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; COSTA NETO, W.P.; GRANDINETTI, R.R.; BÓ, G.A. 2000. Ovarian superovulation in embryo recipients to improve the number of corpus luteum, progesterone concentration and pregnancy rates. **Acta Scientiae Veterinariae** 28: 218.
- BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BO, G. A. 2004a The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrous beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science** 82: 479-486.
- BARUSELLI, P.; REIS, E.; MARQUES, M.; NASSER, L.; BO, G.; 2004b: O uso Desempenho de anestrous de bovinos de corte em climas tropicais. **Animal Reproduction Science** 83: 479-486.
- BARUSELLI, P.; BO, G.; REIS, G.; MARQUES, M.; SA FILHO, M. 2005: Introduccio'n da IATF no área reproductivo de rebanhos bovinos de corte no Brasil. **VI Simposio internacional de reproduccion animal** 151-176.
- BARUSELLI, P.S.; JACOMINI, J.O.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A. 2008. Importância do emprego da eCG em protocolos de incronização para IA, TE e SOV em tempo fixo. In: **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 3, Londrina, PR. Anais: SIRAA 146-167.
- BARUSELLI, P. S.; MARTINS, C.M.; SALES, J.N.S.; FERREIRA, R.M. 2008a. Novos avanços na superovulação de bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae** 36: 433-448.
- BINELLI, M.; PORTELA, V.; MURPHY, B. 2009. Dinâmica ovariana e eficiência reprodutiva: estado da arte. In **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal** 18.
- BISCARDE, C.E.A.; BARBOSA, L.P.; SOUZA, D.O.; ROMERO, D.C.M.; FERREIRA, A.B.; ARAÚJO, R.C.S.A.; ALMEIDA, V.F.; DUTRA, P.A. 2012 Crescimento folicular e ovulação de cabras com aplicação hormonal no acuponto Bai Hui. In: **Congresso Brasileiro de Zootecnia**, 22, 2012, Cuiabá, MT. Cuiabá, MT: Associação Brasileira de Zootecnistas 3
- BO, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRIBULO, R.; MAPLETOFT, R.J. 2002. The control of follicular wave development for self appointed embryo transfer programs in cattle **Theriogenology** 57: 53–72
- BURATINI, J.J.R. 2007. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte 31: 190-196.
- CRICENTI, S.V. 2001. Acupuntura e moxabustão-localização anatômica dos pontos. São Paulo: **Manole** 11-15.

- DOROTEU, E.M.; OLIVEIRA, R.A.; PIVATO, I. 2014. Avaliação de diferentes doses de eCG nas taxas de prenhez em vacas Nelore lactantes ressincronizadas e submetidas à IATF. **Animal Reproduction Science** 11: 351.
- DRAEHMPAEHL, D.; ZOEHMANN, A. 1994. Acupuntura no cão e no gato: Princípios básicos e prática científica. São Paulo: **Roca** 01-246.
- DRIANCOURT, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology** 55: 211-39.
- FARIA, A.B. 2007. A farmacopuntura com xilazina para sedação em cães. 37f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- FARIA, A.B.; SCOGNAMILLO, S.; BÓ, M.V.R. 2008. Acupuntura veterinária: conceitos e técnicas- Revisão. **Ars Veterinaria**, J aboticabal, SP 24: 083-091.
- FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V. 2007. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte 31: 143-152.
- FORTUNE, J.E. 1994. Ovarian Follicular Growth and Development in Mammals. **Biology of Reproduction** 50: 225-232.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K. 2002. Role of low circulating FSH concentrations in controlling the interval to emergence of the subsequent follicular wave in cattle. **Reproduction** 124: 475-482.
- GINTHER, J.O.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. 2003. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science** 78: 239-257.
- HWANG, Y.C.; LIMEHOUSE, J.B. 2006. Atlas de acupuntura canina. In: SCHOEN, A. M. Acupuntura veterinária: da arte antiga à moderna, São Paulo: **ROCA** 9: 122-146.
- KARSCH, F.J.; BOWEN, J.M.; CARATY, A.; EVANS, N.P.; MOENTER, S.M. 1997. Gonadotropin-releasing hormone requirements for ovulation. **Biology of Reproduction** 56: 303-309.
- KOMATSU, S.; SAITO, S.; EGAWA, D. 1998. Research of acupuncture point (Hou Hai) in bovine on the index value of reproductive efficiency and puncture method. **The Tohoku Journal Veterinary Clinics** 21: 01-05.
- LIN, J. H.; CHAN, W.W.; W.U.L.S. 2006. Acupuntura para tratar distúrbios reprodutivos. In: SCHOEN, A. M. Acupuntura veterinária: da arte antiga à moderna, São Paulo: **ROCA** 21: 258-264.
- LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, R.L.S. 1992. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science** 70: 3615-3626.
- LUNA, S.P.; ANGELI, A.L.; FERREIRA, C.L.; LETTRY, V.; SCOGNAMILLO-SZABO, M. 2006. Comparison of pharmacopuncture, aquapuncture and acepromazine for sedation of horses. **Access published** 01-06.
- LUNA, S.P.; ANGELI, A.L.; FERREIRA, C.L.; LETTRY, V.; SCOGNAMILLO-SZABO, M. 2008. Comparison of pharmacopuncture, aquapuncture and acepromazine for sedation of horses. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** 5: 267-272.
- MACIOCIA, G. 2007. Os fundamentos da medicina chinesa: um texto abrangente para acupunturistas e fisioterapeutas. São Paulo: **Roca**, 1000p.

