

EDUARDO SOUTO DE CASTRO CASTRICINI

**DETERMINAÇÃO DA DOSE MÍNIMA DE LH SUÍNO NA SINCRONIZAÇÃO DA
OVULAÇÃO E EFEITO DO NÚMERO DE INSEMINAÇÕES ARTIFICIAIS EM
TEMPO FIXO NA TAXA DE FERTILIZAÇÃO E VIABILIDADE EMBRIONÁRIA
EM PORCAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Reprodução Animal

Área de Concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Henrique Cabral Viana

**São Paulo
2006**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

E. J. C.
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
22/6/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1722
FMVZ

Castricini, Eduardo Souto de Castro
Determinação da dose mínima de LH suíno na sincronização da ovulação e efeito do número de inseminações artificiais em tempo fixo na taxa de fertilização e viabilidade embrionária em porcas / Eduardo Souto de Castro Castricini. – São Paulo: E. S. C. Castricini, 2006.
53 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique Cabral Viana

1. Sincronização. 2. Ovulação. 3. Inseminação. 5. Desmame.
5. Hormônio Lutinizante. I. Título.




UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Determinação da dose mínima de LH suíno para a sincronização da ovulação e do efeito do número de inseminações em tempo fixo sobre a taxa de fecundação e a viabilidade embrionária em porcas", Protocolo nº449/2004, utilizando 80 suínos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Henrique Cabral Viana, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Determination of the minimal dose of porcine LH for synchronization of ovulation and of the effect of the number of fixed time inseminations on fertilization rate and embryo viability in sows", protocol number 449/2004, utilizing 80 porcine, under the responsibility of Prof. Dr. Carlos Henrique Cabral Viana, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 27 de julho de 2004


Prof.ª Dr.ª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Castricini, Eduardo Souto de Castro

Título: Determinação da dose mínima de LH suíno na sincronização da ovulação e efeito do número de inseminações artificiais em tempo fixo na taxa de fertilização e viabilidade embrionária em porcas

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais Jorge e Sylvia pelo apoio amoroso, confiança, dedicação, companheirismo e principalmente pelos ensinamentos e educação no crescimento humano.

**Ao meu orientador
Prof. Dr. Carlos Henrique Cabral Viana
pela atenciosidade, compreensão, espírito docente e oportunidades oferecidas.**

AGRADECIMENTOS

Aos amigos André Furugem César de Andrade, Manoel de Sá Filho, Lindsay Uno Gimenes, Huenderson Ayres, Claudiney de Melo Martins pela oportunidade da construção de projetos e serviços que vieram a complementar essa caminhada.

Ao Andrezinho, Ubatuba, Alemão, Claudinha, Simone, Juliana pelo companheirismo e momentos agradáveis de convivência no departamento.

Aos Professores: Dr. Rubens Paes de Arruda, Dr. Ed Hoffman Madureira, Dr. Mário Binelli, Dr. Paulo Henrique Mazza Rodrigues e Dr. Pietro Sampaio Baruselli pelas oportunidades por eles oferecidas, pelos encorajamentos, pelo espírito docente tudo vertendo para o engrandecimento de minha formação profissional .

Ao Sr. Cornélio Van Han pela dedicação, espírito profissional e participação fundamental neste trabalho, ressaltando a oportunidade dada para a realização do experimento em sua propriedade.

Ao Sr. Paulo Viola que me permitiu acesso irrestrito a sua propriedade, cedendo as suas instalações bem como acompanhar os animais inseridos no processo objetivando as coletas de material necessário ao estudo e desenvolvimento deste experimento.

Aos funcionários das Granjas CVH: Sr. Valter, D. Nelci, Daiane, Sr. Antônio, Osvaldo, Sr. César, Sr. Donizete, Marilene entre outros pela dedicação, compreensão, amizade e hospitalidade dispensados durante o experimento se tornando em grandes amigadas.

Aos Drs. Renato e Isabel, da Tecnopec, a Dra. Kristina do Laboratório Bioniche, ao Dr. Andres da Nutricell, todos viabilizando recursos técnicos- científicos, suporte financeiro bem como transmitindo confiança que resultaram no bom andamento do experimento.

A todos aqueles que direta ou indiretamente, contribuíram para a conclusão desta obra.

RESUMO

CASTRICINI, E. S. C. **Determinação da dose mínima de LH suíno na sincronização da ovulação e efeito do número de inseminações artificiais em tempo fixo na taxa de fertilização e viabilidade embrionária em porcas.** [Determination of the minimum porcine LH dose on synchronization of ovulation and effect of number of fixed time AI on fertilization rate and embryo viability in sows]. 2006. 53 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O objetivo deste trabalho foi determinar a eficiência do LH suíno, em dosagens reduzidas em relação à dose tradicional de 5,0mg, no processo de sincronização da ovulação em fêmeas cíclicas. Foram tratadas 115 fêmeas das raças Landrace e Large White, com ordem de parto variando de 1 a 6 e escore corporal acima de 2 dentro de uma escala de 1-5, com variação de meio ponto. A detecção do cio foi realizada duas vezes ao dia, no início da manhã e no final da tarde, através do reflexo positivo de tolerância ao macho. As fêmeas foram divididas aleatoriamente em três tratamentos, com 600UI de eCG ao desmame e 2,5 (T1), 1,25 (T2) e 0,625mg (T3) de LH, 56 horas após a injeção de eCG. O grupo controle não recebeu a administração de LH. A ocorrência da ovulação foi determinada pela ultra-sonografia trans-retal. Os dados foram reavaliados de acordo com o número de inseminações em 1 e 2 inseminações. As fêmeas foram abatidas 96 horas após a ovulação, com a finalidade de proceder com a contagem do número de corpos lúteos e a colheita de embriões. O intervalo entre a aplicação do LH e a ocorrência da ovulação (IA-OV), nos três tratamentos foi de $41,0 \pm 5,9$, $56,0 \pm 17,0$, $58,2 \pm 18,8$ respectivamente e $62,9 \pm 14,8$ para o grupo controle. A melhor sincronização da ovulação ($p < 0,05$, teste de Bartlett), ocorreu no T1, o qual corresponde a dose de LH de 2,5mg. Os resultados quanto ao número de inseminações, taxa de fertilização e viabilidade embrionária, não diferiram estatisticamente entre os tratamentos, porém, quando o intervalo (IA-

OV) foi maior que 24 horas, a taxa de fecundação e viabilidade embrionária sofreram uma diminuição em comparação com os intervalos menores do que 24 horas ($p < 0,05$). Os protocolos hormonais não influenciaram quanto ao número de cistos ovarianos ($p < 0,05$, teste de Tukey). Conclui-se que a utilização da dose de LH de 2,5mg sincroniza a ovulação e pode ser aplicada em programas de IATF e que a realização de 1 inseminação artificial até 24 horas antes da ovulação em tempo fixo não deprecia a taxa de fecundação e o número de embriões viáveis.

Palavras-chave: Sincronização. Ovulação. Inseminação. Desmame. Hormônio Luteinizante.

ABSTRACT

CASTRICINI, E. S. C. **Determination of the minimum porcine LH dose on synchronization of ovulation and effect of number of fixed time AI on fertilization rate and embryo viability in sows.** [Determinação da dose mínima de LH suíno na sincronização da ovulação e efeito do número de inseminações artificiais em tempo fixo na taxa de fertilização e viabilidade embrionária em porcas]. 2006. 53 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

This work had as purpose the determination of the efficiency of the LH swine, in reduced dosage against the traditional 5,0mg dose, in the process of synchronization of the ovulation in cyclical females. There were treated 115 females of Landrace and Large White races, with average parity number varying from 1 to 6 and corporal sustain above 2 among 1 to 5 scale, with variation of half point. The detection of the heat was accomplished twice a day, in the beginning of the morning and at the end of the afternoon, through the positive reflex of tolerance to the male. The females were randomly divided in three treatments, with 600UI of eCG by the weaning and 2,5 (T1), 1,25 (T2) and 0,625mg (T3) of LH, 56 hours after the eCG injection. The control group didn't receive the LH administration. The occurrence of the ovulation was determined by the trans-rectal ultrasonography. The data were revalued according to the number of inseminations in 1 and 2 inseminations. The females were slaughtered 96 hours after the ovulation, with the purpose of proceeding with the counting of the number of corpora lutea and the recovered embryos. The interval between the LH application and the occurrence of the ovulation (IA-OV), in the three treatments was of $41,0 \pm 5,9$, $56,0 \pm 17,0$, $58,2 \pm 18,8$ respectively and $62,9 \pm 14,8$ for the control group. The best ovulation synchronization ($p < 0,05$, test of Bartlett) happened in T1, which corresponds to the LH 2,5mg dose. The results concerning the number of inseminations, fertilization rate and embryonic viability, didn't differ statistically among

the treatments, however, when the interval (IA-OV) was over 24 hours, the fecundation rate and embryonic viability decreased if compared with the intervals shorter than 24 hours ($p < 0,05$). The hormonal protocols didn't cause influence as to the ovarian cysts number ($p < 0,05$, test of Tukey). It's conclusive that the use of the LH 2,5mg dose synchronizes the ovulation and it can be applied in IATF programs, and that accomplishment of 1 artificial insemination up to 24 hours before the ovulation in fixed time doesn't depreciate the fecundation rate and the number of viable embryos.

