KEDSON ALESSANDRI LOBO NEVES

**Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação na
taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em
tempo fixo com sêmen sexado**

São Paulo
2010

KEDSON ALESSANDRI LOBO NEVES

Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado

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 Ciências

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo
2010

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2341
FMVZ

Neves, Kedson Alessandri Lobo

Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado / Kedson Alessandri Lobo Neves. -- 2010.
89 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2010.

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

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Vaca Nelore. 2. Sêmen sexado. 3. IATF. 4. Ovulação.
5. Ressincronização. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética para uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito intervalo inseminação-ovulação na taxa de prenhez de vacas nelores submetidas ao protocolo de IATF com sêmen sexado", protocolado sob o nº1807/2009, utilizando 350 (trezentos e cinquenta) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética para uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 25/11/2009.

We certify that the Research "Effect of interval between insemination ovulation on pregnancy rate in cows subjected to TAI protocol with sexed semen", protocol number 1807/2009, utilizing 350 (three hundred fifty) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethics Committee for animal use" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo was approved in the meeting of day 11/25/2009.

São Paulo, 30 de novembro de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP - Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55-11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NEVES, Kedson Alessandri Lobo

Título: Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado.

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 Ciências

Data: ____ ____ ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

*“Educação não transforma o mundo.
Educação muda pessoas.
Pessoas transformam o mundo.”
(Paulo Freire)*

DEDICO

Aos meus pais, Alvalinda Lobo Neves e Everton Francisco Ferreira Neves,

A minha esposa Mary Glaucy Brito Chianca Neves,

A meus filhos Amanda Chianca Neves, Juliana Chianca Neves e Lucas Chianca Neves,
por serem minha inspiração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser meu guia.

Agradeço a minha família pelo apoio.

Agradeço ao Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, pela orientação neste trabalho, pelos conselhos e amizade.

Ao Profs. Drs. William Gomes Vale e Rubens Paes Arruda, por aceitarem o convite para comporem minha banca de defesa.

Ào amigo Antônio Humberto Hamad, responsável pela minha vinda para São Paulo.

Ào amigo Manoel Francisco de Sá filho, pelo apoio incondicional na realização do meu experimento, ao convívio, as conversas sempre produtivas.

A amiga Isadora Karolina Freitas de Sousa, pelo apoio sempre presente na estruturação da dissertação, pelos incentivos, convivência e amizade.

Aos colegas de pós graduação do VRA-FMVZ, José Nélío, Gabriel Crepaldi, Henderson Ayres, Roberta Ferreira, Alessandra Ambrósio, Lindsay Gimenes, Paulo Cavalcanti, Rodrigo Otávio, Eduardo Galtieri, Everton, Marcílio Nichi, Lilian Kirsch, Guta Alonso, Cristina, Júlia Baldrighi, pelos bons momentos passados juntos.

Aos colegas de pós graduação do VCM-FMVZ Carol Araújo, Frederico Rodrigues, Leonardo Frasson, VCI Ewaldo Matos Jr., VPS Herbert Sousa, pela amizade e apoio no período do Mestrado.

Agradeço aos Professores .do VRA-FMVZ-USP Prof. Dr. José Antônio Visintin, Prof. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Avila Assunção, Prof. Dra. Camila Vanuchi, Prof. Dr. Cláudio Alvarenga, Prof. Dr. Rubens Paes Arruda, Prof. Dr. Ed Hoffman Madureira, Prof. Dr. Marcelo Guimarães, Prof. Dra. Valquiria Barnabé, Prof. Dr. Renato Barnabé, Prof. Dra. Annelise Traldi e Prof. Dra. Eneiva Carla Celeghini.

Agradeço ao Prof. Dr. Enrico Lippi Ortolani pelas conversas sempre prazerosas.

As secretarias do departamento de reprodução animal da FMVZ-USP, Harumi Shiraishi, Thaís Soto e Maria Alice pelo auxílio, competência e amizade.

Aos funcionários do VRA, em especial Dona Sílvia, Dona Áurea, Miguel e Belau, pelos sorrisos e bom humor sempre demonstrados.

As funcionárias da Biblioteca Elsa, Elena, pela colaboração na verificação das normas para publicação e produção da ficha catalográfica desta dissertação.

A Agência Paulista de Tecnologias dos Agronegócios– APTA- Colina na pessoa do seu Diretor Dr. Flávio Dutra de Resende, e aos pesquisadores Marcelo Henrique de Faria e Gustavo Resende Siqueira pelo apoio na realização do experimento.

Aos campeiros da APTA – Colina, José Carlos Meneguelo, Luiz Cardoso de Sá, Roberto Borges de Carvalho, que colaboraram e não mediram esforços no manejo dos animais.

Agradeço as secretárias da APTA- Colina, Sueli Machado, Flora Camolese, Dulcinéia Gomes e Vitória Catani, pela disponibilidade em sempre atender nossos pedidos.

A D. Francisca, responsável pela hospedaria e aos pós graduandos Raul, Ernani, Geraldo e Aníbal aos estagiários APTA Letícia, Paula, Natália, Ricardo, pela convivência harmoniosa, no período do experimento.

Aos estagiários que estiveram comigo durante a realização do experimento, Juliana Belico, Adriana, Rainéria do Valle e Tomás.

Aos Veterinários Rodrigo Sala, Raphael Oliveira, Isabela Barros, Isadora Karolina e Renan Fernandes, Júlia Baldrighi que me acompanharam durante o experimento.

Ao Dr. Evanil Campos, diretor da empresa Sexing Technologies no Brasil, pela doação da sexagem do sêmen, Ourofino pelo doação dos Implantes e fármacos, a CRV Lagoa pela doação do sêmen.

As Faculdades Integradas do Tapajós, na pessoa do seu diretor Prof. Hêlvio Arruda, pela oportunidade de realização do mestrado e pela bolsa concedida no período.

As coordenadoras do curso de Ciências Biológicas e Medicina Veterinária da FIT, professoras. Gina Cyntia do Vale e Ana Patrícia Moreira pelo apoio e amizade.

RESUMO

NEVES, K. A. L. N. **Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado.** [Effect of interval between insemination and ovulation in conception rates in Nelore cows timed AI with sex-sorted semen], 2010. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

A identificação do momento mais apropriado para realizar a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) utilizando sêmen sexado pode aumentar a prenhez por inseminação (P/IA) e aumentar a utilização do sêmen sexado em fazendas de corte. Este trabalho teve por objetivo avaliar o melhor intervalo entre a inseminação e a ovulação na P/IA de vacas Nelore lactantes submetidas ao protocolo de IATF utilizando sêmen sexado. Um total de 339 vacas Nelore apresentando 30 a 60 dias pós-parto da fazenda experimental da APTA, em Colina-SP foram utilizadas. No início do tratamento as fêmeas receberam um dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona (Sincrogest[®], Ourofino Saúde Animal) e a aplicação i.m de 2mg de BE (Sincrodiol[®], Ourofino). Após oito dias, o dispositivo foi removido e aplicados via i.m 0,25 mg de cloprostenol sódico (Sincrocio[®], Ourofino) e 300UI de eCG (Folligon[®], Intervet-Schering Plough). As vacas foram homogeneamente distribuídas para receberem IATF com sêmen sexado de um único touro da raça Angus (2.1milhões de espermatozóides por dose) às 36, 48 e 60 horas após a retirada dos dispositivos. O intervalo entre as inseminações e ovulações foi determinado e as análises realizadas comparando a taxa de prenhez entre os intervalos. Exames ultrassonográficos (7.5MHz, CTS-3300V, SIUI, China) foram realizados duas vezes ao dia, a partir da retirada do implante até 96 horas após e aos 30 pós IA para realização do diagnóstico de gestação. A P/IA foi definida como o número de fêmeas prenhes divididas pelo número de fêmeas inseminadas em cada intervalo. Os dados encontrados foram analisados usando o programa estatístico SAS. A taxa de ovulação após o protocolo foi de 92.0 % (312/339), o diâmetro do folículo ovulatório de $14,7 \pm 2,3$ mm e o intervalo entre retirada do dispositivo e ovulação de 71.8 ± 7.7 horas [48 horas (6.73%; 21/312), 60 horas (0.64%; 2/312), 72

horas (80.77%; 252/312), 84 horas (11.22%; 35/312), e 96 horas (0.64%; 2/312)]. A P/IA aumentou conforme se atrasou o momento da inseminação: 36 horas (5,8%; 5/86)^c, 48 horas (20.8%; 27/130)^b e 60 horas (30.9%; 38/123)^a. A P/IA foi maior quando as inseminações foram realizadas próximas ao momento da ovulação (0 a 12 horas antes da ovulação = 37,9 %; 35/95) do que as realizadas entre 12,1 a 24 horas (19,4%; 21/108; P = 0,05) ou com mais de 24 horas (5,8%; 5/87; P = 0,0001) antes da ovulação sincronizada. Vacas recentemente ovuladas tiveram P/IA semelhante às realizadas próximo ao momento da ovulação (36,4%; 8/22; P = 0,95). Concluiu-se que a P/IA utilizando sêmen sexado é aumentada quando as inseminações são realizadas próximas a ovulação sincronizada. No experimento 2, de ressincronização, foram avaliadas, as taxas de serviço, concepção e prenhez em vacas previamente sincronizadas e inseminadas em tempo fixo. Foram formados dois grupos: observação de estro e IATF, utilizando na IA sêmen sexado e convencional. Os resultados para os grupos observação de estro e IATF foram, respectivamente: taxa de serviço [(63,5% (61/96); 100% (88/88)], taxa de concepção [(41% (25/61); 11,4% (10/88)], taxa de prenhez [(26% (25/96); 11,4% (10/88)]. Os resultados para os grupos observação de estro e IATF de acordo com o tipo de sêmen utilizado foram, respectivamente: sêmen convencional taxa de concepção [(43,3% (13/30); 14,9% (7/47))]; taxa de prenhez [(27,49% (13/61); 14,9% (7/47))]; sêmen sexado taxa de concepção [(38,7% (12/31); 7,3% (3/41))]; taxa de prenhez [(24,57% (12/61); 7,3% (3/41))].

Palavras-chave: Vaca Nelore. Sêmen sexado. IATF. Ovulação. Ressincronização.

ABSTRACT

NEVES, K. A. L. **Effect of interval between insemination and ovulation in conception rates in Nelore cows timed AI with sex-sorted semen.** [Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado]. 2010. 89f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

The identification of most appropriate moment to perform the timed artificial insemination (TAI) using sex-sorted semen following synchronization protocol can be important to improve the fertility of sex-sorted semen and increase the use sexed semen technology in commercial beef farms. The aim of this study was evaluated the better interval to perform the TAI relative to synchronized ovulation in suckled cows. A total of 339 suckled multiparous Nelore cows from an experimental farm (APTA), in Colina-SP, were evaluated in this study. The protocol started between 30 and 60 days post-partum. Cows received one synchronization protocol using an intravaginal device containing 1.0g of progesterone (Sincrogest[®], Ouro Fino) plus an i.m. injection of 2.0mg of EB (Sincrodiol[®], Ouro Fino). Eight days later, the device was removed and 0.25mg i.m. injection of cloprostenol sodium (Sincrocio[®], Ouro Fino) and 300IU of eCG (Folligon[®], Intervet-Shering Plough) were administered. Cows were homogenously assigned to receive TAI using sex-sorted semen from a single sire (2.1 millions of sperm cell per straw) at 36, 48 or 60 hours after device removal. The TAI to ovulation interval of synchronized cows was determined and the analysis was performed to compare the pregnancy for TAI performed at various intervals before ovulation using 12 hours time intervals. Ovarian ultrasonographic examinations (CTS-3300V, SIUI, China) were performed twice daily from day of the device removal to 96 hours afterwards, to evaluate ovarian follicular dynamics and interval from device removal to ovulation. All females were examined for pregnancy 30 days after AI. The data were analyzed using the SAS program. Incidence of ovulation after the estrous synchronization protocol was 92.0 % (312/339). Diameter of ovulatory follicle was 14.7 ± 2.3 mm and the interval between the P4 device removal and synchronized ovulation occurrence was 71.8 ± 7.7 hours. The

distribution of the synchronized ovulation relative to the device removal was: 48 hours (6.73%; 21/312), 60 hours (0.64%; 2/312), 72 hours (80.77%; 252/312), 84 hours (11.22%; 35/312), and 96 hours (0.64%; 2/312). The pregnancy per artificial insemination (P/AI) was increased ($P < 0.001$) when the TAI was delayed 36 hours (5.8%; 5/86)^c, 48 hours (20.8%; 27/130)^b and 60 hours (30.9%; 38/123)^a. Higher P/AI was achieved on TAI performed closer to ovulation (0 to 12 hours before ovulation = 37.9 %; 35/95) than TAI performed on 12.1 to 24 hours (19.4%; 21/108; $P = 0.05$) or > 24 hours (5.8%; 5/87; $P = 0.0001$) before the synchronized ovulation. Recently ovulated cows had P/AI similar to those performed around the time of ovulation (36,4%; 8/22). In conclusion, P/AI is increased when the TAI using sex-sorted is performed closer to synchronized ovulation in suckled Nelore cows. In experiment 2, resynchronization, were assessed the service rates, conception and pregnancy in cows previously synchronized and timed AI. Two groups were formed: estrous detection and TAI, using in AI, sexed and unsexed semen. The results for groups of estrus detection and TAI were, respectively, service rate [(63.5% (61/96) 100% (88/88)], conception rate [(41% (25/61), 11.4% (10/88)], pregnancy rate [(26% (25/96), 11.4% (10/88))]. The results for groups of estrus detection and TAI according the type of semen used were: conventional semen conception rate [(43.3% (13/30), 14.9% (7 / 47))] ; pregnancy rate [(27.49% (13/61), 14.9% (7 / 47))]; sexed semen conception rate [(38.7% (12/31) 7.3% (3 / 41))]; pregnancy rate [(24.57% (12/ 61), 7.3% (3 / 41))].

Keywords: Nelore cows. Sexed semen. TAI. Ovulation. Resynchronization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagrama experimental do protocolo de sincronização de vacas Nelore lactantes usando sêmen sexado.....	45
Figura 2 -	Diagrama experimental do protocolo ressincronização: Grupos IATF e observação de estro.....	46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Frequência de ovulação após a retirada do dispositivo intravaginal de progesteron em vacas Nelore lactantes (n=312).....	57
Gráfico 2 -	Momento da inseminação artificial em relação à retirada do dispositivo de progesterona sobre a taxa de concepção.....	58
Gráfico 3 -	Taxa de concepção após a IATF em diferentes intervalos para a ovulação.....	60
Gráfico 4 -	Taxa de serviço, concepção e prenhez na ressincronização nos grupos IATF e observação de estro ($P < 0,001$).....	61
Gráfico 5 -	Taxa de serviço, concepção e prenhez na ressincronização nos grupos IATF e observação de estro de acordo com o tipo de sêmen utilizado (convencional ou sexado).....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Diâmetro do folículo ovulatório (FO) de acordo com o intervalo entre a retirada do dispositivo de progesterona e a ovulação em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado - Colina, SP – Dezembro de 2009 a Março de 2010.....	56.
Tabela 2 -	Risco de concepção conforme o intervalo entre a IATF e a ovulação em vacas Nelore inseminadas com sêmen sexado - Colina, SP – Dezembro de 2009 a Março de 2010.....	59
Tabela 3 -	Taxa de serviço, concepção e prenhez na ressincronização nos grupos IATF e observação de estro de acordo com o tipo de sêmen utilizado (convencional ou sexado) em vacas Nelore - Colina, SP – Dezembro de 2009 a Março de 2010.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AATT	-	Aminoácidos Adenina e Timina
ASBIA	-	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
BE	-	Benzoato de Estradiol
CE	-	Cipionato de Estradiol
CL	-	Corpo Lúteo
DNA	-	Ácido desoxirribonucléico
D	-	Dia
ECC	-	Escore de Condição Corporal
eCG	-	Gonadotrofina Coriônica Equina
FSH	-	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	-	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
IA	-	Inseminação Artificial
IATF	-	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IM	-	Intramuscular
Nm	-	Nanômetro
MAPA	-	Ministério da Agricultura, Abastecimento e Pecuária
MHz	-	Mega Hertz
mg	-	Miligrama
ml	-	Mililitro
mm	-	Milimetro
P	-	Nível de Significância
PGF	-	Prostaglandina
PH	-	Potencial Hidrogeniônico
Psi	-	Unidade de pressão sistema Inglês
TRIS	-	Meio Diluidor de Sêmen
UI	-	Unidade Internacional
US	-	Ultrassonografia
USDA	-	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos das Américas

USP	-	Universidade de São Paulo
UV	-	Ultravioleta
VE	-	Valerato de Estradiol

LISTA DE SÍMBOLOS

%	-	Porcentagem
=	-	Igual
°C	-	Graus Celsius
®	-	Marca registrada
μ	-	Micro
≤	-	Menor ou igual
≥	-	Maior ou igual
>	-	Maior que
<	-	Menor que
g	-	Grama
g	-	Gravidade
β	-	Beta
μL	-	Microlitro
±	-	Mais ou menos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
2 OBJETIVOS.....	24
3 HIPÓTESES DO TRABALHO.....	25
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	26
4.1 SÊMEN SEXADO.....	26
4.1.1 Histórico.....	26
4.2 PROCESSO DE SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES.....	28
4.2.1 Aplicação de sêmen sexado em bovinos.....	31
4.2.2 Dose inseminate.....	33
4.3 INTERVALO INSEMINAÇÃO – OVULAÇÃO EM BOVINOS.....	35
4.4 PROTOCOLOS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO.....	38
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
5.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO.....	44
5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	45
5.2.1 Experimento 1 - Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação sobre a taxa de concepção de vacas Nelore após IATF utilizando sêmen sexado.....	45
5.2.2 Experimento 2 - Técnicas de ressincronização de fêmeas Nelore após IATF utilizando sêmen sexado.....	46
5.3 TRATAMENTOS.....	47
5.3.1 Experimento 1.....	47
5.3.2 Experimento 2.....	48
5.4 EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS.....	49
5.5 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	50
5.6 PROCESSAMENTO DE SÊMEN E SEXAGEM DOS ESPERMATOZÓIDES.....	50
5.6.1 Colheita de sêmen.....	50
5.6.2 Avaliação do sêmen <i>in natura</i>.....	50
5.6.3 Volume.....	51
5.6.4 Concentração espermática.....	51