- MAIA, K.M.; BEZERRA, A.C.D.S. 2010. Controle do ciclo estral em caprinos: revisão. **Acta Scientiae Veterinariae** 4: 14-19.
- MARQUES, M.O.; SÁ FILHO, M.F.; GIMENES, L.U.; FIGUEIREDO, T.B.; SORIA, G.F.; BARUSELLI, P.S. 2005. Efeito do tratamento com PGF2a na inserção e/ou tratamento com eCG na remoção do dispositivo intravaginal de progesterona na taxa de concepção à inseminação artificial em tempo fixo em novilhas nelore. In: *Acta Scientiae Veterinariae*, 2005, Angra dos Reis/RJ. **Acta Scientiae Veterinariae** 1: 287-287.
- MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. 2002. The use of a progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengestrol acetate with GnRH, LH, or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. *Journal of Animal Science* 80: 1746–1751
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. 2006. Departamento de Atenção Básica. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Brasília: **Ministério da Saúde** 92.
- MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; TSAFRIRI, A. 2008. Response of follicle cells to ovulatory stimuli within the follicle and in primary culture. **Mol Cell Endocrinol** 282: 26-31.
- MURPHY, M.G.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. 1990: Pattern of follicular growth and resumption of ovarian activity in post-partum beef suckler cows. **Journal Reproduction Fertil** 90: 523–533.
- MURPHY, B.D.; MANTINUK, S.D. 1991 Equine chorionic gonadotropin. **Endocrinology Reviews** 12: 27-44.
- MURPHY, B.D. 2012. Gonadotrofina coriônica equina: uma ferramenta enigmática, mas essencial. In: **XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embiões**, Foz do Iguaçu, Paraná. Anais 123-129.
- PALHANO, H.B.; JESUS, V.L.T.; FIGUEIREDO, M.A.; BALDRIGHI, J.M.; MELLO, M.R.B. 2012. Efeito da ciclicidade de vacas nelore sobre as taxas de concepção e de prenhez após protocolos de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo. **Revista Brasileira Reprodução Animal**. 34: 63-68.
- PALMA, G. A. 2008. Biotecnología de la reproducción. 2 ed. Mar del Plata: **Pugliese y Siena** 669.
- PIRES, V.A.; ARAUJO, C.R.; MENDES, Q.C. 2004. Fatores que interferem na eficiência reprodutiva de bovinos de corte. In: SIMPÓSIO PECUÁRIA INTENSIVA NOS TRÓPICOS. Anais. Piracicaba: **Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz** 355-398.
- PRADIPTO, M. J. 1986. Zen shiatsu- equilíbrio energético e consciência do corpo. São Paulo: **Summus** p.13-41.
- PRATA, A.B.; MONTEIRO, J.R.P.L.J.; PONTES, G.C.S.; SARTORI, R. 2014. Fertilidade de vacas leiteiras mestiças submetidas à IATF com eCG incorporado ao protocolo. **Animal Reproduction Science** 11: 200.
- PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C.; STEVENSON, J.S.; OTTOBRE, J.S.; GARVERICK, H.A.; ANDERSON, L.L. 1997. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. **Journal of Dairy Science** 80: 95-130.
- QUICK, F.S.S. 2010. Comparação da Indução de Estro Pelo Método Convencional e Aplicação de 10% da Dose de Prostaglandina e eCG em Pontos de Acupuntura em Ovelhas da Raça Santa Inês. Dissertação de Mestrado pelo **Instituto Jaqueline Pecker**, Belo Horizonte MG.

