

GABRIEL ARMOND CREPALDI

**Desenvolvimento do uso de sêmen sexado  
refrigerado na IATF de vacas de corte**

São Paulo

2023

GABRIEL ARMOND CREPALDI

# **Desenvolvimento do uso de sêmen sexado refrigerado na IATF de vacas de corte**

Tese 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 Doutor em Ciências.

**Departamento:**

Reprodução Animal

**Área de concentração:**

Reprodução Animal

**Orientador:**

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

**São Paulo  
2023**

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)

4311  
FMVZ

Crepaldi, Gabriel Armond  
Desenvolvimento do uso de sêmen sexado refrigerado na IATF de vacas de corte /  
Gabriel Armond Crepaldi. – 2023.  
63 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e  
Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2023.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Sêmen sexado. 2. Sêmen refrigerado. 3. IATF. 4. Vaca de corte. I. Título.

# CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA (CEUA)



Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

Comissão de Ética no  
Uso de Animais

## CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Desenvolvimento do uso de sêmen sexado refrigerado na IATF de vacas de corte", protocolada sob o CEUA nº 6289070622 (10.009626), sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli** e equipe; *Gabriel Armond Crepaldi* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 09/11/2022.

We certify that the proposal "Development of the use of fresh sexed semen in the FTAI of beef cows", utilizing 3800 Bovines (3800 females), protocol number CEUA 6289070622 (10.009626), under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli and team; Gabriel Armond Crepaldi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/09/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 08/2022 a 02/2023 Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 15 anos**

Quantidade: **3800**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **300 a 600 kg**

São Paulo, 09 de novembro de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo



## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: CREPALDI, G. A.

Título: Desenvolvimento do uso de sêmen sexado refrigerado na IATF de vacas de corte

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção de título de Doutor em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

À minha esposa, Erica, meus filhos Heloísa e Gustavo, pela família que formamos, pela compreensão nos momentos de ausência e sobretudo pelo amor, carinho e convivência quando estamos juntos!

Aos meus pais, Victor e Marta, pelo apoio e torcida incondicional, por me ensinarem o valor do trabalho e mostrar que com esforço e força de vontade podemos alcançar nossos objetivos.

Ao Mestre dos mestres, Professor Pietro que com sua liderança, humildade e sabedoria nos conduz diariamente ao caminho da produtividade e da integridade.

***DEDICO***

## **AGRADECIMENTOS**

A minha família, base de tudo, suporte nos momentos mais difíceis e presença constante nos melhores momentos da minha vida! Erica, Helô, Gu, pai (Victor), mãe (Marta), Vó Aracy, Bruno, Dani, Lucas, Beatriz, Fernando, Pedro, Salete, Geraldo, Thiago, Jéssica, Pedrinho e Cecília, obrigado por todos os momentos vividos juntos até agora e por todos os que ainda iremos viver.

Ao Pietrão, orientador no sentido mais amplo da palavra. Pode ter certeza que só de estar perto de você já é suficiente para tornar alguém um ser humano melhor. Obrigado por mais esses anos de convívio, pela oportunidade de tornar esse sonho uma realidade e pela amizade.

Ao grande amigo Zé Nélio. Eu achava que ele não ia virar muita coisa, mas até que saiu bom. Você vai longe, meu amigo! Uma pena que até hoje não aprendeu a jogar futebol (eu já tinha falado isso no mestrado e continua até hoje) e teve que partir para a peteca... Obrigado também por colaborar com minha qualificação, ajudar com a estatística (novamente) e aceitar participar da minha defesa.

Ao Nil, profissional exemplar, mas acima de tudo, um ser humano único com o coração que não cabe no peito! Obrigado pela amizade, pelo apoio nos momentos de desabafo e por aguentar minha teimosia constante.

Ao professor Guilherme Pugliesi por aceitar e colaborar na etapa de qualificação desse projeto e por prontamente aceitar o convite para participar da banca.

Ao Mano, professor Marcílio pela coorientação e amizade e a toda equipe do laboratório de Andrologia da USP, especialmente Raphaela, Ken e Álvaro pela ajuda com a etapa laboratorial do projeto desenvolvido.

Aos professores Lindsay e Roberto Sartori por aceitarem participar da conclusão dessa etapa, fazendo parte da banca de defesa.

À toda equipe da ST Repro, em especial aos amigos Marcos, Cristiano, Marcelo, Rafael e nosso mais novo agregado Rodrigo que deram suporte para que eu pudesse me dedicar ao desenvolvimento desse trabalho.

À equipe da STgen/Sexing Technologies, em especial ao Sthefano por ajudarem no desenvolvimento do trabalho realizando a sexagem de todas as partidas usadas nesse estudo.

Aos parceiros de laboratório orientados do professor Pietro. Obrigado pelo suporte nos banners e resumos. Não é fácil nomear todo mundo porque a família é muito grande! Desejo muito sucesso a todos e espero encontrá-los futuramente nas nossas andanças pelas fazendas do Brasil afora.

À Harumi, sempre nos ajudando com a papelada e cobrando a turma dos prazos de entrega, pela sua dedicação, competência e amizade.

A toda equipe do VRA, professores, pós-graduandos e funcionários que fazem com que o departamento esteja sempre na vanguarda da pesquisa em reprodução animal.

Não posso deixar de lembrar da equipe da Geraembryo que foi fundamental para que eu começasse meus primeiros passos nessa jornada que se iniciou no mestrado e resultou no trabalho apresentado nessa tese. Obrigado, Marcio, Marinho e Rubinho por toda ajuda no momento mais difícil da carreira profissional que é a fase inicial.

A toda equipe da CIA Pecuária de Campo Grande-MS, em especial ao Caio e ao Rafael por disponibilizar as fazendas e animais e pela competência no auxílio do desenvolvimento da parte de campo da etapa MS do projeto desenvolvido.

A toda equipe da Spezia Consultoria de Capão Verde-MT, em especial ao amigo João Paulo por disponibilizar as fazendas e animais e pela competência no auxílio do desenvolvimento da parte de campo da etapa MT do projeto desenvolvido. Não foi fácil entregar sêmen refrigerado em Cáceres 24 horas após liberar no laboratório em Indaiatuba!!

Aos parceiros Ney Conti e Fernando Pereira que disponibilizaram uma partida de sêmen dos reprodutores da bateria deles para contribuir com o projeto desenvolvido.

Ao Fredson e equipe da logística que não mediram esforços para que o sêmen pudesse chegar ao destino no momento adequado, mesmo que tivessem que viajar quase 24 horas direto.

A toda equipe da Seleon por realizar as coletas dos touros do experimento e disponibilizarem o ejaculado para utilização nesse trabalho, em especial ao Bruno, José Roberto, Breno, Rafael e equipe toda de coleta e manejo dos touros que estão alojados lá.

## RESUMO

CREPALDI, G.A. **Desenvolvimento do uso de sêmen sexado refrigerado na IATF de vacas de corte**. 2023. 63f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O objetivo desse estudo foi desenvolver estratégias para otimizar o uso do sêmen sexado refrigerado (SSR) mantido entre 15°C e 20°C por até 48 horas nos programas IATF. Assim, estudos foram realizados para: determinar a P/IA com SSR 48 ou 54 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de P4 (DP4; Experimento 1); inseminar com SSR por até 48 horas após a liberação do sêmen no laboratório (TLab; Experimento 2); avaliar o impacto do processo de sexagem nos padrões seminais analisados pelo CASA durante 84 horas (Experimento 2a); estudar o efeito da redução da quantidade de espermatozoides na palheta contendo SSR na P/IA (Experimento 3) e a P/IA com a menor concentração de SSR na palheta com inseminação realizada 48 horas após TLab e 48 horas após a DP4 (Experimento 4). No Experimento 1, não houve interação tratamento\*momento da IATF para P/IA ( $P=0,27$ ). Também, não houve efeito do tratamento ( $P=0,09$ ) na P/IA [Controle = 61,6% (167/271) vs SSR 4M = 54,4% (161/296)]. Ainda, não se verificou efeito do momento da inseminação ( $P=0,11$ ) na P/IA realizada 48h (54,8%; 155/283) ou 54h (60,9%; 173/284) após a retirada do DP4. No Experimento 2, não houve interação ( $P=0,66$ ) tratamento\*momento da IA após TLab (24 ou 48 horas) na P/IA. Não houve diferença ( $P=0,13$ ) na P/IA entre os grupos Controle (63,1%; 125/198), Convencional Refrigerado 6M (53,2%; 91/171) e SSR 4M (52,8%; 103/195). Ainda, não houve diferença ( $P=0,84$ ) na P/IA quando a IATF foi realizada 24 (54,1%; 167/309) ou 48 (59,6%; 152/255) horas após a TLab. No Experimento 2a, não houve interação tempo\*tratamento para nenhuma das variáveis analisadas. Verificou-se menor velocidade linear progressiva (VSL), batimento flagelar cruzado (BCF), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR) e espermatozoides com movimento progressivo no SSR em relação ao sêmen convencional refrigerado. Contudo, o SSR apresentou maior percentual de células com membrana íntegra (eosina/nigrosina; 82,9% vs. 75,3%;  $P=0,001$ ). Verificou-se redução de espermatozoides móveis e rápidos a partir das 72 horas e BCF a partir das 84

horas. As demais variáveis analisadas não apresentaram diferença no tempo. No Experimento 3, não houve efeito ( $P=0,29$ ) na P/IA entre as diferentes quantidades de espermatozoides na palheta de SSR. A P/IA do grupo 2M foi 47,2% (84/178), grupo 3M foi 47,9% (82/171), grupo 4M foi 56,1% (96/171) e Controle 52,2% (83/159). No Experimento 4, não houve interação tratamento\*TLab para P/IA ( $P=0,18$ ). Entretanto, houve diferença entre os tratamentos ( $P=0,01$ ). O grupo Controle apresentou P/IA de 62,5% (65/104)<sup>a</sup>, o grupo SSR 2M 50,4% (67/133)<sup>ab</sup> e o grupo SSR 4M 43,2% (51/118)<sup>b</sup>. Não houve diferença na P/IA entre os diferentes TLab ( $P=0,37$ ), sendo 53,8% (64/119) para 24h e 50,4% para 48h (119/236). Conclui-se que o processo de sexagem não comprometeu a P/IA em relação ao sêmen convencional, quando a inseminação foi realizada com SSR. Além disso, foi possível inseminar com SSR 48 horas após a retirada do DP4 sem reduzir a P/IA. Também, foi possível reduzir a quantidade de espermatozoides na palheta para 2 milhões e realizar a inseminação com SSR até 48 horas após TLab sem comprometer a P/IA.

