

Inseminação artificial em tempo fixo com sêmen bovino sexado

Sidnei Nunes de Oliveira; Marcos Chalhoub; Alexandra Soares Rodrigues; Endrigo Adonis Braga de Araujo; Priscila Assis Ferraz; Marcus Vinícius Galvão Loiola; Bruno Henrique Araújo Andrade; Leandro Moreira Castro Feitosa; Tess Picq Coutinho; Antonio de Lisboa Ribeiro Filho

Universidade Federal da Bahia. Av. Ademar de Barros, nº 500, Ondina, Salvador, BA CEP: 40170-110. E-mails: sidmev@hotmail.com; chalhoub@ufba.br; alexandravet_19@yahoo.com.br; adonis.tecvet@gmail.com; prisferraz@gmail.com; vinicius_mev@hotmail.com; bruno.henryque@gmail.com; leofeitosa85@yahoo.com.br; tesspc3@hotmail.com; alisboafilho@uol.com.br

Resumo: Objetivou-se desenvolver um protocolo hormonal que viabilizasse um melhor momento da IATF com sêmen sexado. Para isso, 60 fêmeas foram avaliadas por palpação retal e ultrassonografia e consideradas aptas à reprodução. Em um dia aleatório do ciclo estral (D0), às 16:00h os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (DIB[®], MSD Saúde Animal) associado a 2mg de Benzoato de Estradiol (BE) por via intramuscular (i.m.) (Gonadiol[®], MSD Saúde Animal). No D8, às 16:00h os dispositivos intravaginais foram retirados e aplicou-se 300U.I. de eCG i.m. (Novormon[®], MSD Saúde Animal) e 500µg de Cloprostenol i.m. (Ciosin[®], MSD Saúde Animal). No D9, às 18:00h aplicou-se 1mg de BE i.m. e no D11, às 6:00h os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: G1-CONV (n=30), animais inseminados com doses de sêmen convencional e G2-SEX (n=30), animais inseminados com doses de sêmen sexado. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal, 30 dias após as IATFs e as análises dos dados, executadas pelo teste do qui-quadrado (χ^2) disponível no Statistical Analysis System (P<0,05). Dos 60 animais inseminados, 30 ficaram prenhes (50,0%). A taxa de concepção entre os grupos experimentais não diferiu estatisticamente, os grupos G1-CONV e G2-SEX obtiveram taxas de concepção de respectivamente, 60,0 e 40,0%. O protocolo possibilitou aos animais inseminados com sêmen sexado 62 horas após a retirada do dispositivo intravaginal, alcançarem taxas de concepção próximas às fêmeas inseminadas com sêmen convencional.

Palavras chave: Nelore, IATF, Benzoato de Estradiol, sêmen sexado, ovulação

Artificial insemination for fixed-time with bovine sexed semen

ABSTRACT: The objective of this study was to develop a hormonal protocol that enables a better moment of FTAI with sexed semen. For such, 60 females were evaluated by rectal palpation and ultrasonography and considered suitable for breeding. On a random stage of the estrous cycle (D0) at 4:00 pm the animals received an intravaginal progesterone device (DIB[®], MSD Saúde Animal) in association with 2 mg of estradiol benzoate (EB) intramuscularly (i.m.) (Gonadiol[®], MSD Saúde Animal). On D8, 4:00 pm intravaginal devices were removed and applied 300 IU of eCG i.m. (Novormon[®], MSD Saúde Animal) and 500 µg Cloprostenol i.m. (Ciosin[®], MSD Saúde Animal). On D9, at 6:00 pm it was applied 1 mg EB i.m. and on D11, at 6:00 am the animals were randomly divided into two groups: G1-CONV (n=30), animals inseminated with conventional semen and G2-SEX (n=30), animals inseminated with sexed semen. Pregnancy diagnosis was performed by transrectal ultrasonography 30 days after the FTAI and data analysis was, performed by chi-square (χ^2) available in Statistical Analysis System (P<0,05). Of the 60 animals inseminated, 30 became pregnant (50.0%). The conception rate among the experimental groups did not differ statistically, the groups G1- CONV and G2-SEX had conception rates of respectively 60.0 and 40.0%. The protocol allowed the animal inseminated with sexed semen 62 hours after removal of intravaginal device, achieving conception rates close to the females inseminated with conventional semen.