Key words: Synchronization. Ovulation. Insemination. Wean. Luteinizing Hormon.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Média, desvio padrão e variação do intervalo desmame-cio (IDC), duração do cio (DC), intervalo entre aplicação do LH e a ovulação (LH-OV), número de corpos lúteos (NCL) e número de cistos (NC) de acordo com os tratamentos 35
- Tabela 2 – Média, desvio padrão (DP) do tempo em horas do intervalo cio-ovulação (Cio-ov), e os valores quanto a duração do cio (DC).....36
- Tabela 3 - Média, desvio padrão e variação na taxa de recuperação (TR), taxa de fertilização (TF) e taxa de viabilidade embrionária (EV), de acordo com os tratamentos38
- Tabela 4 - Média, desvio padrão e variação na taxa de fertilização (TF) e taxa de viabilidade embrionária (VE), de acordo com o intervalo inseminação ovulação (IA-OV).....39

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática da metodologia de sincronização da ovulação e inseminação em tempo fixo29
- Figura 2 - Esquema cronológico dos exames ultra-sonográficos para o diagnóstico da ovulação 31
- Figura 3 - Período em horas entre a aplicação do LH e a ocorrência da ovulação (média \pm erro padrão) em fêmeas submetidas ao esquema de sincronização da ovulação, duração do cio (DC) e intervalo entre a inseminação e a ovulação (IA-OV), de acordo com os tempos comparativos entre T0 (controle), T1,T2 e T3.....35
- Figura 4 - Valores médios dos intervalos entre a ocorrência do cio e a ovulação (Cio-Ov) e da porcentagem da duração de cio em que a ovulação ocorreu (co/dc) 37
- Figura 5 - Os valores médios, desvios padrão, variação das características número de corpos lúteos (barras), número de cistos (linha), dividido nos 4 tratamentos 37
- Figura 6 - Valores médios das taxas de recuperação (TR) fecundação (TF) e de viabilidade embrionária (TVE) de acordo com os tratamentos 1, 2, 3 e o controle (0)..... 38
- Figura 7 - Relação entre o intervalo inseminação-ovulação e a taxa de fecundação 40
- Figura 8 - Relação entre o intervalo inseminação-ovulação e a taxa de viabilidade embrionária40

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Sincronização da ovulação e inseminação em tempo fixo	17
2.2	Efeitos quanto ao momento da inseminação	19
2.3	Efeito do número de doses inseminantes nas taxas de fecundação com relação à dose do hormônio luteinizante	22
3	OBJETIVOS	25
4	MATERIAL E MÉTODO	26
4.1	Local e animais	26
4.2	Detecção de cio	26
4.3	Tratamentos	27
4.4	Detecção da ovulação	29
4.5	Avaliação dos embriões	31
4.6	Análise estatística	32
5	RESULTADOS	34
5.1	Sincronização da ovulação	34
5.1.1	Relação entre Cio-ov e DC	36
5.2	Número de inseminações	38
5.3	Intervalo inseminação-ovulação	39
6	DISCUSSÃO	41
7	CONCLUSÕES	48
	REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A suinocultura tem se destacado mundialmente pela massiva utilização de tecnologia em função da necessidade de se produzir maior quantidade de carne com mais qualidade a um menor custo. Neste contexto, novos programas tecnológicos têm sido implantados nos sistemas de produção animal, acompanhando os constantes e dinâmicos avanços da produtividade face à exigência do aumento da produção de alimentos para atender o mercado consumidor. No campo da reprodução suína, várias são as áreas que interferem direta ou indiretamente na qualificação da produtividade, destacando-se a técnica de inseminação artificial, cuja adoção, dentro do processo produtivo, torna-se indispensável, pois, oferece melhorias genéticas ao rebanho, otimiza os talentos humanos, maximiza o uso de instalações, além de propiciar benefícios sanitários.

Para eficácia no processo, é necessário que a inseminação seja realizada num momento pré-determinado, que permita a presença de espermatozóides viáveis em quantidade suficiente para a fertilização dos oócitos.

No entanto, a elevada variabilidade na duração do estro (24 a 108 horas, constatada por VIANA, 1998) e no intervalo entre o início do estro e a ovulação (16 e 96 horas segundo WEITZE et al., 1994), dificulta a determinação de um esquema eficiente para a inseminação artificial, uma vez que o momento ideal para inseminar guarda estreita relação com a ovulação e, também, pelo fato dos programas atuais de inseminação se basearem no intervalo médio de ocorrência da ovulação para sua

realização, o que pode resultar em inseminações tardias ou precoces em relação à ovulação (NISSEN et al., 1997; SOEDE et al., 1995a; TERQUI et al., 2000).

Procurando minimizar essa variabilidade, efetivos métodos para sincronizar o estro em rebanhos suínos têm sido desenvolvidos, incluindo práticas de manejo com a exposição de marrãs e porcas ao macho e o agrupamento de fêmeas após a desmama (KEMP et al., 2001) e também, utilização de gonadotrofinas para sincronização de estros e indução da ovulação, na adoção de esquemas de inseminação artificial em tempo fixo (CANDINI et al., 1999; CANDINI et al., 2001; DAY, 2000; WÄHNER; HÜHN, 1996).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Sincronização da ovulação e inseminação em tempo fixo

Muitos autores têm procurado parâmetros fisiológicos, que se relacionem com o momento da ovulação, e técnicas para o seu controle.

O pico de LH tem se mostrado o melhor parâmetro endocrinológico para a determinação do momento da ovulação, uma vez que, os experimentos que relacionam os níveis desse hormônio com a ovulação apontam que esta ocorre aproximadamente 40 horas após o pico de LH, com intervalos médios de 42 ± 5 horas segundo Helmond et al. (1986) e de 44 ± 3 horas segundo Soede et al. (1994).

A administração exógena de gonadotrofina coriônica humana (hCG), a qual possui a ação luteinizante, tem sido utilizada na sincronização da ovulação. De acordo com os dados de Hunter (1967), a ovulação ocorreu entre 40 a 42 horas após a injeção de 500 UI de hCG em marrãs no dia 19 ou 20 do ciclo estral.

A técnica de indução do cio com gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), a qual estimula o crescimento folicular e posterior sincronização da ovulação pela utilização de hCG, contribui para a realização de experimentos com inseminação em tempo fixo, para a determinação do intervalo ideal entre a inseminação e a ovulação (DZIUK, 1970). Além disso, contribuiu como técnica para facilitar o manejo reprodutivo em granjas que utilizam a IA, pois dispensa o diagnóstico de

cio (HÜHN et al., 1996) e ainda para a diminuição do intervalo desmame-cio (ESTIENNE et al., 1998).

O LH suíno também apresentou bons resultados na sincronização da ovulação, sendo que o intervalo entre aplicação de LH e a ovulação foi de $37,3 \pm 3,7$ (32 a 40) horas (CANDINI et al., 1999). A utilização de LH suíno para a sincronização da ovulação em um programa de inseminação em tempo fixo, possibilitou a redução de 3 para 2 doses de sêmen por fêmea sem redução nos resultados de taxa de parição e tamanho de leitegada (CANDINI et al., 2001). No entanto o protocolo desenvolvido por estes autores, o qual se caracteriza pela utilização de 600 UI de eCG, 24 horas após o desmame, e 5mg de LH suíno, 72 horas após a aplicação de eCG, não é economicamente viável (VIANA, 2001).

Segundo Viana (2001), quanto menor o intervalo entre as aplicações de eCG e da droga luteinizante (hCG, GnRH ou LH), melhor é a sincronização da ovulação, pois a chance de ocorrência do pico endógeno de LH antes da injeção da droga luteinizante diminui. Nos protocolos tradicionais, o intervalo entre as aplicações é de 72 horas, o qual resulta em intervalo médio entre a aplicação da droga luteinizante e a ovulação de, aproximadamente, 40 horas com um desvio padrão de, aproximadamente, 6 horas (CANDINI et al., 2001; HUNTER, 1967; HÜHN et al., 1996; VIANA, 2001). No entanto, esta variação pode ser diminuída para $\pm 3,7$ horas, quando o intervalo entre aplicações foi de 56 horas (CANDINI et al., 1999) ou para uma hora, quando o intervalo entre o desmame e a aplicação da droga luteinizante (hCG) foi de 76 horas (NISSEN et al., 1995).

A menor variação quanto ao intervalo entre a aplicação de eCG e a droga luteinizante de 56 horas pode ser explicada pelo fato de que há correlação positiva com relação ao diâmetro folicular, número de células da granulosa ($r^2 =$

0,78, $p < 0,001$) e concentração folicular de estradiol ($r^2 = 0,83$, $p < 0,001$), sendo o folículo neste momento considerado pré-ovulatório, estando em torno de 6 mm (GRANT et al., 1989), sugerindo assim a obtenção de uma maior sincronização da ovulação quando o hormônio luteinizante é administrado antes do início do cio pelo fato da maturação folicular ser induzida pela droga (NISSEN et al., 2000).

A diminuição constante do 17β estradiol 11 horas após a injeção de hCG reflete a inibição da esteroidogênese em folículos pré-ovulatórios na espécie suína. Diferentemente do que ocorre no ciclo natural onde a secreção de LH inicia-se antes que o estrógeno circulante chegue à concentração máxima ou comece a diminuir, sugerindo que o pico de LH pré-ovulatório origina-se 4 horas após o 17β estradiol alcançar sua maior concentração sanguínea (ZIECIK, 1987).

Candini et al. (2001), mesmo utilizando o LH suíno 72 horas após o eCG constatou que a duração do estro foi de $41,3 \pm 9,77$ horas em comparação com o grupo controle onde o estro natural durou $60,1 \pm 10,22$ horas. Então segundo Candini et al. (2004) a estimulação do estro com eCG após o desmame, complementada pela aplicação do hCG, GnRH ou do LH purificado, tem o objetivo de controlar ou mimetizar a liberação pré-ovulatória de LH, possibilitando a predição do momento da ovulação e possibilitando a IA em tempo fixo, estabelecidos para atingir o período de maior fecundação.

2.2 Efeitos quanto ao momento da inseminação

Segundo Hunter (1977), a fertilização normal requer a entrada de um único espermatozóide no citoplasma do ovócito, provocando a extrusão do

segundo corpúsculo polar, seguido pelo desenvolvimento do pró-núcleo masculino e feminino, com a migração e formação do fuso, e a primeira divisão mitótica. Uma barreira para a penetração de espermatozóides acessórios através da região interna da zona pelúcida é estabelecida em seguida, mas os espermatozóides acessórios penetram as regiões exteriores da zona em oócitos suínos fertilizados.

A penetração de um espermatozóide após o envelhecimento do oócito pode gerar a desorganização dos microtúbulos do fuso meiótico, levando à seqüela de retenção do segundo corpúsculo polar, a anomalias cromossômicas e possivelmente a formação de triploides (DE BOMSEL-HELMREICH¹, 1961 apud HUNTER, 1977; MCFEELY², 1967 apud HUNTER, 1977); sendo assim, todas estas anormalidades predispõem a uma morte embrionária precoce.

Na inseminação em suínos, os espermatozóides são depositados na cérvix/útero e transportados para um reservatório natural na junção útero-tubária (HUNTER, 1984), assim a viabilidade deles pode ser mantida por estarem além do alcance de neutrófilos, que entram no lúmen uterino após a inseminação (ROOZEBOOM et al., 1998), mas não no lúmen da junção útero-tubária e a porção distal do istmo, que separa o local da fertilização em relação ao útero e sofre influência pelo evento da ovulação, onde a mudança hormonal altera a motilidade do batimento ciliar local, tendo o batimento ciliar antes da ovulação o papel de favorecer o encontro dos gametas masculino e feminino na junção ampola-istmo e após a ovulação o batimento ciliar converte em direção ao útero (MBURU et al., 1996).