Palavras-chave: sêmen sexado, sêmen refrigerado, IATF, vaca de corte

## ABSTRACT

CREPALDI, G. A. **Development of the use of liquid sexed semen in TAI of beef cows.** 2023. 63f. Thesis (Doctorate in Sciences) – School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2023.

The aim of this study was to develop strategies to optimize the use of liquid sexed semen (LSS) in TAI, kept between 15°C and 20°C for up to 48 hours. To this end, four studies were carried out to determine the P/AI with LSS, 48 or 54 hours after P4 withdrawal (Experiment 1), to inseminate with LSS for up to 48 hours after the release of semen in the laboratory (TLab; Experiment 2), to evaluate the impact of the sexing process on the seminal patterns evaluated by CASA during 84 hours (Experiments 2a), the effect of reducing the amount of sperm in the LSS straw on the P/AI (Experiment 3) and the P/AI of LSS with lower concentration in the straw with insemination performed 48 hours after TLab and 48 hours after removal of P4 (Experiment 4). In Experiment 1, there was no interaction between treatment\* time of TAI for P/AI ( $P=0.27$ ). Also, there was no treatment effect ( $P=0.09$ ) on P/AI [Control = 61.6% (167/271) vs 4M LSS = 54.4% (161/296)]. Also, there was no effect of the time of insemination ( $P=0.11$ ) on the P/AI performed 48h (54.8%; 155/283) or 54h (60.9%; 173/284) after P4 device removal. In Experiment 2, there was no interaction ( $P=0.66$ ) between treatment\*time of AI after TLab (24 or 48 hours) on P/AI. There was no difference ( $P=0.13$ ) in the P/AI between the Control (63.1%; 125/198), Liquid Conventional 6M (53.2%; 91/171) and LSS 4M (52.8% ;103/195). Still, there was no difference ( $P=0.84$ ) in P/AI when TAI was performed 24 (54.1%;167/309) or 48 (59.6%; 152/255) hours after semen output from the lab. In Experiment 2a, there was no time\*treatment interaction for any of the analyzed variables. There was lower VSL, BCF, LIN, STR and spermatozoa with progressive movement in the LSS compared to conventional liquid semen. However, the LSS showed a higher percentage of cells with an intact membrane (eosin/nigrosin; 82.9% vs. 75.3%;  $P=0.001$ ). There was a reduction in mobile and fast spermatozoa after 72 hours and BCF after 84 hours. The other analyzed variables showed no difference thru the time. In Experiment 3, there was no difference ( $P=0.29$ ) for P/AI between the different amounts of sperm in the LSS straw. The P/AI of the 2M group was 47.2%

(84/178), 3M group was 47.9% (82/171), 4M group was 56.1% (96/171) and Control 52.2% (83 /159). In Experiment 4, there was no treatment\*TLab interaction for P/AI ( $P=0.18$ ). However, there was difference between treatments ( $P=0.01$ ). The Control group had a P/AI of 62.5% (65/104)<sup>a</sup>, the 2M LSS group 50.4% (67/133)<sup>ab</sup> and the 4M LSS group 43.2% (51/118)<sup>b</sup>. There was no difference in P/AI between the different TLabs ( $P=0.37$ ), being 53.8% (64/119) for 24h and 50.4% for 48h (119/236). It is concluded that the sexing process did not compromise the P/AI in relation to conventional semen, when the insemination was performed with LSS. Furthermore, it was possible to inseminate with LSS 48 hours after P4 withdrawal without reducing P/AI. Also, it was possible to reduce the number of spermatozoa in the straw to 2 million and perform insemination with LSS up to 48 hours after TLab without compromising P/AI.

Keywords: sexed semen, liquid semen, TAI, beef cows

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Protocolo base de sincronização com P4+E2 utilizado nos Experimentos 1,2,3 e 4.....29
- Figura 2 - Delineamento do Experimento 1 - Efeito do momento da IATF com sêmen sexado refrigerado (48 vs. 54h da retirada do dispositivo de progesterona) na P/IA de fêmeas Nelore.....30
- Figura 3 - Delineamento do Experimento 2 - Momento da IATF após a liberação do sêmen no laboratório (24 ou 48 horas) na P/IA de vacas Nelore inseminadas com sêmen sexado refrigerado (T<sub>Lab</sub> = intervalo entre a liberação do sêmen refrigerado no laboratório e a inseminação artificial).....32
- Figura 4 - Delineamento do Experimento 3 - Efeito da redução da quantidade de espermatozoides (2, 3 ou 4 milhões) na palheta de sêmen sexado refrigerado na P/IA de vacas Nelore.....34
- Figura 5 - Delineamento do Experimento 4 - Efeito da inseminação com sêmen sexado refrigerado com 2 ou 4 milhões de espermatozoides na palheta, 24 ou 48 horas após a liberação do sêmen no laboratório na P/IA de vacas Nelore.....35
- Figura 6 - P/IA de fêmeas Nelore inseminadas com sêmen convencional congelado (controle) ou sêmen sexado refrigerado (P=0,09) 48 ou 54 horas (P=0,11) após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona.....38
- Figura 7 - Percentual de prenhez do sexo desejado (fêmea) de acordo com o tipo de sêmen utilizado (sêmen convencional congelado ou sêmen sexado refrigerado; P<0,001).....39
- Figura 8 - P/IA de fêmeas Nelore inseminadas com sêmen convencional congelado, sêmen convencional refrigerado 6M ou sêmen sexado refrigerado 4M (P=0,13), 24 ou 48 horas (P=0,84) após a liberação do sêmen no laboratório.....40
- Figura 9 - P/IA de fêmeas Nelore inseminadas com sêmen convencional congelado (25 milhões de espermatozoides por palheta) e com sêmen sexado refrigerado contendo 2 milhões (2M), 3 milhões (3M) ou 4 milhões (4M) de espermatozoides por palheta (P=0,29).....43

Figura 10 - P/IA de fêmeas Nelore inseminadas com sêmen convencional congelado (25 milhões de espermatozoides por palheta), sêmen sexado refrigerado contendo 2 milhões (2M) ou sêmen sexado refrigerado contendo 4 milhões (4M) de espermatozoides por palheta (P=0,01), 24 ou 48 horas (P=0,37) após a liberação do sêmen no laboratório.....44

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeito do tratamento, do tempo e da interação entre o tempo e o tratamento nas variáveis laboratoriais avaliadas no sistema CASA no Experimento 2a.....	40
Tabela 2 - Efeito do tratamento nas variáveis (média $\pm$ erro padrão) analisadas no Experimento 2a.....	41
Tabela 3 - Efeito do tempo nas variáveis (média $\pm$ erro padrão) analisadas no Experimento 2a.....	42

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	21
2.1. HISTÓRICO DA SEXAGEM DE SÊMEN .....	21
2.2. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) COM SÊMEN SEXADO .....	22
2.3. USO DE SÊMEN REFRIGERADO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL .....	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
3.1. ANIMAIS E MANEJO .....	28
3.2. TRATAMENTO HORMONAL.....	28
3.3. COLETA E PROCESSAMENTO DO EJACULADO .....	29
3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
<b>3.4.1. Experimento 1 – Efeito do momento da IATF com sêmen sexado refrigerado (48 vs. 54h da retirada do dispositivo de progesterona) na P/IA de fêmeas Nelore.</b> .....	30
<b>3.4.2. Experimento 2 – Momento da IATF após a liberação do sêmen no laboratório (24 ou 48 horas) na P/IA de vacas Nelore inseminadas com sêmen sexado refrigerado.</b> .....	31
3.4.2.1. Experimento 2a – Avaliação laboratorial de sêmen refrigerado (convencional ou sexado) mantido entre 15°C e 20°C por 84 horas. ....	32
<b>3.4.3. Experimento 3 - Efeito da redução da quantidade de espermatozoides (2, 3 ou 4 milhões) na palheta de sêmen sexado refrigerado na P/IA de vacas Nelore.</b> .....	34
<b>3.4.4. Experimento 4: Efeito da inseminação com sêmen sexado refrigerado com 2 ou 4 milhões de espermatozoides na palheta, 24 ou 48 horas após a liberação do sêmen no laboratório na P/IA de vacas Nelore.</b> .....	35
3.5. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO E SEXAGEM FETAL.....	36
3.6. SEXAGEM E CONSERVAÇÃO DO SÊMEN.....	36
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	37
<b>4. RESULTADOS</b> .....	38
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	51
<b>7. IMPLICAÇÕES PRÁTICAS DO TRABALHO</b> .....	52
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	54

## 1. INTRODUÇÃO

A determinação do sexo na bovinocultura de corte e de leite pode ser um dos fatores determinantes para melhorar o desempenho produtivo e econômico da atividade. Em fazendas com um sistema de parto sazonal, o uso de sêmen sexado no início do período de reprodução garante que todas as novilhas de reposição nasçam no início do período de parição. Estudos foram indicativos de que a antecipação do momento do parto das bezerras (futuras matrizes) oferece vantagens para a criação em bloco de novilhas de reposição e garante que as novilhas atinjam o peso corporal alvo no momento do primeiro acasalamento e do primeiro parto (VISHWANATH; MORENO, 2018; FREITAS et al., 2021). Em fazendas de corte comerciais, o macho é o sexo de interesse devido maior potencial de produção. Além disso, existe a possibilidade de aumentar a produção de touros em fazendas que comercializam animais de elevado valor genético avaliados pelos programas de melhoramento. Esses touros serão utilizados para monta natural ou para repasse de matrizes inseminadas que não se tornaram gestantes em fazendas de corte comerciais (SEIDEL; DEJARNETTE, 2022). Além disso, considerando a pecuária leiteira, nascem menos bezerros machos de baixo valor, com a consequente redução de distocia (NORMAN et al., 2010) e de problemas de bem-estar dos bezerros (HÖTZEL et al., 2014). Em fazendas de corte tecnificadas, pode-se utilizar touros com características maternas para a produção de fêmeas nas matrizes de mérito genético superior. Em contrapartida, pode-se direcionar a seleção genética para características frigoríficas objetivando a produção de machos em matrizes de mérito genético inferior, visando melhorar a produtividade do sistema de produção de carne. Considerando os diferentes objetivos de produção, alguns estudos foram desenvolvidos com o objetivo de se prever e/ou manipular a proporção do sexo dos bezerros.

