

DESEMPENHO DE VACAS DOADORAS DA RAÇA NELORE, EM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Adalgiza Pinto Neto
José Monteiro da Silva Filho
Jéferson Ferreira da Fonseca
Marcelo Falci Mota
Heraldo Belisário
Wilson Saliba Pardini
Múcio Túlio Teixeira Alvim

PINTO-NETO¹, A.; SILVA FILHO², J.M.; FONSECA³, J.F.; MOTA⁴, M.F; BELISÁRIO⁵, H.; PARDINI⁵, W.S.; ALVIM⁵, M.T.T. Desempenho de vacas doadoras da raça nelore, em programa de transferência de embriões. *Arq. ciên. vet. zool., UNIPAR*, 3(2): p. 167-173, 2000.

RESUMO: Com o objetivo de avaliar o desempenho de vacas zebuínas em programa de transferência de embriões, 30 vacas doadoras da raça Nelore foram superovuladas com 350 UI de hormônio gonadotrófico (*PluSet*®), iniciando, em média, no 11^a dia do ciclo estral (dia zero = dia do estro), administradas em oito doses decrescentes, com intervalo de 12 horas a cada administração. Ao final do terceiro dia de tratamento superovulatório, administrou-se 2mg de PGF_{2α}. Cada doadora foi inseminada três vezes, sendo a primeira inseminação 14 horas após a manifestação de estro, e as subseqüentes oito horas após a anterior. No sétimo dia após a primeira inseminação, os embriões foram coletados pelo método não cirúrgico e avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária. Foram colhidas 409 estruturas de 40 coletas (10,76 ± 7,73). Desse total 42,54% (174/409) foram consideradas inviáveis (4,34 ± 4,53 por coleta). Das estruturas inviáveis 64,94 % (113/174) eram ovócitos (2,97 ± 4,02 ovócitos/coleta) e 35,06% (61/174) eram embriões degenerados (1,61 ± 1,82 degenerados/coleta). Foram considerados viáveis 57,46% (235/409) das estruturas coletadas (6,18 ± 6,41 embriões viáveis/coleta). A avaliação morfológica quanto ao estágio de desenvolvimento revelou que 5,10% (12/235) das estruturas viáveis encontravam-se em estágio de mórula, 20,00% (47/235) em estágio de blastocisto inicial, 41,28% (97/235) em estágio de blastocisto, 28,94% (68/235) em estágio de blastocisto expandido e 2,69% (11/235) em estágio de blastocisto eclodido. Com relação à qualidade embrionária, 69,30% (163/235) dos embriões viáveis foram classificados como grau I, 26,14% (61/235) grau II e 4,56% (11/235) grau III. Os resultados obtidos nesse estudo viabilizam a fêmea zebuína, da raça Nelore, em programas de transferência de embriões e caracterizam métodos efetivos para os protocolos de superovulação, coleta e manipulação de seus embriões. Porém, há que se considerar a metodologia de inseminação das vacas superovuladas, visto o elevado número de estruturas não fecundadas por coleta, visando adequar o melhor momento e número de inseminações, às particularidades apresentadas pelas vacas dessas raças.

PALAVRAS-CHAVE: bovino, superovulação, embrião, Nelore

¹ Médica Veterinária, Mestre, Doutora, Pesquisadora do IPEAC e Professora de Fisiopatologia da Reprodução – UNIPAR – Praça Mascarenhas de Moraes, s/n – 82502-210 – Umuarama-PR – Brasil. E.mail: netoadalgiza@hotmail.com

² Médico Veterinário, Mestre, Doutora, Professor de Fisiopatologia da Reprodução e Inseminação Artificial / Diretor da Escola de Veterinária – UFMG – Avenida Antônio Carlos, 6627 – 31270-000 – Belo Horizonte-MG – Brasil.

³ Médico Veterinário, Mestre, Doutorando em Zootecnia – UFV – Departamento de Zootecnia – Laboratório de Reprodução Animal – 36570-000 – Viçosa-MG – Brasil.

⁴ Médico Veterinário, Especialista, Autônomo – Rua Manoel Sobreira, 42 – 35240-000 – Conselheiro Pena-MG – Brasil.

⁵ Médicos Veterinários – CENATTE (Centro de Assessoria Técnica e Transferência de Embriões) – Fazenda das Cacimbas, s/n – Pedro Leopoldo-MG – Brasil.