Keywords: Nelore, FTAI, Estradiol Benzoate, sexed semen, ovulation

Introdução

A inseminação artificial (IA) constitui importante ferramenta para a eficiência reprodutiva e lucrativa da bovinocultura (INFORZATTO et al., 2008). Entretanto, apesar dos grandes avanços genéticos proporcionados pela IA em bovinos, na prática ainda não observa-se uma popularização desta técnica (BARUSELLI et al., 2006). Estima-se que no Brasil, apenas 10,0% das fêmeas em idade reprodutiva são inseminadas (ASBIA, 2011), sendo os fatores limitantes ao uso desta biotecnologia a falha na detecção do estro e o anestro pós-parto (RIBEIRO FILHO, 2001). Como alternativa para se promover uma maior difusão desta biotécnica tem-se a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (BARUSELLI et al., 2006).

Nos últimos anos, a IATF tem alcançado um patamar de destaque no cenário nacional e vem ocorrendo um aumento do interesse na associação desta técnica com outras biotecnologias como, por exemplo, a sexagem espermática que permite a separação dos espermatozoides contendo o cromossomo Y daqueles que contém o cromossomo X (BODMER et al., 2005).

Aparentemente, as células espermáticas sexadas têm baixa viabilidade no trato genital feminino o que pode interferir na fertilidade dessas amostras, este fato pode ser justificado, pois, para realização da sexagem espermática é necessário que os espermatozoides sejam submetidos a uma sequência de procedimentos, que podem provocar injúrias à célula espermática (MOCÉ et al., 2006). Além disso, a dose de sêmen sexado tem baixa concentração espermática, o que ocorre em consequência do baixo rendimento obtido pela técnica de separação espermática por meio da citometria de fluxo (BARUSELLI et al., 2007; DEJARNETTE et al., 2010).

Apesar da vasta literatura referente ao tema, ainda há necessidade de estudos para se adequar o momento da IATF com sêmen sexado, em relação ao uso da ovulação. Uma vez que, utilizando-se os protocolos comercialmente definidos, associado à inseminação com células espermáticas de baixa viabilidade no trato genital feminino, como por exemplo, aquelas do sêmen sexado, o ato da inseminação será realizado pré-ovulação, o que, provavelmente, determinará um

decréscimo na taxa de concepção (MOCÉ et al., 2006).

Possivelmente, o melhor momento da inseminação ao se utilizar o sêmen sexado, seja após a ovulação ou próxima desta (BARUSELLI et al., 2007). Sendo assim, a utilização do Benzoato de Estradiol (BE) parece ter benefícios em protocolos de IATF com sêmen sexado (ANDRADE et al., 2012). Segundo Ribeiro Filho (2001), esta droga tem meia vida mais curta, tornando sua ação mais sincrônica com relação aos outros ésteres de estradiol e, com isso a sua utilização pode adequar mais facilmente o momento das IAs em relação à ovulação.

A partir desses princípios e procurando uma alternativa para maximizar a utilização do sêmen sexado em projetos comerciais de gado de corte no Brasil, esse trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo hormonal que proporciona um melhor momento para IATF com sêmen sexado.

Material e Métodos

O experimento foi realizado entre os meses de janeiro a março de 2011, na Fazenda Estrela do Oriente, localizada no município de Itapetinga região centro-sul da Bahia, com latitude 15° 15' 12,48"S, longitude 40° 15' 19,78"W e altitude de 280 metros, com pluviosidade média anual de 860 mm.

Para a execução desse experimento, foram utilizadas 60 fêmeas múltiparas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) em lactação, com média de 65,5 ± 9,6 dias pós-parto, idade entre 5,2 ± 0,6 anos e escore de condição corporal (ECC) de 3,09 ± 0,26 (escala de 1 a 5) (HOUGHTON et al., 1990). Assim, previamente ao início do protocolo de IATF, esses animais foram submetidos ao exame clínico-ginecológico com auxílio da ultrassonografia transretal, utilizando-se um transdutor linear com frequência de 5,0MHz (Pie-Medical, Falco 100, São Paulo, Brasil), sendo considerados aptos a participarem do experimento os animais que no momento da avaliação não apresentavam nenhum tipo de anormalidade do trato genital e ausência de histórico de aborto.

Os animais dessa propriedade eram vacinados contra doenças da esfera reprodutiva, e obedeciam ao calendário oficial estadual de

vacinação. Permaneciam em piquete com pastagem predominante de *Brachiara decumbens* com sal mineral e água *ad libitum*.