5.6.5 Motilidade, vigor e turbilhonamento.....	51
5.6.6 Análise da morfologia espermática.....	52
5.6.7 Sexagem espermática pela técnica de citometria de fluxo.....	52
5.6.8 Criopreservação do sêmen sexado.....	54
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	54
6 RESULTADOS.....	56
6.1 TAXA DE OVULAÇÃO.....	56
6.2 DIÂMETRO DO FOLÍCULO OVULATÓRIO.....	56
6.3 MOMENTO DE OVULAÇÃO.....	57
6.4 TAXA DE CONCEPÇÃO DE ACORDO COM O HORÁRIO DA IATF APÓS RETIRADA DO DISPOSITIVO DE PROGESTERONA.....	58
6.5 TAXA DE CONCEPÇÃO DE ACORDO COM O INTERVALO ENTRE A IATF E A OVULAÇÃO	59
6.6 TAXA DE SERVIÇO, CONCEPÇÃO E PRENHEZ NOS GRUPOS SUBMETIDOS À OBSERVAÇÃO DE ESTRO SEGUIDO DE IA OU INSEMINADOS EM TEMPO FIXO APÓS A PRIMEIRA IATF.....	60
6.7 TAXA DE SERVIÇO, CONCEPÇÃO E PRENHEZ NA RESSINCRONIZAÇÃO NOS GRUPOS IATF E OBSERVAÇÃO DE ESTRO DE ACORDO COM O TIPO DE SÊMEN (CONVENCIONAL OU SEXADO).....	61
7 DISCUSSÃO.....	63
8 CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS.....	71

1 INTRODUÇÃO

A pecuária bovina brasileira atualmente ocupa papel de destaque no cenário mundial, sendo o Brasil o maior exportador de carnes e possuindo o maior rebanho do mundo (FAO, 2010). No ano agrícola 2008/2009 o Brasil produziu 7,8 milhões de toneladas de carne em equivalente-carcaça e exportou 1,6 milhões, detendo uma participação na exportação mundial de 22% (ABIEC, 2010). O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em recente estudo, prevê crescimento de 2,15% ao ano na produção de carne bovina até 2020. Com isso, a expectativa é de que a produção ao final desse período seja de 9,92 milhões de toneladas em equivalente-carcaça. Com essa evolução, a participação do Brasil no comércio mundial será de 42,7% no final da década (BRASÍLIA, 2010). Esse avanço no cenário da pecuária mundial está relacionado a diversos fatores, como: o sanitário, através do controle da febre aftosa, brucelose e tuberculose e implantação de um sistema confiável de rastreabilidade bovina, bem como a utilização em maior escala de biotecnologias reprodutivas, o que tem contribuído para a melhoria genética e dos índices produtivos.

A inseminação artificial é a biotecnologia reprodutiva que apresenta grande impacto no melhoramento genético do rebanho bovino, permitindo a seleção de animais superiores, revertendo seu uso em ganhos econômicos ao produtor pelo aumento da produtividade. No entanto, a inseminação artificial convencional apresenta baixa taxa de serviço em rebanhos de corte, devido a falhas na detecção de estro (GALINA et al., 1996) e a alta incidência de anestro pós-parto (RUIZ-CORTEZ; OLIVEIRA-ANGEL, 1999). Em *Bos indicus*, essa situação é ampliada devido à grande expressão de cio noturnos, com curta duração (PINHEIRO et al., 1998; BARUSELLI et al., 2004). O número de fêmeas inseminadas tem aumentado no Brasil nos últimos anos, visto que em 2009, foram comercializadas 9,2 milhões de doses, aumento de 11,6% em relação a 2008 e com previsão de crescimento de 20% para 2010 (ASBIA, 2010). Esse aumento do número de fêmeas inseminadas no Brasil tem sido possível pela utilização da inseminação artificial em tempo fixo (IATF), técnica que elimina o grande entrave da inseminação artificial (IA), que é a observação de cio, e possibilita o restabelecimento da ciclicidade ovariana pós-parto (RHODES et al., 2002; SOTO BELLOSO et al., 2002; BARUSELLI et al., 2002). Os

avanços na manipulação do ciclo estral e o controle da sincronização do desenvolvimento folicular e ovulação foram decisivos para a utilização de biotécnicas como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) que está permitindo a difusão de material genético superior em rebanhos leiteiros e de corte (BARUSELLI et al., 2007).

Os protocolos hormonais que possibilitam o uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) têm mostrado acomodação de preços no mercado nacional, possibilitando a sua utilização em larga escala. Atualmente os índices de concepção alcançados são satisfatórios, tanto em vacas como em novilhas, melhorando a eficiência reprodutiva e aumentando o número de animais prenhes no início da estação reprodutiva (BARUSELLI et al., 2002).

Com o avanço da técnica de IATF no Brasil, a utilização de sêmen sexado em programas de IA tem ganhado importância crescente, visto a necessidade dos produtores de leite por fêmeas e dos produtores de corte por machos para abate. Ainda rebanhos elite direcionam suas necessidades para produção de macho ou fêmea, dependendo da demanda do mercado pecuário. Adicionalmente, o uso do sêmen sexado, permite selecionar as matrizes potenciais nos rebanhos, produzindo novilhas de reposição apenas de animais melhoradores. Com a utilização do sêmen sexado é possível elevar o ganho genético em até 15% comparado ao sêmen convencional (WEIGEL, 2004). Aliado a isto há redução de custos de programas de teste de progênie e de transferência de embriões e, também do valor de marcadores genéticos (WEIGEL, 2004).

O interesse pela determinação do sexo tem acompanhado o uso da IA e diversas tentativas foram realizadas sempre com resultados negativos. Entretanto, no início dos anos 80 o desenvolvimento do citômetro de fluxo permitiu a separação dos espermatozóides X e Y sem que ocorressem danos severos às células. Essa tecnologia foi considerada um marco divisório na sexagem de espermatozóides (GARNER; SIEDEL, 2003).

A maioria dos experimentos com sêmen sexado foram conduzidos em novilhas leiteiras inseminadas após detecção de estro e ainda existem poucas pesquisas com inseminação em tempo fixo usando sêmen sexado em vacas zebuínas lactantes, para identificar o melhor intervalo entre a inseminação e a ovulação para obtenção de taxas aceitáveis de prenhez. A possibilidade de

ressincronização para melhorar a taxa de serviço e prenhez na segunda IA utilizando sêmen sexado também carece de estudos.

2 OBJETIVOS

Considerando a necessidade de informações mais precisas sobre o melhor momento para realização de IATF utilizando sêmen sexado em vacas Nelore lactante, os objetivos desta pesquisa foram:

- Avaliar o efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação (inseminação 0 a 12 horas, 12 a 24 horas e mais que 24 horas antes da ovulação) na taxa de concepção de vacas Nelore lactantes submetidas à Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com sêmen sexado.
- Avaliar a taxa de serviço, concepção e prenhez nos grupos submetidos à observação de estro seguido de IA ou inseminados em tempo fixo após IATF com sêmen sexado e convencional.

3 HIPÓTESES DO TRABALHO

As hipóteses deste trabalho são:

- Vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado terão melhores taxas de concepção quando inseminadas próximas à ovulação (aproximadamente 0 a 12 horas para o sêmen sexado).
- Vacas Nelore re-inseminadas em tempo fixo após IATF terão maiores taxa de serviço e prenhez comparadas a vacas re-inseminadas com observação de estro.

4 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta revisão serão abordados assuntos referentes ao sêmen sexado, intervalo entre inseminação e a ovulação, sincronização de estro e ovulação para inseminação em tempo fixo (IATF).

4.1 SÊMEN SEXADO

A tecnologia do sêmen sexado tem despertado interesse crescente em sistemas de produção de bovinos de leite e corte. A possibilidade de aumentar a produção de produtos do sexo desejado tem impacto sobre a estrutura e os resultados econômicos da indústria de laticínios e da carne bovina. A tecnologia de sexagem de espermatozóides tem evoluído principalmente no incremento do número de espermatozóides sexados por hora e menores danos aos espermatozóides no processo de sexagem. Apesar do sucesso do sêmen sexado, existe ainda a necessidade em determinar o momento mais apropriado para a realização da inseminação artificial usando protocolos de sincronização do estro e ovulação.

4.1.1 Histórico

A seleção do sexo sempre entusiasmou cientistas em todo o mundo, porém, este entusiasmo esteve sempre acompanhado de grandes frustrações pela falta de entendimento dos princípios básicos que governam a determinação do sexo em mamíferos (GARNER; SEIDEL, 2008).

A identificação dos cromossomos sexuais humanos foi primeiramente relatada por Painter (1923) e somente em 1959, a presença do cromossomo Y foi identificada como o principal fator para determinação do sexo masculino em humanos e ratos (WILHELM et al., 2007).

Em 1971, foi realizado um simpósio na universidade do estado da Pensilvânia, nos Estados Unidos para discutir a sexagem de espermatozóides e predição do sexo das crias em sistemas de produção animal (KIDDY; HAFS, 1971). Porém, apesar do entusiasmo gerado, não foi relatado avanço na técnica de sexagem.

O primeiro avanço significativo ocorreu quando um laboratório americano de armas, Lawrence Livermore National Laboratory (LLNL), estudava os efeitos da radiação em seres humanos usando o esperma de ratos como modelo para indicar danos ao DNA em células germinais (GARNER; SEIDEL, 2008). Em 1976, ocorreram os primeiros experimentos com estabilidade de DNA espermático de ratos e outros mamíferos, utilizando o citômetro de fluxo, porém os resultados foram inconsistentes, devido à forma achatada da cabeça do espermatozóide (GLEDHILL et al., 1976).

O problema foi resolvido por um citômetro desenvolvido por Dr. Daniel Pinkel, que modificou o sistema para orientar o espermatozóide de frente para o feixe de laser, permitindo a mensuração correta do conteúdo de DNA, usando o lado achatado da cabeça do espermatozóide (PINKEL et al., 1982). Estas modificações foram relevantes para detecção de diferenças no cromossomo X e Y do DNA espermático de bovinos, ovinos, suínos e coelhos (GARNER et al., 1983).

Neste estágio da sexagem, o método apesar de efetivo na separação do cromossomo X e Y, lesava a célula espermática devido à remoção da cauda e a remoção da membrana para acessar e corar o núcleo com o corante 4-6-diamino-2-fenilindol (DAPI), matando os espermatozóides (GARNER et al., 1983; SEIDEL, 2007).

Um refinamento da técnica de coloração permitiu a sexagem sem lesão severa ao esperma, com a substituição do corante de DNA (JOHNSON et al., 1987a), não sendo mais necessário a remoção da membrana nuclear do espermatozóide. Para alcançar este resultado eles usaram o corante de DNA com acesso de membrana plasmática íntegra bisbenzimidazol, Hoeschst 33342.

No entanto, o primeiro uso documentado dessa coloração de DNA em esperma vivo de mamíferos foi realizado por Morrell et al. (1989), que usou sêmen de touro e coelho para inseminação, obtendo crias saudáveis, no entanto a pureza do sêmen sexado nesse experimento não foi claramente determinada.

Em 1989, foi relatado o nascimento de crias saudáveis de coelhos oriundas de sêmen sexado, aonde pela primeira vez na história o sexo foi determinado na concepção pela sexagem de populações de esperma de cromossomos X e Y corados pelo Hoeschst 33342 e inseminados cirurgicamente nos ovidutos de coelhos (JOHNSON et al., 1989).

O método de sexagem desenvolvido por Johnson et al. (1987a,b; 1989; 1999) e conhecido como Beltsville Sperm Sexing Technology, usando o citômetro de fluxo e o corante de DNA Hoeschst 33342, continua sendo o único método comercial confiável para separar populações de espermatozóides vivos de mamíferos (SEIDEL; GARNER, 2002; WEIGEL, 2004; SEIDEL, 2007). Esta tecnologia de sexagem de sêmen foi patenteada pelo USDA e licenciada para a Fundação de pesquisa da Universidade do Estado do Colorado, e XY Inc., (Fort Collins) que adaptou a produção comercial para sêmen bovino (SEIDEL; SCHENK, 2008).

4.2 PROCESSO DE SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES

Os mamíferos produzem sêmen onde 50% dos espermatozóides carregam o cromossomo X e 50% carregam o cromossomo Y, sendo idênticos em tamanho, peso, carga elétrica, e velocidade de deslocamento (GARNER; SEIDEL, 2008).

O princípio básico da sexagem está relacionado com a diferença no DNA espermático, o cromossomo X apresenta 4,0% mais DNA do que o cromossomo Y em bovinos (GARNER et al., 1983). No entanto existe uma diferença no conteúdo de DNA espermático entre raças, esta diferença, apesar de pequena, é possível de mensuração do conteúdo de DNA espermático com acurácia de 90% entre espermatozóides X e Y, em 50% do esperma, sendo os 50% restantes descartados como não sexados e 10% de taxa de erro dos sexados no processo (SEIDEL; GARNER, 2002).

O conteúdo de DNA do espermatozóide é determinado usando o corante fluorescente, Hoechst 33342 (H33342) (trihidrato de trihidrocloroeto, invitrogenTM Molecular probes, Eugene, Oregon, USA) que penetra rapidamente na membrana celular do espermatozóide e se liga a quatro pares de base AATT na curvatura menor da dupla hélice do DNA (GARNER, 2009).

As células espermáticas coradas ao passarem pelo citômetro de fluxo, através do *nozzle tip* (CytonozzoleTM) são divididas em pequenas gotículas devido a vibrações na coluna fluída por um mecanismo piezoelétrico, são formadas em média 70.000 a 80.000 mil gotículas por segundo, sendo que um terço (1/3) das gotículas contém o espermatozóide e dois terços (2/3) apresentam-se vazias. As gotículas com espermatozóide são expostas ao laser UV VanguardTM, emitem uma fluorescência azul de 351 e 364 nm de comprimento de onda (JOHNSON, 2000), as gotículas são analisadas pelo computador, e recebem uma carga elétrica antes de passarem pelo fluxo eletrostático para separação. Espermatozóides X recebem carga positiva e Espermatozóides Y recebem carga negativa, gotículas sem espermatozóides, com vários espermatozóides, espermatozóides lesados, ou sem distinção do DNA espermático, não recebem carga elétrica. O feixe de gotículas, contendo os espermatozóides ao deixarem o *nozzle* a uma velocidade de 80 km/h, passa por um campo elétrico positivo de um lado e negativo de outro, atraindo as cargas opostas, gotículas com carga positiva, contendo um espermatozóide X, deslocam-se para o lado negativo do campo e gotículas com carga negativa, contendo um espermatozóide Y, deslocam-se para o lado positivo do campo, as gotículas sem carga elétrica passam retilíneas no campo.

O feixe de gotículas separadas é recolhido em três tubos coletores, separando o espermatozóide X do Y, no final do processo 20% é composto da fração X e 20% da fração Y, e 60% estão lesados ou não sexados. Posteriormente os tubos são centrifugados e o sedimento contendo o sêmen é diluído na concentração adequada para preservação espermática (RATH et al., 2009).

A eficiência da separação de espermatozóides foi ampliada pela identificação de células mortas ou lesadas, sendo coradas e separadas somente células vivas intactas, isto foi possível pela utilização do iodeto de propídio, onde a membrana plasmática íntegra é impermeável ao corante (JOHNSON et al., 1994).

No fim do processo somente um terço (1/3) do sêmen pode ser separado, caracterizando a baixa eficiência do Hoechst 33342, com limite máximo de acurácia de 90% (SEIDEL; GARNER, 2002). Além disto, perdas de concentração e envase (SEIDEL; GARNER, 2002) e baixa qualidade do ejaculado prejudicam o processo de sexagem (GARNER, 2006).

A sexagem de espermatozóides expõe à suscetibilidade dos gametas a coloração ao Hoechst 33342, à exposição ao laser, diluições elevadas, pressão

elevada, resistência a mudança na composição dos meios durante o processo (MAXWELL et al., 1998) e injúria mecânica (GARNER, 2001; GARNER; SUH, 2002; GARNER, 2006;). No entanto, uma análise da estabilidade do DNA espermático durante e após o processo de sexagem, indica não haver danos significativos a estrutura da cromatina espermática no processo (GARNER; SUH, 2002; SUH et al., 2005).

A redução do sistema de pressão durante o processo de sexagem, de 50 para 40 psi aumentou a sobrevivência dos espermatozóides, e a qualidade do sêmen, diminuindo o nível de danos (CAMPOS-CHILLON; DE LA TORRE, 2003; SUH et al., 2005) e aumentando a proporção de células viáveis recuperadas após a sexagem (GARNER, 2008).

Os riscos genéticos relativos à segurança do uso do sêmen sexado foram avaliados (MEISTRICH, 1996), não sendo detectados efeitos genotóxicos em espermatozóides sexados com Hoechst 33342 (PARILLA et al., 2004). As progênes resultantes do uso do sêmen sexado com Hoechst 33342 e expostos à iluminação Laser, não tem diferido das progênes advindas de sêmen convencional (sem coloração e sem sexagem), quanto à normalidade de nascimento (SEIDEL; GARNER, 2002; TUBMAN et al., 2004; DOYLE et al., 1999).

As diferentes interfaces envolvidas no processo de sexagem de sêmen, como coloração, exposição ao laser UV, diferenças de pressão, diluições, cargas elétricas, injúrias mecânica, tempo necessário para produção de dose inseminante, limitam a viabilidade do sêmen sexado, assim a sobrevivência dos espermatozóides após a sexagem é extremamente importante, considerando os investimentos realizados para a obtenção do sêmen. A criopreservação e a estocagem adequada precisam de cuidados adicionais, o primeiro relato de criopreservação com sucesso de sêmen sexado, mostrou que os métodos de criopreservação convencionais usando gema de ovo e meio tampão Tris funcionaram bem para o sêmen sexado (SCHENK et al., 1999) e o desenvolvimento de métodos de criopreservação reforçada, como o sistema de congelamento de gradiente Multi-Termal, pode aumentar a sobrevivência do sêmen sexado a criopreservação e descongelamento (ARAV et al., 2002). Este avanço permitiu ao processo de sexagem ser realizado próximo do local de coleta do sêmen e as fêmeas serem inseminadas com sêmen sexado independente da distância geográfica (GARNER; SEIDEL, 2008).