REPRODUCTIVE PERFORMANCE OF NELORE COWS IN EMBRYO TRANSFER PROGRAM

PINTO NETO, A.; SILVA FILHO, J.M.; FONSECA, J.F.; MOTA, M.F.; BELISÁRIO, H.; PARDINI, W.S.; ALVIM, M.T.T. Reproductive performance of Nelore cows in embryo transfer program. *Arq. ciên. vet. zool., UNIPAR*, 3(2) : p. 167-173, 2000.

ABSTRACT: The objective of this study was to evaluate zebu cows performance in an embryo transfer program. Thirty Nelore cows were superovulated with 350 UI of the FSH, divided in eight decreasing doses. The first dose began in the eleventh day of the cycle (day zero = estrous day). The cows were inseminated three times. The first insemination was done 14 hours after the beginning of estrous and the other two inseminations were done eight hours after the last insemination. In the seventh day after the first insemination, the embryos were non-surgically collected and evaluated under stereoscopic microscopy to determine the development stage and grade of quality. A total of 409 structures were collected from the 40 collection (10.76 ± 7.73 per collection), 42.54% (174/409) of the structures were not fecundated (2.97 ± 4.02 per collection) and 35.06% (61/174) were degenerated embryos (1.61 ± 1.82 per collection). Viable embryos were 57.46% (235/409 – 6.18 ± 6.41 per collection). The viable embryos were classified according to the development stage [5.10% (12/235) morulae, 20.00% (47/235) young blastocyst, 41.28% (97/235) blastocyst, 28.94% (68/235) expanded blastocyst and 2.69% (11/235) hatched blastocyst] and to the quality [viable embryos were 69.30% (163/235) grade I, 26.14% (61/235) grade II and 4.56% (11/235) grade III]. The results of this study showed that Nelore cows have good performance in embryo transfer program and relate effective procedures to superovulation, collection and manipulation of their embryos. However, because of the high number of non-fecundated structures, the artificial insemination protocol must be re-evaluated, in order to adapt the ovulation and moment/number of inseminations to the peculiarities of Nelore cows.

KEY-WORDS: bovine, embryo, Nelore cows, zebu

DESEMPEÑO DE VACAS DADORAS DE RAZA NELORE, EN PROGRAMA DE TRANSFERENCIA DE EMBRIONES

PINTO NETO, A.; SILVA FILHO, J.M.; FONSECA, J.F.; MOTA, M.F.; BELISÁRIO, H.; PARDINI, W.S.; ALVIM, M.T.T. Desempeño de vacas dadoras de raza nelore, en programa de transferencia de embriones. *Arq. ciên. vet. zool., UNIPAR*, 3(2): p. 167-173, 2000.

RESUMEN: Con el objetivo de evaluar el desempeño de vacas cebuínas en un programa de transferencia de embriones, 30 vacas donadoras de la raza Nelore fueron superovuladas con 350 UI de hormona gonadotrófica (*PluSet*), iniciando el día 11 del período estral (día cero = día del estro), administradas en ocho dosis decrecientes, con un intervalo de 12 horas, a cada administración. Al fin del tercer día de la inseminación, se administró 2 mg de $\text{PGF}_2\alpha$. Cada donadora fue inseminada tres veces, siendo la primera inseminación, 14 horas después de la manifestación del estro, y en las subsecuentes ocho horas después. En el séptimo día, después de la primera inseminación, los embriones colectados por el método no quirúrgico se evaluaron en cuanto a la fase de desarrollo y calidad. Fueron recogidas 409 estructuras de 40 colectas ($10,76 \pm 7,73$). En este total 42.54% (174/409) consideradas inviábiles ($4,34 \pm 4,53$ por colecta). De las estructuras inviábiles 64,94% (113/174) eran huevos pequeños ($2,97 \pm 4,02$ huevos/colecta) y 35,06% (61/174) eran embriones degenerados ($1,61 \pm 1,82$ degenerados/colecta). Fueron consideradas viables 57,46% (235/409) de las estructuras recogidas ($6,18 \pm 6,41$ embriones viables/colecta). El test morfológico, en cuanto a la fase de desarrollo, reveló que el 5,10% (12/235) de las estructuras viables se encontraba en fase de mórula; 20,00% (47/235) en fase de blastocisto joven; 41,28% (97/235) en fase de blastocisto; 28,4% (68/235) en fase de blastocito expandido y, 2,69% (11/235) en fase de blastocisto ecloído. Con relación a la cualidad embrionaria, 69,30% (163/235) de los embriones viables eran de nivel I;