¹ DE BOMSEL-HELMREICH; Proc. 4º International Congress Animal Reproduction, Animal Reproduction .v 3, p. 578. 1961.

² MCFEELY, R.A.; Journal Reproduction Fertility, v 13, p.579. 1967.

Kaeoket (2002) também constatou este evento em seu estudo sobre a influência da inseminação pré e pós ovulatória e a distribuição de espermatozoides no oviduto afirmando que há uma mudança da motilidade do oviduto e do batimento ciliar quando a I.A. tardia é executada, devido ao mais baixo nível plasmático de estradiol 17β e um nível mais alto de progesterona observado quando comparado com a I.A. executada antes da ovulação. Portanto, segundo Soede et al. (1995a,b), o intervalo inseminação ovulação influencia a taxa de fertilização e o número de espermatozoides acessórios nos limites da zona pelúcida. Para isso foi demonstrado também que o tempo ótimo de inseminação está dentro de 24 horas antes da ovulação (NISSEN, 1997; SOEDE, 1995a); onde a porcentagem de embriões normais foi significativamente superior comparado com a porcentagem quando a inseminação ocorreu antes ou depois deste período. Sendo assim, quando a inseminação aconteceu entre 0-24 horas antes à ovulação, oócitos não fertilizados representaram menos que 10% do número de embriões e oócitos, considerando que a inseminação realizada com mais de 24 horas antes, ou após a ovulação, resultaram em mais de 25% de oócitos não fertilizados (SOEDE et al., 1995a).

Terqui et al. (2000), obtiveram resultados que apoiaram a hipótese de que, até mesmo quando são executadas várias inseminações, o intervalo de tempo entre a IA e a ovulação ainda afeta o tamanho de leitegada. Além disso, quando as inseminações eram realizadas o mais próximas da ovulação, o resultado do tamanho de leitegada abaixo de 12 leitões foi menor.

Contudo, a inseminação pós ovulatória resulta em uma taxa de parto e tamanho de leitegadas mais baixas (NISSEN, 1997; ROOZEBOOM, 1997).

Bertani et al. (1997), compararam a utilização de sêmen a fresco (3×10^9 espermatozoides em 100ml) ou congelado (5×10^9 espermatozoides em 80ml), associada a um protocolo de sincronização da ovulação com 400UI de eCG e 200UI de hCG subcutâneo, seguido de 500UI de hCG subcutâneo 72 horas após. A ovulação foi prevista para ocorrer 42 horas após a segunda injeção (hCG), sendo então realizada uma inseminação 6 horas antes e 6 horas após a ovulação, com a utilização de sêmen congelado e a fresco em um delineamento fatorial 2x2. Os resultados encontrados mostraram que o método de preservação do sêmen não influenciou a taxa de viabilidade embrionária total ($p=0,269$). Não houve interação significativa entre o tempo da IA e o método de processamento do sêmen ($p=0,187$). A inseminação pós-ovulatória reduziu a viabilidade embrionária ($p=0,041$), independente do método de processamento do sêmen.

2.3 Efeito do número de doses inseminantes nas taxas de fecundação com relação à dose do hormônio luteinizante

Todos os experimentos (CANDINI et al., 1999; CANDINI et al., 2001; VIANA, 2001) que utilizaram o LH suíno como droga luteinizante em protocolos de sincronização da ovulação mostraram sua eficiência na indução e sincronização da ovulação, na dose de 5mg (dose clássica), independentemente do peso vivo das fêmeas tratadas. Gama et al. (2003) mediram a sincronização da ovulação utilizando várias doses de LH (1,25; 2,5; e 5,0mg) em marrãs e

mostraram que é possível obter uma boa sincronização da ovulação mesmo quando se utiliza um quarto da dose clássica.

A viabilidade do espermatozóide no trato genital da porca é de, no mínimo 24 horas, tanto de acordo com as taxas de fecundação e viabilidade embrionária (NISSEN et al., 1997; SOEDE et al., 1995a; STEVERINK et al., 1997; UEMOTO et al., 1999; VIANA, 2001), quanto com a taxa de parição e com o tamanho de leitegada (NISSEN et al., 1997; VIANA, 2001). Por tanto, se a sincronização da ovulação com LH limita a ocorrência da ovulação a até 44,5 horas (CANDINI et al., 1999), a utilização de apenas uma IA seria suficiente. Experimentos que avaliaram o efeito do número de inseminações sobre os parâmetros reprodutivos mostraram que a utilização de apenas uma dose inseminante promoveu a redução na taxa de parição (CANDINI et al., 2001) e no tamanho de leitegada (VIANA, 2001). Soede et al. (1995b) avaliaram o efeito de 1 ou 2 IAs sobre a taxa de fecundação e não encontraram diferenças significativas. No entanto, no grupo com 2 IAs; a segunda foi realizada sempre após a ovulação; ou seja, fora do período considerado ideal para a realização da IA e, talvez por esse motivo, nenhum efeito tenha sido constatado.

Wähner et al. (1996), preconizaram o protocolo “tradicional” de 750-800 UI de eCG e 5mg de LH 72 horas após o eCG, entretanto Candini et al. (1999), averiguou a utilização de uma IA em tempo fixo utilizando o protocolo de 600UI de eCG na desmama, no qual, comparou uma única IA 24 horas e o tratamento 2 com a IA dupla 24 e 32 horas após o indutor de ovulação. A taxa de parição neste caso foi significativamente reduzida ($p=0,0095$) quando comparado com o tratamento 2 e o grupo controle, sem indução hormonal e 3 IAs após a detecção do estro, sugerindo um possível efeito de doses inseminantes.

Cassar et al. (2005) compararam 5 protocolos de sincronização da ovulação, onde o primeiro tratamento compreendia a administração de 600 UI de eCG ao desmame e duas inseminações com intervalos de 12 horas no D5 pós-desmame. O segundo utilizando 600 UI de eCG no desmame e 5mg de LH, 80 horas mais tarde, seguido de duas inseminações 36 e 44 horas após o LH. O terceiro sem a administração de eCG e 5mg de LH 80 horas pós-desmame, seguido de duas inseminações 36 e 44 horas após o LH. O quarto tratamento, sem nenhuma indução hormonal sendo as porcas inseminadas no D5 pós-desmame com um intervalo de 12 horas. O quinto tratamento refere-se ao segundo protocolo apresentado, sendo alterado para apenas uma inseminação, 36 horas após o LH, obtendo assim taxas de prenhez de 73,8%, 87,0%, 82,5%, 72,3% e 89,2% respectivamente, sendo que, os tratamentos 2 e 5 que utilizaram o eCG e o LH são estatisticamente iguais, mas diferiram dos outros tratamentos ($p < 0,01$). Isto indica que a administração do LH teve um papel importante na indução da ovulação, considerando o momento da aplicação e a dosagem hormonal em protocolos utilizando a combinação de eCG e LH.

Gama et al. (2005) utilizou o protocolo de 600 UI de eCG ao desmame e 5,0mg de LH 72 horas após, compondo o (T1), seguindo como descrito anteriormente por Candini et al. (2001), objetivando a partir disto testar a eficiência do LH suíno em doses menores de 2,5mg (T2) e 1,25mg (T3) dentro do mesmo protocolo. Os resultados quanto ao intervalo LH-ovulação foram respectivamente $37,17 \pm 4,07h$; $38,26 \pm 2,84h$ e $36,25 \pm 5,69$ horas, não sendo detectada diferença estatística entre os tratamentos ($p < 0,05$), porém o (T2) utilizando 2,5mg de LH apresentou a menor dispersão quanto ao intervalo LH-ovulação ($p < 0,05$).

3 OBJETIVOS

- Testar a eficiência do LH suíno, nas doses de 0,625mg, 1,25mg e 2,5mg, na indução e sincronização ovulação;
- Testar o efeito da utilização de 1 ou 2 doses de sêmen em tempo fixo sobre as taxas de fecundação e viabilidade embrionária;
- Verificar a influência do intervalo inseminação-ovulação sobre as taxas de fecundação e viabilidade embrionária;
- Verificar a influência da indução da ovulação sobre as variáveis, intervalo desmame-cio, duração do cio, número de corpos lúteos e número de cistos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Local e animais

O trabalho foi realizado em uma granja de ciclo completo, com produção de suínos para abate, localizada no município de Holambra – SP. Os animais são oriundos das raças Landrace e Large White. As fêmeas utilizadas, em sua maioria Dalland, (n= 115) da linhagem C40, possuindo ordem de parto variando entre 1^o e 6^o partos, sendo estas alojadas durante a lactação, no setor de maternidade, com ração de lactação e água *ad libitum*, lá permanecendo por um período médio de 21 dias. Após o desmame as fêmeas foram levadas para instalações de gestação, sendo confinadas em gaiolas individuais. A condição corporal das fêmeas foi medida ao desmame, classificando-as de 1 a 5, com variações de meio ponto. Apenas fêmeas a partir de 2 fizeram parte do experimento, a fim de evitar influências nutricionais.

4.2 Detecção de cio

A observação foi realizada nos horários de 08:00 e 17:00 horas. A ocorrência de cio foi definida pelo teste de tolerância positivo na presença do macho, com ou sem apresentação prévia de edema e hiperemia de vulva ou comportamento característico pré-cio. O macho foi conduzido através do corredor entre as fileiras das gaiolas, de modo que permanecesse exatamente

em frente à fêmea que estivesse em teste para o reflexo de tolerância, desencadeada também pela pressão lombar realizada pelo técnico.

O início do cio foi definido como a primeira demonstração do reflexo de imobilização menos 4 horas. O fim do cio foi definido como a última vez que a porca demonstrou o reflexo de imobilização mais 4 horas.

4.3 Tratamentos

As fêmeas foram divididas em quatro grupos: controle e tratamentos 1, 2 e 3. No dia do desmame (D0) as fêmeas foram tratadas por via intramuscular com 600 UI de eCG (Novormon[®]) e 56 horas após a injeção de LH (Lutropin[®]), sendo este aplicado nas doses de 2,5mg (T1), 1,25mg (T2) e 0,625mg (T3). O grupo controle não recebia a aplicação de LH.