O sucesso da criopreservação foi avaliado por diferentes experimentos de campo para avaliar o potencial do uso comercial do sêmen sexado bovino criopreservado (DOYLE et al., 1999; SEIDEL et al., 1999; SEIDEL, 1999; AMANN, 1999).

Embora a separação das células espermáticas, resulte na eliminação de espermatozóides mortos ou com lesão, as células que sobrevivem ao processo de sexagem tendem a se degenerar mais rapidamente do que em sêmen convencional de touros e bodes (MORRIS et al., 2003; RATH et al., 2003), mas , aparentemente, isso não ocorre em sêmen de garanhões (MORRIS et al., 2003) e de carneiros (HOLLINSHEAD et al., 2004). Os ganhos na eficiência da sexagem, criopreservação e estocagem, reduzem o tempo requerido para sexagem de cada dose de sêmen (CENTURION et al., 2003).

4.2.1 Aplicações de sêmen sexado em bovinos

A maioria da sexagem comercial de espermatozóides tem sido com bovinos, após os primeiros relatos de Garner et al. (1983) foram necessários 15 a 20 anos de pesquisa adicional antes que o processo de sexagem estivesse pronto para aplicação comercial em bovinos (DEJARNETTE et al., 2009).

A primeira produção comercial de sêmen sexado foi realizada pela companhia Cogent no Reino Unido (GARNER; SEIDEL, 2008) e no início de 2003 começou a aplicação comercial da tecnologia de sêmen sexado nos Estados Unidos da América, com a concessão da licença de sexagem a empresa Sexing Technologies Inc. (Navasota,TX). O início da comercialização foi relativamente lento, porém em anos subseqüentes aconteceu uma explosão na produção de sêmen sexado, com comercialização de mais de quatro milhões de doses em 2008 (SHARPE; EVANS, 2009).

A aplicação principal do sêmen sexado é a produção de fêmeas para rebanhos leiteiros (SEIDEL, 2009), até o presente momento a maioria das pesquisas e aplicações comerciais para sêmen sexado tem recomendado sua utilização em novilhas virgens, para incrementar a concepção em comparação com vacas lactantes (DEJARNETTE et al., 2009). A taxa de concepção do sêmen sexado situa-

se entre 70 a 80% do sêmen convencional (não sexado) e 90% das crias são do sexo desejado. Estes resultados são baseados em utilização do sêmen sexado preferencialmente em novilhas ao primeiro serviço e mostrando sinais de estro (DEJARNETTE et al., 2009). No entanto existem diferenças entre rebanhos usando sêmen sexado, sendo o nível de manejo um fator importante para aplicação desta tecnologia (GARNER; SEIDEL, 2008).

A reposição de fêmeas para a bovinocultura de corte e leite acelera o ganho genético, pois as fêmeas jovens, produto de sêmen sexado são geneticamente superiores as suas mães. A produção de bezerros a partir das melhores vacas, para produção de touros melhoradores é outra opção atraente aos criadores. Em criações de corte o aumento na produção de carne, pelo número maior de machos, através do uso do sêmen sexado é um importante aspecto econômico a ser considerado (In press¹).

O sêmen sexado pode ser usado em programas de ovulações múltiplas e transferência de embriões (MOET), porém os embriões produzidos serão em menor número e mais variáveis do que com sêmen convencional (não sexado) (SCHENK et al., 2006). Baruselli et al. (2007a) encontraram diminuição do número de embriões transferíveis e congeláveis quando da utilização de sêmen sexado em vacas Nelore superovuladas e inseminadas em tempo fixo, foi verificado ainda pelos autores aumento do número de embriões não fertilizados. Diversos pesquisadores procuraram adequar à dose inseminante e à hora das inseminações em programas de transferências de embriões (PANARACE et al., 2003; SARTORI et al., 2004; SCHENK et al., 2006; BARUSELLI et al., 2008). No entanto mais pesquisas são necessárias para otimizar os protocolos de inseminação artificial (IA) em programas de ovulações múltiplas e transferência de embriões (MOET) para aumentar a produção de embriões, considerando os custos extras associado ao produto sexado e fertilidade ligeiramente menor do sêmen sexado (GARNER; SEIDEL, 2008).

Hayakawa et al. (2009) em recente experimento concluiu que o uso do sêmen sexado congelado, com 5×10^6 espermatozóides por dose, duas vezes ao dia em novilhas holandesas superovuladas resultou em múltiplos embriões predominantemente fêmeas. Vacas apresentam baixa taxa de embriões transferidos comparado com novilhas em condição de campo

¹ SALES, J. N. S.; NEVES, K. A. L.; SOUZA, A. H.; CREPALDI, G. A.; SALA, R. V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHOS, 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 semen. *Theriogenology*, 2010. (In press).

4.2.2 Dose inseminante

O número de espermatozóides por dose criopreservada para inseminação artificial é geralmente de 20×10^6 espermatozóides por palheta. Para a maioria dos touros a fertilidade é satisfatória com 10×10^6 espermatozóides móveis por dose e em alguns a fertilidade continua elevada com 2×10^6 espermatozóides/dose (SEIDEL, 2007; SEIDEL; SCHENK, 2008; FRIJTERS et al., 2009). A variação do número de espermatozóides aptos a fertilizar por dose de sêmen congelado de diferentes touros permite concluir que 20% da população de touros apresentam alta fertilidade e alcançam taxas normais de concepção com baixa população de espermatozóides, no entanto 20% da população de touros são de baixa fertilidade (DEN DAAS et al., 1998).

A sexagem de espermatozóides X e Y usando o citômetro de fluxo têm uma limitação quanto ao tempo necessário para produção de doses necessárias à fertilização. Considerando essa limitação do processo de sexagem e a necessidade de viabilidade comercial, as doses de sêmen sexado contêm somente $2,1 \times 10^6$ espermatozóides e apresentam fertilidade menor quando comparadas ao sêmen convencional (GARNER; SEIDEL, 2003). Segundo Bodmer et al. (2005) uma das razões para a fertilidade diminuída em novilhas leiteiras usando sêmen sexado, seria a combinação da menor dose inseminante, motilidade pós descongelamento, fragilidade do espermatozóide sexado, diferenças no manejo de detecção de estro, horário da IA e manejo sanitário. No entanto Sá Filho et al. (2010) não encontraram diferença na taxa de prenhez de novilhas leiteiras inseminadas com 2 doses de sêmen sexado 12 ou 24 horas após a detecção do estro. Segundo Seidel e Schenk (2008) os danos mecânicos associados ao processo de sexagem, não podem ser compensados com o aumento do número de espermatozóides na proporção de 2 a 6×10^6 espermatozóides por dose na IA de novilhas (In press²).

A fertilidade das doses do sêmen sexado é menor do que as do sêmen convencional, no entanto, somente a quantidade de espermatozóides por dose não explica essa fertilidade diminuída (GARNER; SEIDEL, 2003; BODMER et al., 2005; SCHENK; SEIDEL, 2007). Provavelmente a associação de baixo número de espermatozóides por dose e as lesões provocadas ao esperma no processo de sexagem, expliquem a fertilidade reduzida, porém até a presente data não está

² SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; NICHI, M.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; BARUSELLI, P. S. Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. *Theriogenology*, 2010. (In press).

claramente definido o grau de importância dessas duas variáveis no processo (FRIJTERS et al., 2009). As lesões ao sêmen no processo de sexagem, provavelmente estão ligadas a forças mecânicas associadas ao processo (GARNER; SUH, 2002). Schenk e Seidel (2007) relataram não haver efeito prejudicial na taxa de prenhez entre a intensidade do laser UV e na concentração do Hoechst 33342 estudados.

Após a sexagem, os espermatozóides estão parcialmente capacitados (LU; SEIDEL, 2004), apresentando menor viabilidade de tempo de vida e conseqüentemente menor capacidade fertilizante (VAZQUEZ et al., 2003). Existem diferenças significativas entre touros quanto à qualidade do espermatozóide e a tolerância ao stress no processo de sexagem (BARUSELLI et al., 2007a; SEIDEL; SCHENK, 2008; FRIJTERS et al., 2009).

Tubmam et al. (2004) e Schenk et al. (2005) demonstraram que com bom manejo as taxas de prenhez em novilhas, usando sêmen sexado são ligeiramente menores do que o normal. A concepção em vacas usando sêmen sexado é menor do que em novilhas (BODMER et al., 2005; ANDERSON et al., 2006; BARUSELLI et al., 2007a; SEIDEL, 2007).

Comparando o local de deposição de sêmen, no corpo do útero ou no corno uterino, não foi encontrado vantagens para a inseminação profunda no corno uterino, aliado a dificuldade técnica de realizá-la (KURYKIN et al., 2007; SEIDEL; SCHENK, 2008).

A tecnologia de processamento do sêmen sexado tem apresentado melhoria constante e atraído maior interesse comercial por parte dos produtores, os resultados de campo têm estimulado sua utilização mais intensivamente, no entanto, é necessário maior investimento em pesquisa usando protocolos de sincronização em tempo fixo para alcançar o tempo ótimo de inseminação artificial com sêmen sexado.

4.3 INTERVALO INSEMINAÇÃO-OVULAÇÃO EM BOVINOS

O horário de inseminação artificial (IA) em relação ao período do estro tem sido investigado por aproximadamente 60 anos (TRIMBERGER; DAVIS, 1943), diversos estudos foram realizados para determinar o melhor horário para IA (TRIMBERGER; DAVIS, 1943; BARRET; CASSIDA, 1946; ASCHBACHER et al., 1956). Estes estudos mostraram que as taxas de concepção máximas são alcançadas quando a IA ocorre da metade do estro a poucas horas do final das manifestações comportamentais de estro (MACMILLAN; WATSON, 1975). Desde então, a recomendação para IA tem sido inseminar 12 (doze) horas após o início do estro, alcançando na maioria das fêmeas o melhor horário para fertilização. Esta diretriz levou a adoção que vacas observadas em estro pela manhã, poderiam ser inseminadas à tarde no mesmo dia, e vacas observadas em estro à tarde, poderiam ser inseminadas na manhã do próximo dia.

O estudo de Trimberger foi reconhecido como ponto de referência e definiu o modelo para o horário de IA em bovinos (NEBEL et al., 2000). Diversos estudos compararam as taxas de prenhez em diferentes intervalos entre os sinais comportamentais do estro e à ovulação (DRANSFIELD et al., 1998; MARTINEZ et al., 2004; DEMIRAL et al., 2007). No entanto, por conta do intervalo entre o início e a observação do estro, é difícil definir o horário ideal de IA em relação à ovulação (GWAZDAUSKAS et al., 1986; BLOCH et al., 2006) sendo os intervalos estro para ovulação bastante variáveis nestes casos (SAUMANDE; HUMBLLOT, 2005).

Foote (1978) e Nebel et al. (1994) reportaram taxas de retorno similares para uma única IA ao dia em comparação com o esquema manhã e tarde. Dransfield et al. (1998) trabalhando com radiotelemetria computadorizada, determinou que a maior taxa de concepção em 17 rebanhos leiteiros comerciais, resultou de IA entre 4 à 16 horas depois do início do estro. Sá Filho et al. (2010) em estudo recente avaliaram o momento da IA usando sêmen sexado relativo à identificação de estro usando radiotelemetria em novilhas Jérseis cíclicas (in press²). Neste estudo, inseminações realizadas entre 16 a 24 horas depois do início do estro, foram associadas com grande chance de prenhez quando comparadas com aquelas realizadas 12 a 16 horas. Dois recentes estudos avaliaram o efeito do horário da inseminação em tempo fixo (54 vs. 60 horas depois da retirada do dispositivo de progesterona) em novilhas Jérseis (CREPALDI et al., 2009) e vacas Nelore lactantes (SOUZA et al., 2008), submetidas a protocolos de

² SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; NICHI, M.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; BARUSELLI, P. S. Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. *Theriogenology*, 2010. (In press).

progesterona) em novilhas Jérseis (CREPALDI et al., 2009) e vacas Nelore lactantes (SOUZA et al., 2008), submetidas a protocolos de sincronização da ovulação. Foram utilizados no experimento sêmen sexado e convencional e foi realizada avaliação no atraso de 6 horas no momento da IA. Nas novilhas Jérseis o atraso no horário da IA aumentou a taxa de prenhez quando da utilização de sêmen sexado (54h = 16,2%; 60h = 31,4%), mas não houve efeito quando da utilização do sêmen convencional (54h = 50,5%; 60h = 51,8%). Em vacas Nelore lactantes, a taxa de prenhez aumentou quando ocorreu o atraso no horário da IA com os dois tipos de sêmen. Uma possível influência de fatores ligados ao sêmen, em relação aos intervalos da IA para ovulação no referido experimento deve ser considerada.

Os eventos biológicos que interferem no horário de IA e fertilização são a viabilidade funcional de vida dos gametas (espermatozóides e óvulo), tempo de transporte de espermatozóides até o local de fertilização, tempo de ovulação em relação a IA. O intervalo entre o início comportamental de sinais de estro, para ovulação foi determinado em $27,6 \pm 5,4$ horas em gado de leite (WALKER et al., 1996) e gado de corte (WHITE et al., 2002). O transporte de espermatozóides viáveis para os ovidutos requer 6 horas no mínimo para obter uma população capaz de fertilização, o número de espermatozóides aumenta progressivamente após 8 até 18 horas (THIBAUT, 1973; WILMUT; HUNTER, 1984; HAWK, 1987). A vida funcional viável do espermatozóide bovino no trato reprodutivo foi estimada entre 24 e 30 horas (TRIMBERGER; DAVIS, 1943). O tempo máximo de capacidade para fertilização do óvulo é 20 a 24 horas, e o período ótimo situa-se entre 6 a 10 horas (BRACKETT et al., 1980).

Recentes pesquisas foram realizadas avaliando a quantidade de espermatozóides acessórios e correlacionando esta quantidade de espermatozóides com a qualidade embrionária. Estes estudos discorrem sobre o horário que a inseminação artificial pode contribuir para o aumento nas taxas de prenhez (DALTON et al., 2001; SAACKE, 2008).

Espermatozóides acessórios ficam presos na zona pelúcida, membrana que protege o óvulo e que o espermatozóide tem de penetrar para fertilizar. Somente um espermatozóide penetra e fertiliza o óvulo, ocorrendo em seguida à reação de zona, impedindo a entrada de outros espermatozóides, bem como a ligação de espermatozóides acessórios à zona pelúcida. Espermatozóides acessórios presos

na zona pelúcida indicam o número e qualidade de espermatozóides competindo pela fecundação (SAACKE, 2008).

A qualidade embrionária está associada ao número médio de espermatozóides acessórios, embriões bons e excelentes têm um número elevado de espermatozóides acessórios, comparado a embriões ruins. Fica evidente que a competição favorece o espermatozóide mais competente. Saacke (2008) concluiu que perto de dez espermatozóides por embrião são necessários para alcançar o máximo índice de qualidade embrionária.

O efeito do horário de inseminação no número de espermatozóides acessórios, status de fertilização e qualidade embrionária foi estudado por Dalton et al. (2001). No citado experimento as inseminações foram realizadas 0, 12, 24 horas após o início do estro, detectado pelo sistema de radiotelemetria Heat Watch[®]. O número de espermatozóides acessórios foi claramente influenciado pela inseminação mais tardia, comparada a inseminação mais precoce, assim como a taxa de fecundação. No entanto, a qualidade embrionária é maior com inseminações realizadas próximo do início do estro, e decrescem com inseminações realizadas 24 horas após o início do estro.

O horário de inseminação intermediário, 12 horas após o início do estro é mais eficiente, quando se usa um método confiável de determinação do início do estro (DRANSFIELD et al., 1998). A falha na fertilização pela inseminação tardia pode estar relacionada à viabilidade do óvulo, uma vez que a ovulação ocorre em média 27.6 ± 5.4 horas após o início do estro (WALKER et al., 1996) e o espermatozóide necessita de no mínimo de 4 a 6 horas para alcançar o local de fertilização (HUNTER; WILMUT, 1984)

Em rebanhos comerciais a detecção de estro baseada em observações visuais, monitoramento da monta usando tinta de cauda ou Heat Watch, não apresenta praticidade para determinar o exato momento do início do estro (HOCKEY et al., 2009). Uma das possibilidades de diminuir a variação do momento da ovulação é o emprego de técnicas de sincronização de estro e ovulação, permitindo realizar a IA em um horário ótimo em relação à ovulação (PURSLEY et al., 1998; BARUSELLI et al., 2007a).

O horário ideal para IA relativo à ovulação depende principalmente do tempo de vida fértil do espermatozóide e do óvulo, no trato genital feminino (ROELOFS et

al., 2006) e do tipo de sêmen utilizado, convencional ou sexado (BARUSELLI et al., 2007a).

4.4 PROTOCOLOS PARA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Atualmente, estão disponíveis uma série de tratamentos hormonais para controlar tanto a função luteal como folicular, permitindo a sincronização do estro e ovulação, eliminando a detecção de estro para determinar o horário da IA (BARUSELLI et al., 2002; BÓ et al., 2003).

A implementação de protocolos de sincronização baseados na utilização de hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e prostaglandinas (PGF) tem se revelado um meio prático e eficiente para incrementar a IA em gado de corte e leite (PURSLEY et al., 1997). Um desses protocolos baseado no tratamento com GnRH e prostaglandina é conhecido como protocolo Ovsynch (PURSLEY et al., 1995), consiste no tratamento inicial com GnRH, seguido de uma aplicação de prostaglandina sete dias depois, e uma segunda injeção de GnRH dois dias após a prostaglandina, com inseminação em tempo fixo quinze horas após o GnRH. Essa técnica promove a concentração das ovulações em um período de 8 a 12 horas e permite a realização da inseminação entre 16 e 24 horas após a segunda aplicação do GnRH (BARROS et al., 2000).