26,14% (61/235) de nível II, y 4,56% (11/235) de nível III. Los resultados en este estudio, viabilizan a la hembra cebuína, de la raza Nelore, en programas de transferencia de embriones, y caracterizan también, algunos métodos efectivos para aplicación de protocolos de fecundación, colecta y manipulación de sus embriones. Es importante considerar, la metodología de inseminación de las vacas donadoras, observando el elevado número de estructuras no fecundadas por colecta, adecuando también la hora y el número de inseminaciones, de acuerdo a las particularidades de las hembras de estas razas.

PALABRAS-CLAVE: bovino, embrión, raza Nelore, cebú

Introdução

A difusão de animais zebuínos na maioria das regiões brasileiras deve-se às características de rusticidade e de adaptação dessas raças às condições de clima tropical. Estima-se que 70-80% do rebanho bovino nacional seja composta por animais zebuínos puros e seus cruzamentos, inserindo o Brasil como o maior detentor de material genético de zebuínos do mundo (ZANENGA, 1993).

Diante disso, a raça Nelore é a que mais se destaca, devido ao seu importante papel social e econômico que exerce no país (VISINTIN, 1996). No entanto, poucas pesquisas tem sido feitas, buscando avaliar o desempenho dessa raça em programas de transferência de embriões.

A maioria das investigações ligadas à biotecnologia de embriões tem sido realizadas em bovinos de raças européias. Os resultados encontrados não se aplicam com a mesma eficiência para embriões zebuínos. Diferenças em vários aspectos reprodutivos tem sido demonstradas entre estas raças, inclusive na ultra-estrutura de seus embriões (ESPER & BARBOSA, 1991).

Dessa foram pretende-se com esse estudo relatar o desempenho de vacas da raça Nelore, submetidas a um processo superovulatório, em programas de transferência de embriões.

Material e Métodos

Esse estudo foi conduzido no Centro de Assessoria Técnica e Transferência de Embriões - CENATTE, no município de Pedro Leopoldo, Estado de Minas Gerais, durante o

período de abril do ano de 1997 a junho de 1999, onde 30 vacas doadoras da raça Nelore, após um exame clínico completo e observação de pelo menos dois ciclos estrais normais foram submetidas a tratamento superovulatório, totalizando 40 superovulações.

O protocolo de superovulação foi iniciado em média no décimo primeiro dia do ciclo estral (dia zero correspondente ao dia do estro), variando do oitavo ao décimo segundo dia. Para tanto, administrou-se 350 UI de hormônio gonadotrófico¹, dividido em oito doses decrescentes, aplicadas duas vezes ao dia, por via intramuscular, com intervalo de 12 horas cada aplicação.

A dose de hormônio foi diluída em 50 ml de solução, de acordo com a Tabela 01. Ao final do terceiro dia do tratamento superovulatório, aplicou-se 2 mg de prostaglandina F_{2α}, por via intramuscular, para indução do estro (Tabela 01).

Cada doadora foi inseminada três vezes, com sêmen de touros da mesma raça e qualidade comprovada, sendo a primeira inseminação efetuada aproximadamente 14 horas após a manifestação de estro, e as subseqüentes oito horas após a anterior.

Sete dias após a primeira inseminação artificial, os embriões foram coletados via transcervical, por meio de lavagem uterina com solução tamponada fosfatada de *Dulbeco* (PBS), modificada por WHITTINGHAM³ (1971). O conteúdo uterino foi filtrado, utilizando-se filtro para embriões⁴, colocado em placa de Petri⁵ descartáveis e observado ao microscópio estereoscópio⁶, a fim de se identificar e selecionar os embriões.