As doses de LH eram preparadas seguindo o procedimento: as fêmeas foram distribuídas entre os tratamentos de forma aleatória, sendo então preparadas as seringas (3ml), identificadas conforme os tratamentos, 1 (0,5ml), 2 (0,25ml) e 3 (0,125ml), com uma fita adesiva. Em seguida utilizando uma seringa de insulina (1ml) dosava-se o LH sendo o restante da seringa preenchida com água de Mili-K. Esse conteúdo era repassado para a seringa de 3ml que também era preenchida com água de Mili-K, deixando em seu interior uma pequena porção com ar. A aplicação foi feita com agulha 40 X 12 para obter a musculatura profunda, sendo aplicada na base da orelha.

As fêmeas foram submetidas a outros dois tratamentos, ou seja, uma ou duas inseminações, distribuídas, uniformemente entre os tratamentos e o grupo controle. As fêmeas que recebiam duas doses eram inseminadas 24 e 36 horas após a aplicação do LH enquanto que as fêmeas que receberam uma dose eram inseminadas 30 horas após (Figura 1). As fêmeas do grupo controle eram inseminadas 24 horas após o horário das tratadas obedecendo ao mesmo padrão de uma ou duas doses.

As fêmeas foram inseminadas com sêmen homeospermico de quatro reprodutores com fertilidade conhecida, oriundos da própria granja. Durante o cumprimento do protocolo tentou-se em sua maioria inseminar as fêmeas que recebiam duas doses com o sêmen do mesmo reprodutor, porém não se pode ter isto como padrão. A dose inseminante foi de $3,5 \times 10^9$ espermatozoides.

O intervalo inseminação-ovulação foi considerado como sendo a última inseminação antes da ovulação.

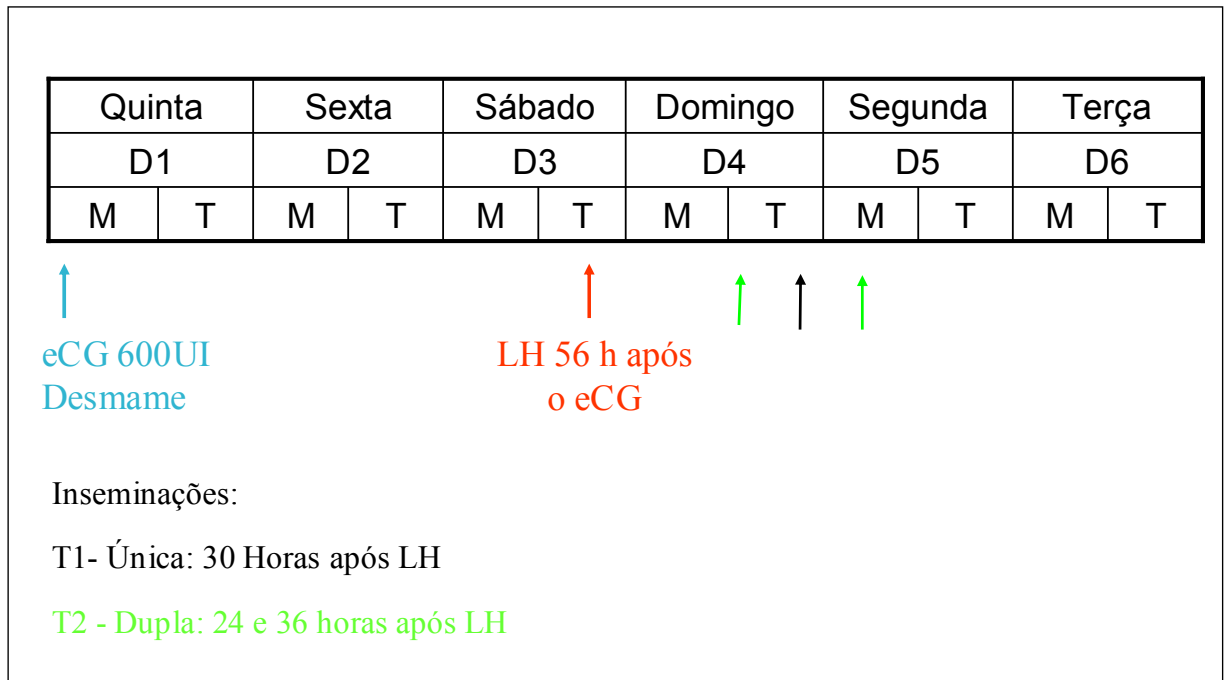


FIGURA 1: Representação esquemática da metodologia de sincronização da ovulação e inseminação em tempo fixo.

4.4 Detecção da ovulação

Foi utilizada a técnica de ultra-sonografia por via trans-retal com o aparelho Tringa (Pie Medical®), equipado com um transdutor setorial 5,0 MHz. No momento do exame, a superfície de contato do transdutor era coberta com gel (carboximetilcelulose), para garantir a propagação adequada do som. Foi efetuada também a limpeza do reto manualmente antes do exame, além da lubrificação do braço com o mesmo composto, estando este devidamente enluvado. O transdutor foi introduzido aproximadamente 30cm no reto e

posicionado 45° no sentido dorso-ventral em relação ao eixo caudo-cranial da fêmea, promovendo a varredura dos ovários.

A partir do desmame até a ovulação, foram realizados exames para determinar a dinâmica folicular (Figura 2). No dia da aplicação do eCG ou dia do desmame (D0), mediu-se o diâmetro de um total de 2 a 3 folículos, incluindo ovários direito e esquerdo. Também foi realizado o exame no dia da aplicação do LH com um espaçamento de 24 horas, seguindo com intervalos de 8 horas aproximadamente, até que a ovulação ocorresse. O momento da ovulação (MO) foi definido como: o período de tempo médio entre os exames quando da ocorrência da ovulação. O diagnóstico da ovulação foi determinado quando, ao exame ultra-sonográfico, nenhum folículo foi encontrado ou quando o número de folículos foi menor que no exame anterior.

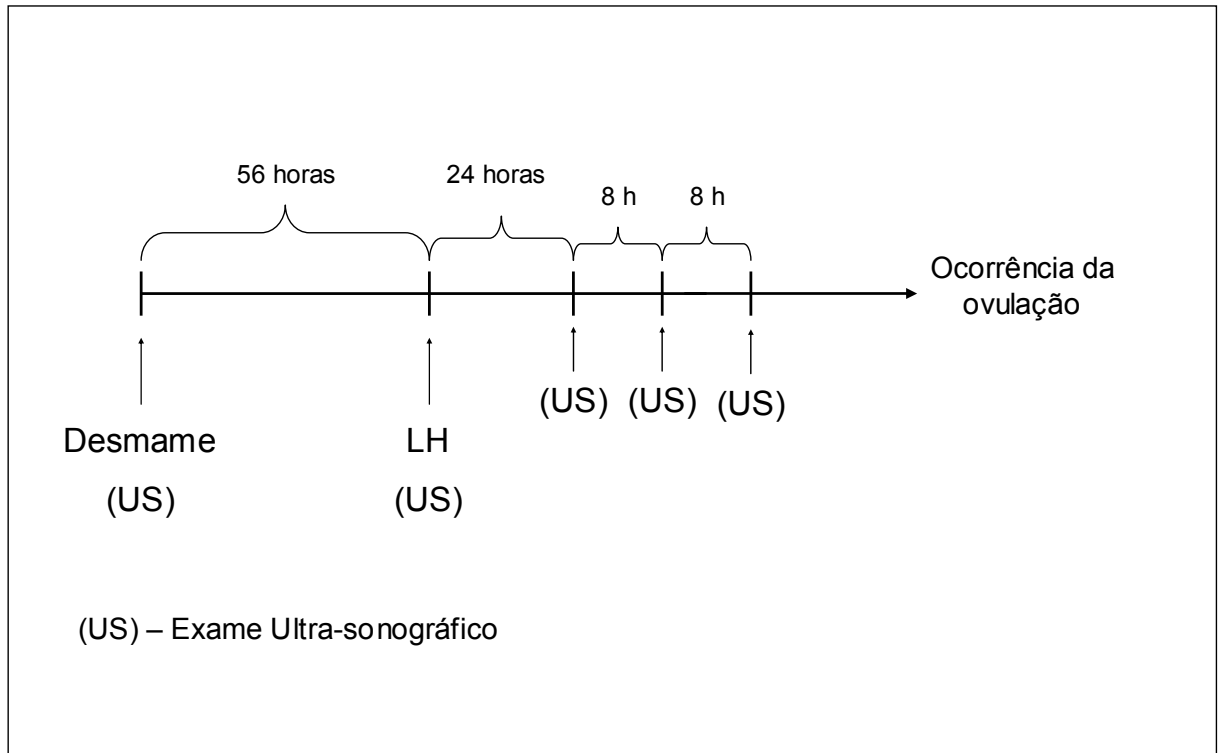


FIGURA 2: Esquema cronológico dos exames ultra-sonográficos para o diagnóstico da ovulação.

4.5 Avaliação dos embriões

As fêmeas foram abatidas 96 horas após a ocorrência da ovulação e os genitais foram coletados após o atordoamento, com os animais ainda em decúbito, para evitar o refluxo de urina para dentro do útero. O número de corpos lúteos (NCL) foi contado em ambos os ovários. Cada oviduto foi lavado com 10ml de solução salina fosfato tamponada (PBS), do infundíbulo em direção ao útero. Posteriormente, os ovidutos foram separados do útero e cada corno uterino foi

lavado duas vezes, sendo que na primeira lavagem, utilizou-se 20ml e na segunda 30ml de PBS, em duas placas separadas para coletar os embriões e oócitos. A taxa de recuperação (TR) foi determinada pelo número total de embriões e oócitos coletados (ET) em relação ao número de corpos lúteos (STEVERINK et al., 1997). A avaliação dos embriões foi realizada por estereomicroscopia, em aumento de 40x e baseada, primeiramente, na presença e uniformidade do espaço perivitelíneo com células e blastômeros uniformemente distribuídos, nos estágios de desenvolvimento correspondente ao tempo entre ovulação e a colheita (HUNTER, 1974), embriões que não obedeceram aos critérios de avaliação, foram classificados como degenerados. A taxa de fecundação (TF) foi calculada dividindo-se o número de embriões (degenerados e viáveis) pelo número total de embriões mais oócitos; e a taxa de viabilidade embrionária (TVE), dividindo-se o número de embriões com desenvolvimento normal pelo número total de embriões mais oócitos.

4.6 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o programa SAS (1999) e foram apresentados como a média \pm desvio padrão e a variação (mínimo-máximo).

Todas as variáveis foram submetidas ao teste de normalidade dos resíduos para verificar se estas obedeciam à distribuição normal.