Uma variação desse protocolo é a aplicação do segundo GnRH no momento da IATF, conhecido como CO-Synch. As taxas de prenhez são menores quando não há ovulação ao primeiro GnRH e o estro é prematuro (PURSLEY, 2007), ou o segundo GnRH induz a ovulação um folículo pré-ovulatório pequeno (<12mm) (VASCONCELOS et al., 2001).

Uma alternativa para aumentar a resposta ovulatória no protocolo ovsynch é alterar o horário da segunda injeção de GnRH e da inseminação (PORTALUPPI; STENVENSON, 2005). Pursley et al. (1998) observaram maiores taxas de prenhez quando as vacas eram inseminadas em tempo fixo 16 horas depois da segunda injeção de GnRH. Portaluppi e Stenvenson (2005) avaliaram diferentes momentos da injeção de GnRH e IA e observaram aumento da resposta reprodutiva quando as vacas recebiam a segunda injeção de GnRH e a inseminação em tempo fixo às 72

horas depois da aplicação da PGF. No entanto outros pesquisadores não observaram diferenças ou decréscimo de prenhez quando as vacas foram inseminadas às 72 horas comparadas com 48 horas depois da luteólise induzida (BRUSVEEN et al., 2006; STERRY et al., 2007). Em um recente experimento, Dobbins et al. (2009) descreveram que inseminações às 56 horas ou mais tarde aumentaram as taxas de prenhez por IA, quando se usa o protocolo CoSynch + CIDR em vacas de corte *Taurus*. Os autores relataram ainda que inseminações às 48 horas eram precoce para a maioria das vacas e às 72 horas eram tardia para as vacas jovens. A mortalidade embrionária foi maior para vacas inseminadas às 48 horas e 72 horas.

O GnRH induz a ovulação ou a luteinização do maior folículo presente no momento do tratamento e resulta na emergência de uma nova onda folicular dois dias depois de ser implementada; a administração de PGF sete dias após a primeira aplicação de GnRH tem a função de promover a luteólise do CL originado, e a segunda aplicação de GnRH promove a ovulação sincronizada de um novo folículo dominante, induzido pelo GnRH; a IATF é realizada entre 16 a 24 horas após a segunda aplicação de GnRH (WILTBANK, 1997).

As taxas de ovulação em bovinos após aplicação de GnRH são bastante variáveis, variando de 40% a 85% (MARTINEZ et al., 1999; COLAZO et al., 2007). Pursley et al. (1995) relatam que a primeira aplicação de GnRH do protocolo Ovsynch apresenta melhor eficiência na taxa de ovulação em vacas lactantes (85%) do que em novilhas (54%).

O intervalo de sete dias entre a primeira aplicação de GnRH e a PGF é suficiente para o desenvolvimento de um novo folículo dominante (GAMBINI et al., 1998) e para a maturação do corpo lúteo, favorecendo resposta positiva à administração da PGF (BARROS, 2000).

O protocolo Ovsynch também tem sido usado para controlar o desenvolvimento folicular e a sincronização da ovulação em *Bos Indicus* (BARROS et al., 2000). As taxas de prenhez após de IATF não diferem em relação à *Bos taurus*, variando entre 42 e 48% (FERNANDES et al., 2001; WILLIAMS et al., 2002). No entanto em novilhas a taxa de prenhez é variável de 21 a 43% (BARROS et al., 1998; WILLIAMS et al., 2002). A prenhez em vacas em anestro é significativamente menor (14,9%) do que em vacas cíclicas (46,3%) (FERNANDES et al., 2001; BARUSELLI et al., 2003). Os resultados obtidos com o protocolo Ovsynch sofrem

influências do período pós parto no qual a técnica é empregada (PURSLEY; KOSOROK; WILTBANK, 1997).

Outro fator que pode interferir na resposta do protocolo Ovsynch é a fase do ciclo estral na qual ele é iniciado. Segundo Vasconcelos (2000) vacas nas quais o tratamento teve início na primeira metade do ciclo estral (D1 a D12) apresentaram maior taxa de ovulação (91%) do que aquelas tratadas na segunda metade do ciclo estral (>D-12, 80%). No entanto a pré-sincronização com PGF reduz este problema (VASCONCELOS et al., 1999; MOREIRA et al., 2001) e aumenta a prenhez em vacas leiteiras lactantes.

Williams et al. (2002) relataram que 28,9% das novilhas tratadas com o protocolo Ovsynch, mostraram estro natural entre a primeira aplicação de GnRH e o horário determinado da IATF, sugerindo que em novilhas ocorre um rápido crescimento folicular. Uma alternativa para prevenir estro prematuro e ovulações precoces é a suplementação com progesterona entre a aplicação de GnRH e PGF, sendo este tratamento mais eficiente em primíparas do que em múltiparas de corte (MARTINEZ et al., 2002; DEJARNETTE et al., 2004). Em gado leiteiro há um incremento nas taxas de prenhez, quando se utiliza um suplemento de progesterona no protocolo Ovsynch (STEVENSON et al., 2006). Em recente experimento Small et al. (2009) avaliaram o efeito da pré-sincronização com baixas doses de progesterona por 15, 7 ou 5 dias em gado de corte *Taurus* usando o protocolo Ovsynch. Eles concluíram que houve um aumento no diâmetro do folículo dominante e na proporção de animais que ovularam ao primeiro GnRH, porém não houve um incremento nas taxas de prenhez. Barros et al. (2000) substituíram o segundo GnRH por benzoato de estradiol (BE), 24 horas após a PGF, obtendo ovulação sincronizada $45,4 \pm 2,0$ horas em 7 de 10 vacas Nelore tratadas. A taxa de prenhez obtida em 53 vacas Nelore cíclicas foi de 43,3%, mas foi somente de 14,7% em 68 vacas Nelore não cíclicas (FERNANDES et al., 2001) e de 33,3% em novilhas Nelore (BARROS et al., 1998). Estes resultados enfatizam que o protocolo Ovsynch somente pode ser usado em vacas cíclicas, comprometendo seu uso em vacas zebuínas que apresentam anestro pós parto prolongado (BARUSELLI et al., 2004a). Portanto, não é uma boa opção a sincronização de estro e ovulação com protocolo Ovsynch para IATF com sêmen sexado em fêmeas *Bos indicus*.

Em criações de bovinos de corte sob condições tropicais, onde prevalece animais zebuínos, o tratamento mais usado para o restabelecimento da atividade

ovariana pós parto é a utilização de um implante intravaginal de progesterona por 5 a 10 dias. O implante intravaginal de progesterona mantém as concentrações plasmáticas de progesterona por certo período de tempo. Assim que as concentrações de progesterona atingem níveis sub-luteais durante o tratamento, há um aumento na frequência dos pulsos de LH, levando ao crescimento folicular, prevenindo a atresia do folículo dominante (STOCK; FORTUNE, 1993; SÁVIO et al., 1993a). Este mecanismo permite o crescimento e maturação do folículo dominante capaz de ovulação, inclusive em animais em anestro (RHODES et al., 2002). A ovulação decorrente do tratamento com progesterona permite a formação de um corpo lúteo com atividade normal, sustentando o desenvolvimento e a manutenção da gestação (WILTBANK et al., 2002). O uso do estradiol em combinação com a progesterona foi adicionado ao protocolo, quando se descobriu que o estradiol induzia regressão luteal (WILTBANK et al., 1961).

Assim, diferentes investigações sobre a eficácia da associação entre estrógenos – estradiol 17 β (E-17 β), valerato de estradiol (VE) e benzoato de estradiol (BE) – e progesterona ou progestágenos em bovinos foram implementados (BÓ et al., 1994, 1995, 1996).

O estrógeno quando associado à progesterona ou progestágeno, promove o crescimento sincronizado de uma nova onda folicular cerca de 4 a 5 dias após sua aplicação, independente do estágio do ciclo estral no qual o tratamento é iniciado (BÓ et al., 1995; ROCHA, 2000).

Os dispositivos intravaginais de progesterona e estradiol têm sido amplamente utilizados em programas de sincronização de estro e da ovulação em IATF para vacas de corte e de leite (MACMILLAN; PETERSON, 1993; MACMILLAN; BURKE, 1996; BÓ et al., 2002).

Vários produtos sincronizadores do estro e da ovulação estão disponíveis no mercado. Alguns são constituídos por progestágenos – norgestomet – associados ao valerato de estradiol. O tratamento com norgestomet consiste na inserção de um implante hidrônico contendo 6 mg de norgestomet (Syncro-Mate-B, Merial) ou um implante de silicone contendo 3 mg de norgestomet (Crestar, Intervet) colocados subcutaneamente na orelha. Uma injeção contendo 5 mg de Valerato de estradiol e 3 mg de norgestomet é aplicada intramuscular (i.m) no momento do implante. O implante é removido após nove (9) dias. Vacas e novilhas são inseminadas 12 horas

após a observação do estro ou inseminadas em tempo fixo 48 horas (novilhas) ou 56 horas (vacas) depois da remoção do implante.

Taxas satisfatórias de prenhez foram obtidas em vacas zebuínas, mas os resultados em novilhas têm sido variáveis. Uma das possíveis causas para a fertilidade diminuída das novilhas a esse protocolo é a manutenção de altas taxas de estradiol por um período prolongado, o que estaria provocando a supressão do crescimento folicular. (BÓ et al., 1993).

Baruselli et al. (2001) ao trocarem o valerato de estradiol (VE) por benzoato de estradiol (BE) combinado com 50 mg de progesterona no momento do implante de crestar, obtiveram alta taxa de prenhez em novilhas cruzadas, inseminadas 54 horas após a remoção do implante.

Outros produtos disponíveis para sincronização da ovulação são aqueles a base de progesterona associada ou não ao estrógeno, apresentados sob a forma de dispositivos intravaginais (MACMILLAN; PETERSON, 1993).

O tratamento consiste na administração de 2 mg de BE no momento da inserção do dispositivo intravaginal de progesterona (dia 0), retirada do dispositivo e administração de PGF i.m no dia 7 ou 8 (dia 7-8), e injeção i.m de 1 mg de BE 24 horas mais tarde e IATF 52 a 56 horas após a remoção do implante (BÓ et al., 2002).

De modo geral, quando aplicado na presença de folículos FSH - dependentes, o estradiol provoca a atresia destes, pois promove redução das concentrações de FSH via feed-back negativo. Quando os níveis de estradiol retornam a valores basais, ocorre a emergência de nova onda de crescimento folicular em virtude do novo aumento de FSH (BÓ et al., 1995).

A aplicação de BE 24 horas após a remoção do implante é essencial, pois resulta em melhor sincronização de estro (LEMASTER et al., 1999) e ovulação (CUTAIA et al., 2001) e maiores taxas de prenhez (COLAZO et al., 1999) do que quando não se administra BE no momento do implante.

Com o objetivo de diminuir o número de manejo dos animais sincronizados, passou-se a utilizar o cipionato de estradiol (CE) no momento da retirada da fonte de progesterona (COLAZO et al., 2003; MARQUES et al., 2004; PENTEADO et al., 2005; AYRES et al., 2006; CREPALDI, 2009), obtendo-se taxas de prenhez similares ao uso do BE 24 horas após a retirada do implante. O CE promove a ovulação sincronizada, similar ao BE, em média 70 horas após a remoção da fonte de

progesterona (REIS et al., 2004; MARTINS et al., 2005). A inseminação artificial em tempo fixo quando se utiliza CE pode ser realizada em um intervalo de 48 a 58 horas após a retirada da fonte de progesterona, sem prejudicar as taxas de prenhez (AYRES et al., 2008, CREPALDI et al., 2009), no entanto quando se utiliza implantes previamente utilizados a IATF deve ser realizada 48 horas após a remoção do implante de P4 (CREPALDI et al., 2009).

O sucesso de um programa de inseminação artificial baseado na sincronização das ovulações e inseminação artificial em tempo fixo (IATF) ou pré-determinado de cios, não depende somente do status sanitário, bom manejo do rebanho e das administrações corretas dos hormônios, vários outros fatores interferem no resultado da taxa de prenhez ao primeiro serviço, como a qualidade do sêmen, o horário de inseminação e a competência dos inseminadores em manipular e aplicar no local adequado o sêmen (SAACKE, 2008).

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no período de dezembro de 2009 a fevereiro de 2010, na unidade de pesquisa do Pólo Regional de Desenvolvimento tecnológico da Alta Mogiana (PRDTA - Alta Mogiana), órgão da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, da Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo. O PRDTA – Alta Mogiana está localizado no município de Colina, São Paulo (latitude de 20° 43' 05" S; longitude 48° 32' 38" W). O clima da região é do tipo AW (segundo classificação de Köppen), onde a temperatura média do mês mais quente é superior a 22°C e do mês mais frio superior a 18°C. As precipitações pluviárias mensais médias, coletadas na unidade de pesquisa, nos últimos anos mostraram que de outubro a maio ocorreram 1222 mm, correspondendo a 93,7% do total anual; enquanto que de junho a setembro choveu 82 mm, representando 6,3%. O solo do local é classificado como latossolo vermelho-escuro, fase arenosa, com topografia quase plana e de boa drenagem. No período de dezembro de 2009 a fevereiro de 2010 época da realização do presente experimento, o volume de precipitações pluviárias foi de 722,20 mm, com média mensal de 240,73 mm, 18% superior a série histórica do município.

No presente estudo foram utilizadas 339 vacas Nelore lactantes entre 30 e 60 dias pós parto com idade entre 48 a 96 meses, classificadas por escore de condição corporal e período pós parto. Todos os animais foram suplementados com mistura mineral e água *ad libitum*. O escore de condição corporal (ECC) médio desses animais era de $3,0 \pm 0,5$ (1 a 5; 1=magra e 5=muito gorda), segundo Ayres et al., 2009. As vacas ao exame reprodutivo por palpação retal e ultrassonografia não apresentaram qualquer tipo de distúrbio que comprometesse o experimento. Os procedimentos com os animais foram aprovados pela comissão de ética para experimentação da Universidade de São Paulo-USP.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.2.1 Experimento 1 – Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação sobre a taxa de concepção de vacas Nelore após IATF utilizando sêmen sexado

O experimento foi delineado de forma inteiramente ao acaso, sendo os animais divididos, levando-se em consideração a ordem do parto e escore de condição corporal (ECC) e o momento da inseminação artificial (IA) 36, 48 ou 60 horas após a retirada do dispositivo intravaginal, conforme ilustrado na figura 1.

Figura 1 - Diagrama experimental do protocolo de sincronização de vacas Nelore lactantes usando sêmen sexado

*IATF com 36, 48 ou 60 horas após a retirada do dispositivo

5.2.2 Experimento 2 – Técnicas de ressincronização de fêmeas Nelore após IATF utilizando sêmen sexado

Foram utilizadas neste experimento 184 vacas Nelore lactantes previamente inseminadas em tempo fixo utilizando sêmen sexado. (Figura 2)

GRUPO IATF (n= 88 animais)

GRUPO OBS. ESTRO (n=96 animais)

Figura 2 - Diagrama experimental do protocolo ressincronização: Grupos IATF e observação de estro

5.3 TRATAMENTOS

5.3.1 Experimento 1

Os animais foram divididos em lotes de acordo com a ordem do parto e escore de condição corporal.

Cada animal recebeu, no dia zero (D0), um dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona (Sincrogest[®], Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil), mantido por oito dias (D8). Depois de adequada assepsia da região perineal, tais dispositivos foram inseridos na vagina com o auxílio de aplicador comercial.

No momento da implantação do dispositivo (D0), os animais receberam 2,0 mg de benzoato de estradiol – BE (Sincrodiol[®], Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil) por via intramuscular (IM) profunda, usando seringa de 3ml e agulha 40x12.

No momento da retirada dos dispositivos intravaginais, todos os animais receberam, também por via intramuscular profunda, dose luteolítica de 0,25mg de cloprostenol sódico (Sincrocio[®], Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil) e trezentas unidades internacionais (300 UI) de gonadotrofina coriônica eqüina – eCG (Folligon[®], Intervet-Shering Plough, Boxmeer, Holanda).

No dia nove (D9), os animais receberam por via intramuscular profunda (IM), 1,0mg de benzoato de estradiol – BE (Sincrodiol[®], Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil) como indutor de ovulação.

As vacas foram homogeneamente separadas para receberem IATF usando sêmen sexado (2,1 milhões de espermatozóides por palheta) às 36, 48 ou 60 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de P4. Sêmen de um único touro da raça Angus (*Bos taurus*) foi utilizado para inseminar todas as vacas. O intervalo entre a IATF e a ovulação das vacas sincronizadas foi determinado e análise realizada para comparar as taxas de concepção para IATF realizada em vários intervalos antes da ovulação, usando como parâmetro 12 horas de intervalos entre as IA.

5.3.2 Experimento 2

Os animais foram divididos em dois lotes experimentais (IATF ou Observação de estro) de acordo com o resultado do programa de IATF previamente realizado no experimento 1. As fêmeas do grupo observação de estro foram monitoradas duas vezes ao dia, manhã e tarde com sessões de observação de duas horas por turno, as vacas identificadas em estro eram inseminadas 12 horas após, metade com sêmen convencional, metade com sêmen sexado. O período de observação de estro foi entre os dias 17 e 25 após a IATF. As fêmeas do grupo IATF receberam um segundo protocolo durante o período de retorno, sendo que todas as fêmeas foram inseminadas em tempo fixo 29 dias após a primeira IATF. Considerou-se como dia zero (D0) o dia da IATF do experimento 1.

Cada animal do grupo IATF recebeu, no dia dezenove (D19), um dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona previamente usado (Sincrogest[®], Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil) mantido por oito dias (D27). Depois de adequada assepsia da região perineal, tais dispositivos foram inseridos na vagina com o auxílio de aplicador comercial.

No momento da implantação do dispositivo (D19) os animais receberam 0,105 mg de acetato de buserelina (Sincroforte[®], Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil) por via intramuscular (IM) profunda usando seringa de 3ml e agulha 40x12.