Em fazendas de corte, a inseminação artificial é a biotecnologia mais utilizada para disseminar o melhoramento genético. Com o desenvolvimento da técnica de IATF, o uso da inseminação artificial aumentou em grande escala. No Brasil, entre 2002 e 2022, a taxa de crescimento anual composta da IATF foi de 31,8% atingindo mais de 25 milhões de protocolos comercializados e representou em 97% de todas as inseminações (BARUSELLI et al., 2023). No

mesmo período, o número de doses de sêmen comercializadas cresceu de 7,1 milhões para 26 milhões (INDEX ASBIA, 2023). Portanto, pode-se inferir que a possibilidade de crescimento do uso do sêmen sexado está condicionado à sua adequação ao protocolo de IATF. Os principais entraves para esse crescimento são o momento da inseminação no protocolo de sincronização e a taxa de prenhez (P/IA) em relação ao resultado obtido com sêmen convencional. Seidel & DeJarnette (2022) estimam que nos Estados Unidos o sêmen sexado representa um terço das inseminações em vacas de leite. Entretanto, em vacas de corte, o número não ultrapassa 2%. No Brasil, de acordo com o relatório da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), em 2023 aproximadamente 15% das doses vendidas para vacas de leite foram de sêmen sexado. No corte, esse número representa apenas 0,15% (INDEX ASBIA 2023). Diversos estudos mostram que o sêmen sexado congelado atinge P/IA entre 80% e 90% do obtido com o sêmen convencional (BARUSELLI et al., 2007; SALES et al., 2011; SEIDEL, 2014). Aprimorar essa relação para próximo de 100% é fundamental para que a técnica seja utilizada sem reduzir a eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, sem prejuízo financeiro nas fazendas de corte. Uma hipótese para a diminuição dos índices de fertilidade após o uso de sêmen sexado é o menor tempo de viabilidade do espermatozoide, associado com diferentes padrões de motilidade espermática (SCHENK et al., 2006). Alguns autores relatam que o sêmen sexado necessita de menos tempo para a capacitação devido ao processo de sexagem por meio da separação por citometria de fluxo (LU et al., 2004). Dessa maneira, estudos desenvolvidos com sêmen sexado congelado mostram que a IATF apresenta melhores resultados quando realizada 60 horas após a retirada do dispositivo de P4 (SOUZA et al., 2007; SALES et al., 2011), o que ocasiona alteração de manejo e do momento de inseminação nas fazendas. O ajuste do horário para que todos os manejos e a inseminação ocorram em um período mais adequado do dia (iniciar após às 7 horas da manhã e finalizar até às 18 horas), sem redução da P/IA, é imprescindível para o aumento da utilização do sêmen sexado.

Em um estudo retrospectivo, Souza et al., (2018) avaliaram o resultado de 37.281 inseminações, parte realizada com sêmen refrigerado (18.042 IA com sêmen refrigerado mantido entre 2°C e 7°C por até 24 horas) e parte realizada com sêmen congelado (19.239 IA com sêmen congelado). Os autores

encontraram uma P/IA superior nas vacas inseminadas com sêmen refrigerado (36,6%) do que nas inseminadas com sêmen congelado (30,8%). Yang et al., (2018) citam que a dose inseminante para sêmen refrigerado pode ser 10 vezes menor do que a do sêmen congelado para obtenção da mesma taxa de não retorno aos 24 dias após a IA (67,6% para o sêmen refrigerado vs. 67,8% para o sêmen congelado). Murphy et al., (2016) avaliaram diferentes temperaturas (5°C, 15°C, 22°C e 32°C) para manutenção do sêmen refrigerado por 5 dias. Os autores observaram que o sêmen refrigerado mantém padrões laboratoriais aceitáveis por 5 dias em temperaturas entre 5°C e 22°C. Contudo, a temperatura de 15°C foi mais eficiente em manter a motilidade após o primeiro dia de avaliação. Wiebke et al., (2023) compararam o uso de sêmen refrigerado (mantido entre 13°C e 20°C) com o sêmen congelado. Nesse estudo a P/IA foi superior no sêmen refrigerado em relação ao sêmen congelado (45,4% vs. 33,7%;  $P=0,016$ ), sobretudo em animais com ovulação atrasada (46,8% vs. 27,7%;  $P=0,017$ ). Dessa forma, os autores acreditam que o uso de sêmen refrigerado pode prolongar a viabilidade seminal na IA. Xu (2014) avaliou o uso de sêmen sexado refrigerado comparado ao sêmen convencional (não sexado) refrigerado em um estudo com 98.335 inseminações. Os resultados mostraram que foi possível atingir uma relação de 95% de taxa de não retorno do sêmen sexado em relação ao sêmen convencional. Além disso, a taxa de prenhez do sexo desejado foi de aproximadamente 86% nas fêmeas inseminadas com sêmen sexado contra 52% nas fêmeas inseminadas com sêmen convencional.

Ainda, novas possibilidades de uso para o sêmen sexado seguem sendo estudadas como o sistema “somente novilhas/zero vacas” proposto por Seidel & Whittier (2015) e revisado por Seidel & DeJarnette (2022). Nesse modelo, as novilhas de corte seriam inseminadas com sêmen sexado de fêmea para parirem até os 24 meses de idade. Ainda, as bezerras nascidas nesse modelo seriam desmamadas aos 3 meses de idade. Assim, as primíparas seriam abatidas até os 28 meses de idade, garantindo uma bonificação pela carcaça jovem. Contudo, ainda seria necessário recorrer à compra externa de novilhas ou bezerras, visto que a taxa de natalidade não é de 100% e o sêmen sexado não garante todos os nascimentos do sexo desejado. Outra possibilidade descrita por Seidel & DeJarnette (2022) é que o uso do sêmen sexado possibilita a seleção para aumentar o dimorfismo sexual nos rebanhos de corte. De acordo com os autores,

com sêmen convencional é necessário buscar uma genética que seja equilibrada na produção de machos e de fêmeas ou seja, com características maternas e terminais presentes no mesmo reprodutor. Por exemplo, não se seleciona exclusivamente para ganho de peso com o objetivo de evitar fêmeas com peso corporal excessivo, o que eleva o custo de manutenção e dificulta a reconcepção. Com o uso do sêmen sexado é possível produzir fêmeas filhas de touros que transmitem características de habilidade materna e machos filhos de touros que transmitem elevado ganho de peso.

O presente trabalho com sêmen sexado refrigerado visou adequar o momento da inseminação artificial nos programas de IATF, com o objetivo de melhorar o manejo nas fazendas de corte e de incrementar a P/IA. Considerando a vastidão do território nacional e a distância logística das fazendas em relação aos centros de coleta e processamento de sêmen (CCPS) e dos laboratórios de sexagem de sêmen, foram realizados estudos para avaliar a viabilidade de inseminar com sêmen refrigerado sexado por um período maior após a sua produção no laboratório. Ainda, foram avaliadas diferentes quantidades de espermatozoides por palheta para estabelecer a dose mínima inseminante com sêmen sexado. Portanto, a hipótese do presente estudo é de que o processo de sexagem não compromete a fertilidade quando a inseminação é realizada com sêmen sexado refrigerado e que o emprego de sêmen sexado refrigerado permite manter o horário da IATF similar ao horário utilizado rotineiramente na IATF com sêmen convencional congelado. Além disso, o presente estudo tem como hipótese que a redução da quantidade de espermatozoides na palheta não prejudica a P/IA em relação ao sêmen convencional por até 48 horas após a saída do laboratório.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. HISTÓRICO DA SEXAGEM DE SÊMEN

Os trabalhos de pesquisa com sêmen sexado tiveram início em meados da década de 1970 e culminaram com a publicação do artigo do Dr. Larry Johnson do Departamento de Agricultura dos EUA (USDA) em 1989 (JOHNSON; FLOOK; HAWK, 1989). Os autores demonstraram que era possível direcionar o sexo da gestação tanto para machos quanto para fêmeas pela seleção do espermatozoide por sonda fluorescente, sem comprometer a integridade da célula espermática. O citômetro de fluxo mede a quantidade de DNA no espermatozoide. Os espermatozoides X de bovinos têm cerca de 4% mais DNA do que os espermatozoides Y (SEIDEL, 2014). O sucesso dessa tecnologia foi confirmado pelo nascimento de coelhos vivos após a aplicação da sexagem do espermatozoide (JOHNSON; FLOOK; HAWK, 1989).

O corante Hoechst 33342 se liga ao DNA do espermatozoide sem causar toxicidade ou prejudicar a função espermática. O processo de sexagem depende da difusão de corante Hoechst 33342 através da membrana celular intacta, ligando-se seletivamente aos pares de bases A/T (PENFOLD et al., 1998; GARNER; SEIDEL, 2008; GARNER, 2009). O citômetro então quantifica a diferença de DNA entre os espermatozoides utilizando dois detectores de fluorescência que medem a intensidade do Hoechst H33342 ligado ao DNA quando estimulados por um laser. O citômetro separa os espermatozoides em gotas únicas que posteriormente recebem uma carga para separar as duas populações (X ou Y). Placas carregadas com cargas positiva ou negativa permitem que as populações sejam separadas, desviando o fluxo contendo os espermatozoides X ou Y. A configuração do software também permite que células mortas ou com patologia sejam descartadas (VISHWANATH; MORENO, 2018). Os avanços na seleção das células por citometria de fluxo continuaram a ser desenvolvidos e foi possível selecionar ejaculados com alta pureza para X ou Y (SHARPE; EVANS, 2009). Concomitantemente, estudos de campo foram realizados com o objetivo de inseminar com sêmen sexado com baixas concentrações de espermatozoides por palheta (SEIDEL, 2012).