- ROCHA, J.M; RABELO, M.C; SANTOS, M.H.B; MACHADO, P.P; BARTOLOMEU, C.C; NEVES, J.P; LIMA, P.F; OLIVEIRA, M.A.L. 2007 IATF em vacas Nelore: avaliação de duas doses de eCG e reutilização de implantes intravaginais de progesterona. **Revista Brasileira Reprodução Animal** 1: 40-47.
- RODRIGUES, C.A.; AYRES, H.; REIS, E.L.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. 2004. Aumento da taxa de prenhez em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com uso de eCG em diferentes períodos pós-parto. In: XVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 2004, Barra Bonita. **Acta Scientiae Veterinariae** 32: 220.
- RUBIN, M. 1983. Manual de Acupuntura Veterinária. São Paulo: **Andrei** 9-13.
- SALES, J.N.S; CREPALDI, G.A; GIROTTO, R.W.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. 2011. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation, and fertility in suckled anestrus Nelore beef cows. **Animal Reproduction Science** 124: 12-18.
- SARTORI, R; FRICKE, P.M; FERREIRA, J.C; GINTHER, O.J; WILTBANK, M.C. 2001 Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction** 65: 1403-1409.
- SCHOEN, A. 2006. Acupuntura Veterinária: da arte antiga à medicina moderna. 2. ed. São Paulo: **Roca** 91-108.
- SCOGNAMILLO-SZABÓ, M.V.R. 2006. Breve histórico da acupuntura veterinária no Brasil e sua prática no Estado de São Paulo. **MEDVEP-Revista Científica de Medicina Veterinária-Pequenos Animais e Animais de Estimação** 11: 61-65.
- SMITZ, J.; CORTVRINDT, R. 2008. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. **Reproduction. Nat Med** 14: 1178-1179.
- SOUMANO, K.; PRICE, C.A. 1997. Ovarian follicular steroidogenic acute regulatory protein, low-density lipoprotein receptor, and cytochrome P450 side-chain cleavage messenger ribonucleic acids in cattle undergoing superovulation. **Biology Reproduction** 56: 516-22.
- SOUZA, A.H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F.A.; SILVA, F.F.; ARAÚJO, R.; BÓ, G.A.; WILTBANK, M.C.; BARUSELLI, P.S. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology** 72: 10-21.
- SOUZA, D.O.; BARBOSA, L.P.; BISCARDE, C.E.A.; CARDOSO NETO, B.M.; MENDES, C.S.; SILVA, M.A.A.; ARAÚJO, M.L.; DUTRA, P.A. 2012. Comportamento estral de cabras submetidas a protocolo de sincronização via acuponto Bai Hui. In: Congresso Brasileiro de Zootecnia, 22, Cuiabá, MT: **Associação Brasileira de Zootecnistas** 3-5.
- TORTORELLA, D.R.; FERREIRA, R.; TONELLOTO, S.J.; SILVEIRA, A.O.; BARRETA, M.H.; OLIVEIRA, J.F.; BAYARD, G.A.P.; PEREIRA, N.J. 2013. The effect of equine chorionic gonadotropin on follicular size, luteal volume, circulating progesterone concentrations, and pregnancy rates in anestrous beef cows treated with a novel fixed-time artificial insemination protocol. **Theriogenology** 79: 1204-1209.
- WANG, X.L.; ZHANG, T.F.; ZHANG, H.X.; MAO, H.R.; HUANG, G.F. 2007. Therapeutic effects of acupoint injection at cervical Jiaji points and effects on ET and CGRP in the patient of ischemic stroke. **Article in Chinese. Zhongguo Zhen Jiu** 27: 93-5.
- WU, D.Z. 1990. **Acupuncture and neurophysiology**. Clinical Neurology and Neurosurgery 92: 13-25.
- XIE, H.; PREAST, V. 2007. Xie's **Veterinary Acupuncture**. Oxford: Blackwell Publishing 376.

YAMAMURA, Y. 2001. Acupuntura Tradicional: A Arte de Inserir. São Paulo: **Roca**.

WEBB, R.; CAMPBELL, B.K. 2007. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. **Soc Reprod Fertil Suppl** 64: 141-163.