As fêmeas foram submetidas a um protocolo farmacológico para sincronização da onda folicular e ovulação, para tanto, em um dia aleatório do ciclo estral denominado dia 0 (D0) às 16:00h, os animais receberam um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona (DIB[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) associado a 2,0mg de Benzoato de Estradiol (GONADIOL[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) i.m. No D8 às 16:00h procedeu-se a retirada da fonte de progesterona e aplicou-se 300U.I. de eCG i.m. (NOVORMON[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e 500µg de Cloprostenol i.m. (CIOSIN[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil), no D9, às 18:00h os animais receberam 1,0mg de Benzoato de Estradiol i.m. (GONADIOL[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil). No D11, às 06:00h os animais foram distribuídos homogeneamente de acordo com os dias pós-parto, idade, e ECC em dois grupos e inseminados sem observação de comportamento de cio: G1-CONV (n=30), animais inseminados com doses de sêmen convencional e G2-SEX (n=30), animais inseminados com doses de sêmen sexado.

As inseminações foram efetuadas por um único técnico. O sêmen empregado pertencia a um mesmo touro da raça Nelore com fertilidade previamente comprovada, criopreservado em palheta de 0,25mL, sendo descongelados a 37°C por 30 segundos. As doses de sêmen sexado tinham uma concentração média de $2,1 \times 10^6$ espermatozoides (SPTZs) (Sexing Technologies Brasil, Sertãozinho, SP – Brasil) enquanto as doses de sêmen convencional apresentavam em média 25×10^6 SPTZs.

O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após as IATFs, por meio da ultrassonografia transretal utilizando transdutor linear de 5,0MHz (Pie-Medical, Falco 100, São Paulo, Brasil). Foi considerado como diagnóstico positivo de gestação a presença da vesícula embrionária com o embrião visível. Em seguida calculou-se a taxa de concepção, dividindo o total de vacas gestantes pelo total de vacas inseminadas em cada grupo experimental.

Para as análises estatísticas das características avaliadas, foi empregado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS) - versão 6. Para tanto, realizou-se a seguinte sequência de análises:

1- A consistência dos dados e a análise descritiva da variável ECC (média e desvio padrão) foram realizadas por meio do PROC MEANS.

2- A variável taxa de concepção teve suas tabelas de distribuição e estudo de dispersão de frequências elaboradas pelo PROC FREQ, e para tanto, se utilizou o teste de Qui-quadrado (χ^2).

Para as análises considerou-se nível de significância de 5% e atenderam-se os padrões de amostragem e graus de liberdade estabelecidos por Sampaio (1998).

Resultados e Discussão

A taxa de concepção média encontrada no presente estudo foi de 50%, resultado este que diverge dos reportados por Barbosa et al. (2011), que ao compararem a utilização do sêmen sexado e convencional, para realização das IATF 54h após a retirada da fonte de P4, obtiveram uma taxa de prenhez média de 18,7%, todavia, estes autores justificaram os baixos índices de fertilidade ao fato de trabalharem com novilhas mestiças leiteiras *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* no período do verão e altas temperaturas presentes, o que pode explicar as diferenças encontradas em relação ao presente estudo. Sales et al. (2011) trabalhando com vacas Nelore lactantes e induzindo a ovulação com GnRH, obtiveram resultados de concepção semelhantes ao presente estudo, de 50,8%. Contudo uma melhoria significativa nas taxas de concepção foi observada quando Sá Filho et al. (2010) direcionaram o programa de IATF, utilizando sêmen convencional e sexado em animais que apresentavam folículos com diâmetro ovulatório acima de 11mm (conv = 59,1% e sex = 56,8%), em relação àqueles em que os folículos não atingiram este diâmetro (conv = 51,0% e sex = 36,8%).

Os grupos experimentais G1-CONV e G2-SEX não diferiram ($P>0,05$) entre si (Tabela 1) em relação a taxa de concepção, corroborando com as afirmações de outros autores (BARUSELLI et al., 2011; SALES et al., 2011).

Neste contexto, Baruselli et al. (2007) realizaram experimento com vacas paridas da raça Nelore, utilizando para IATF sêmen sexado ($2,1 \times 10^6$ SPTZs /dose) ou convencional (40×10^6 SPTZs /dose), sendo as inseminações realizadas 60 horas após a retirada do implante de progesterona. Esses autores verificaram taxas de

preñez ao empregarem sêmen sexado para fêmea de 52,0%, sexado para macho de 49,0% e convencional de 58,9%, não havendo diferença estatística entre os grupos experimentais.