Desde então, a citometria de fluxo continua a ser o único método viável para classificar os espermatozoides e gerar gestações do sexo desejado (VISHWANATH; MORENO, 2018). O processo de sexagem sofreu diversos avanços, tanto no manuseio do espermatozoide quanto na preparação para a sexagem. Houve também melhorias significativas na tecnologia de classificação, como processamento digital avançado e automação, o que tornou o processo mais eficiente e com P/IA mais próximo ao sêmen convencional (SHARPE; EVANS, 2009; VISHWANATH, 2014). Técnicas alternativas para sexagem foram pesquisadas, mas falham principalmente na precisão, repetibilidade e aplicação prática (revisado por SEIDEL, 2012)

Mais recentemente, novas alterações no processo foram realizadas com a implementação da tecnologia SexedULTRA<sup>®</sup> que aumentou significativamente a prenhez do sêmen sexado em relação à metodologia anteriormente utilizada (tecnologia Legacy; VISHWANATH, 2014; BARUSELLI, et al., 2017). As principais alterações incluíram um novo protocolo para pré-tratar o espermatozoide antes da etapa de coloração e também um novo meio de coloração que equilibrou o pH e se manteve estável por um período prolongado. O meio de congelamento também foi modificado levando em conta a menor concentração de espermatozoides presente na dose de sêmen sexado (VISHWANATH; MORENO, 2018).

## 2.2. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) COM SÊMEN SEXADO

Diversos estudos relatam que o uso de sêmen sexado resulta em P/IA inferior ao sêmen convencional (BARUSELLI et al., 2007; SALES et al., 2011; SEIDEL, 2014). Uma hipótese para a diminuição dos índices de fertilidade após o uso de sêmen sexado é o menor tempo de viabilidade do espermatozoide, associado com diferentes padrões de motilidade espermática (SCHENK et al., 2006). Alguns autores relataram que o sêmen sexado necessita de menos tempo para a capacitação espermática devido ao processo de sexagem por meio da separação por citometria de fluxo (LU et al., 2004).

Programas de sincronização da ovulação para inseminação em momentos programados podem contribuir para o uso de sêmen sexado. Vacas

de corte e de leite sincronizadas com progesterona e estradiol ovulam cerca de 70-72h após a retirada dos dispositivos quando a indução é com cipionato de estradiol no momento da retirada do dispositivo ou benzoato de estradiol 24 horas após a retirada do dispositivo (SOUZA et al., 2006, BARUSELLI et al., 2007, SALES et al., 2012, CREPALDI et al., 2019). Porém, quando o benzoato de estradiol é utilizado como indutor de ovulação no momento da retirada do dispositivo de progesterona, a ovulação ocorre aproximadamente 60 horas depois da injeção (CREPALDI et al., 2019). Souza et al., (2007) avaliaram o efeito da inseminação realizada em momento mais próximo à ovulação estimada após protocolos de sincronização da ovulação em vacas Nelore paridas entre 30 e 60 dias. As inseminações foram realizadas em tempo fixo com o sêmen convencional ( $40 \times 10^6$  espermatozoides/dose) ou com sêmen sexado ( $2.1 \times 10^6$  espermatozoides/dose), 54 horas ou 60 horas após a retirada da fonte de progesterona. Não foi verificada diferença na P/IA à IATF com sêmen sexado quando a IA foi realizada 60 horas após a retirada da P4 em relação a IATF com sêmen convencional. Além disso, não houve diferença na P/IA entre o uso do sêmen convencional (58,9%), sexado-X (52,0%) e sexado-Y (49,0%). No mesmo sentido, Carvalho et al., (2010) encontraram desenvolvimento embrionário similar entre embriões macho ou fêmea produzidos com sêmen sexado.

Em um estudo realizado por Sales et al., (2011), também se avaliou o efeito do atraso no momento da IATF (60 horas após a retirada) com sêmen sexado em novilhas Jersey cíclicas sincronizadas e inseminadas em tempo fixo. Os animais foram inseminados 54 ou 60 horas após retirada da fonte de P4. Os autores observaram uma tendência de interação entre o tipo de sêmen e o momento da IATF na taxa de concepção ( $P=0,06$ ). Observou-se aumento da taxa de concepção quando a IATF foi realizada com sêmen sexado 60 horas após a retirada do dispositivo de progesterona, mas não se verificou esse efeito com o sêmen convencional.

Souza et al. (2008) avaliaram o efeito de uma maior aproximação do momento da IATF em relação ao momento da ovulação esperada (IATF realizada 60 ou 64 horas após a retirada da fonte de P4). Os autores verificaram redução na taxa de concepção quando a IATF foi realizada 64 horas após a retirada da fonte de P4, sugerindo que o momento mais adequado para realização da IATF com sêmen sexado congelado seria 60 horas após a retirada

da fonte de progesterona, ou seja, 10 a 12 horas antes da ovulação estimada. Esse intervalo coincide com o encontrado por Sá Filho et al. (2010a) que utilizou a radiotelemetria para detecção do estro e posterior inseminação convencional. Nesse sentido, Neves (2010) avaliou qual o melhor momento para realizar a IATF com sêmen sexado em relação ao momento da ovulação após o protocolo de sincronização. Foram inseminadas vacas de cortes lactantes com sêmen sexado 36, 48 ou 60 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. Todas as vacas foram submetidas a ultrassonografia de 12 em 12 horas para avaliar o momento da ovulação. O autor verificou que o melhor momento para inseminação após o protocolo de sincronização foi mais próximo à ovulação (até 12 horas antes da ovulação) e em fêmeas recém ovuladas.

Com o objetivo de identificar as fêmeas mais férteis para uso do sêmen sexado após a sincronização da ovulação, Sá Filho et al., (2012) verificaram que quanto maior o tamanho do folículo dominante, maior a probabilidade de prenhez 30 dias após a IATF. Os autores verificaram também que fêmeas que aceitam a monta após o protocolo de sincronização têm aumento da P/IA, tanto com sêmen convencional quanto com sêmen sexado. Baruselli et al., (2017) verificaram interação entre a manifestação do estro e a utilização do sêmen sexado ou convencional. Os pesquisadores encontraram a mesma P/IA nas fêmeas que manifestaram estro quando inseminadas com sêmen convencional ou sexado. Entretanto, nas fêmeas que não manifestaram estro, o sêmen convencional resultou em P/IA maior que o sêmen sexado. Contudo, independentemente do tipo de sêmen utilizado, as fêmeas que manifestaram estro apresentaram maior P/IA.

Novos estudos foram conduzidos com o intuito de reduzir o número de manejos nos protocolos de IATF com sêmen sexado. Para isso, vacas Nelore lactantes foram submetidas a dois diferentes protocolos de sincronização da ovulação (SÁ FILHO et al. 2010b). Os autores avaliaram a possibilidade de realizar o tratamento com benzoato de estradiol no momento da retirada do dispositivo de P4 (3 manejos) contra o protocolo controle que utiliza 4 manejos (tratamento com benzoato de estradiol 24 horas após a remoção do dispositivo). As inseminações com sêmen sexado foram realizadas aproximadamente 10 horas antes do momento da ovulação estimada (IA 60 horas após a retirada no grupo de 4 manejos e IA 50 horas após a retirada no grupo de 3 manejos). Os

autores não encontraram diferença na P/IA entre os diferentes tratamentos. No mesmo sentido, Silva et al., (2018) avaliaram diferentes tratamentos para induzir a ovulação. Os autores encontram maior P/IA em vacas Nelore inseminadas com sêmen sexado quando a indução da ovulação foi induzida com cipionato de estradiol no momento da retirada do dispositivo de P4 (3 manejos) do que quando foi utilizado benzoato de estradiol no protocolo de 4 manejos (administração de BE 24 horas após a retirada do dispositivo de P4). Esse estudo é indicativo de que o tratamento com cipionato de estradiol como indutor de ovulação no momento da retirada do dispositivo de P4 pode ser utilizado com eficácia superior ao benzoato de estradiol nos protocolos de IATF com sêmen sexado.

Em estudo não publicado (MARQUES, 2018; comunicação pessoal), foi avaliado o efeito do aumento da concentração de espermatozoides na palheta (6 ou 8 milhões) na P/IA com sêmen sexado congelado. Foi utilizado o protocolo com cipionato de estradiol na retirada da fonte de P4 e IATF 60h após a retirada do dispositivo. O autor encontrou as seguintes P/IA para os grupos com 4 (63,6%; 63/99), 6 (59,2%; 58/98) ou 8 (52,8%;47/89) milhões de espermatozoides na dose de sêmen sexado congelado, indicando não haver efeito positivo de concentração superior a 4 milhões de espermatozoides na palheta de sêmen sexado congelado.

### 2.3. USO DE SÊMEN REFRIGERADO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Os estudos sugerem que há benefício na P/IA quando se usa sêmen refrigerado para inseminação artificial, tanto após observação de cio (MURPHY et al., 2016) quanto na IATF (BORGES-SILVA et al., 2016; CRESPILO et al., 2012; PAPA et al., 2015; RESENDE et al., 2018). Há divergências quando se avalia a P/IA quando o sêmen refrigerado é comparado ao sêmen congelado quanto à concentração espermática utilizada (BUCHER et al., 2009), o tipo de palheta, a composição do diluidor (VERBERCKMOES et al., 2005) e o tempo e temperatura utilizados (MURPHY et al., 2016). Alguns autores divergem quanto a P/IA do sêmen refrigerado por 48 horas a 5°C quando comparado ao sêmen congelado. Crespilho et al., (2014) encontraram diminuição da P/IA com sêmen refrigerado em relação ao sêmen congelado. Entretanto, Tarragó (2017)

encontrou P/IA similar entre o sêmen refrigerado e sêmen congelado. Borges-Silva et al., (2019) também encontrou P/IA similar entre o sêmen criopreservado e o sêmen refrigerado por 24 ou 48 horas após a coleta.