As variáveis, intervalo desmame-cio, número de corpos lúteos, taxa de recuperação e número de estruturas totais, obedeceram à distribuição normal e

foram analisadas pelo processo ONEWAY de acordo com o fator intervalo inseminação-ovulação, dividido em 4 classes (T1, T2, T3 e T4); e o número de inseminações, dividido em duas classes (AI1 e AI2); e o intervalo ovulação-inseminação IA-OV (IA-OV1, IA-OV2 e IA-OV3).

As variáveis, duração de cio (DC), taxa de fecundação (TF), taxa de viabilidade embrionária (TVE) e embriões viáveis (EV) não obedeceram à distribuição normal e foram analisados pelo procedimento não paramétrico NPAR1WAY de acordo com os fatores intervalo inseminação-ovulação dividido em 4 classes (T1, T2, T3 e T4); e o número de inseminações, dividido em duas classes (AI1 e AI2); e o intervalo ovulação-inseminação IA-OV (IA-OV1, IA-OV2 e IA-OV3).

5 RESULTADOS

5.1 Sincronização da ovulação

A dose única efetiva encontrada para sincronizar a ovulação acompanhou um padrão semelhante aos experimentos que usaram o LH na dose de 2,5mg. Não houve diferença estatística nos resultados das sincronizações usando 1,25mg ou 0,625mg quando comparado com o grupo controle. A ovulação ocorreu em média $51,7 \pm 13,9$ horas após a administração do LH entre os tratamentos. Os valores médios: desvio padrão, variação das características intervalo desmame-cio (IDC), duração do cio (DC), intervalo entre a aplicação do LH e a ovulação (LH-OV), número de corpos lúteos (NCL), número de cistos (NC), de acordo com 4 tratamentos; são mostrados na tabela 1. Apesar da redução no LH-OV, não houve diferença estatística de IDC, DC (Tabela 1).

O intervalo entre a inseminação e a ovulação (IA-OV) que permaneceu dentro do ideal ocorreu no T1 com 8 horas antes ao evento da ovulação como demonstrado na figura 3.

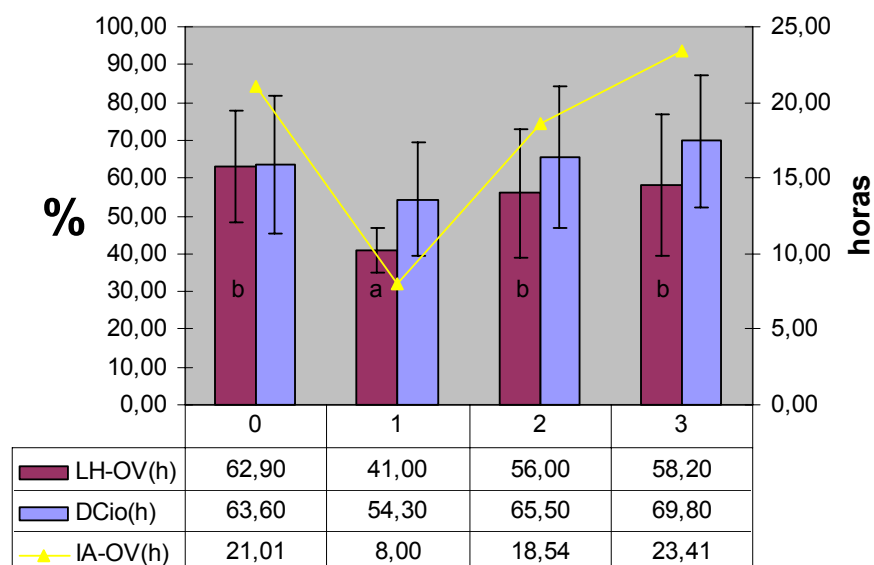
Tabela 1 - Média, desvio padrão e variação do intervalo desmame-cio (IDC), duração do cio (DC), intervalo entre aplicação do LH e a ovulação (LH-OV), número de corpos lúteos (NCL) e número de cistos (NC) de acordo com os tratamentos.

VARIÁVEL	TRATAMENTOS			
	T1	T2	T3	T4 (C)
IDC (horas)	76,6±12,8 (45-96)	79,3±21,2 (22-136)	76,0±18,7 (20-116)	84,4±16,6 (56-129)
DC (horas)	54,3± 15,1 (32-91)	65,5±18,5 (32-102)	69,8±17,4 (32- 96)	63,6±18,3 (32-98)
LH-OV (horas)	41,0 ^b ±5,9 ^d (35-60)	56,0 ^a ±17,0 ^c (30-110)	58,2 ^a ±18,8 ^c (30-120)	62,9 ^a ± 14,8 ^c (38-100)
NCL	24,7±4,05 (18-35)	23,2±4,8 (15-33)	25,3±4,6 (17-32)	23,0±2,9 (20-31)
NC	1,2±1,4 (0-5)	1,1±1,5 (0-5)	0,5±1,5 (0-6)	0,6±1,2 (0-5)

Valores na mesma linha com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0.05$).

^{a, b} Médias diferentes, teste de Tukey;

^{c, d} Variáveis diferentes, teste de Bartlett.



*(barras com letras diferentes, dentro do mesmo tempo diferem entre si, $P < 0,05$).

^{a, b} Médias diferentes, teste de Tukey;

Figura 3 - Período em horas entre a aplicação do LH e a ocorrência da ovulação (média ± erro padrão) em fêmeas submetidas ao esquema de sincronização da ovulação, duração do cio (DC) e intervalo entre a inseminação e a ovulação (IA-OV), de acordo com os tempos comparativos entre T0 (controle), T1, T2 e T3

5.1.1 Relação entre Cio-ov e DC

O intervalo cio-ovulação e duração de cio apresentaram um padrão crescente entre os grupos tratados com a administração do LH indicando sua dose efetiva para o processo de sincronização da ovulação (Tabela 2).

Tabela 2 - Média, desvio padrão (DP) do tempo em horas do intervalo cio-ovulação (Cio-ov), e os valores quanto a duração do cio (DC)

VARIÁVEL	TRATAMENTOS			
	T1	T2	T3	T4 (C)
CIO-OV (horas)	19,22±8,78	27,92±13,10	39,04±12,26	36,21±10,35
DC (%)	33,23±14,1	42,50±18,37	53,1±13,70	51,55±11,61

A porcentagem de duração do cio dentro de uma escala de (0-100), mostra que nos tratamentos 1, 2 e 3, houve um aumento no período de permanência no cio. Porém, quanto menor o intervalo Cio-ov, menor a duração do cio (Figura 4), mostrando que conforme a efetividade da dose de LH e considerando que a maioria das fêmeas recebeu a injeção do hormônio luteinizante antes do início do cio, fica mais fácil de visualizar a diferença entre os grupos. Embora a administração do hormônio luteinizante tenha sido realizada antes do início do cio, isto não representou um aumento no número de cistos (Figura 5).

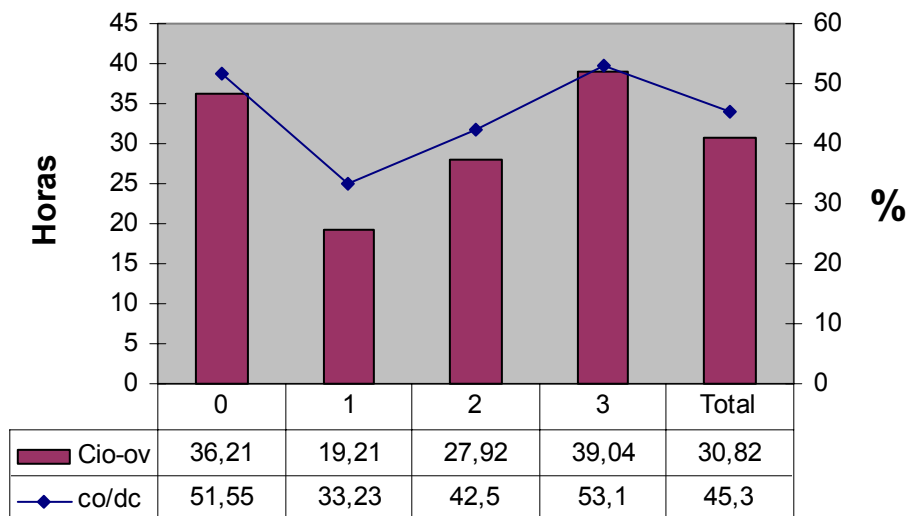


Figura 4 - Valores médios dos intervalos entre a ocorrência do cio e a ovulação (Cio-Ov) e da porcentagem da duração de cio em que a ovulação ocorreu (co/dc)

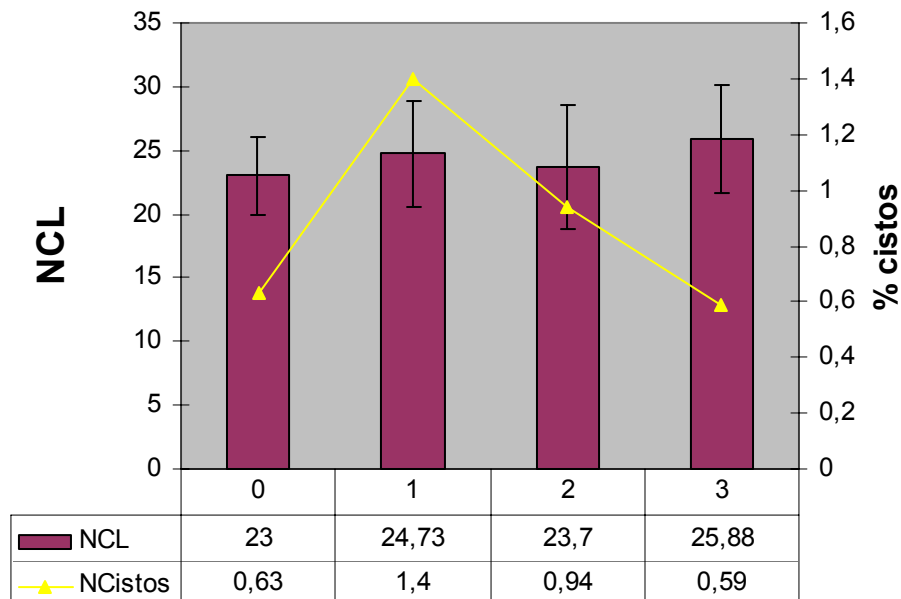


Figura 5 - Os valores médios, desvios padrão, variação das características número de corpos lúteos (barras), número de cistos (linha), dividido nos 4 tratamentos. (Médias não diferem entre si, teste de Tukey)

As taxas de recuperação (TR), fertilização e viabilidade embrionária de acordo com tratamentos e o grupo controle (0) estão representadas percentualmente na figura 6.