Resultados diferentes foram reportados por Seidel Jr. e Shenk (2008) que encontraram diferenças significativas ao empregarem a IA com sêmen sexado ou convencional, justificando as divergências entre os grupos devido à utilização de sêmen sexado por citometria de fluxo, que necessita de uma força mecânica para promover à separação dos espermatozoides, provocando assim danos estruturais a célula espermática, e comprometimento dos índices de fertilidade. No entanto, a tolerância dos espermatozoides ao estresse provocado pela técnica da sexagem pode variar entre diferentes touros (DEJARNETTE et al., 2010), o que pode ter contribuído com os resultados deste experimento que empregou apenas um touro, provavelmente apresentando espermatozoides resistentes a separação, sugerindo que o sucesso da IATF com sêmen sexado tem como importante etapa a seleção do touro.

Sales et al. (2011) utilizando IATF e trabalhando com um protocolo a base de implante auricular de progesterona, valerato de estradiol e GnRH como indutor da ovulação, alcançaram taxas de prenhez com sêmen sexado de 41,8% e convencional de 51,8%, não observando diferença estatística entre os grupos experimentais, até mesmo na taxa de prenhez em relação ao momento da inseminação 54 ou 60 horas após retirada do implante. Apesar dos referidos autores utilizarem um protocolo diferente do estudo em evidência, o momento das inseminações pode ter favorecido os resultados semelhantes na taxa de prenhez.

Tabela 1 - Taxa de concepção (TC) de vacas inseminadas artificialmente em tempo fixo com sêmen convencional (G1-CONV) ou sexado (G2-SEX).

Grupos	N	TC (Nº de vacas prenhes)	P
G1-CONV	30	60,0% (18)	0,12
G2-SEX	30	40,0% (12)	0,12
TOTAL	60	50,0% (30)	---

Em divergência aos resultados encontrados no presente estudo, Barbosa et al. (2011) obtiveram taxa de concepção de 25,0% quando as inseminações foram realizadas 60h após retirada a fonte de progesterona exógena. Esses achados podem ser justificados pelo fato desses autores, utilizarem em seus estudos novilha, uma diferente categoria e até mesmo devido ao uso de touros distintos.

Seidel Jr. et al. (1999) trabalharam com inseminações usando sêmen sexado ou convencional e demonstraram comprometimento da fertilidade dos animais inseminados com sêmen sexado, em comparação aos submetidos a inseminação com sêmen convencional, atribuindo estes resultados as baixas concentrações espermáticas presentes nas amostras seminais sexadas. No presente estudo, estas diferenças não afetaram a fertilidade.

O atraso das inseminações, no presente estudo, sendo realizada 62 horas após a retirada do progestágeno, é justificado pelo fato do sêmen sexado, ter uma menor viabilidade no trato genital da fêmea (MOCÉ et al., 2006), e sua capacitação ser mais rápida, quando comparada ao sêmen convencional (LU et al., 2004). Baseado nos trabalhos de Baruselli et al. (2006) e Sales et al. (2012), as ovulações ocorrem de 70 a 72 horas após a retirada do implante liberador de progesterona. Portanto, resultados demonstram que o atraso das inseminações 10 a 12 horas antes da ovulação favorece o aumento nas taxas de prenhez quando a IATF é realizada com sêmen sexado (SALES et al., 2011). Neste sentido, vários estudos (SOUZA et al., 2008; BARBOSA et al., 2011; SALES et al., 2011) também constataram aumento na taxa de prenhez com sêmen sexado, quando as inseminações foram realizadas 60 horas após a remoção da progesterona em comparação aquelas realizadas 54 horas, após a retirada do implante. No presente estudo as inseminações foram feitas, 62 horas após a retirada do implante, o que possibilitou uma taxa de prenhez satisfatória tanto para o grupo G1-CONV quanto para o grupo G2-SEX.

Conclusões

O protocolo possibilitou aos animais inseminados com sêmen sexado 62 horas após a retirada do dispositivo intravaginal, alcançarem

taxas de concepção próximas às fêmeas inseminadas com sêmen convencional, tornando assim, satisfatória a utilização comercial do sêmen sexado em programas de inseminação artificial em tempo fixo.

Agradecimentos

A Fazenda Estrela do Oriente por ceder os animais, ao laboratório MSD Saúde Animal pelo fornecimento dos hormônios necessários para realização dos protocolos de sincronização e à central CRV Lagoa pelo fornecimento das doses de sêmen necessárias para realizar esse estudo.