A temperatura ótima de armazenamento do sêmen pode depender da espécie envolvida e da tecnologia de diluição do sêmen implementada. Em um recente estudo realizado por Wiebke et al., (2023), verificou-se maior risco de prenhez com sêmen refrigerado comparado ao sêmen congelado dos mesmos touros. Nesse estudo, o sêmen foi refrigerado a 4°C e mantido em recipiente térmico. O sêmen era descartado quando atingia a temperatura de 20°C. Os autores também observaram tendência de redução na P/IA em vacas que atrasaram a ovulação e foram inseminadas com sêmen congelado, mas esse efeito não foi verificado em fêmeas inseminadas com sêmen refrigerado. Um estudo realizado com o meio CAPROGEN® indica que uma temperatura entre 18 e 24°C pode manter a fertilidade do sêmen bovino por até 4 dias sem redução na fertilidade (revisado por VISHWANATH; SHANNON, 2000). Murphy et al., (2016) observaram queda linear e constante na motilidade do sêmen refrigerado entre o dia da coleta e o quinto dia. Entretanto, os autores verificaram que o sêmen mantido a 15°C manteve motilidade superior ao sêmen mantido a 5°C, 22°C ou 32°C, sendo 32°C a temperatura que provocou maior comprometimento dos espermatozoides. Os autores encontraram também interação entre a concentração de espermatozoides na palheta e o tempo de uso após o processamento do sêmen. Verificou-se queda na P/IA quando foi utilizada a concentração de 3 ou 4 milhões de espermatozoides por dose inseminante, o que não ocorreu quando dose de 5 milhões foi utilizada. Ainda, verificou-se interação entre touro e a concentração da dose. Os pesquisadores encontraram menor taxa de não retorno de um dos reprodutores com 5 milhões de espermatozoides por palheta no segundo dia após a coleta quando comparado com o primeiro dia após a coleta. Entretanto, nos demais touros não foi observada essa diferença. Em contrapartida, Murphy et al., (2013) constataram que a redução do número de espermatozoides por dose inseminante pode otimizar não apenas o aumento do uso de touros jovens geneticamente selecionados durante uma curta estação reprodutiva, mas também prolongar o armazenamento de sêmen refrigerado devido aos menores níveis de estresse oxidativo.

Com o objetivo de avaliar o desempenho reprodutivo de novilhas e vacas de leite inseminadas com sêmen sexado refrigerado a 18°C ou congelado, Maicas *et al.*, (2019) encontraram similar P/IA entre o sêmen sexado refrigerado e o sêmen convencional congelado em novilhas. Entretanto, os autores verificaram que o sêmen sexado congelado apresentou resultado inferior ao sêmen convencional congelado. Ainda, em múltiparas, o sêmen convencional congelado apresentou P/IA superior aos grupos inseminados com de sêmen sexado congelado e refrigerado. Em outro estudo, Xu (2014) verificou que a relação da taxa de não retorno entre o sêmen sexado refrigerado e o sêmen convencional congelado foi de 94%, ante a relação de 70% a 80% obtidos em estudos realizados com sêmen sexado congelado (SEIDEL; SCHENK, 2008; DEJARNETTE; NEBEL; MARSHALL, 2009).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. ANIMAIS E MANEJO**

O estudo foi conduzido em fazendas comerciais localizadas no Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, na região Centro Oeste do Brasil. Um total de 2.326 fêmeas Nelore, sendo 269 Novilhas e 2.057 vacas paridas foram usadas nesse estudo. As fêmeas foram mantidas a pasto com livre acesso à suplementação mineral e água. O presente estudo atendeu as normas e princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – SP (FMVZ; protocolo número 6289070622).

#### **3.2. TRATAMENTO HORMONAL**

Esse estudo foi desenvolvido em uma sequência de quatro experimentos. Todas as fêmeas foram sincronizadas com o protocolo que utiliza como base tratamentos com E2 e P4 (Figura 1). No D0, as fêmeas receberam 2mg de benzoato de estradiol e um dispositivo contendo 1g de P4. As novilhas (Experimento 1) receberam uma dose adicional de 0,530mg de Cloprostenol sódico no início do protocolo de sincronização (D0). Oito ou nove dias depois, o dispositivo de progesterona foi retirado e todas as fêmeas receberam uma dose de 0,530mg de Cloprostenol sódico. Nesse mesmo dia, as vacas paridas receberam 1mg de Cipionato de estradiol e 300UI de eCG enquanto as Novilhas receberam 0,5mg de Cipionato de estradiol e 200UI de eCG. Dois dias após a retirada (D10), as fêmeas foram inseminadas de acordo com o protocolo experimental.

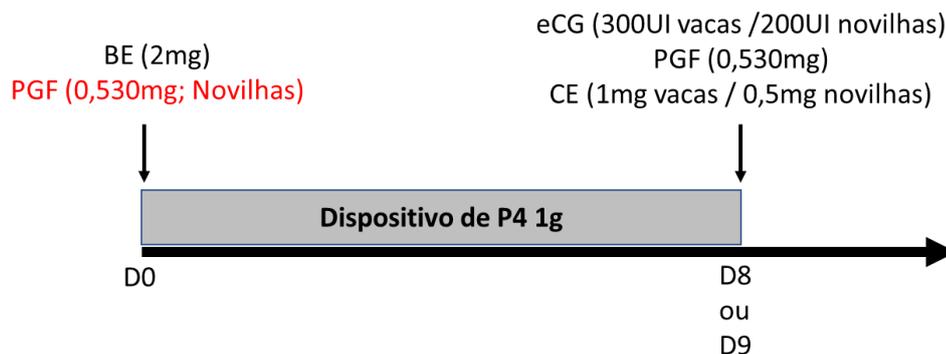


Figura 1. Protocolo base de sincronização com P4+E2 utilizado nos Experimentos 1,2,3 e 4.

### 3.3. COLETA E PROCESSAMENTO DO EJACULADO

Concomitante ao período de sincronização das fêmeas, o sêmen foi coletado na Seleon Biotecnologia no município de Itatinga, SP. Em seguida, o sêmen foi transportado para Indaiatuba-SP, na sede da Sexing Technologies, para processamento. Em cada experimento, os mesmos touros da raça Nelore foram utilizados em todos os tratamentos e a mesma partida de sêmen (mesmo ejaculado) foi utilizada no grupo controle e nos tratamentos com sêmen refrigerado. Para tanto, o ejaculado foi dividido após a coleta para o processamento e produção do sêmen sexado e convencional. A alíquota destinada aos diferentes tratamentos foi enviada para sexagem e posterior refrigeração, enquanto uma parcela do ejaculado foi retirada para processamento e congelação convencional (Grupo Controle). O sêmen congelado foi mantido nos botijões criogênicos e as doses foram descongeladas a 36°C por 20 segundos para a inseminação artificial. O sêmen refrigerado foi acondicionado em palhetas de 0,25ml e mantidos em caixas próprias com temperatura entre 15°C e 20°C entre a liberação no laboratório e a IATF. Após as caixas serem fechadas no laboratório, só foram abertas novamente no momento da inseminação. As doses foram retiradas das caixas e montadas diretamente no aplicador de sêmen, sem nenhum tratamento adicional. O transporte entre o laboratório e a fazenda foi realizado de carro com o objetivo de garantir que o tempo entre a liberação no laboratório e a IATF estivesse no período previsto.

### 3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais do presente estudo foram divididos em 4 experimentos sequenciais.

#### 3.4.1. Experimento 1 – Efeito do momento da IATF com sêmen sexado refrigerado (48 vs. 54h da retirada do dispositivo de progesterona) na P/IA de fêmeas Nelore.

No Experimento 1, um total de 567 fêmeas Nelore (269 nulíparas e 298 múltíparas) com escore de condição corporal (ECC) de  $2,97 \pm 0,49$  foram divididos de maneira equilibrada em 4 grupos experimentais para inseminação com sêmen sexado refrigerado com 4 milhões de espermatozoides (4M; N=296) ou sêmen convencional congelado com 25 milhões de espermatozoides (N=271) e inseminadas 48 (N=283) ou 54 (N=284) horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona em um delineamento fatorial 2x2 (Figura 2). Portanto, aproximadamente metade das fêmeas em cada momento recebeu sêmen sexado refrigerado (N=140 às 48h e N=156 às 54h) ou sêmen convencional congelado (N=143 às 48h e N=128 às 54h) de três diferentes touros.

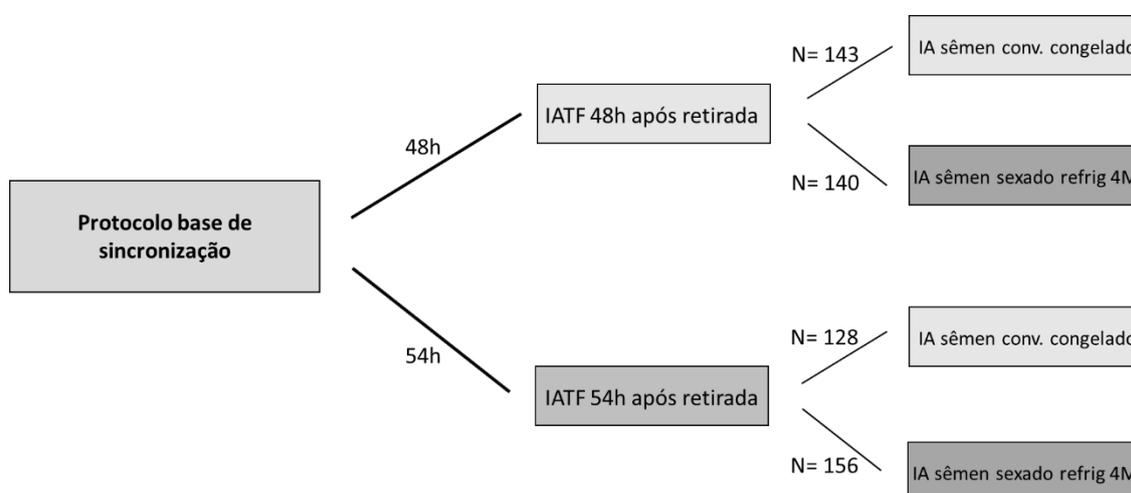


Figura 2. Delineamento do Experimento 1 - Efeito do momento da IATF com sêmen sexado refrigerado (48 vs. 54h da retirada do dispositivo de progesterona) na P/IA de fêmeas Nelore

### **3.4.2. Experimento 2 – Momento da IATF após a liberação do sêmen no laboratório (24 ou 48 horas) na P/IA de vacas Nelore inseminadas com sêmen sexado refrigerado.**

No Experimento 2, 564 multíparas Nelore com ECC de  $2,77 \pm 0,01$  foram distribuídas de maneira equilibrada em 6 grupos experimentais para inseminação com sêmen sexado refrigerado com 4 milhões de espermatozoides na palheta (N=195), sêmen convencional refrigerado com 6 milhões de espermatozoides na palheta (6M; N=171) ou sêmen convencional congelado com 25 milhões de espermatozoides na palheta (N=198). As inseminações foram realizadas 24 (N=309) ou 48 (N=255) horas após a liberação do sêmen no laboratório em um delineamento fatorial 3x2 (Figura 3). Todas as inseminações foram realizadas 48 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. Portanto, aproximadamente um terço das fêmeas em cada momento recebeu sêmen sexado refrigerado 4M (N=106, 24h após a liberação e N=89, 48h após a liberação), convencional refrigerado 6M (N=95, 24h após a liberação e N=76, 48h após a liberação) ou convencional congelado (N=108, 24h após a liberação e N=90, 48h após a liberação) de três diferentes touros.