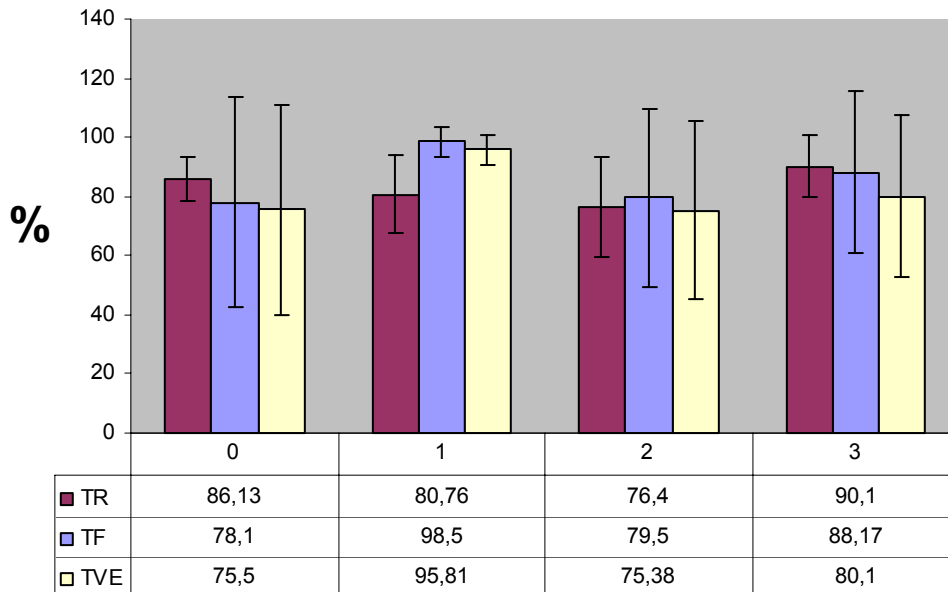


Figura 6 - Valores médios das taxas de recuperação (TR) fecundação (TF) e de viabilidade embrionária (TVE) de acordo com os tratamentos 1, 2, 3 e o controle (0)

5.2 Número de inseminações

A execução de 1 ou 2 inseminações não influenciou os resultados de TF e VE (Tabela 3) porém foram fortemente influenciados pelo intervalo inseminação-ovulação (IA-OV Tabela 4). Avaliando os resultados de TR, a TR média ($83,1 \pm 13,9$; 33,3 a 100) foi satisfatória.

Tabela 3 - Média, desvio padrão e variação na taxa de recuperação (TR), taxa de fertilização (TF) e taxa de viabilidade embrionária (EV), de acordo com os tratamentos

VARIÁVEIS	TRATAMENTOS	
	1 IA	2 IA
N	29	32
TR (%)	82,9±13,5 (47-100)	83,3±14,2 (33-100)
TF (%)	81,5±32,1 (0-100)	84,5±27,1 (0-100)
VE (%)	75,2±32,3 (0-100)	82,6±27,7 (0-100)

5.3 Intervalo inseminação-ovulação

Os valores médios, desvio padrão das taxas de fertilização e de viabilidade embrionária de acordo com o intervalo inseminação-ovulação, distribuídos em três períodos de tempo, caracterizando o melhor momento para a realização da IA.

Tabela 4 - Média, desvio padrão e variação na taxa de fertilização (TF) e taxa de viabilidade embrionária (VE), de acordo com o intervalo inseminação ovulação (IA-OV)

VARIÁVEIS	IA – OV (h)		
	0 - 12	12 - 24	> 24
N	28	16	17
TF (%)	95,9 ^a ±6,8 (77,3 – 100)	83,8 ^a ±25,5 (22,7 – 100)	61,2 ^b ±42,5 (0,0 – 100)
VE (%)	94,4 ^a ±7,7 (75,0 – 100)	79,5 ^a ±26,4 (18,2 – 100)	53,4 ^b ±39,4 (0,0 – 100)

^{a,b}Valores na mesma linha com letras diferentes diferem significativamente ($p < 0.05$).

^{a, b} Médias diferentes, teste de Tukey;

Foi possível observar que, conforme o intervalo IA-OV de 0-12 e 12-24 horas, a TF obteve os melhores resultados como demonstrado pela dispersão dos dados na curva (Figura 7). Quando o período de tempo entre a inseminação e a ovulação foi maior que 24 horas a TF tendeu ao declínio. Sendo assim a TVE acompanhou a

mesma tendência em relação ao intervalo IA-OV como demonstrada pela curva de dispersão dos dados na figura 8.

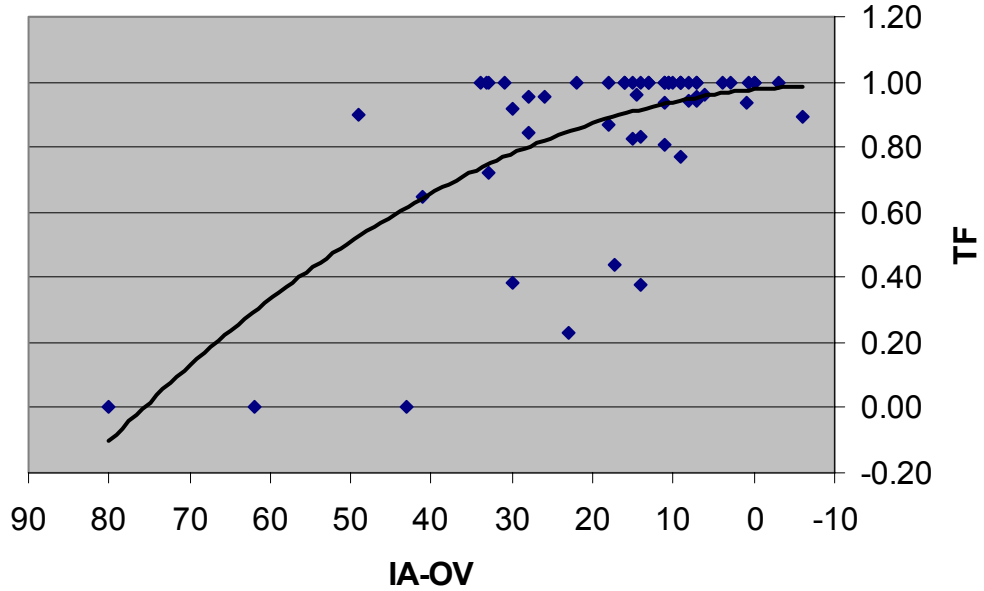


Figura 7 - Relação entre o intervalo inseminação-ovulação e a taxa de fecundação

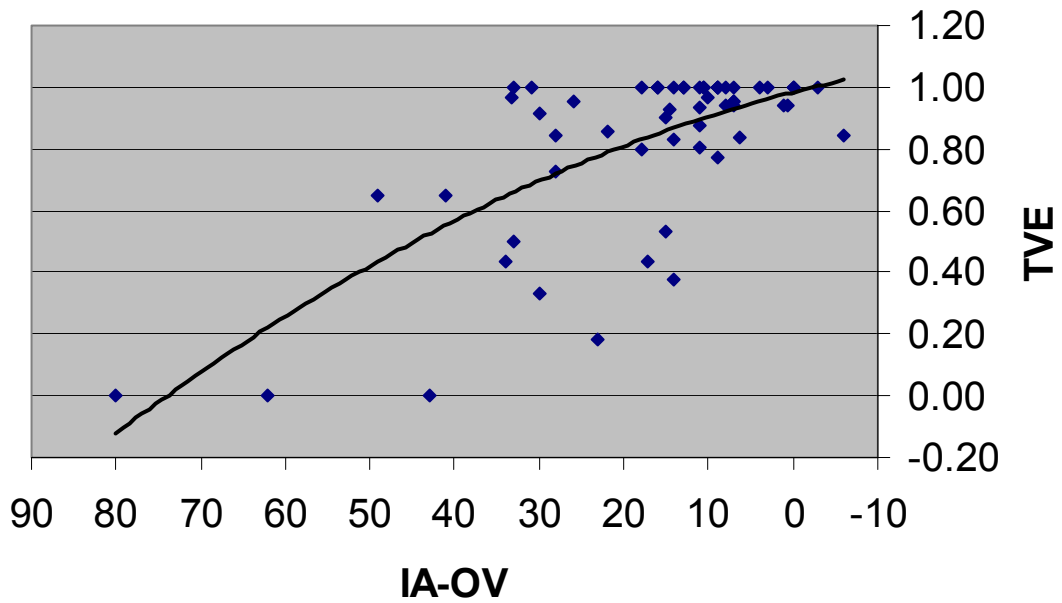


Figura 8 - Relação entre o intervalo inseminação-ovulação e a taxa de viabilidade embrionária

6 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste experimento mostraram que é possível usar 2,5mg de LH suíno para sincronizar a ovulação em fêmeas multíparas. O intervalo entre a aplicação de LH e a ocorrência da ovulação foi de aproximadamente 40 horas sendo bem semelhante com os resultados apresentados em experiências que empregaram o LH suíno (CANDINI et al., 1999), hCG ou GnRH (HÜHN, 1967; WÄHHNER et al., 1996).

A maioria dos experimentos que utilizaram o LH suíno em protocolos de IATF com 5,0mg foram considerados muito efetivos em sincronizar a ovulação (CANDINI et al., 1999) e mostraram resultados satisfatórios de taxa de parto e tamanho de leitegada (CANDINI, 2001). Porém testando uma única dose era importante executar uma experimentação fracionando a dosagem, especialmente porque em algumas situações a utilização de 5.0mg fica economicamente inviável.

Gama et al. (2005), objetivando constatar a dose mínima efetiva, testaram três doses do hormônio luteinizante e constataram que para protocolos de IATF, a dose deve ser de 2,5mg (IA-OV $38,26 \pm 2,84$ horas), embora não tenha confirmado diferença estatística em comparação com a dose de 1,25mg (IA-OV $36,25 \pm 5,69$ horas). Porém a dispersão da ovulação nesta dosagem foi maior ($p < 0,05$ teste de Bartlett). Nos dados apresentados no trabalho a dose de 2,5mg e 1,25mg não obtiveram diferença considerável em relação ao grupo controle com a dose de 5mg (dose clássica); talvez pelo fato de que o protocolo utilizado por Gama et al. (2005) tenha um intervalo maior de 72 horas entre a aplicação do eCG e o LH, favorecendo assim a influência do pico endógeno de LH, em contradição aos dados

apresentados utilizando o protocolo de 56 horas entre a administração do eCG e a droga luteinizante.