¹ *PluSet* – Laboratório Serono

² *Lutalyse* (dose 4ml) – Laboratório Rhodia Mérieux

³ Laboratório Cultilab

⁴ *Millipore*

⁵ *Costar* ou *Corning*

⁶ *Bausch Lomb*

Tabela 01 - Representação esquemática da diluição do hormônio superovulatório

Hormônio Gonadotrófico	Dia da superovulação								TOTAL
	Dia 01		Dia 02		Dia 03		Dia 04		
	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	Manhã	Tarde	
Dose (UI)	122,50		105,00		70,00		52,00		350
	61,25	61,25	52,50	52,50	35,00	35,00	26,25	26,25	
Volume da dose (ml)	17,50		15,00		10,00		7,50		50,00
	8,75	8,75	7,50	7,50	5,00	5,00	3,75	3,75	
Porcentagem da dose (%)	35		30		20		15		100
PGF _{2α} Dose						2mg			
Volume						4ml			

Após a identificação, os embriões foram colocados em PBS enriquecido com 20% de soro fetal bovino¹, avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento e qualidade, segundo LINDNER & WRIGHT (1983) e KENNEDY, BOLAND & GORDON (1983), respectivamente, com algumas

alterações, como apresentado nas Tabelas 02 e 03. Considerou-se o número de células, a compactação dos blastômeros, a forma, cor e tamanho das células, presença ou não de extrusão celular, diferenciação visual entre trofoblasto e massa celular interna, além da presença da blastocele.

Tabela 02 - Classificação de embriões bovinos quanto ao estágio de desenvolvimento

Estádio de desenvolvimento	Definição
Mórula	Aglomerado celular que permite a distinção entre os blastômeros, porém sem a diferenciação celular.
Blastocisto inicial	Início da diferenciação entre as células do trofoblasto e massa celular interna, com o aparecimento de uma pequena cavidade entre os blastômeros (blastocele).
Blastocisto	Clara diferenciação entre as células do trofoblasto e massa celular interna. Blastocele visível. O embrião ocupa a maior parte do interior da zona pelúcida sem alterar o diâmetro do embrião.
Blastocisto expandido	Aumento de 1,2 a 1,5 o diâmetro embrionário, com adelgaçamento da zona pelúcida, em até dois terços da espessura inicial.
Blastocisto eclodido	Embrião fora do espaço peri-vitelínico, podendo estar próximo ou não da zona pelúcida, apresentando o dobro do volume inicial.
Ovócito	Gameta feminino não fecundado. Não há distinção entre células. Espaço interno a zona pelúcida homogêneo.
Estrutura degenerada	Estrutura comprometida que impede a classificação quanto ao estágio de desenvolvimento

¹ Laboratório Cultilab

Tabela 03 - Classificação de embriões bovinos quanto a qualidade embrionária

Qualidade Embrionária	Definição
Grau I	Embrião excelente. Possui zona pelúcida intacta e esférica, blastômeros íntegros, uniformes, nenhum fragmento ou debris celular no espaço peri-vitelínico ou blastocele.
Grau II	Embrião bom. Pequenas alterações na forma e coloração dos blastômeros. Alguns fragmentos ou debris celulares no espaço peri-vitelínico e/ou pequenas formações vesiculares nos blastômeros.
Grau III	Embrião regular. Alterações significativas nos blastômeros, porém com a maior parte deles intacta.
Grau IV ou degenerado	Embrião ruim. Muitos fragmentos ou debris celulares no espaço peri-vitelínico e/ou blastocele. Formações vesiculares e alterações degenerativas evidentes. Menos da metade dos blastômeros intactos.

Resultados e Discussão

Os resultados médios relativos aos parâmetros de controle, do preparo da doadora até o dia da coleta, estão apresentados na Tabela 04.

Das 409 estruturas coletadas ($10,76 \pm 7,73$ por coleta), 42,54% (174/409) foram consideradas inviáveis ($4,34 \pm 4,53$ por coleta), incluindo 64,94% (113/174) de ovócitos ($2,97 \pm 4,02$ por coleta) e 35,06% (61/174) de embriões degenerados ($1,61 \pm 1,82$ por coleta).

Tabela 04 - Parâmetros indicativos obtidos em vacas da raça Nelore superovuladas com hormônio gonadotrófico. Pedro Leopoldo-MG, 1999.