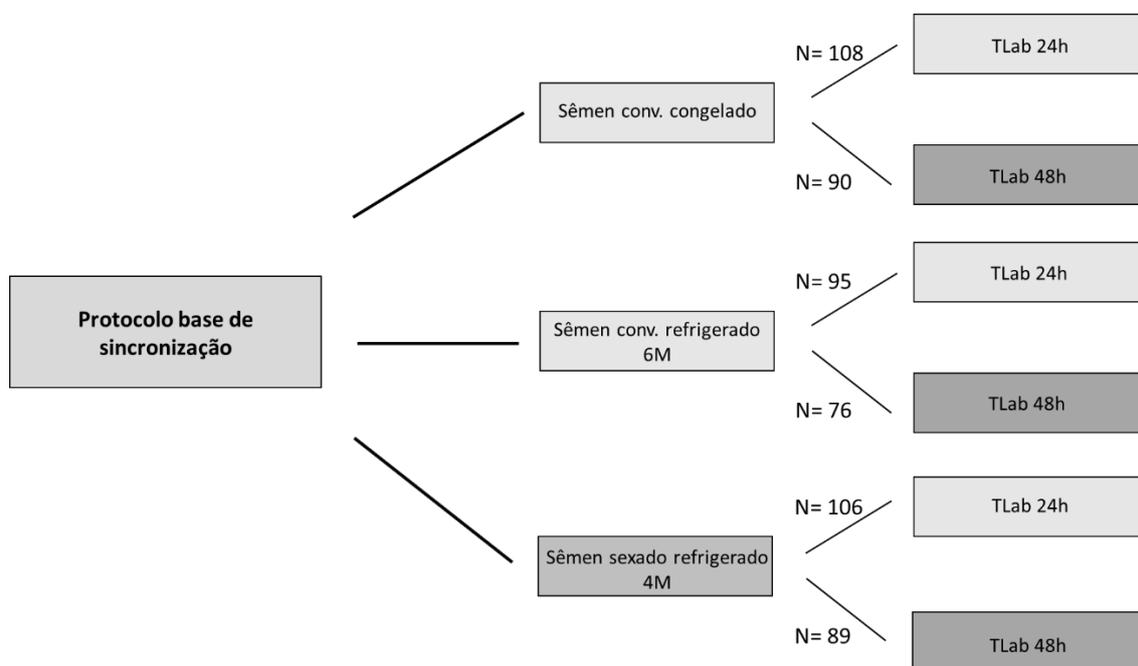


Figura 3. Delineamento do Experimento 2. - Momento da IATF após a liberação do sêmen no laboratório (24 ou 48 horas) na P/IA de vacas Nelore inseminadas com sêmen sexado refrigerado (TLab = intervalo entre a liberação do sêmen refrigerado no laboratório e a inseminação artificial).

#### 3.4.2.1. Experimento 2a – Avaliação laboratorial de sêmen refrigerado (convencional ou sexado) mantido entre 15°C e 20°C por 84 horas.

No Experimento 2a, uma amostra de sêmen refrigerado convencional e de sêmen sexado refrigerado contendo 9 doses de cada touro e de cada tratamento foi enviada para avaliação no laboratório de Andrologia do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. As análises foram realizadas a cada 12 horas do momento da saída do laboratório até 84 horas.

A cinética espermática foi avaliada pelo sistema CASA (Computer-Assisted Sperm Analysis; Hamilton-Thorne®, Ivos 12.3, E.U.A.), utilizando o setup para touros do equipamento (GOOVAERTS et al., 2006). A aquisição de imagem foi em 60 Hz frames/s com mínimo de 80 espermatozoides por campo, cinco pixels como tamanho mínimo e 70 para intensidade das células, velocidade de 50  $\mu\text{m/s}$ , 70% de retilinearidade (STR) para células progressivas e valor de corte para células lentas de 30 e 15  $\mu\text{m/s}$  para velocidade média de percurso

(VAP) e velocidade retilínea (VSL), respectivamente. Uma alíquota (3  $\mu\text{L}$ ) de cada amostra foi inserida em câmaras de contagem Leja (Leja Products B.V, Holanda), mantidas a  $37^{\circ}\text{C}$ , com a análise de pelo menos 1000 células em no mínimo seis campos por amostra, conforme descrito por Leite (2022).

As variáveis analisadas no Experimento 2a foram:

- ✓ Velocidade curvilínea (VCL-  $\mu\text{m/s}$ ) - velocidade da trajetória real do espermatozoide;
- ✓ Velocidade linear progressiva (VSL-  $\mu\text{m/s}$ ) - velocidade média em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e o último ponto da trajetória do espermatozoide;
- ✓ Velocidade média da trajetória (VAP-  $\mu\text{m/s}$ ) - velocidade da trajetória média do espermatozoide; amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH -  $\mu\text{m}$ ) - amplitude do deslocamento médio da cabeça do espermatozoide em sua trajetória real;
- ✓ Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz) - número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento;
- ✓ Retilinearidade (STR - %) - relação percentual entre VSL e VAP. Estima a proximidade do percurso da célula a uma linha reta;
- ✓ Linearidade (LIN - %) - Relação percentual entre VSL e VCL, ou seja, é a porcentagem de célula que tem index linear  $> 0.7$ , ângulo absoluto menor que  $25^{\circ}$  e ângulo algébrico menor que  $3^{\circ}$ . Quanto mais o espermatozoide se afasta da velocidade em linha reta, menor será sua linearidade (MORTIMER, 2000);
- ✓ Espermatozoides móveis (Móveis - %) - Relação percentual entre os espermatozoides móveis e o total;
- ✓ Espermatozoides com motilidade progressiva (Progressivos - %) - Relação percentual entre os espermatozoides móveis e o total;
- ✓ Espermatozoides com velocidade rápida (Rápidos - %) - Relação percentual entre os espermatozoides com movimentos rápidos e o total;
- ✓ Integridade acrossomal (POPE - %) - Relação percentual entre os espermatozoides com acrossoma íntegro e o total;
- ✓ Integridade da membrana plasmática (eosina/nigrosina; E/N - %) - Relação percentual entre os espermatozoides com membrana plasmática íntegra e o total;

### 3.4.3. Experimento 3 - Efeito da redução da quantidade de espermatozoides (2, 3 ou 4 milhões) na palheta de sêmen sexado refrigerado na P/IA de vacas Nelore.

No Experimento 3, 679 multíparas Nelore com ECC de  $2,74 \pm 0,01$  foram distribuídas em 4 grupos para inseminação com sêmen sexado refrigerado com 2 milhões (2M; N=178), 3 milhões (3M; N=171) ou 4 milhões (4M; N=171) de espermatozoides ou com sêmen convencional congelado com 25 milhões de espermatozoides (N=159; Figura 4). Todas as inseminações foram realizadas entre 24 e 30 horas após a liberação do sêmen no laboratório e 48 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona. Foram utilizados 3 diferentes touros no estudo.

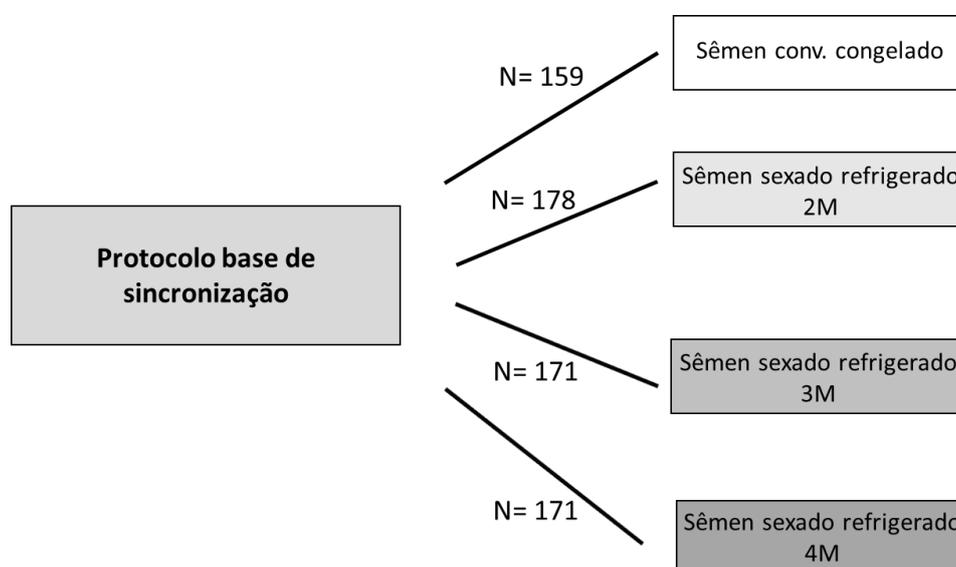


Figura 4. Delineamento do Experimento 3 - Efeito da redução da quantidade de espermatozoides (2, 3 ou 4 milhões) na palheta de sêmen sexado refrigerado na P/IA de vacas Nelore.

### 3.4.4. Experimento 4: Efeito da inseminação com sêmen sexado refrigerado com 2 ou 4 milhões de espermatozoides na palheta, 24 ou 48 horas após a liberação do sêmen no laboratório na P/IA de vacas Nelore.

No Experimento 4, 355 multíparas Nelore com ECC de  $2,92 \pm 0,01$  foram distribuídas de maneira equilibrada em 6 grupos experimentais para inseminação com sêmen sexado refrigerado 2M (N=133), sêmen sexado refrigerado 4M (N=118) ou sêmen convencional congelado 25M (N=104). As inseminações foram realizadas 24 (N=119) ou 48 (N=236) horas após a liberação do sêmen no laboratório em um delineamento fatorial 3x2 (Figura 5). Portanto, as fêmeas em cada momento receberam sêmen sexado refrigerado 2M (N=47, 24h após a liberação e N=86, 48h após a liberação), sexado refrigerado 4M (N=43, 24h após a liberação e N=76, 48h após a liberação) ou convencional congelado (N=29, 24h após a liberação e N=74, 48h após a liberação). Todas as inseminações foram realizadas 48 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. Foram utilizados 2 diferentes touros.