De acordo com Nissen et al. (1995), fêmeas que recebem a aplicação de hCG precocemente ao pico endógeno de LH, mostram um menor diâmetro folicular por ocasião da ovulação o que provavelmente afeta a maturação folicular final e a subsequente qualidade dos oócitos ovulados (GRANT et al., 1989; WIESAK et al., 1990). Entretanto, Soede et al. (1998) em um experimento não publicado, com o intuito de estudar se a indução da ovulação com um tamanho de folículos menores, resultaria em mudanças no desenvolvimento do embrião e na função luteal chegando à conclusão de que quando o hCG foi aplicado 48 (grupo precoce) e 72 (grupo “normal”) horas após a aplicação do eCG, o diâmetro folicular na aplicação de hCG, foi menor para o grupo precoce ($5,9\pm 0,3\text{mm}$) em comparação com o grupo normal ($7,0\pm 0,4\text{mm}$). Na ocasião da ovulação, não houve diferença entre os dois grupos, em relação ao diâmetro folicular ($7,5\pm 0,2$ e $7,9\pm 0,4\text{mm}$, respectivamente), como também não foram diferentes os níveis séricos de progesterona, 5 dias após a ovulação, entre os dois grupos. Estes autores concluem que a aplicação precoce de hCG não afeta o processo ovulatório mas resulta em um crescimento compensatório dos folículos no intervalo entre a aplicação de LH e a ovulação. Sendo assim, é possível afirmar que a redução do intervalo entre as injeções de eCG-LH de 56 horas, não seja uma administração prematura, já que possui um papel importante na sincronização da ovulação, pois a aplicação desta forma na maioria das situações ocorre antes do pico endógeno de LH.

Nissen et al. (2000), posteriormente, concluíram que a aplicação do indutor após o início do cio provavelmente coincida com o pico endógeno de LH, sugerindo o efeito deste na indução da ovulação e na maturação folicular final. Ao contrário,

quando o indutor da ovulação é administrado antes do início do cio a maturação folicular final é induzida pelo hormônio exógeno. Assumindo assim um grande papel na sincronização da ovulação.

O protocolo considerado “precoce” de 56 horas para a aplicação do LH, possivelmente, explica a redução na duração do cio entre os tratamentos onde mesmo não sendo possível demonstrar diferença estatística, os dados do presente trabalho, numericamente sugerem que, a partir do início do cio, a ocorrência da ovulação aconteceu antes no tratamento 1 em comparação com os demais tratamentos.

Quanto a utilização de protocolos com 1 ou 2 doses inseminantes, a inseminação única (30 horas após o LH) obteve resultados estatisticamente iguais ao protocolo com duas IAs (24 e 36 horas após o LH) mas pode-se observar que o intervalo IA-OV foi importante com relação as taxas de fecundação e viabilidade embrionária, onde entre o intervalo IA-OV de 0-24 horas e > 24 horas houve diferença estatística para as duas variáveis em questão devido ao fato de que o intervalo com mais de 24 horas representa uma diminuição na viabilidade espermática (NISSEN et al., 1997; SOEDE et al., 1995a; STEVERINK et al., 1997; UEMOTO et al., 1999; VIANA, 2001) .

Kaeoket et al. (2005) afirmam que a inseminação pós-ovulatória tende a diminuir seus índices conforme o aumento do intervalo, pois os níveis plasmáticos de estradiol são menores em comparação com o nível crescente de progesterona. Isto seria a causa de distúrbios não apenas diretamente na taxa de prenhez, mas na perda embrionária precoce levando a retornos de cio irregulares e a infecções uterinas, com uma baixa na resposta imune endometrial, característica da fase de metaestro.

Ao projetar este estudo, havia um conceito muito forte sobre a redução da dose de LH suíno e, conseqüentemente, tendo um número mais alto de cistos, uma vez que a razão principal para a origem de cisto ovariano é a deficiência de LH (VIANA et al., 1998). Para nossa surpresa, não houve nenhuma diferença significativa no número de cistos de acordo com os tratamentos. Não foi possível provar, mas pareceu ter havido um efeito da dose de LH no intervalo LH-OV, uma vez que se observou um aumento gradual em LH-OV relacionado com a diminuição da dose de LH. Esta observação, de acordo com os tratamentos, ocorreu de forma mais clara entre os tratamentos T2 e T3, demonstrando que poderia ser um indício de que a administração de LH apenas funcionou como um estímulo ao aumento do estradiol, e desta forma influenciou no pico ovulatório de LH. Outra forma de realizar essa comparação se dá também pelo intervalo do percentual da duração do cio onde a ovulação ocorreu, sendo que o (T3) e o grupo controle tiveram resultados semelhantes (Figura 4). Isto se deve ao fato de que após o pico de LH há uma diminuição constante da esteroidogênese, caracterizando o fim dos sinais de aceitação de monta da fêmea no momento da inseminação (ZIECIK et al., 1987).

A variação do LH-OV na maioria dos protocolos ainda é alta (20 - 44h) para executar uma única dose inseminante a campo. Porém o resultado LH-OV de $41,0 \pm 5,9$ horas, variou de 35 a 60 horas, sendo esta variação devida a duas porcas do tratamento 1 que apresentaram essa discrepância em relação ao restante das fêmeas tratadas. Portanto a utilização de uma dose inseminante pode ser empregada já que o tempo para a manutenção da viabilidade dos espermatozoides aceitável é de 24 horas no trato reprodutivo da porca (NISSEN et al., 1997; SOEDE et al., 1995a; STREVERINK et al., 1997; UEMOTO et al., 1999; VIANA, 2001) ou, até futuramente, a aplicação da tecnologia de sêmen congelado pode ser

empregada mesmo com o tempo de viabilidade espermática reduzido; estando em torno de 4 horas (WABERSKI et al., 1994) após o processo de congelamento e descongelamento.

Sendo assim, a adoção do intervalo entre a administração do LH e a inseminação nos protocolos de inseminação em tempo fixo representam outro fator determinante relativo ao intervalo IA-OV e conseqüentemente, na taxa de fecundação e viabilidade embrionária quando se emprega apenas uma inseminação. No presente estudo, onde se utilizou um intervalo LH-IA de 30 horas com uma única inseminação e de acordo com o LH-OV de $41,0 \pm 5,9$ horas, o tempo de viabilidade espermática está dentro do esperado. De acordo com CANDINI et al, (2004b) a utilização de apenas 1 IA não é recomendada, pois considerando que 100% das ovulações ocorreram no período de 24 e 48 horas após o LH, as fêmeas que possivelmente ovularam próximo das 48 horas após a aplicação do LH, comprometeriam a viabilidade dos espermatozoides na inseminação realizada 24 horas após o LH, pois estaria perto de seu limite máximo e talvez por isso, não tenha encontrado resultados satisfatórios com a inseminação única.

Bertani et al. (1997), comparando a utilização do sêmen congelado e sêmen a fresco, realizando uma inseminação 6 horas antes e 6 horas após a suposta ocorrência da ovulação (42 horas após a injeção de hCG), constatou que, independente do método de conservação do sêmen, a inseminação pós ovulatória obteve as piores taxas de viabilidade embrionária, isto devido aos fatores deletérios, anteriormente mencionados, relativos à inseminação no início da fase de diestro. Contudo, consideraram a viabilidade espermática do sêmen congelado no trato reprodutivo da porca como sendo de 20 horas.

Neste contexto, a sincronização da ovulação poderia ser uma alternativa para melhorar os resultados em programas de IA com sêmen congelado, já que os resultados de fertilidade da IA com sêmen congelado não atingem níveis satisfatórios quando comparados com o sêmen resfriado ou com a monta natural. Johnson et al. (1985) elaboraram uma revisão sobre a utilização de sêmen congelado, compreendendo o período de 1970 a 1985, constataram que a fertilidade foi 20% e 30% inferior para a taxa de parição e 2 a 3 leitões a menos por leitegada em relação ao sêmen resfriado. Mesmo assim, a utilização de sêmen congelado tem sido uma alternativa viável para maximizar a utilização de material genético superior em programas de melhoramento genético (JOHNSON, 1980). No entanto, considerando que o intervalo ideal para a realização da IA com sêmen congelado é de até 4 horas antes da ovulação, a sincronia do momento da ovulação obtida no protocolo padrão (5mg LH) e nos protocolos com a dose fracionada (desvio padrão de ± 6 horas; CANDINI et al., 2001; GAMA et al., 2005; HUNTER, 1967; HÜHN et al., 1996; VIANA, 2001) parece não ser satisfatória. Sendo assim, restaria a possibilidade do aumento do número de doses inseminantes, diminuindo os riscos quanto aos resultados de fertilidade da IA com sêmen congelado.

A utilização da inseminação artificial em tempo fixo pode ser associada com as técnicas de inseminação artificial intra-uterina ou intra-uterina profunda, onde recentes estudos demonstram que a adoção da inseminação artificial intra-uterina profunda maximiza o uso de machos doadores de sêmen, através da redução do número de espermatozoides por dose inseminante (VAZQUEZ et al., 2001).

Com o objetivo de determinar a mínima concentração espermática em doses de baixo volume, sem diminuir a taxa de fertilização e tamanho de leitegada, usando inseminação intra-uterina cirúrgica, Krueger et al. (1999), chegaram à conclusão que

as baixas concentrações em um pequeno volume (até 10 milhões de espermatozoides/ 0,5ml) foram suficientes para garantir sucesso da inseminação. No entanto, seriam necessários estudos associando as técnicas de sincronização da ovulação utilizando o LH com a técnica de inseminação intra-uterina, para demonstrar sua viabilidade.

7 CONCLUSÕES

1. A dose de 2,5mg de LH foi única eficiente na indução e na sincronização da ovulação;
2. Não foi possível mostrar diferença significativa quanto a taxa de fecundação e de embriões viáveis, de acordo com o número de inseminações nas fêmeas que receberam 1 ou 2 doses de sêmen;
3. De acordo com os intervalos entre a inseminação e a ovulação, o melhor momento para a realização da IA está entre 24 e 0 horas antes da ocorrência da ovulação, havendo uma queda importante nos resultados de taxa de fecundação e viabilidade embrionária quando o intervalo entre inseminação e ovulação foi maior que 24 horas;
4. Não foi possível mostrar diferença nas variáveis, intervalo desmame-cio, duração do cio, número de corpos lúteos e número de cistos entre os diferentes tratamentos de indução da ovulação.