No momento da retirada dos dispositivos intravaginais (D27) os animais passaram por exames ultrassonográficos pela técnica transretal com auxílio de sonda linear de 7,5 MHz (CTS-3300V, SIUI, China) para diagnóstico de gestação, os animais que apresentaram uma vesícula embrionária com embrião viável (presença de batimento cardíaco) foram liberados, os animais não gestantes receberam, por via intramuscular profunda, dose luteolítica de 0,25mg de cloprostenol sódico (Sincrocio[®], Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil).

No dia vinte e oito (D28), os animais receberam por via intramuscular profunda (IM) 1,0mg de benzoato de estradiol – BE (Sincrodiol[®], Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil) como indutor de ovulação.

As vacas foram homogeneamente separadas para receberem IATF usando sêmen sexado (2,1 milhões de espermatozóides por palheta) ou sêmen convencional (20 milhões de espermatozóides por palheta) às 60 horas após a

remoção do dispositivo intravaginal de P4. Sêmen de um único touro da raça Angus (*Bos taurus*) foi utilizado para inseminar todas as vacas.

No experimento 2, a taxa de serviço no grupo observação de estro foi definida pelo número de fêmeas que retornaram ao estro, multiplicado por 100 e dividido pelo número total de fêmeas do grupo. No grupo IATF a taxa de serviço foi definida pelo número de fêmeas inseminadas, multiplicado por 100 e dividido pelo número total de fêmeas do grupo. A taxa de concepção para os dois grupos foi definida pelo número de fêmeas inseminadas e que ficaram prenhas, multiplicado por 100 e dividido pelo número de fêmeas inseminadas. A taxa de prenhez foi definida pelo número de fêmeas prenhas, multiplicado por 100 e dividido pelo número total de fêmeas de cada grupo, de acordo com o tipo de sêmen utilizado.

5.4 EXAMES ULTRASSONOGRÁFICOS

Os exames ultrassonográficos, foram realizados pela técnica transretal com auxílio de sonda linear de 7,5 MHz (CTS-3300V, SIUI, China), tiveram início no D8 do protocolo de sincronização – isto é, no momento da retirada dos dispositivos intravaginais de P4, e foram repetidos em intervalos de 24 horas até o dia 10 (D10) e de 12 em 12 horas do D10 até que fosse constatada a ovulação. Os dois ovários foram visualizados e os dois maiores folículos em cada ovário foram mensurados para acompanhamento da dinâmica de crescimento folicular e determinação do diâmetro máximo do folículo ovulatório. O desaparecimento dos folículos ≥ 8 mm anteriormente identificados foi considerado como indicativo de ovulação. O horário da ovulação foi estabelecido como à hora do exame, no qual foi diagnosticado o desaparecimento do folículo dominante (ovulação).

5.5 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

Todas as vacas foram examinadas por ultrassonografia transretal para diagnóstico de gestação 27 dias após a IATF, com exceção das que retornaram em estro e foram re-inseminadas do grupo observação do estro do experimento 2. A detecção de uma vesícula embrionária com embrião viável (presença de batimento cardíaco) foi considerada como indicativo de prenhez. A taxa de concepção foi definida como o número de fêmeas gestantes aos 27 dias após a IATF, divididas pelo número total de fêmeas inseminadas artificialmente em cada tratamento.

5.6 PROCESSAMENTO DO SÊMEN E SEXAGEM DOS ESPERMATOZÓIDES

Neste estudo foram adotados os procedimentos de acordo com o descrito por Tanno (2009).

5.6.1 Colheita do sêmen

A colheita de sêmen foi realizada com vagina artificial, com auxílio de uma vaca como manequim devidamente contida, conforme preconizado pela central de coleta. Foi utilizado um touro *Bos taurus* da raça Angus. Foram realizadas duas colheitas de sêmen, com intervalo semanal.

Após a colheita, o ejaculado foi encaminhado ao laboratório para análise.

5.6.2 Avaliações do sêmen in natura

O ejaculado foi analisado quanto ao volume, concentração espermática, motilidade, vigor e alterações morfológicas. Todo material utilizado na colheita e

avaliação do sêmen foi mantido aquecido, na temperatura de 37°C para evitar o choque térmico e alterações das características seminais.

5.6.3 Volume

O volume foi determinado pela leitura direta do tubo de 15 mL graduado com fração de 0,1 mL.

5.6.4 Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada por um contador nuclear denominado NucleoCounter® SP-100™ System com software versão 1.21, calibrado para o programa DF 401, para o qual diluiu-se 25 µL de sêmen em 10 mL de reagente S100 responsável pela lise da membrana celular em tubo de 15 mL.

Em seguida, foi homogeneizado em um vórtex durante 12 segundos, aproximadamente, e uma alíquota foi separada para a leitura em um SP1 - Cassete™ – Chemometec. O SP 1 - Cassete™ contendo iodeto de propídio (PI), que identifica as células lesadas pelo reagente S100 e realiza a contagem nuclear.

5.6.5 Motilidade, vigor e turbilhonamento

Uma alíquota de 10µL de *in natura* foi diluída em 500µL de diluidor à base de Tris e gema de ovo pré-aquecido (37°C) para avaliação da motilidade. A motilidade foi avaliada em uma gota de 10µL da alíquota diluída colocada entre lâmina e lamínula e visualizada em aumento de 100 X sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC).

Para avaliação do turbilhonamento, uma amostra de 10µL de sêmen fresco foi depositada em lâmina pré-aquecida a 37°C e a análise foi efetivada sem lamínula,

sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) em aumento de 100 X. O movimento de massas das células foi classificado em escala que variou de 0 (movimento ausente) a 5 (máximo).

5.6.6 Análise da morfologia espermática

Para a avaliação das alterações morfológicas, foram adicionados 10µL de formol salino tamponado no tubo pré-diluído para a avaliação prévia da motilidade. Em seguida, foi realizada a leitura da morfologia em preparação úmida com aumento de 1000 X sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC) (OLYMPUS AX70, Olympus True Reserch System Microscoper model AX70, Melville, NY), contando 100 células por amostra. As porcentagens das diversas alterações morfológicas foram agrupadas e classificadas em defeitos maiores e defeitos menores.

Somente ejaculados com concentração igual a 1000×10^6 espermatozóides por mililitros, 60% de motilidade progressiva, vigor maior do que o escore 3 e menos de 20% de defeitos foram utilizados no experimento.

5.6.7 Sexagem espermática pela técnica de citometria de fluxo.

Após as avaliações do sêmen in natura, o ejaculado foi preparado para produzir o sêmen sexado.

Para a sexagem dos espermatozóides uma solução estoque de Hoeschst 33342 foi preparada a 8,89 mM (5 mg/mL) com água nanopura, corante cuja função foi penetrar na membrana celular e ligar-se a regiões específicas do DNA, que são 3 pares de bases ricos em adenina-timina das menores depressões da hélice de DNA (GARNER, 2009). O sêmen foi diluído na concentração de 200×10^6 /mL, em TALP modificado (meio Tyrode com albumina, lactato e piruvato) em pH de 7,4 visando alcançar maior eficiência do corante Hoechst 33342. Após a amostra foi incubada a 34°C durante 45 minutos protegida dos efeitos da luz.

Em seguida foi adicionado TALP contendo 4% de gema de ovo clarificada e 0,002% de “food colouring dye” (FD&C#40 Power, Waner Jenkinson Company Inc., St Louis, MO, USA), que teve com objetivo diminuir o pH, prevenindo dano celular e, também, apagar o H33342 dos espermatozóides com as membranas celulares comprometidas (SCHENK et al., 1999; GARNER, 2001; GARNER, 2009), permitindo o descarte destas células no momento da separação no citômetro de fluxo.

Cada amostra foi filtrada à unidade gravitacional em um filtro de nylon com poros de 50µm (CellTrics™, Partec GmbH, Germany) para a remoção de debris ou espermatozóides aglutinados, formando uma solução final de 4 mL com uma concentração de 80×10^6 espermatozóides/ mL e mantidas em temperatura à 21°C durante a separação espermática no citômetro de fluxo.

O citômetro de fluxo usado para sexagem foi o MoFlo SX® (Cytomation, Inc.) operado a 40 psi. A fluorescência que foi emitida pelas células quando excitadas pelo laser Vanguard™, sistema de estado sólido de *diode-pumped* (Newport Corporation, Irvine, CA, USA) passou por dois detectores de fluorescência (PMT), localizados a 0° e a 90°, um com a função de orientar corretamente as células e, outro para medir o valor da fluorescência. Dependendo da onda emitida, foi dada uma carga elétrica na célula, ou seja, o espermatozóide contendo o cromossomo X recebeu uma carga negativa, sendo atraído pelo campo positivo e o oposto para os espermatozóides contendo cromossomo Y.

Um diluidor (Sheath Fluid) a base de TRIS (hidroximetil aminometano- TRIS 197,0 Mm), ácido cítrico monohidratado (55,4 Mm) e frutose (47,5 Mm) foram utilizados para formar o fluxo hidrodinâmico onde as células espermáticas percorreram.

As células separadas pelo citômetro de fluxo (MoFlo SX®) foram coletadas em tubos cônicos graduados para centrifuga de 50 mL, contendo diluidor sem glicerol, denominado de *catch* (meio TRIS – 2% gema de ovo – Sexing Technologies, Navasota, USA) que foi diluído com 16% de água, até atingir o volume de 20 mL. A concentração final de um tubo foi de aproximadamente $8,0 \times 10^5$ espermatozóides/mL, como consequência da mistura dos diluidores durante a separação, *catch* e o *sheath fluid*.

Em seguida, foram colocados sob refrigeração a 5°C por um período de 90 minutos.

5.6.8 Criopreservação do sêmen sexado

Após a refrigeração, foi adicionado ao sêmen, diluidor TRIS contendo 12% de glicerol em duas etapas, com intervalos de 15 minutos (9,5mL cada). O sêmen foi levado à centrífuga refrigerada a 5°C, SORVALL® RC-4 (Heareus Sorvall Revco, Asheville, NC) a 850 x g durante 20 minutos.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento formado foi homogeneizado e colocado em um único tubo, com uma concentração aproximadamente de 40×10^6 espermatozóides/mL. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 25µL para a determinação da concentração através do NucleoCounter® SP-100™ system NA-103 (ChemoMetec A/S Gydevang 43, DK-3450 Allerød, Dinamarca), visando a adição do restante do diluidor TRIS-gema até atingir concentração final de $9,4 \times 10^6$ de espermatozóides/mL (considera-se em torno de um milhão de espermatozóides perdidos durante o envase).

Logo após a diluição com TRIS-gema de ovo, o sêmen permaneceu protegido da luz a temperatura de 5°C durante 3 horas (tempo de equilíbrio) para então, ser envasado em palhetas de 0,25mL (IMV®, Aigle, France). As palhetas foram congeladas em caixa de isopor contendo 7 cm de altura de nitrogênio a uma distância de 4 cm das palhetas durante 20 minutos, sob vapor de nitrogênio líquido. Em seguida, as palhetas foram retiradas e imersas em nitrogênio líquido (-196°C). Imediatamente, as palhetas foram raqueadas e armazenadas em botijões criogênicos para posterior utilização.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A variável binomial taxa de concepção foi analisada utilizando o procedimento estatístico GLIMMIX do programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). No experimento 1, as variáveis explanatórias como o grupo de fêmeas sincronizadas, ECC ao início do tratamento de sincronização, momento de inseminação e interações foram introduzidas no modelo inicial. Para obtenção do modelo estatístico final, as variáveis explanatórias foram removidas por uma eliminação retrógrada de

acordo com o critério Back Wald's quando apresentaram valor de $P > 0.10$. No Experimento 1, o modelo final para análise da taxa de concepção incluiu somente o momento da inseminação. No Experimento 2, as variáveis explanatórias grupo de fêmeas sincronizadas e tipo de técnica de ressincronização e interações foram introduzidas no modelo inicial. O modelo final para análise da taxa de concepção incluiu somente a técnica de ressincronização utilizada. No experimento 2, também foi analisado a taxa de serviço de acordo com a técnica de ressincronização pelo procedimento estatístico GLIMIX do SAS.

Uma análise adicional foi realizada para avaliar o efeito do diâmetro do folículo dominante 24 horas após a remoção do dispositivo intravaginal, ou seja, no momento da administração do indutor de ovulação, sobre o momento da ocorrência das ovulações. Para isso, os dados foram analisados utilizando o procedimento GLM do programa SAS e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Para análise do intervalo entre inseminação e ovulação, as informações de cada vaca foram agrupadas em um único conjunto de dados para análise estatística. Os dados foram analisados por uma regressão logística multivariada, utilizando o procedimento LOGISTIC do SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), utilizando novamente o critério de Back Wald's com valor de $P > 0.10$ para determinação do modelo estatístico final. O modelo final para análise do intervalo entre a inseminação e a ovulação sincronizada, incluiu somente o intervalo entre inseminação e a ovulação. O valor de risco ajustado (R) e 95% de intervalo de confiança (IC) foram gerados durante a regressão logística. Os resultados são apresentados como proporções e riscos ajustados (R).

Diferenças com $P < 0.05$ foram consideradas significativas para as variáveis explanatórias avaliadas.

6 RESULTADOS

6.1 TAXA DE OVULAÇÃO

No presente estudo a taxa de ovulação após o protocolo de sincronização da ovulação foi de 92,0 % (312/339).

6.2 DIÂMETRO DO FOLÍCULO OVULATÓRIO

O diâmetro do folículo ovulatório foi de $14,7 \pm 2,3$ mm. As vacas que apresentaram ovulações antecipadas (de 48 a 59 horas após a remoção do dispositivo; $n = 23$) apresentaram maiores folículos ovulatórios ($14,0 \pm 2,2$ mm) do que as vacas com ovulações tardias (de 73 a 96 horas após a remoção do dispositivo; $n = 37$; $11,4 \pm 2,2$ mm). As vacas que ovularam 60 a 72 horas após a remoção do dispositivo ($n = 252$) tiveram folículo ovulatório intermediário ($13,6 \pm 2,1$ mm). Os dados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 - Diâmetro do folículo ovulatório (FO) de acordo com o intervalo entre a retirada do dispositivo de progesterona e a ovulação em vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado - Colina, SP – Dezembro de 2009 a Março de 2010.

Intervalos (horas)	Número de animais	Diâmetro do FO (mm)
48 a 59h	23	$14,0 \pm 2,2^a$
60 a 72h	252	$13,6 \pm 2,1^{ab}$
73 a 96h	37	$11,4 \pm 2,2^c$

P<0,001

6.3 MOMENTO DE OVULAÇÃO

O intervalo entre a retirada do dispositivo de progesterona e a ovulação foi de $71,8 \pm 7,7$ horas. A distribuição das ovulações após à remoção do dispositivo de progesterona foi de: 48 horas (6,73%; 21/312), 60 horas (0,64%; 2/312), 72 horas (80,77%; 252/312), 84 horas (11,22%; 35/312) e 96 horas (0,64%; 2/312). Estes dados estão apresentados no gráfico 1. O momento da ovulação foi influenciado pelo diâmetro do folículo dominante 24 horas após a retirada do dispositivo de progesterona (momento da aplicação do BE), onde os folículos maiores ($14,0 \pm 2,2$ mm) ovularam antecipadamente e os menores ($11,4 \pm 2,2$ mm) tardiamente ($P < 0,001$), como descrito na tabela 1.

Gráfico 1 – Frequência de ovulação após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona em vacas Nelore lactantes (n=312)

6.4 TAXA DE CONCEPÇÃO DE ACORDO COM O HORÁRIO DA IATF APÓS À RETIRADA DO DISPOSITIVO DE PROGESTERONA

A taxa de concepção foi maior ($P < 0,001$) quando a IATF foi realizada mais tardiamente em relação à retirada do dispositivo intravaginal de progesterona. As taxas de concepção em relação ao intervalo entre a retirada do dispositivo e a IATF foram: 36 horas (5,8%; 5/86)^c; 48 horas (20,8%; 27/130)^b; e 60 horas (30,9%; 38/123)^a. Os dados estão apresentados no gráfico 2.

Gráfico 2 – Taxa de concepção conforme o intervalo entre a retirada do dispositivo de progesterona e a IATF em vacas Nelore inseminadas com sêmen sexado

6.5 TAXA DE CONCEPÇÃO DE ACORDO COM O INTERVALO ENTRE A IATF E A OVULAÇÃO

A taxa de concepção, considerando o intervalo entre a IATF e a ovulação, foi maior quando a inseminação foi realizada próxima ao momento da ovulação (0 a 12 horas antes da ovulação = 37,9%; 35/95) quando comparada às inseminações realizadas entre 12,1 a 24 horas antes da ovulação (19,4%; 21/108; $P = 0,05$) e acima de 24 horas antes da ovulação (5,8%; 5/87; $P = 0,001$). No entanto, não foram encontradas diferenças ($P = 0,95$) desse grupo, (IATF de 0 a 12 horas antes da ovulação) com o grupo recentemente ovuladas (36,4%; 8/22; gráfico 3).

Vacas inseminadas próximas à ovulação (0 a 12 horas antes da ovulação) possuem 2,34 vezes ($P < 0,01$) mais chances de se tornarem gestantes após a IATF do que vacas inseminadas 12,1 a 24 horas antes da ovulação. Entretanto, fêmeas inseminadas com intervalo entre a inseminação e a ovulação (>24horas) apresentam menor risco de se tornarem gestantes ($P = 0,009$) quando comparadas as fêmeas inseminadas 12 a 24 horas antes da ovulação sincronizada. (Tabela 2).

Tabela 2 – Risco de concepção conforme o intervalo entre a IATF e a ovulação em vacas Nelore inseminadas com sêmen sexado - Colina, SP – Dezembro de 2009 a Março de 2010

Intervalos IATF/ Ovulação (Horas)	Concepção (%)	OR (95%CI) ¹	P
Ovuladas	36,4% (8/22) ^{ab}	1,80	0,27
>0 a 12 horas	37,9% (36/95) ^a	2,34	0,01
12,1 a 24 horas	19,4% (21/108) ^b	Referência ²	
>24 horas	5,8% (5/87) ^c	0,24	0,009

Referência² = 1, 00

Gráfico 3 – Taxa de concepção conforme o intervalo entre a IATF e a ovulação em vacas Nelore inseminadas com sêmen sexado

6.6 TAXA DE SERVIÇO, CONCEPÇÃO E PRENHEZ NOS GRUPOS SUBMETIDOS À OBSERVAÇÃO DE ESTRO SEGUIDO DE IA OU RESSINCRONIZADOS E INSEMINADOS EM TEMPO FIXO APÓS A PRIMEIRA IATF

Não houve interação entre sêmen (sexado e convencional) e tratamento (observação de estro seguido de IA ou IATF). Desta forma os resultados foram apresentados conjuntamente.