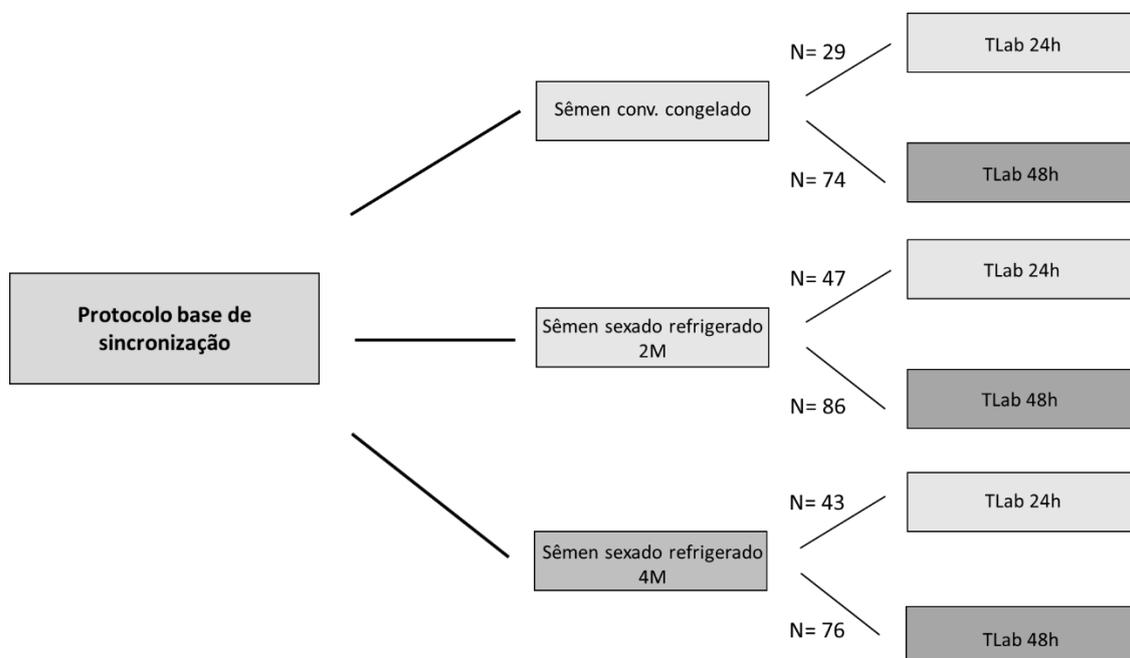


Figura 5. Delineamento do Experimento 4 - Efeito da inseminação com sêmen sexado refrigerado com 2 ou 4 milhões de espermatozoides na palheta, 24 ou 48 horas após a liberação do sêmen no laboratório na P/IA de vacas Nelore. (TLab = intervalo entre a liberação do sêmen refrigerado no laboratório e a inseminação artificial).

### 3.5. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO E SEXAGEM FETAL

Os diagnósticos de gestação foram realizados entre 30 e 35 dias após a realização da IATF por ultrasonografia transretal. Foram considerados com prenhez positiva animais com vesícula embrionária viável. A sexagem fetal (Experimento 1) foi realizada por ultrasonografia transretal 70 dias após a IATF e o sexo foi determinado pela visualização do posicionamento do tubérculo genital. A P/IA foi determinada pela quantidade de fêmeas positivas em relação ao total de animais diagnosticados. Ainda, foi avaliada a perda gestacional entre os dias 30 e 70 após a IATF.

### 3.6. SEXAGEM E CONSERVAÇÃO DO SÊMEN

Os procedimentos de sexagem padrão foram utilizados nas instalações da Sexing Technologies localizadas em Indaiatuba, SP, Brasil. Em todos os experimentos, o isolamento de espermatozoides X foi realizado com um citômetro de fluxo Genesis I (Cytonome, Bedford, MA, EUA) operado sob 30 psi e aproximadamente 30.000 eventos/segundo. Essa configuração permite classificar entre 4000 e 6000 espermatozoides/s, com 90% de precisão de seleção das células desejadas. Os espermatozoides foram corados com Hoechst 33342 com concentração de  $160 \times 10^6$  espermatozoides/mL e classificados com  $120 \times 10^6$  espermatozoides/mL, após filtragem na unidade de gravidade através de filtro descartável. Os espermatozoides foram avaliados com laser com 170 mW de intensidade.

O sêmen convencional congelado foi estendido em um meio gema-Tris (glicerol; Sexing Technologies), embalados em palhetas de 0,25 mL com 25 milhões de espermatozoides e congelados em racks em vapor de nitrogênio líquido na DigitCool (IMV, França) de acordo com os procedimentos padrão utilizados pela Sexing Technologies<sup>®</sup>. O sêmen refrigerado foi estendido em FRSD6+ (Sexing Technologies) e embalado em palhetas de 0,25 mL com concentração seguindo o delineamento de cada experimento e alocado em caixa de resfriamento própria, desenvolvida pela Sexing Technologies, de acordo com o procedimento padrão da empresa.

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis binomiais, por exemplo, P/AI, foram analisadas utilizando o PROC GLIMMIX do programa SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA). O modelo inicial incluiu escore de condição corporal (ECC), fazenda (Experimentos 2, 3 e 4), tratamento, touro, inseminador, presença ou não de cio (CIO), momento da IA (48 ou 54h após a retirada do dispositivo; Experimento 1), tempo após a saída do laboratório (TLab; 24 ou 48 horas; Experimentos 2 e 4) e interações. As variáveis foram então retiradas do modelo final por eliminação backward (de acordo com o critério de Wald) quando  $P > 0,20$  por regressão logística multivariada utilizando o procedimento LOGISTIC no SAS. No Experimento 1, o modelo final para P/IA incluiu tratamento, momento da IA, touro e categoria. No Experimento 2, o modelo final incluiu touro, tratamento, inseminador, CIO e TLab. No Experimento 2a, a análise estatística das análises laboratoriais, foram realizadas por análise de variância de medidas repetidas no tempo com o procedimento MIXED no SAS. Após essa análise, foi realizado o teste de médias LSD. No Experimento 3, o modelo final incluiu fazenda, tratamento e CIO. No Experimento 4, o modelo final para P/IA incluiu ECC, touro, tratamento TLab e CIO. Foi considerado  $P < 0,05$  como diferença estatística entre as variáveis.

#### 4. RESULTADOS

No Experimento 1, não houve interação entre os tratamentos e o momento da IATF para P/IA ( $P=0,27$ ). Não houve efeito do tratamento ( $P=0,09$ ) na P/IA entre o grupo controle (61,6%; 167/271) e o grupo sexado refrigerado 4M (54,4%; 161/296). Também, não se verificou efeito do momento da inseminação ( $P=0,11$ ) na P/IA realizada 48 horas (54,8%; 155/283) ou 54 horas (60,9%; 173/284) após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona (Figura 6). Houve efeito de categoria ( $P=0,03$ ) na P/IA. As múltiparas (62,4%) apresentaram P/IA superior às novilhas (52,8%). Foi observada também diferença na P/IA para o sexo desejado. O grupo controle apresentou 53,3% (89/167) de prenhez de fêmeas enquanto o grupo sexado refrigerado atingiu 93,8% de prenhez de fêmeas (151/161;  $P<0,001$ ; Figura 7). Não houve efeito do tratamento ( $P=0,71$ ) na perda gestacional entre o grupo controle (3,0%; 5/167) e sexado refrigerado (3,7%; 6/161). Ainda, não houve efeito do momento da inseminação ( $P=0,62$ ) na perda gestacional quando a IA foi realizada 48h (3,8%; 6/155) ou 54h (2,9%; 5/173) após a retirada do dispositivo.

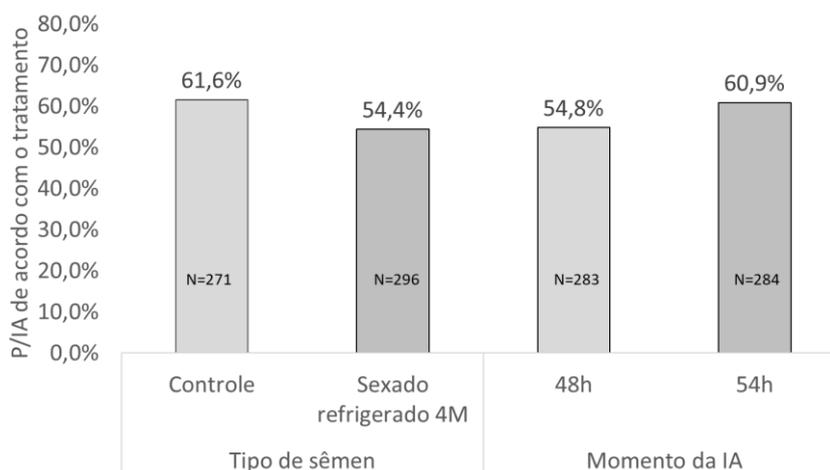


Figura 6. P/IA de fêmeas Nelore inseminadas com sêmen convencional congelado (controle) ou sêmen sexado refrigerado ( $P=0,09$ ) 48 ou 54 horas ( $P=0,11$ ) após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona.