Parâmetros	Média
Número de coletas	40
Idade da doadora (anos)	$9,77 \pm 2,44$
Início da superovulação (dias)	$11,18 \pm 2,21$
Final da superovulação (dias)	$14,18 \pm 2,21$
Número de doses de hormônio superovulatório/coleta	$8,00 \pm 0,00$
Dia de aplicação da prostaglandina F ₂ alfa	$13,18 \pm 2,21$
Início do estro a 1ª inseminação artificial (horas)	$13,93 \pm 0,65$
Início do estro a 2ª inseminação artificial (horas)	$21,61 \pm 0,79$
Início do estro a 3ª inseminação artificial (horas)	$29,36 \pm 1,34$
Número de inseminações	$3,05 \pm 0,33$
Dia de coleta	$7,47 \pm 0,13$

Existem algumas particularidades da fisiologia da reprodução ligadas a animais de raças zebuínas (CHENOWETH, 1994). Fêmeas zebuínas exibem estro de mais curta duração (PINHEIRO *et al.*, 1998) e ovulação mais precoce, decorrente de uma onda de LH, também

mais precoce, ao se comparar com fêmeas de raças taurinas (CAVALIERI *et al.*, 1997). Vacas da raça Brahman ovulam cerca de dez horas antes, em relação ao início do estro, quando comparadas às ovulações de vacas da raça Hereford (RANDEL, 1976).

Observou-se nesse estudo uma porcentagem alta de estruturas inviáveis: degeneradas e/ou não fecundadas. A primeira inseminação ocorreu aproximadamente 14 horas após o início do estro. Em seguida foram feitas outras duas inseminações a cada oito horas. A última inseminação ocorreu aproximadamente 30 horas após o início do estro. É possível que os espermatozóides disponíveis na primeira inseminação tenham sido insuficientes para a fertilização de todos os ovócitos liberados. E, os espermatozóides providos das inseminações posteriores tenham encontrado ovócitos inviáveis, decorrentes do tempo da ovulação. Segundo DOBSON & KAMONPATANA (1986), após o período de seis a oito horas da ovulação, o ovócito torna-se infértil. Dependendo do grau de comprometimento, os ovócitos poderiam até ser fecundados, originando estruturas degeneradas.

Foram considerados viáveis 57,46% (235/409) das estruturas coletadas, apresentando em média $6,18 \pm 6,41$ estruturas viáveis/coleta. Esses resultados foram superiores as 5,19 estruturas viáveis por coleta, descritas por FONSECA *et al.* (2000), para raças zebuínas, incluindo predominantemente vacas da raça Nelore. Também foi superior aos resultados encontrados por CALLESEN *et al.* (1995).

O número de estruturas encontrado retrata a eficiência do protocolo de superovulação utilizado, uma vez que o mesmo foi elaborado por estudos individuais nas raças zebuínas (tentativa e erro), sendo que os já descritos foram desenvolvidos para animais de raças taurinas, apresentando resultados insatisfatórios para raças zebuínas.

Quanto ao estágio de desenvolvimento, 5,10% (12/235) das estruturas viáveis se encontravam em estágio de mórula, 20,00% (47/235) em estágio de blastocisto inicial, 41,28% (97/235) em estágio de blastocisto, 28,94% (68/235) em estágio de blastocisto expandido e 2,69% (11/235) em estágio de blastocisto eclodido. A predominância de estádios adiantados de desenvolvimento, para embriões de raças zebuínas, foi primeiramente descrita por FONSECA *et al.* (2000) e confirmada nesse trabalho.

Ao se comparar a ultra-estrutura de embriões bovinos observou-se menores valores para os perfis mitocondriais de embriões zebuínos quando comparados aos de taurinos (ESPER, 1997). É coerente supor, que diante dessas diferenças, a eficiência no ciclo de *Krebs*, nos embriões zebuínos, seja menor que em embriões taurinos, podendo até levar a um retardo no desenvolvimento. Porém, observa-se em embriões zebuínos, estádios de desenvolvimento mais adiantados em menor tempo, em relação aos taurinos (FONSECA *et al.*, 2000). CAVALIERI *et al.* (1997) sugeriram haver uma onda precoce de LH em vacas zebuínas. FONSECA *et al.* (2000) relataram que uma onda precoce de LH anteciparia a ovulação, podendo refletir em fertilizações mais precoces, o que daria aos embriões zebuínos tempo adicional para seu desenvolvimento, e consequentemente a estádios mais avançados de desenvolvimento.