A taxa de serviço entre 17 e 25 dias após a primeira IATF para os animais ressinchronizados foi de 100% (88/88), sendo superior ($P < 0,001$) aos animais submetidos à detecção de estro (63,5%; 61/96). A taxa de concepção no grupo observação estro foi de 41% (25/61), maior ($P < 0,001$) que no grupo IATF (11,4%; 10/88). A taxa de prenhez no grupo observação de estro foi de 26% (25/96), superior ($P < 0,001$) a do grupo IATF, que foi de 11,4% (10/88; Gráfico 4).

Gráfico 4 - Taxa de serviço, concepção e prenhez na ressincronização nos grupos IATF e observação de estro ($P < 0,001$)

6.7 TAXA DE SERVIÇO, CONCEPÇÃO E PRENHEZ À RESSINCRONIZAÇÃO NOS GRUPOS IATF E OBSERVAÇÃO DE ESTRO DE ACORDO COM O TIPO DE SÊMEN (CONVENCIONAL OU SEXADO)

A taxa de serviço no grupo IATF foi de 100% para os animais inseminados com sêmen sexado (41/41) e convencional (47/47). Para o grupo submetido à observação de estro, verificaram-se taxas de serviço de 64,58% (31/48) e 62,5% (30/48) para os animais inseminados com sêmen sexado e convencional, respectivamente. A taxa de concepção e prenhez para os animais inseminados em tempo fixo foram de 7,3% (3/41) para o sêmen sexado e de 14,9 % (7/47) para o sêmen convencional. As taxas de concepção e prenhez para o grupo submetido à observação de estro com sêmen sexado foram de 38,7% (12/31) e 25% (12/48) e para o sêmen convencional foram de 43,3% (13/30) e 27,08% (13/48), respectivamente (Tabela 3 e Gráfico 5).

Tabela 3 - Taxa de serviço, concepção e prenhez na ressincronização nos grupos IATF e observação de estro de acordo com o tipo de sêmen utilizado (convencional ou sexado) em vacas Nelore - Colina, SP – Dezembro de 2009 a Março de 2010

	Grupo IATF		Grupo Obs. Estro	
	Tipo de sêmen			
	Convencional	Sexado	Convencional	Sexado
Taxa de serviço	100% (47/47)	100% (41/41)	62,5% (30/48)	64,58% (31/48)
Taxa de concepção	14,9% (7/47)	7,3% (3/41)	43,3% (13/30)	38,7% (12/31)
Taxa de prenhez	14,9% (7/47)	7,3% (3/41)	27,08% (13/48)	25% (12/48)

Gráfico 5 – Taxa de serviço, concepção e prenhez na ressincronização nos grupos IATF e observação de estro de acordo com o tipo de sêmen utilizado (convencional ou sexado)

7 DISCUSSÃO

A taxa de concepção foi maior nas vacas com intervalo inseminação-ovulação menor (0 a 12 horas) confirmando a hipótese inicial deste estudo. No entanto, não se verificou diferença ($P = 0,95$) na taxa de concepção entre as vacas inseminadas 0 a 12 horas antes da ovulação e as recentemente ovuladas.

A taxa de ovulação dos animais do experimento e o intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 e a ovulação foram de 92,0% e $71,8 \pm 7,7$ horas, respectivamente. A alta taxa de ovulação neste estudo pode estar relacionado ao fato de os animais estarem em condição corporal acima de 3, bem manejados e com alta disponibilidade de forragem. Dados de literatura relatam que a taxa de ovulação em vacas Nelore submetidas à IATF varia de 64,3% (SALES et al., 2008) a 93,3% (CREPALDI et al., 2008) e está relacionada a condição corporal (SALES et al., 2009). Meneghetti et al. (2009) encontraram taxa de ovulação de 90,9% em vacas Nelore com condição corporal 3 e de 91,1% e 91,5% em vacas com condição corporal 3,5 e 4, respectivamente. Outros estudos recentes (PERES et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010b) encontraram resultados similares. No entanto, vacas com baixa condição corporal apresentam baixa taxa de ovulação após o protocolo para IATF com P4 e BE (SÁ FILHO et al., 2009).

Na presente investigação, o intervalo entre a retirada do dispositivo de P4 e a ovulação foi de $71,8 \pm 7,7$ horas. Estudos anteriores relataram resultados similares ocorrendo entre 69 e 76 horas em novilhas (CARVALHO et al., 2008) e em vacas de corte (CUTAIA et al., 2001; SÁ FILHO et al., 2010a) com ovulação em média 72 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. Neste estudo houve baixa dispersão das ovulações, pois 80,77% das vacas ovularam com 72 horas da retirada do dispositivo de P4. A utilização de protocolos que proporcionam uma ovulação sincronizada é uma condição importante na eficiência de programas de inseminação artificial, utilizando sêmen sexado (BARUSELLI et al., 2007b), pois a possibilidade de diminuir a variação do momento de ovulação permite a realização da IA em um momento satisfatório favorecendo a fertilização em protocolos de IATF que utilizam sêmen sexado.

Neste estudo foi administrado eCG no momento da retirada do dispositivo de progesterona. Estudos anteriores relataram que o emprego de eCG no momento da

retirada de implantes auriculares de norgestomet e de dispositivos intravaginais de progesterona aumentam as taxas de ovulação e concepção em vacas de corte, principalmente em animais em anestro, com baixa condição corporal e no período pós parto recente (MARQUES et al., 2003; BARUSELLI et al., 2004b; SÁ FILHO et al., 2010a). Em dois recentes estudos, Souza et al. (2009) e Sá Filho et al. (2010b) observaram que o tratamento com eCG no momento da retirada do dispositivo de progesterona não interferiu no intervalo entre a retirada da fonte de P4 e a ovulação.

O diâmetro médio do folículo ovulatório, foi de $14,7 \pm 2,3$ mm, superior ao observado em outros estudos prévios (REIS et al., 2004; AYRES et al., 2008; CREPALDI, 2009). O diâmetro do folículo ovulatório influenciou o momento das ovulações, nos quais folículos maiores ovularam precocemente (48 a 59 horas após a retirada do dispositivo de P4) em relação aos folículos menores que ovularam mais tardiamente (73 a 96 horas após retirada de P4). Em um recente estudo (SÁ FILHO et al., 2009) relataram que o diâmetro do folículo ovulatório afetou positivamente a taxa de ovulação, resultado semelhante ao encontrado por Meneghetti et al. (2009), possivelmente pelo aumento da capacidade ovulatória dos folículos. Sá filho et al. (2010a) ao associarem o tamanho do folículo ovulatório com a probabilidade de ovulação em vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF com P4 e BE, encontraram que folículos com diâmetro entre 11,1mm e 14,4mm no momento da IATF apresentam 95,8% de probabilidade de ovulação. Gimenes et al. (2008) correlacionaram o diâmetro do folículo ovulatório no momento do tratamento com LH, a taxa de ovulação, folículos entre 7 – 8,4mm; 8,5mm - 10mm e > 10mm apresentaram capacidade ovulatória de 33%, 80% e 90%, respectivamente.

A taxa de prenhez, neste estudo, foi maior ($P < 0.001$) nas vacas inseminadas 60 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de P4, quando comparada a vacas inseminadas 48 e 36 horas após a retirada de P4. Os resultados corroboram com dois estudos recentes que avaliaram o efeito do momento da inseminação em tempo fixo (54 vs. 60 horas após a retirada do dispositivo de P4) em novilhas Jérsey (CREPALDI et al., 2009) e em vacas Nelore lactantes (SOUZA et al., 2008). O atraso de 6 horas na realização da IATF com sêmen sexado aumentou a taxa de concepção em novilhas (54h = 16,2%; 60h = 31,4%) e em vacas Nelore (54h = 37,4%; 60h = 46,4%), No entanto, não houve efeito do atraso da IA na prenhez, quando da utilização do sêmen convencional nestes experimentos. O atraso no horário das inseminações, usando protocolos de sincronização de estro e ovulação

com utilização de sêmen sexado, tem aumentado as taxas de prenhez. Em novilhas leiteiras, inseminadas com sêmen sexado, maiores taxas de prenhez foram obtidas quando a IA foi realizada 67 a 68 horas, em comparação a IA realizadas 55 a 56 horas após a retirada do dispositivo de P4 (SHENK et al., 2009).

A possível influência de fatores ligados ao sêmen, em relação aos intervalos da IA para ovulação, nas taxas de concepção deve ser considerada. O efeito do horário da inseminação em relação à concepção, provavelmente é mais pronunciado no sêmen sexado (CREPALDI et al., 2009) ou em sêmen de baixa qualidade (HAWK, 1987). Uma possível explicação a este fato é que os danos causados aos espermatozóides no processo de sexagem resultem em menor viabilidade funcional no trato genital feminino (SCHENK et al., 1999).

A sexagem de espermatozóides expõe à suscetibilidade dos gametas ao corante Hoescht 33342, à exposição ao laser UV, às diluições elevadas, pressão elevada, resistência a mudança na composição dos meios diluidores e injúria mecânica (GARNER, 2006). No entanto, as lesões mais pronunciadas ao sêmen no processo de sexagem, provavelmente estão ligadas a forças mecânicas associadas ao processo (GARNER; SUH, 2002) e a menor motilidade pós descongelamento (BODMER et al., 2005). Tanno (2009) ao avaliar as alterações morfo-funcionais do sêmen bovino submetido à sexagem através da citometria de fluxo, concluiu que o sêmen de taurinos apresenta maior comprometimento do que os de zebuínos. O sêmen sexado oriundo de taurinos apresentou maior peroxidação lipídica nos espermatozóides com membrana íntegra e fatores indicativos de capacitação espermática.

Além disto, a concentração de espermatozóides é menor no sêmen sexado, o que pode diminuir a taxa de prenhez (SCHENCK et al., 1999). O número de espermatozóides no momento da fertilização aumenta a qualidade embrionária (SAACKKE, 2008) e o risco de prenhez (FRIJTERS et al., 2009). Bodmer et al. (2005) verificaram que dose inseminante de 2×10^6 espermatozóides por palheta apresenta redução de 30% nas taxas de prenhez de vacas, tanto com sêmen sexado quanto com sêmen convencional, demonstrando que o número de espermatozóides é mais importante para a concepção nesta categoria do que o tipo de sêmen utilizado. Em um recente estudo, Frijters et al. (2009) ao avaliarem os efeitos da baixa dose inseminante por palheta de sêmen convencional e sexado concluíram que 2/3 do decréscimo da fertilidade se deve à baixa dose inseminante e 1/3 às injúrias sofridas

pelos espermatozóides no processo de sexagem. No entanto, segundo Seidel e Schenck (2008) os danos aos espermatozóides no processo de sexagem não são corrigidos pelo aumento da dose inseminante no intervalo de 2 a 6×10^6 espermatozóides por palheta quando se insemina novilhas. Alguns touros possuem sêmen que suportam melhor as injúrias do processo de sexagem e mantêm a fertilidade em relação a outros (DOYLE et al., 1999; SEIDEL et al., 1999 ; BODMER et al., 2005). O número de espermatozóides em uma dose usual de sêmen convencional é 20×10^6 espermatozóides por palheta e não são todos os touros que mantêm a fertilidade quando essa dose é reduzida para 10×10^6 espermatozóides por palheta (PACE et al., 1981). Den Daas et al. (1998) ao verificarem a variação do número de espermatozóides aptos a fertilizar por dose de sêmen congelado de diferentes touros leiteiros concluíram que 20% da população de touros apresentam alta fertilidade. No entanto, 20% da população de touros são de baixa fertilidade. É imperativo a necessidade de identificação de touros que possuam sêmen refratário às injúrias mecânicas do processo de sexagem e mantenham fertilidade adequada com baixo número de espermatozóides por palheta, garantindo a viabilidade do sêmen sexado.

No presente estudo, vacas inseminadas com intervalos inseminação-ovulação menores (0 a 12 horas antes da ovulação) apresentaram 2,34 vezes ($P < 0,01$) mais chances de estarem gestantes aos 30 dias após a IATF do que vacas inseminadas 12,1 a 24 horas antes da ovulação. Em outro estudo recente, novilhas Jersey cíclicas inseminadas com sêmen sexado entre 16 a 24 horas do início do estro (6 a 14 horas antes da ovulação) apresentaram maior chance de se tornarem gestantes quando comparadas com aquelas realizadas 12 a 16 horas (In press²). Similar resultado foi observado com o sêmen convencional, no qual maiores taxas de prenhez foram observadas em intervalos inseminação-ovulação menores (HOCKEY et al., 2009). Nesse citado estudo, maiores taxas de prenhez (50,8%) foram alcançadas com inseminações realizadas 0 a 16 horas antes da ovulação, quando comparadas com inseminações realizadas entre 16 a 32 horas antes da ovulação (28,7%). No entanto, alguns autores (Dalton et al., 2001; Roelofs et al., 2006; Saacke, 2008) relataram que inseminações com sêmen convencional realizadas 6 a 12 horas antes da ovulação apresentam melhores taxas de prenhez.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças na taxa de concepção de vacas com intervalo inseminação-ovulação menores (0 a 12 horas) em relação a

² SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; NICHÍ, M.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; BARUSELLI, P. S. Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. *Theriogenology*, 2010. (In press).

vacas recentemente ovuladas, possivelmente pelo fato do sêmen sexado necessitar de menor tempo para a capacitação (LU et al., 2004) e estar disponível para fertilização mais rapidamente. No entanto, o efeito mais pronunciado do processo de sexagem no sêmen é a eliminação dos espermatozóides menos competentes, garantindo rapidamente a formação de reservatórios espermáticos de qualidade no trato genital feminino (SAACKE, 2008). Em relação a este resultado, deve-se considerar o reduzido número de animais nessa categoria de intervalo e a consolidação científica da maior viabilidade funcional do ovócito 6 a 10 horas após a ovulação (BRACKETT et al., 1980) com o envelhecimento do ovócito comprometendo a fertilização e qualidade embrionária (FRIJTERS et al., 2009).

Os valores absolutos de prenhez encontrados neste estudo podem ter sido influenciados pelo touro utilizado e fatores relacionados ao sêmen, pois somente um touro Angus foi utilizado nas inseminações e alguns touros apresentam maior sensibilidade na queda da qualidade espermática em resposta ao processo de sexagem (SEIDEL; SCHENCK, 2008; BORCHERSEN; PEACOCK, 2009). Experimentos de campo realizados em novilhas leiteiras identificaram diferenças entre touros na qualidade do sêmen sexado. Baixa fertilidade específica de efeito touro foram observadas, indicando que o sêmen de certos touros toleram melhor o stress do processo de sexagem do que de outros (SEIDEL; SCHENCK, 2002). Resultados similares foram encontrados por Borchersen e Peacock (2009) ao avaliarem a taxa de concepção do sêmen sexado e convencional de mesmos touros em fazendas comerciais leiteiras da Dinamarca, onde concluíram que existe uma diferença de 10 a 20% de queda de fertilidade entre touros. A variação na fertilidade dos touros é um importante fator para a inconsistência nas taxas de concepção, principalmente quando da utilização de sêmen sexado em programas de IATF.

A sincronização do estro após a primeira IA (ressincronização) pode ser uma alternativa para controlar a variação dos intervalos de retorno ao estro e incrementar o desempenho reprodutivo (EAGLES et al., 2001; McDOUGALL; LOEFFLER, 2004). Vacas que não concebem ao primeiro serviço necessitam ser re-inseminadas rapidamente para manter a eficiência reprodutiva (STEVENSON et al., 2003). No presente estudo, apesar da taxa de serviço ser maior nos animais ressincronizados (100% IATF vs 63,5% observação de estro) a taxa de serviço no grupo observação de estro foi relativamente satisfatória, provavelmente pela elevada taxa de ciclicidade do rebanho e eficiente detecção dos estros. Bartolome et al. (2009)

verificaram taxa de serviço de 49,2% em vacas leiteiras, com observação de estro de 30 dias a partir da primeira IA.

Os resultados da taxa de serviço do grupo IATF deste estudo, está de acordo com estudos anteriores, onde os mesmos relataram que o implante de progesterona por sete a oito dias a partir do 14º ou 21º dia aumenta o número de vacas não prenhes re-inseminadas (GALVÃO et al., 2007; CAVALIERI et al., 2008; BARTOLOME et al., 2009).

A hipótese de que vacas Nelore re-inseminadas em tempo fixo após a primeira IA teriam melhores taxas de prenhez quando comparadas a vacas inseminadas com observação de estro não foi confirmada, pois o grupo observação de estro, apesar da menor taxa de serviço apresentou maior taxa de concepção e prenhez.

No presente estudo a inserção do dispositivo de progesterona aconteceu no dia dezenove (D19), sendo aplicado nesse instante 0,105mg de acetato de buserelina. Segundo Fricke et al. (2003) começando o protocolo Ovsynch no dia dezenove após a primeira IA reduz-se as taxas de prenhez em comparação ao início nos dia vinte e seis ou trinta e três em vacas leiteiras. Em um estudo subsequente, melhores taxas de prenhez foram reportadas quando se iniciou o protocolo no dia trinta e três em comparação ao dia vinte e seis (STERRY et al., 2006) provavelmente por mais vacas estarem em um período apropriado do ciclo estral quando o GnRH foi administrado. Chenault et al. (2003) relataram uma diminuição de 4% nas taxas de prenhez quando da utilização de CIDR entre os dia quatorze e vinte e hum em programas de ressincronização. Bartolome et al. (2009) encontraram 25,3% e 22,7% de taxa de prenhez, respectivamente para os grupos controle (observação de estro) e ressincronização em vacas leiteiras.