Referências

- ANDRADE, B.H.A.; FERRAZ, P.A.; RODRIGUES, A.S.; LOIOLA, M.V.G.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L. Eficiência do cipionato de estradiol e do benzoato de estradiol em protocolos de indução da ovulação sobre a dinâmica ovariana e taxa de concepção de fêmeas nelore inseminadas em diferentes momentos. **Archives of Veterinary Science**, v.17, n. 4, p. 70-82, 2012.
- ASBIA. **Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen**, 2011. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/download/mercado/relatorio2011.pdf>>. Acesso: 17 fev. 2014.
- BARBOSA, L.P.; MENEZES, D.S.; FARIA, E.F.S.; WICKE, A.A.; OLIVEIRA, R.L.; BAGALDO, A.R.; CARDOSO NETO, B.M.; DUTRA, P.A. Inseminação artificial em tempo fixo utilizando sêmen sexado em novilhas leiteiras. **Magistra**. Cruz das Almas, v. 23, n. 3, p. 146-148, 2011.
- BARUSELLI, P.S.; AYRES, H.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M.; GIMENES, L.U.; TORRES-Jr, J.R.S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 2, 2006, Londrina, PR. *Anais São Paulo*, SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. v. 1, p. 113-132, 2006.
- BARUSELLI, P.S.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S.; AYRES, H.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; ARRUDA, R.P. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 374-381, 2007.
- BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M.; SALA, R. V.; NEVES, K.A.L. Estratégias del uso eficiente de sêmen sexado em bovinos. **SPERMOVA**, v. 1, n. 1, p. 14-25, 2011.
- BODMER, M.; JANETT, F.; HÄSSIG, M.; DES DAAS, N.; REICHERT, P.; THUN, R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. **Theriogenology**, v. 64, p. 1647-1655, 2005.
- DeJARNETTE, J.M.; McCLEARY, C.R.; LEACH, M.A.; MORENO, J.F.; NEBEL, R.L.; MARSHALL, C.E. Effects of 2.1 and 3.5 x 10⁶ sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 9, p. 4079-4085, 2010.
- INFORZATTO, G.R.; SANTOS, W.R.M.; CLIMENI, B.S.O.; DELLALIBERA, F.L.; FILADELPHO, A.L. Emprego de IATF (Inseminação Artificial em Tempo Fixo) como alternativa na reprodução da pecuária de corte. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 11, p. 1-8, 2008.
- HOUGHTON, P.L.; LEMENAGER, R.P.; MOSS, G.E.; HENDRIX, K.S. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. **Journal Animal Science**, v. 68, p.1428–1437. 1990.
- LU, K.H.; SEIDEL, Jr G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage rates of bovine oocytes inseminate with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 62, p. 819-830, 2004.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J.K.; SCHENK, J.L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an

acrossome reaction. **Theriogenology**, v. 66, p. 929-936, 2006.

RIBEIRO FILHO, A.L. **Indução, sincronização e resincronização do estro e da ovulação em vacas zebuínas**. Belo Horizonte. Escola de Veterinária da UFMG, 2001.133p. (Tese Doutorado).

SALES, J.N.S.; NEVES, K.A.L.; SOUZA, A.H.; CREPALDI, G.A.; SALA, R.V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E.P.; FARIA, M.; SÁ FILHO, M.F.; BARUSELLI, P.S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 76, p. 427-435, 2011.

SALES, J.N.S.; CARVALHO, J.B.P.; CREPALDI, G.A.; CIPRIANO, R.S.; JACOMINI, J.O.; MAIO, J.R.G.; SOUZA, A.H.; NOGUEIRA, G.P.; BARUSELLI, P.S. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus* cows submitted to a timer artificial insemination protocol. **Theriogenology**, v. 78, p. 510-516, 2012.

SAMPAIO, I.B.M. **Estatística Aplicada a Experimentação Animal**. Belo Horizonte: **Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia**; 1998.

SÁ FILHO, M.F.; SALES, J.N.S.; GIROTTO, R.; PENTEADO, L.; CAMPO FILHO, E.P.; BARUSELLI, P.S. Optimizing the use of sexed semen and reducing animal handling during timed artificial insemination programs in suckled Nelore cows. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38 (Suplemento 2): p. 738, 2010.

SEIDEL Jr, G.E.; SCHENK, J.L.; HENICKHOFF, L.A.; DOYLE, S.P.; BRINK, Z.; GREEN, R.D.; CRAN, D.G. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1407-1420, 1999.

SEIDEL Jr, G.E.; SCHENK, J.L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 129-138, 2008.

SOUZA, A.H.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; TEIXEIRA, A.A.; BARUSELLI, P.S. Effect of type of semen (sexed vs non-sexed) and time of AI (60h vs 64h) on pregnancy rates of postpartum Nelore cows inseminated in a fixed time. **Animal Reproduction science**, v. 6, n. 1, p. 224, 2008.

Recebido: em 27/03/13
Aceito: em 17/02/14