A avaliação morfológica quanto a qualidade embrionária revelou que 69,30% (163/235) dos embriões viáveis eram grau I, 26,14% (61/235) grau II e 4,56% (11/235) grau III. Aproximadamente 95,00% dos embriões viáveis foram considerados bons ou excelentes, comprovando a eficiência dos procedimentos utilizados durante a manipulação dos embriões, bem como de todos os procedimentos utilizados na doadora antes da coleta dos embriões. Esses resultados também foram superiores aos de FONSECA *et al.* (2000), que encontraram aproximadamente 80,00% dos embriões excelentes e bons.

Conclusões

Os resultados obtidos nesse estudo viabilizam a utilização da fêmea zebuína da raça Nelore, em programas de transferência de embriões e caracterizam métodos efetivos para os protocolos de superovulação, coleta e manipulação de seus embriões. Estudos posteriores deverão ser efetuados, visando adequar o melhor momento e número de inseminações às particularidades apresentadas pelas vacas dessas raças.

Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio físico, financeiro e intelectual das seguintes Empresas/Instituições: CENATTE – Centro de Assessoria Técnica e Transferência de Embriões, município de Pedro Leopoldo-MG; EPAMIG – Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais; FAPEMIG – Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (Projetos de CAG 930/97 e 2206/97); Fazenda do Arrojo, município de Esmeraldas-MG; Fazenda Bela Vista, em Conselheiro Pena-MG e Fazenda Santo Antônio Caetano da Cerca Grande, em Pedro Leopoldo.

Referências Bibliográficas

- CALLESEN, H.; LOVENDAHL, P.; BAK, A.; GREVE, T. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. *Journal of Animal Science*, Savoy, v.73, p.1539-1543, 1995.
- CAVALIERI, J.; RUBIO, I.; KINDER, J.E.; ENTWISTLE, K.W.; FITZPATRICK, L.A. Synchronization of estrus and ovulation and associated endocrine changes in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*, Gainesville, v.47, p.801-814, 1997.
- CHENOWETH, P.J. Aspects of reproduction in female *Bos indicus* cattle: a review. *Australian Veterinary Journal*, Sidney, v.71 (12), p.422-426, 1994.
- DOBSON, H. & KAMONPATANA, M. A review of female cattle reproduction with special reference to a comparison between buffaloes, cows and zebu. *Journal of Reproduction and Fertility*, Cambridge, v.77, p.1-36, 1986.
- ESPER, C.R. Ultra-estrutura comparativa de embriões bovinos. Jaboticabal: UNESP, Departamento de Reprodução Animal, 1997. 84p. Tese (Livre Docência).
- ESPER, C.R. & BARBOSA, J.C. Ultra-estrutura comparativa de embriões bovinos. IN: *IX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Anais...* Belo Horizonte, 295, 1991. v.II, p.295.
- FONSECA, J.F.; SILVA FILHO, J.M.; PINTO NETO, A.; PALHARES, M.S. Estádio de desenvolvimento avançado em zebuínos. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte, v.-, p.-, 2000. [No Prelo]
- KENNEDY, L.G., BOLAND, M.P., GORDON, I. The effect of embryo quality at freezing on subsequent development of thawed cow embryos. *Theriogenology*, Gainesville, v.19 (6), p.823-832, 1983.
- LINDNER, G.M., WRIGHT, Jr. R.W. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, Gainesville, v.20, p.407-416, 1983.
- PINHEIRO, O.D., BARROS, C.M., FIGUEIREDO, R.A., DO VALE, E.R., ENCARNAÇÃO, R.O., PADOVANI, C.R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus induced with prostaglandin F_{2a} or norgestomet and estradiol valerate. *Theriogenology*, v.49, p.667-681, 1998.
- RANDEL, R.D. LH and ovulation in Brahman, Brahman X Hereford and Hereford heifers. *Journal of Animal Science*, v.43, p.300, 1976.
- VISINTIN, J.A. Criopreservação de embriões *Bos taurus indicus*. *Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS*, Porto Alegre, v.24, p.82-97, 1996.
- WHITTINGHAM, D.G. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, London, v.233, p.125, 1971.
- ZANENGA, C.A. Congelamento de embriões em zebuínos: evolução e viabilidade. IN: *X Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. Anais...* Belo Horizonte, 1993. p.125.

Recebido para publicação em 27/06/00.

Received for publication on 27 June 2000.

Recebido para publicación en 27/06/00.

Aceito para publicação em 17/08/00.

Accepted for publication on 17 August 2000.

Acepto para publicación en 17/08/00.