Uma possível explicação para a taxa de prenhez diminuída no grupo IATF do presente estudo, pode ter sido o desenvolvimento de folículos persistentes, o que diminui a fertilidade subsequente, fato corroborado por Sávio et al. (1993b) ou a inadequada resposta a aplicação do GnRH no dia dezenove após a primeira IA. Em um estudo anterior (BARTOLOME et al., 2005) relataram aceitáveis taxas de prenhez (25%) em vacas leiteiras quando se iniciou o protocolo Ovsynch ou heatsynch no dia vinte e três após a primeira IA.

As vacas do grupo observação de estro tiveram taxa de prenhez de 43,3% quando da utilização de sêmen convencional e de 38,7% com utilização de sêmen

sexado, portanto, 10,62% menor, estes resultados são consistentes com estudos prévios (SEIDEL; SCHENK, 2008; BORCHENSEN; PEACOCK, 2009). No grupo IATF a taxa de prenhez utilizando sêmen convencional foi de 14,9% e de 7,3% com utilização de sêmen sexado, portanto, 51% menor. Neste caso, possivelmente o protocolo utilizado falhou em sincronizar a ovulação, necessitando de maiores investigações na ressincronização de vacas Nelore lactantes utilizando sêmen sexado.

8 CONCLUSÃO

A hipótese do presente estudo foi parcialmente aceita. Vacas Nelore lactantes inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado tiveram melhores taxas de prenhez quando o intervalo entre a inseminação e a ovulação foi reduzido. No entanto, quando se utilizou a ressincronização as vacas inseminadas em tempo fixo apresentaram menor taxa de prenhez que as vacas inseminadas após detecção do estro.

Dentro dos objetivos propostos, é possível concluir que:

- A taxa de concepção à IATF aumenta conforme reduziu o intervalo entre a inseminação e a ovulação.
- A taxa de concepção aumentou, quando a IATF foi realizada mais tardiamente em relação à retirada do dispositivo intravaginal de progesterona.
- A taxa de prenhez das vacas inseminadas após a detecção de estro é maior do que as submetidas à IATF para ressincronização tanto com sêmen sexado quanto com sêmen convencional.

REFERÊNCIAS

- AMANN, R. P. Issues affecting commercialization of sexed sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1441-1457, 1999.
- ANDERSON, M.; TAPONEN, J.; KOMMERI, M.; DAHLBOM, M. Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 41, p. 95-97, 2006.
- ARAV, A.; ZERO, Y.; SHTURMAN, H.; GACITUA, H. Successful pregnancies in cows following double freezing of large volume of semen. **Reproduction Nutrition Science Development**, v. 42, p. 583-586, 2002.
- ASCHBACHER, P. W.; SMITH, V. R.; STONE, W. H. Observation on fertility following insemination at three stages of the same estrus. **Journal Animal Science**, v. 51, p. 952-958, 1956.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE – ABIEC. **Exportações de carne bovina do Brasil**: período janeiro-dezembro de 2009. São Paulo: ABIEC, 2010. 12 p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL – ASBIA. **Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen 2009**. São Paulo: ASBIA, 2010, 18 p.
- AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TORRES-JÚNIOR J. R. S.; DEMÉTRIO, C. G. B.; DE LIMA, C. G.; BARUSELLI, P. S. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. **Livestock Science**, v. 123, p. 175-179, 2009.
- AYRES, H.; MARTINS, C. M.; FERREIRA, R. M.; MELLO, J. E.; DOMINGUEZ, J. H.; SOUZA, A. H.; VALENTIN, R.; SANTOS, I. C. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of timing of estradiol benzoate administration upon synchronization of ovulation in suckling Nelore cows (*Bos indicus*) treated with a progesterone-releasing intravaginal device. **Animal Reproduction Science**, v. 109, p. 77-78, 2008.
- AYRES, H. PENTEADO, L.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Taxa de concepção de vacas nelore lactantes sincronizadas com implante auricular de progestágeno associado ao benzoato ou ao cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 410, 2006.

BARRET, G. R.; CASIDA, L. E. Time of insemination and conception rates in artificial breeding. **Journal of Dairy Science**, v. 29, p. 556, 1946.

BARROS, C. M.; MOREIRA, M. B. P.; FERNANDES, P. Pharmacological manipulation of the oestrus cycle to improve artificial insemination or embryo transfer programs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 26, p. 179-198, 1998.

BARROS, C. M.; MOREIRA, M. B. B.; FIGUEIREDO, R. A.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*), using GnRH, PGF2 α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, p. 1121-1134, 2000.

BARTOLOME, J. A.; SOZZI, A.; McHALE, J.; SWIFT, K.; KELBERT, D.; ARCHBALD, L. E.; THATCHER, W. W.; Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows III. Administration of GnRH 23 days post AI and ultrasonography for nonpregnancy diagnosis on day 30. **Theriogenology**, v. 63, p. 1643-1658, 2005.

BARTOLOME, J. A.; VAN LEEUWEN, J. J. J.; THIEME, M.; SÁ FILHO, O. G.; MELENDEZ, P.; ARCHBALD, L. F.; THATCHER, W. W. Synchronization and resynchronization of inseminations in lactating dairy cows with the CIDR insert and the Ovsynch protocol. **Theriogenology**, v. 72, p. 869-878, 2009.

BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 205-211, 2007a.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; MARQUES, M. O. Programas de IA a tempo fixo em *Bos indicus*. Segunda Parte. **Taurus**, v. 13, p. 9-21, 2001.

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

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; MELLO, J. E.; CAMPOS FILHO, E. P. Taxa de concepção de diferentes protocolos de inseminação artificial em tempo fixo em vacas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* durante o período pós parto. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5., 2003, Fortaleza-CE. **Proceedings...** 2003. v. 1, p. 380.

BARUSELLI, P. S.; MARTINS, C. M.; SALES, J. N.; FERREIRA, R. M. Recent advances in bovine superovulation. **Acta Science Veterinary**, v. 38, p. 433-448, 2008.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; CARVALHO, N. A. T.; CARVALHO, J. B. P. eCG increase ovulation rate and plasmatic progesterone concentration in Nelore (*Bos indicus*) heifers treated with progesterone releasing device. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 14., 2004,[Abstract...], 2004b. v. 1, p. 117.

BARUSELLI, P. S.; REIS, E. L.; MARQUES, M. O.; NASSER, L. F.; BO, G. A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 479-486, 2004a.

BARRUSELLI, 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, 2007b.

BLOCH, A.; FOLMAN, Y.; KAIM, M.; ROTH, Z.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Endocrine alterations associated with extended time interval between estrus and ovulation in high-yield dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 89, p. 4694-4702, 2006.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 3, p. 193-204, 1995.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles, emergences of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, v. 40, p. 225-239, 1993.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p. 1555-1596, 1994.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effects of progestogen plus estradiol- 17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 897-910, 1996.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTÍNEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307-326, 2003.

BÓ, G. A.; CUTAIA, L.; TRÍBULO, R. Tratamientos hormonales para inseminación artificial a tiempo fijo em bovinos para carne: algumas experiências realizadas em Argentina. Primeira Parte. **Taurus**, v. 14, p. 10-21, 2002.

BODMER, M.; JANETT, F.; HÄSSIG, M.; DEN 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.

BORCHERSEN, S.; PEACOCK, M. Danish A.I. field data with sexed semen. **Theriogenology**, v.71, p. 59–63, 2009.

BRACKETT, B. G.; OH, Y. K.; EVANS, F.; DONAWICK, W. J. Fertilization and early development of cow ova. **Biology Reproduction**, v. 23, p. 189- 205, 1980.

BRASILIA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. MAPA. **Projeções do agronegócio: Brasil 2009/10 a 2019/2020. ASSESSORIA DE GESTÃO ESTRATÉGICA**. Brasília: MAPA, 2010, 48 p.

BRUSVEEN, D. J.; CUNHA, A. P.; SILVA, P. M.; CUNHA, R. A.; STERRY, R. A.; SILVA, E. P. B.; GUENTER, J. N.; WILTBANK, M. C. Effects of conception rates of lactating dairy cows by altering the time of the second GnRH and AI during Ovsynch. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 150, 2006. Abstract.

CAMPOS-CHILLON, L. F.; DE LA TORRE, J. F. Effect of concentration of sexed bovine sperm sorted at 40 and 50 psi on developmental capacity of in vitro produced embryos. **Theriogenology**, v. 59, p. 506, 2003.

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A.T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.

CAVALIERE, J.; SMART, V. M.; HEPWORTH, G.; RYAN, M.; MacMILLAN, K. L. Ovarian follicular development and hormone concentrations in inseminated dairy cows with resynchronized estrous cycles. **Theriogenology**, v. 70, p. 946-955, 2008.

CENTURION, F.; VASQUEZ, J. M.; CALVETE, J. J.; ROCA, J.; SANZ, L.; PARILLA, I. Influence of porcine spermadhesins on the susceptibility of boar spermatozoa to high dilution. **Biology Reproduction**, v. 69, p. 640- 646, 2003.

CHENAULT, J. R.; BOUCHER, J. F.; DAME, K. J.; MEYER, J. A.; WOOD-FOLLIS, S. L. Intravaginal progesterone insert to synchronize return to estrus of previously inseminated dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2039-2049, 2003.

COLAZO, M.G.; AMBROSE, D. J.; MAPLETOFT, R. J. Pregnancy rates to timed-AI of dairy cows treated with pLH or GnRH. **Journal Dairy of Science**, v. 90, p. 328, 2007.

COLAZO, M. G.; BÓ, G. A.; ILLUMINATI, H.; MEGLIA, G.; SCHMIDT, E. E.; BARTOLOME, J. Fixed-time artificial insemination in beef cattle using CIDR-B devices, progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 51, p. 404, 1999. (Abstract).

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, p. 855-865, 2003.

CREPALDI, G. A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. 2009. 87 f. . Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

CREPALDI, G. A.; SALES, J. N. S.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; BARUSELLI, P. S. Momento da ovulação e taxa de prenhez de novilhas Jersey submetidas à inseminação artificial em tempo fixo com sêmen sexado em diferentes momentos. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCION ANIMAL (IRAC), 8., 2009, Córdoba – Argentina. **Anais...** 2009.

CUTAIA, L.; MORENO, D.; VILLATA, M. L.; BÓ, G. A. Synchrony of ovulation in beef cows treated with progesterone vaginal devices and estradiol benzoate administered at device removal or 24 h later. **Theriogenology**, v. 55, p. 244, 2001.

DALTON, J. C.; NADIR, S.; BAME, J. H.; NOFTSINGER, M.; NEBEL, R. L.; SAACKER, R. G. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2413-2418, 2001.

DEJARNETTE, J. M.; HOUSE, R. B.; AYARS, W. H.; WALLACE, R. A.; MARSHALL, C. E. Synchronization of estrus in postpartum beef cows and virgin heifers using combinations of melengestrol acetate, GnRH, and PGF2 alpha. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 867-877, 2004.

DEJARNETTE, J. M.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farms records. **Theriogenology**, v. 71, p. 49-58, 2009.

DEMIRAL, O.; UN, M.; ABAY, M.; BEKYUREK, T. The effect of articial insemination timing on the sex ratio of offspring and fertility in dairy cows. **Turkish Journal of Veterinary Animal Science**, v. 31, p. 21-24, 2007.

DEN DAAS, J. H. G.; DE JONG, G.; LANSBERGEN, L. M T. E.; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A. M. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individuals dairy bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1714-1723, 1998.

DOBBINS, C. A.; EBORN, D. R.; TENHOUSE, D. E.; BREINER, R. M.; JOHNSON, S. K.; MARSTON, T. T.; STEVENSON, J. S. Insemination timing affects pregnancy rates in beef cows treated with CO-Synch protocol including an intravaginal progesterone insert. **Theriogenology**, v. 72, p. 1009-1016, 2009.

DOYLE, S. P.; SEIDEL, JR., G. E.; SCHENK, J. L.; HERICKHOFF, L. A.; CRAN, D.; GREEN, R. D. Artificial insemination of lactating angus cows with sexed semen. **American Society of Animal Science**, v. 50, p. 203-205, 1999. Trabalho apresentado no Proceedings of the western section.

DRANSFIELD, M. B. G.; NEBEL, R. L.; PEARSON, R. E.; WARNICK, L. D. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1874-1882, 1998.

EAGLES, V. E.; MALMO, J.; MACMILLAN, K. L. Resynchronising returnsto-service in anoestrous cows in Victorian dairy herds. **New Zealand Society of Animal Production**, v. 61, p. 176-179, 2001.

FAO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATION. 2008. Disponível em:< <http://faostat.fao.org/site/573/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 28 ago. 2010.

FERNANDES, P.; TEIXEIRA, A. B.; CROCCI, A. J.; BARROS, C. M. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF2& and estradiol benzoate (BE). **Theriogenology**, v. 55, p. 1521-1532, 2001.

FOOTE, R. H. Time of artificial insemination and fertility in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 62, p. 355-358, 1978.

FRICKE, P. M.; CARAVIELLO, D. Z.; WEIGEL, K. A.; WELLE, M. L. Fertility of dairy cows after resynchronization of ovulation at three intervals following first timed insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 3941-3950, 2003.

FRIJTERS, A. C. J.; MULLAART, E.; ROELOFS, R. M. G.; VAN HOORNE, R. P.; MORENO, J. F.; MORENO, O.; MERTON, J. S. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process. **Theriogenology**, v. 71, p. 64-67, 2009.

GALINA, G. S.; ORIHUELA, A.; BUBIO, I. Behavioral trends affecting estrous detection in Zebu cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 465-470, 1996.

GALVÃO, K. N.; SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L.; CHEBEL, R. C.; RUTIGLIANO, H. M.; BRUNO, R. G.; BICALHO, R. C. Evaluation of methods of resynchronization for insemination in cows of unknown pregnancy status. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 4240-4252, 2007.

GAMBINI, A. L. G.; MOREIRA, M. B. P.; CASTILHO, C.; BARROS, C. M. Desenvolvimento folicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, n. 4, p. 201-210, 1998.

GARNER, D. L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 943-957, 2006.

GARNER, D. L. Hoechst 33342: the dye that enabled the differentiation of living X- and Y- chromosome bearing mammalian sperm. **Theriogenology**, v. 68, p. 11-21, 2009.

GARNER, D. L. Sex-sorting mammalian sperm: concept to applications in animals. **Journal of Andrology**, v. 22, p. 519-526, 2001.

GARNER, D. L.; GLEDHILL, B. L.; PINKEL, D.; LAKE, S.; STEPHENSON, D.; VAN DILLA, M. A.; JOHSON, L. A. Quantification of the X- and Y- chromosome-bearing of domestic animals by flow cytometry. **Biology Reproduction**, v. 28, p. 312-321, 1983.

GARNER, D. L.; SEIDEL, JR., G. E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, v. 69, p. 886-895, 2008.

GARNER, D. L.; SEIDEL, JR., G. E. Past, present and future perspectives on sexing sperm. **Canadian Journal Animal Science**, v. 83, p. 375-385, 2003.

- GARNER, D. L.; SUH, T. K. Effects of Hoechst 33342 staining and laser illumination on viability of sex-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 57, p. 746, 2002.
- GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES JUNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 852-858, 2008.
- GLEDHILL, B. L.; LAKE, S.; STEINMETZ, L. L.; GRAY, J. W.; CRAWFORD, J. R.; DEAN, P. N.; VAN DILLA, M. A. Flow microfluorometric analysis of sperm DNA content: effect of cell shape on the fluorescence distribution. **Journal Cell Physiology**, v. 87, p. 367-376, 1976.
- GWAZDAUSKAS, F. C.; WHITTIER, W. E.; VINSON, W. E.; PEARSON, R. E. Evaluation of reproductive efficiency of dairy cattle with emphasis on timing of breeding. **Journal of Dairy Science**, v. 69, p. 290-297, 1986.
- HAWK, H. W. Transport and fate of spermatozoa after insemination of cattle. **Journal Dairy Science**, v. 70, p. 1487-1503, 1987.
- HAYAKAWA, H.; HIRAI, T.; TAKIMOTO, A.; IDETA, A.; AOYAGI, Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 71, p. 68-73, 2009.
- HOCKEY, C. D.; MORTON, J. M.; NORMAN, S. T.; MCGOWAN, M. R. Improved prediction of ovulation time may increase pregnancy rates to artificial insemination in lactating dairy cattle. **Reproduction Domestic Animal**, (doi:10.1111/j.1439-0531.2009.01548.x), 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2009.01548.x/pdf>>. Acesso em: 27 ago. 2010.
- HOLLINSHEAD, F. K.; O'BRIEN, J. K.; GILLAN, L.; MEYERS, M.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Birth of lambs of a predetermined sex after in vitro production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, p. 557- 568, 2004.
- HUNTER, R. H. F.; WILMUT, I. Sperm transport in the cow: periovulatory redistribution of viable cells within the oviduct. **Reprod. Nutr. Dev.**, v. 24, p. 597-603, 1984.

JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state –of-the-art. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 93-107, 2000.

JOHNSON, L. A.; FLOOK, J. P.; HAWK, H. W. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. **Biology Reproduction**, v. 41, p. 199- 203, 1989.

JOHNSON, L. A.; FLOOK, J. P.; LOOK, M. V. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. **Gamete Research**, v. 17, p. 203-212, 1987a.

JOHNSON, L. A.; FLOOK, J. P.; LOOK, M. V.; PINKEL, D. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing spermatozoa into two populations. **Gamete Research**, v. 16, p. 1-9, 1987b.

JOHNSON, L. A.; WELCH, G. R.; GARNER, D. L. Improved flow sorting resolution of X- and Y- bearing viable sperm using dual staining and dead cell gating. **Cytometry**, v. 17, p. 83, 1994.

JOHNSON, L. A.; WELCH, G. R.; RENS, W. The Beltsville Sperm Sexing Technology: High-speed sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI. **Journal Animal Science**, v. 77, p. 213-220, 1999.

KIDDY, C. A.; HAFS, H. D. Sex ratio at birth-prospects for control. Savoy, IL: **American Society of Animal Science**, p.85-97, 1971.

KURYKIN, J.; JAAKMA, U.; JALAKAS, M.; AIDNIK, M.; WALMANN, A.; MAJAS, L. Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. **Theriogenology**, v.67, p. 754-759, 2007.