REFERÊNCIAS

BERTANI, G. R.; SCHEID, I. R.; FIALHO, F. B.; RUBIN, M. I. B.; WENTZ, I.; GONÇALVES, P. B. D. Effect of the time of artificial insemination with frozen-thawed or fresh semen on embryo viability and early pregnancy rate in gilts. **Theriogenology**, v. 48, p. 933-945, 1997.

CANDINI, P. H.; MORETTI, A. S.; SILVEIRA, P. R. S.; ZANELLA, E. L.; VIANA, C. H. C.; SANTOS, I. C. C. Utilization of synchronized ovulation protocol, induced by porcine LH, to perform insemination programs in fixed time, with one or two inseminations per sow. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION, 6., 2001, Columbia-Missouri, **Anais...** Columbia: University of Missouri, 2001. p. 99.

CANDINI, P. H.; MORETTI, A. S.; ZANELLA, E. L.; SILVEIRA, R. S. S.; VIANA, C. H. C.; VALENTIM, R. Avaliação do uso de Hormônio Luteinizante (LH) como indutor da ovulação em porcas. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 2, p.118-123, 2004.

CANDINI, P. H.; ZANELLA, E. L.; SILVEIRA, P. R. S.; MORETTI, A. S.; VIANA, C. H. C.; VALENTIN, R. Utilização de gonadotrofinas (eCG e LH) para sincronização da ovulação em fêmeas suínas desmamadas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 1999. p. 375-376.

CASSAR, G.; KIRKWOOD, R. N.; STEWARD, K. B.; FRIENDSHIP, R. M.; Towards timed single insemination in sows. In: AASV, 2005, Ontario. **Anais....** Canadá: Veterinary College, University of Guelph, 2005. p. 353-355.

DAY, B. N. Sincronização controlada do estro e ovulação em suínos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM SUÍNOS, 7., 2000, Foz do Iguaçu, **Anais...** 2000. p. 19-28.

DZIUK, P. Estimation of optimum time for insemination of gilts and ewes by double mating at certain times relative to ovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 22, n. 2, p. 277-282, 1970.

ESTIENNE, M. J.; HARTSOCK, T. G. Effect of exogenous gonadotropins on the weaning-to-estrus interval in sows. **Theriogenology**, v. 49, n. 4, p. 823-828, 1998.

GAMA, R. D.; VIANNA, W. L.; PINESE, M. E.; ROSETO, A. L.; MORETTI, A. S. Different doses of porcine luteinizing in precocious puberty induction in gilts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40 p. 433-435, 2005.

GRANT, S. A.; HUNTER, M. G.; FOXCROFT, G. R. Morphological and biochemical characteristics during ovarian follicular development in the pig. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 86 p.171-183, 1989.

HELMOND, F.; AARNINK, A.; OUDENAARDEN, C. Perioovulatory hormone profiles in relation to embryonic development and mortality in pigs. In: SREENAN, J. N.; DISKIN, M. G. **Embryonic mortality in farm animals**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1986. p. 119-125.

HÜHN, U.; JÖCHLE, W.; BRÜSSOW, K. P. Techniques developed for the control of estrus, ovulation and parturition in the east german pig industry: a review. **Theriogenology**, v. 46, n. 6, p. 911-924, 1996.

HUNTER, R. H. F. Chronological and cytological details of fertilization and early embryonic development in the domestic pig, *Sus scrofa*. **Anatomical Records**, v. 178, p. 169-186, 1974.

HUNTER, R. H. F. Ovulation, fertilization, early embryonic development and establishment of pregnancy in pigs. **British Veterinary Journal**, p. 133-135, 1977.

HUNTER, R. H. F. Porcine ovulation after injection of human chorionic gonadotropin. **Veterinary Record**, v. 81, n. 1, p. 21-23, 1967.

HUNTER, R.H.F. Ovulation, fertilization, early embryonic development and establishment of pregnancy in pigs. **British Veterinary Journal**, p. 133-135, 1977.

JOHNSON, L. A. Artificial insemination of swine: fertility with frozen boar semen. In: INTERNATIONAL PIG VETERINARY SOCIETY CONGRESS, 6., 1980, Copenhagen, Dinamarca. **Anais...** Copenhagen: University of Copenhagen, 1980. p. 37.

JOHNSON, L. A. Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970 to 1985. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN, 1., 1985, Uppsala, Suécia. **Anais...** Uppsala: Swedish University of Agricultural Science, 1985. p. 199-222.

JOHNSON, L. A. Fertility results using frozen boar spermatozoa: 1970 to 1985. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON DEEP FREEZING OF BOAR SEMEN, 1., 1985, Uppsala, Suécia. **Anais...** Uppsala: Swedish University of Agricultural Science, 1985. p.199-222.

KAEOKET, K.; PERSSON, E.; DALIN, A. M. Influence of pré-ovulatory insemination and early pregnancy on the infiltration by cells of the immune system in the sow endometrium. **Animal Reproduction Science**, v. 75 p. 55-71, 2005.

KAEOKET, K.; PERSSON, E.; DALIN, A. M. The influence of pré-and post-ovulatory insemination on sperm distribution in the oviduct, accessory sperm to the zona pellucida, fertilisation rate and embryo development in sows. **Animal Reproduction Science**, v. 71 p. 239-248, 2002.

KEMP, B.; LANGENDIJK, P.; SOEDE, N. M. The role of the boar in reproductive efficiency of the sow. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 10., 2001, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos, 2001. v. 1, p. 327-328.

KRUEGER, C.; RATH, D.; JOHNSON, L. A. Low dosage insemination in synchronized gilts. *Theriogenology*, v. 52, p.1363-1373,1999.

NISSEN, A. K.; LEHN-JENSEN, H.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Follicular development and ovulation in sows: effect of hCG and GnRH treatment. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 36, n. 1, p. 123-143,1995.

NISSEN, A. K.; SCHMIDT, M.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Ovulation and embryonic development rate following hCG-stimulation in sows. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 41, p. 321-328, 2000.

NISSEN, A. K.; SOEDE, N. M.; HYTTEL, P.; SCHMIDT, M.; D'HOORE, L. The influence of time of insemination relative to time of ovulation on farrowing frequency and litter size in sows, as investigated by ultrasonography. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1571-1582, 1997.

ROZEBOOM, K. J.; TROEDSSON, M. H. T.; CRABO, B. G. Characterization of the post-mating uterine inflammatory response in the gilts. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 114, p. 195-199, 1998.

ROZEBOOM, K. J.; TROEDSSON, M. H. T.; SHURSON, G. C.; HAWTON, J. D.; CRABO, B. G. Late estrus or metaestrus insemination after estrual inseminations decreases farrowing rate and litter size in swine. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2323-2327, 1997.

SOEDE, M. N.; WETZELS, C. C. H.; ZONDAG, W.; HAZELEGER, W.; KEMP, B. Effects of a second insemination after ovulation on fertilization rate and accessory sperm count in sows., v. 105, n. 1, p. 135-140, 1995b.

SOEDE, N. M.; HELMOND, F. A.; KEMP, B. Periovolatory profiles oestradiol, LH and progesterone in relation to oestrus and embryo mortality in multiparous sows using transrectal ultrasonography to detect ovulation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 3, p. 633-641, 1994.

SOEDE, N. M.; WETZELS, C. C. H.; ZONDAG, W.; DE KONING, M. A. I.; KEMP, B. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by

ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 104, n. 1, p. 99-106, 1995a.

STEVERINK, D. W. B.; SOEDE, N. M.; BOUWMAN, E. G.; KEMP, B. Influence of insemination to ovulation interval and sperm cell dosage on fertilization in sows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 111, p. 165-171, 1997.

TERQUI, M.; GUILLOUET, P.; MAUREL, M. C.; MARTINAT-BOTTÉ, F. Relationship between peri-oestrus progesterone levels and time of ovulation by ecography in pigs and influence of the interval between ovulation and artificial insemination (AI) on litter size. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 40, p. 393-404, 2000.

UEMOTO, D. A.; BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, I.; POZZOBON, M. C.; BARIONI JR., W. Sobrevivência embrionária e número de embriões viáveis em leitões submetidas à inseminação artificial em diferentes intervalos pré-ovulatórios. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE VETERINÁRIOS ESPECIALISTAS EM SUÍNOS, 9., 1999, Belo Horizonte. **Anais...Belo Horizonte: Associação Brasileira de Veterinários Especialistas em Suínos**, 1999. p. 359-360.

VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; PARRILA, I.; CUELLO, C.; GIL, M. A.; LUCAS, X.; ROCA, J.; VAZQUEZ, J. L.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Deep intrauterine insemination in natural post-weaning estrus sows. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON PIG REPRODUCTION, 6., 2001, Columbia- Missouri. **Anais... Columbia: University of Missouri**, 2001. p. 134.

VIANA, C. H. C. **Relações entre as características intervalo desmame-cio, duração do cio e momento da ovulação pela ultra-sonografia e dosagem de progesterona sérica em fêmeas da espécie suína**. 1998. 104 f Dissertação (Mestre em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

VIANA, C. H. C. **Avaliação dos intervalos inseminação-ovulação e desmame cio e da duração do cio como parâmetros na determinação de programas alternativos de inseminação artificial em suínos**. 2001. 76 f Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

WABERSKI, D.; WEITZE, K. F.; GLEUMES, T.; SCHWARS, M.; WILLMEN, T.; PETZOLDT, R. Effect of time of insemination relative to ovulation on fertility with liquid and frozen boar semen. **Theriogenology**, v. 42, n. 5, p. 831-840, 1994.

WÄHHNER, M.; HÜHN, U. New aspects of the management of reproduction in pig. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, n. 3, p. 477-482, 1996.

WEITZE, K. F.; WAGNER-RIETSCHER, H.; WABERSKI, D.; RICHTER, L.; KRIETER, J. The onset of heat after weaning, heat duration, and ovulation as

major factors in IA timing sows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 29, n. 7, p. 433-443, 1994.

WIESAK, T.; HUNTER, M. G.; FOXCROFT, G. R. Differences in follicular morphology, steroidogenesis and oocyte maturation in naturally cyclic and PMSG/hCG-treated prepuberal gilts. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 89, p. 633-641, 1990.

ZIECIK, A.; TILTON, J. E.; ESPANA, F.; WEIGL, R. Effect of chorionic gonadotropin on preovulatory luteinizing hormone surge and ovarian hormone secretion in gilts. **Journal of Animal Science**, v. 64, p. 1134-1143, 1987.