LEMASTER, J. W.; YELICH, J. V.; KEMPER, J. R.; SCHRICK, F. N. Ovulation and estrus characteristics in crossbred Brahman heifers treated with an intravaginal progesterone-releasing insert in combination with prostaglandin F2 α and estradiol benzoate. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1860-1868, 1999.

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.

MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of estrus cycle control on reproductive efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 307-320, 1996.

MACMILLAN, K. L.; PETERSON, A. J. A new intravaginal progesterone releasing device for cattle (CIDR-B) for oestrus synchronization, increasing pregnancy rates and the treatment of post-partum anoestrus. **Animal Reproduction Science**, v. 33, p. 1, 1993.

MACMILLAN, K. L.; WATSON, J. D. Factors influence A. B. conception rates. V. cows age and stage of estrus at insemination. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, v. 3, p. 29, 1975.

McDOUGALL, S.; LOEFFTER, S. H. Resynchrony of postpartum dairy cows previously treated for anestrus. **Theriogenology**, v. 61, p. 239-253, 2004.

MARQUES, M. O.; AYRES, H.; REIS, E. L.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Efeito do cipionato e do benzoato de estradiol na taxa de prenhez de vacas nelore inseminadas em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinário**, v. 32, p. 222, 2004.

MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; CAMPOS FILHO E. P.; BARUSELLI, P. S. Effect of eCG and estradiol benzoate for synchronization of ovulation in zebu cows during the post-partum period. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF ANIMAL REPRODUCTION, 5., 2003, Córdoba, Argentina. [**Proceedings...**], 2003, p. 392. Abstract.

MARTINEZ, F.; KAABI, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; DE PAZ, P.; ANEL, L. Effect of the interval between estrus onset and artificial insemination on sex ratio and fertility in cattle: a Field study. **Theriogenology**, v. 62, p. 1264-1270, 2004.

MARTINEZ, M. F.; ADAMS, G. P.; BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. **Animal of Reproduction Science**, v. 57, p. 23-33, 1999.

MARTINEZ, M. F.; KASTELIC, J. P.; ADAMS, G. P.; COOK, R. B.; OLSON, W. O.; MAPLETOFT, R. J. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 1049-1059, 2002.

MARTINS, C. M.; CASTRINI, E. S. C.; SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; BARUSELLI, P. S. Dinâmica folicular de vacas nelore tratadas com cipionato ou

benzoato de estradiol em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 285, 2005.

MAXWELL, W. M. C.; LONG, C. R.; JOHNSON, L. A.; DOBRINSKY, J. R.; WELCH, G. R. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction Fertility and Development**, v. 10, p. 433-440, 1998.

MEISTRICH, M. L. Possible genetics risks of sperm sorting. **Cytometry**, p. 134, 1996. Supplement, 8. Abstract S113.

MENEGHETTI, M.; SÁ FILHO, O. G.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed time artificial insemination with estradiol and progesterona for *Bos indicus* cows I: Basis for development of protocols. **Theriogenology**, v.72, p. 179-189, 2009.

MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C. A.; MATTOS, R. LOPES, F.; THATCHER, W. W. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 84, p. 1646-1659, 2001.

MORRELL, J. M.; DRESSER, D. W. Offspring from inseminations with mammalian sperm stained with Hoechst 33342, either with or without flow cytometry. **Mutation Research**, v. 224, p. 177-183, 1989.

MORRIS, L.; HOLLINSHEAD, F. K.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. The longevity and acrosome status of flow sorted stallion. **Spermatozoa**, v. 59, p. 512, 2003.

NEBEL, R. L.; DRANSFIELD, B. G.; DALTON, J. C.; BAME, J. H.; SAACKKE, R. G. Timing of AI-have we been wrong all these years. **Advances in Dairy Technology**, v. 12, p. 195-209, 2000.

NEBEL, R. L.; WALKER, W. L.; MCGILLIARD, M. L.; ALLEN, C. H.; HECKMAN, G. S. Timing of artificial-insemination of dairy-cows-fixed time once-daily versus morning and afternoon. **Journal of Dairy Science**, v. 77, p. 3185-3191, 1994

PACE, M. M.; SULLIVAN, J. J.; ELLIOT, F. I.; GRAHAM, E. F.; COULTER, G. H. Effects of thawing temperature, number of spermatozoa and spermatozoa quality on fertility of bovine spermatozoa packaged in 0,5 French straws. **Journal Animal Science**, v.53, p. 693-701, 1981.

PAINTER, T. Studies in mammalian spermatogenesis II. The spermatogenesis of man. **Journal of Experimental Zoology**, v. 37, p. 291-335, 1923.

PANARACE, M.; MEDINA, M.; CATTANEO, L.; CABALLERO, J.; CERRATE, H.; DALLA LASTA, M. Embryo production using sexed sêmen in superovuted cows and heifers. **Theriogenology**, v. 59, p. 513, 2003.

PARILLA, I.; VASQUEZ, J. M.; CUELLO, C.; GIL, M. A.; ROCA, J.; DI BERNARDINO, D. Hoechst 33342 stain and UV exposure do not induce genotoxic effect in flow- sorted boar spermatozoa. **Reproduction**, v. 128, p. 615-621, 2004.

PENTEADO, L.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U.; AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. Variação na taxa de concepção de vacas nelore lactantes sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao benzoato ou ao cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 260, 2005.

PERES, R. F. G.; CLARO JÚNIOR, I.; SÁ FILHO, O. G.; NOGUEIRA, G. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* cycling heifers and non-lactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v.92, p.681-689, 2009.

PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; VALLE, E. R.; ENCARNAÇÃO, R. O.; PADOVANI, C. R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F2 alpha or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, v. 49, p. 667-681, 1998.

PINKEL, D.; LAKE, S.; GLEDHILL, B. L.; VAN DILLA, M. A.; STEPHENSON, D.; WATCHMAKER, G. High resolution DNA content measurements of mammalian sperm. **Cytometry**, v. 3, p. 1-9, 1982.

PORTALUPPI, M. A.; STEVENSON, J. S. Pregnancy rates in lactating dairy cows after presynchronization of estrous cycles and variations of the Ovsynch protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 914-921, 2005.

PURSLEY, J. R. Practical ovsynch programs. **Proceedings of the American Association of Bovine Practitioners (AAPB) annual meeting**, v. 40, p. 44-49, 2007.

PURSLEY, J. R.; KOSOROK, M. R.; WILTBANK, M. C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. **Journal Dairy Science**, v. 80, n. 2, p. 301-306, 1997.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-923, 1995.

PURSLEY, J. R.; SILCOX, R. W.; WILTBANK, M. C. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. **Journal Dairy of Science**, v. 81, p. 2139- 2144, 1998.

PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C.; STEVENSON, J. S.; OTTOBRE, J. S.; GARVERICK, H. A.; ANDERSON, L. L. Pregnancy rates per artificial insemination for cows and heifers inseminated at a synchronized ovulation or synchronized estrus. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 295-300, 1997.

RATH, D.; MOENCH-TEGEDER, G.; TAYLOR, U.; JOHNSON, L. A. Improved quality of sex sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application. **Theriogenology**, v. 71, p. 22-29, 2009.

RATH, D.; RUIZ, S.; SIEG, B. Birth of females piglets following intrauterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen. **The Veterinary Record**, v. 152, p. 400-401, 2003.

REIS, E. L.; GIMENES, L. U.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Efeitos do cipionato e do benzoato de estradiol na dinâmica folicular e luteínica de vacas nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 236, 2004.

RHODES, F. M.; BURKE, C. R.; CLARK, B. A.; DAY, M. L.; MACMILLAN, K. L. Effect of treatment with progesterone and estradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrus cows and which have resumed oestrus cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 139-150, 2002.

ROCHA, J. L. **Sincronização hormonal da onda folicular e do estro em novilhas de corte mestiças monitoradas por radiotelemetria**. 2000. 125 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ROELOFS, J. B.; SOEDE, N. M.; KEMP, B. Insemination strategy based on ovulation prediction in dairy cattle. **Flemish Veterinary Journal**, v. 75, p. 70-78, 2006.

RUIZ-CORTEZ, Z. T.; OLIVERA-ANGEL, M. Ovarian follicular dynamics in suckled zebu (*Bos indicus*) cows monitored by real time ultrasonography. **Animal Reproduction Science**, v. 54, p. 211-220, 1999.

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; SILVA, R. C.; RODRIGUES, C. A.; MADUREIRA, E. H.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin and gonadotropin-releasing hormone enhance fertility in a norgestomet-based, timed artificial insemination protocol in suckled Nelore (*Bos indicus*) cows. **Theriogenology**, v. 73, n. 5; p. 651-658, 2010b.

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E.; PERRY, G. A.; BARUSELLI, P. S. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 23-30, 2010a.

SÁ FILHO, O. G.; THATCHER, W. W.; VASCONCELOS, J. L. M. Effect of progesterone and/or estradiol treatments prior to induction of ovulation on subsequent luteal lifespan in anestrous Nelore cows. **Animal Reproduction Science**, v. 112, p. 95-106, 2009.

SAACKE, R. G. Insemination factors related to timed AI in cattle. **Theriogenology**, v. 70, p. 479-484, 2008.

SALES, J. N. S.; CARVALHO, J. B. P.; CREPALDI, G. A.; MAIO, J. R. G.; CARVALHO, C. A. B.; BARUSELLI, P. S. Rate and timing of ovulation in Nelore cows treated with estradiol cypionate or benzoate to induce ovulation on FTAI protocols. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 16.; 2008, Budapeste. [**Proceedings...**]. Berlin: Wiley-Blackwell, 2008. v. 43. p. 181.

SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; DIAS, L.M.K.; TEIXEIRA, A.A.; CARDOSO, G.G.C.; GRANDINETTI, R.R.; OLIVEIRA, V.G.; COMBI, I.M.; BARUSELLI, P. S. Evaluation of different protocols to induce cyclicity in prepubertal beef heifers. In: International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 2., São Paulo. **Animal Reproduction**. Belo Horizonte: Brazilian College of Animal Reproduction, 2009. v. 6. p. 234.

SARTORI, R.; SOUZA, A. H.; GUENTER, J. N.; CARVIELLO, D. Z.; GEIGER, L. N.; SCHENK, J. L. Fertilization rate and embryo quality in super-ovulated Holstein

heifers artificially inseminated with X-sorted sperm. **Animal Reproduction**, v. 1, p. 86-90, 2004.

SAUMANDE, J.; HUMBLLOT, P. The variability in the interval between estrus and ovulation in cattle and its determinants. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 171-182, 2005.

SÁVIO, J. D.; THATCHER, W. W.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; WOLFENSON, D. Regulation of dominant follicle turnover during the oestrus cycle in cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 197-203, 1993a.

SÁVIO, J. D.; THATCHER, W. W.; MORIS, G. R.; ENTWISTLE, K.; DROST, M.; MATTIACCI, M. R. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone- releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.98, p. 77-84, 1993b.

SCHENK, J. L.; BRINK, Z.; SUH, T. K. Use of competitive fertilization to evaluate a simpler laser for flow cytometric sexing of bovine sperm. **Reproduction Fertility And Development**, v. 16, p. 306, 2005

SCHENK, J. L.; SUH, T. K.; CRAN, D. G.; SEIDEL, JR., G. E. Cryopreservation of flow-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1375-1391, 1999.

SCHENK, J. L.; CRAN, D. G.; EVERETT, R. W.; SEIDEL JR., G. E. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. **Theriogenology**, v.71, p. 717-728, 2009.

SCHENK, J. L.; SEIDEL, JR., G. E. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed spermatozoa: effects of laser intensity, staining conditions and catalase. **Society of Reproduction Fertility**, v. 64, p. 165-177, 2007.

SCHENK, J. L.; SUH, T. K.; SEIDEL, JR., G. E. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 299- 307, 2006.

SEIDEL JR., G. E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v. 68, p. 443-446, 2007.

SEIDEL JR., G. E. Sperm sexing technology - The transition to commercial application- An introduction to the symposium "Update on sexing mammalian sperm". **Theriogenology**, v. 71, p. 1-3, 2009.

SEIDEL JR., G. E. Commercializing reproductive biotechnology- the approach used by XY, Inc.. **Theriogenology**, v. 51, p. 5, 1999.

SEIDEL JR., G. E.; GARNER, D. L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 124, p. 733-743, 2002.

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.

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

SHARP, J. C.; EVANS, K. M. Advances in flow cytometry for sperm sexing. **Theriogenology**, v. 71, p. 4-10, 2009.

SMALL, J. A.; COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of progesterone presynchronization and eCG on pregnancy rates to GnRH-based, timed-AI in beef cattle. **Theriogenology**, v. 71, p. 698-706, 2009.

SOTO BELLOSO, E.; PORTILLO MARTÍNEZ, G.; DE ONDIZ, A.; ROJAS, N.; SOTO CASTILLO, G.; RAMÍREZ IGLESIA, L.; PEREA GANCHOU, F. Improvement of reproductive performance in crossbred zebu anestrous primiparous cows by treatment with norgestomet implants or 96 h calf removal. **Theriogenology**, v. 57, p. 1503-1510, 2002.

SOUZA, A. H.; MUNDIM, L.; VENTURIM, P.; AYRES, H.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S.; MRTINS, C. M.; BARUSELLI, P. S. Effect of the type of semen (sexed vs. non-sexed) and time of AI on pregnancy rates in Nelore cows inseminated at fixed time. JUBILEE WORLD BUIATRICS CONGRESS. **Hungarian Veterinary Journal**, v.130, p.208, 2008. Trabalho apresentado no XXV Jubilee World Buiatrics Congress.

SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A.; SILVA, F. F.; ARAÚJO, R.; BÓ, G. A.; WILTBANK, M. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed -IA protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, p. 10-21, 2009.

STERRY, R. A.; JARDON, P. J.; FRICKE, P. M. Effect of timing of Cosynch on fertility of lactating Holstein cows after first postpartum and Resynch timed-AI services. **Theriogenology**, v. 67, p. 1211-1216, 2007.

STERRY, R. A.; WELLE, M. L.; FRICKE, P. M. Effect of interval from timed artificial insemination to initiation of resynchronization of ovulation on fertility of lactating dairy cows. **Journal Dairy Science**, v. 89, p. 2099-2109, 2006.

STEVENSON, J. S.; CARTMILL, J. A.; HENSLEY, B. A.; EL-ZARKOUNY, S. Z. Conception rates of dairy cows following early not-prognant diagnosis by ultrasonography and subsequent treatments with shortened Ovsynch protocol. **Theriogenology**, v. 60, p. 475-483, 2003.

STEVENSON, J. S.; PURSLEY, J. R.; GARVERICK, H. A.; FRICKE, P. M.; KESLER, D. J.; OTTOBRE, J. S.; WILTBANK, M. C. Treatment of cycling and noncycling lactating dairy cows with progesterone during Ovsynch. **Journal Dairy Science**, v. 89, p. 2567-2578, 2006.

STOCK, A. E.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth and the ovulatory follicle and endocrine parameters. **Endocrinology**, v. 132, p. 1108-1114, 1993.

SUH, T. K.; SCHENK, J. L.; SEIDEL, JR., G. E. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. **Theriogenology**, v. 64, p. 1035-1048, 2005.

TANNO, P. H. **Estudo das alterações morfo-funcionais de espermatozóides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

THIBAUT, C. Sperm transport and storage in vertebrates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 18, p. 39-53, 1973.

TRIMBERGER, G. W.; DAVIS, H. P. Breeding efficiency in dairy cattle bred at various stages of estrus by artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 26, p. 757-759, 1943.

TUBMAN, L. M.; BRINK, Z.; SUH, T. K.; SEIDEL, JR., G. E. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 1029-1036, 2004.

- VASCONCELOS, J. L. M. Controle do estro e da ovulação visando a inseminação artificial em tempo fixo em bovinos de leite. In: SIMPÓSIO SOBRE O CONTROLE FARMACOLÓGICO DO CICLO ESTRAL EM RUMINANTES. 1., 2000, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2000. p.115-157.
- VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. N.; WILTBANK, M. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. **Theriogenology**, v. 56, p. 307-314, 2001.
- VASCONCELOS, J. L. M.; SILCOX R. W.; ROSA, G. J. M.; PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C. Synchronization rate, diameter of the ovulatory follicle, and conception rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrus cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, p. 1067-1078, 1999.
- VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; PARILLA, I.; ROCA, J.; GIL, M. A.; VAZQUEZ, J. L. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59. P. 1605-1614, 2003.
- WALKER, W. L.; NEBEL, R. L.; MCGILLIARD, M. L. Time of ovulation relative to mounting activity in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 79, p. 1555-1561, 1996.
- WEIGEL, K. A. Exploring the role of sexed semen in dairy productions systems. **Journal Dairy Science**, v. 87, p. 120-130, 2004.
- WHITE, F. J.; WETTWMANN, R. P.; LOOPER, M. L.; PRADO, T. M.; MORGAN, G. L. Seasonal effects on estrous behavior and time of ovulation in nonlactating beef cows. **Journal Animal Science**, v. 80, p. 3053-3059, 2002.
- WILHELM, D.; PALMER, S.; KOOPMAN, P. Sex determination and gonadal development in mammals. **Physiological Reviews**, v. 87, p. 1-28, 2007.
- WILLIAMS, S. W.; STANKO, R. L.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, G. L. Compararison of three approaches for synchronization of ovulation for timed artificial insemination in *Bos indicus*- influenced cattle managed on the Texas gulf coast. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1173-1178, 2002.
- WILMUT, I.; HUNTER, R. H. F. Sperm transport into the oviducts of heifers mated early in oestrus. **Reproduction, Nutrition and Development**, v. 24, p. 461-468, 1984.

WILTBANK, J. N.; INGALLS, J. E.; ROWDEN, W. W. Effects of various forms and levels of estrogens alone or in combination with gonadotrophins on the estrous cycle of beef heifers. **Journal Animal Science**, v. 20, p. 341-346, 1961.

WILTBANK, M. C. How information on hormonal regulation of the ovary has improved understanding of timed breeding programs. In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR THERIOGENOLOGY, 1997, Oregon. **Proceedings...**, 1997. p. 83-97.

WILTBANK, M. C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 21-52, 2002.