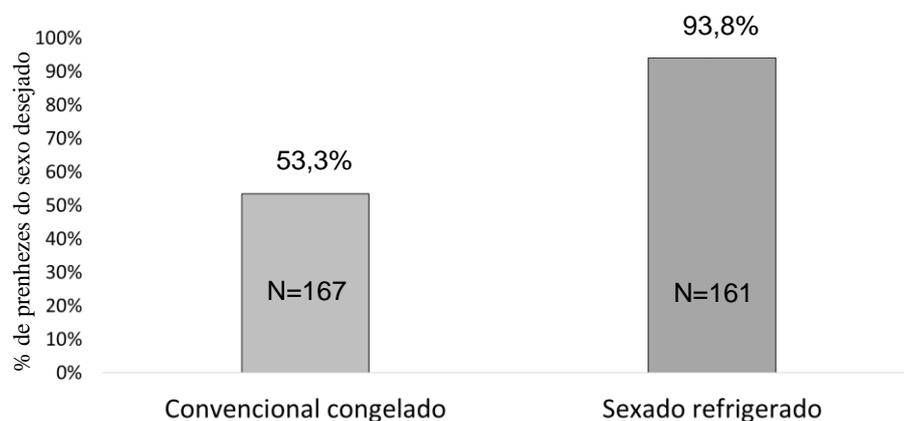


Figura 7. Percentual de prenhez do sexo desejado (fêmea) de acordo com o tipo de sêmen utilizado (sêmen convencional congelado ou sêmen sexado refrigerado;  $P < 0,001$ ).

No Experimento 2, não houve interação entre os tratamentos e o TLab para P/IA ( $P=0,66$ ). Não foi observada diferença ( $P=0,13$ ) na P/IA entre os grupos Controle (63,1%; 125/198), Convencional Refrigerado 6M (53,2%; 91/171) e Sexado Refrigerado 4M (52,8%; 103/195). Não houve diferença ( $P=0,84$ ) no TLab. A P/IA quando a IATF foi realizada 24 horas após a saída do sêmen do laboratório foi de 54,1% (167/309) comparada com 59,6% (152/255) quando a IATF foi realizada 48 horas após a saída do laboratório. Foi verificado nesse estudo efeito de touro [touro 1 = 56,2% (136/242)<sup>a</sup>; touro 2 = 63,6% (142/223)<sup>a</sup>; touro 3 = 41,4% (41/99)<sup>b</sup>;  $P < 0,001$ ] e de inseminador [inseminador 1 = 64,4% (125/194)<sup>a</sup>; inseminador 2 = 47,8% (91/190)<sup>b</sup>; inseminador 3 = 57,2% (103/180)<sup>ab</sup>;  $P=0,04$ ]. Não houve efeito ( $P=0,13$ ) da presença (58,6%; 248/423) ou ausência (50,3%; 71/141) de estro na P/IA.

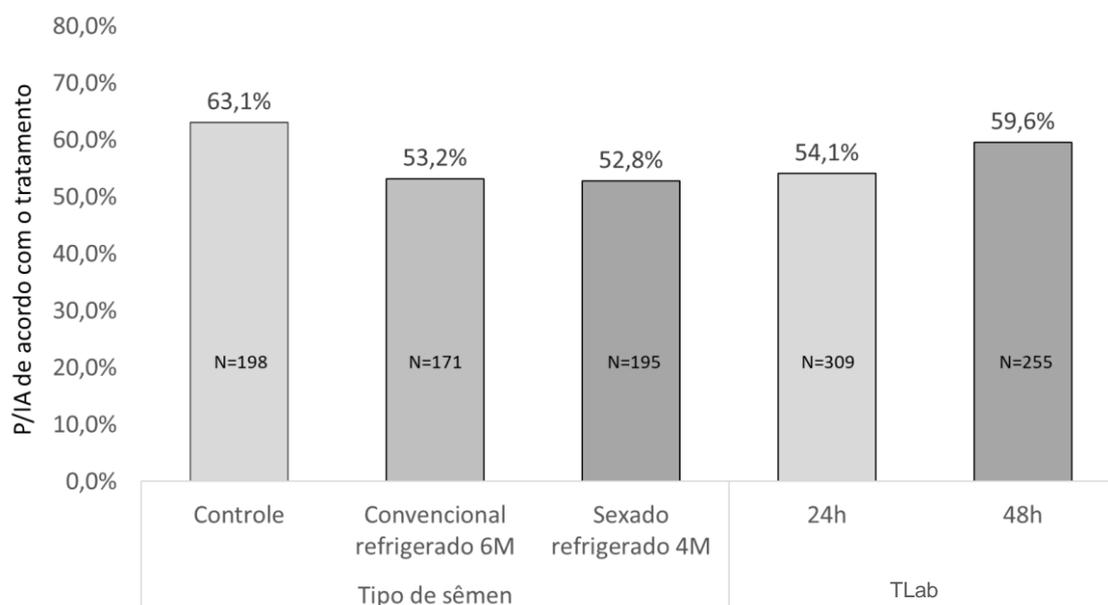


Figura 8. P/IA de fêmeas Nelore inseminadas com sêmen convencional congelado, sêmen convencional refrigerado 6M ou sêmen sexado refrigerado 4M ( $P=0,13$ ), 24 ou 48 horas ( $P=0,84$ ) após a liberação do sêmen no laboratório.

Nas análises laboratoriais do Experimento 2a, não houve interação entre o tempo e o tratamento para nenhuma das variáveis analisadas (Tabela 1).

Tabela 1. Efeito do tratamento, do tempo e da interação tempo e tratamento nas variáveis laboratoriais avaliadas no sistema CASA no Experimento 2a.

	Tempo	Tratamento	Tempo*tratamento
VAP	0,06	0,11	0,89
VSL	0,65	0,01	0,96
VCL	0,27	0,64	0,94
ALH	0,77	0,15	0,88
BCF	0,002	<0,001	0,90
STR	0,95	0,003	0,86
LIN	0,64	0,003	0,91
Móveis	0,01	0,17	0,93
Progressivos	0,91	0,05	0,93
Rápidos	0,03	0,64	0,71
POPE	0,06	0,44	0,22
E/N	0,12	0,001	0,90

VAP = velocidade média da trajetória; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade linear progressiva; ALH = amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF= Frequência de batimento flagelar cruzado; STR = Retilinearidade; LIN = Linearidade; Móveis = espermatozoides móveis; Progressivos = espermatozoides com motilidade progressiva; Rápidos = Espermatozoides com velocidade rápida; POPE = Integridade acrossomal; E/N = Integridade da membrana plasmática.

Houve diferença entre os tratamentos para as variáveis VSL, BCF, STR, LIN, Progressivos e E/N, sendo o sêmen convencional congelado maior na VSL, BCF, STR, Progressivos e LIN e menor na E/N, conforme mostrado na tabela 2.

Tabela 2. Efeito do tratamento nas variáveis (média  $\pm$  erro padrão) analisadas no Experimento 2a.

	Convencional	Sexado refrigerado	P
VAP	150,3 $\pm$ 5,5	138,9 $\pm$ 4,8	0,11
VSL	108,5 $\pm$ 5,7	87,9 $\pm$ 4,7	0,01
VCL	285,9 $\pm$ 6,9	280,5 $\pm$ 9,0	0,64
ALH	10,3 $\pm$ 0,2	11,0 $\pm$ 0,3	0,15
BCF	34,4 $\pm$ 0,7	28,6 $\pm$ 0,7	<0,001
STR	72,9 $\pm$ 1,6	64,6 $\pm$ 1,7	0,003
LIN	40,3 $\pm$ 1,4	33,5 $\pm$ 1,3	0,003
Móveis	65,4 $\pm$ 2,4	68,9 $\pm$ 1,3	0,17
Progressivos	34,5 $\pm$ 2,5	26,8 $\pm$ 2,3	0,05
Rápidos	53,9 $\pm$ 2,6	54,5 $\pm$ 1,3	0,64
POPE	96,6 $\pm$ 0,4	97,0 $\pm$ 0,2	0,44
E/N	75,2 $\pm$ 1,7	82,8 $\pm$ 1,2	0,001

VAP = velocidade média da trajetória; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade linear progressiva; ALH = amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF= Frequência de batimento flagelar cruzado; STR = Retilinearidade; LIN = Linearidade; Móveis = espermatozoides móveis; Progressivos = espermatozoides com motilidade progressiva; Rápidos = Espermatozoides com velocidade rápida; POPE = Integridade acrossomal; E/N = Integridade da membrana plasmática.

Houve efeito do tempo para as variáveis BCF, Móveis e Rápidos, conforme mostrado na tabela 3. Apesar de haver variações pontuais para essas variáveis em momentos intermediários, só foi verificada queda significativa e constante a partir das 72 horas para espermatozoides móveis e rápidos e apenas às 84 horas para BCF quando o sêmen é mantido entre 15°C e 20°C no meio de refrigeração utilizado no experimento.

Tabela 3. Efeito do tempo nas variáveis (média  $\pm$  erro padrão) analisadas no Experimento 2a.

	0h	12h	24h	36h	48h	60h	72h	84h	P
VAP	152,1 $\pm 13,5$	152,5 $\pm 13,2$	157,8 $\pm 9,3$	163,2 $\pm 10,0$	132,7 $\pm 4,7$	144,6 $\pm 6,1$	134,4 $\pm 9,2$	119,7 $\pm 7,0$	0,06
VSL	104,0 $\pm 10,4$	102,4 $\pm 12,5$	106,2 $\pm 12,0$	109,9 $\pm 16,1$	84,9 $\pm 9,4$	98,7 $\pm 8,1$	96,9 $\pm 10,7$	82,8 $\pm 9,2$	0,65
VCL	289,7 $\pm 22,0$	285,6 $\pm 23,7$	297,8 $\pm 14,7$	310,0 $\pm 12,8$	274,8 $\pm 10,1$	290,6 $\pm 8,1$	268,8 $\pm 13,8$	248,1 $\pm 10,7$	0,27
ALH	10,6 $\pm 0,6$	9,7 $\pm 0,8$	10,3 $\pm 0,7$	11,0 $\pm 0,7$	11,1 $\pm 0,7$	11,3 $\pm 0,4$	10,8 $\pm 0,4$	10,6 $\pm 0,4$	0,77
BCF	33,4 $\pm 0,6^{ab}$	34,0 $\pm 2,0^a$	33,9 $\pm 1,8^{ab}$	33,8 $\pm 1,9^{ab}$	28,0 $\pm 1,6^c$	30,3 $\pm 1,3^{abc}$	29,2 $\pm 2,0^{abc}$	29,0 $\pm 1,9^{bc}$	0,002
STR	70,0 $\pm 2,1$	69,5 $\pm 4,2$	68,5 $\pm 4,1$	67,5 $\pm 5,3$	65,0 $\pm 4,3$	68,1 $\pm 3,7$	71,8 $\pm 3,7$	69,6 $\pm 3,4$	0,95
LIN	39,0 $\pm 2,8$	39,8 $\pm 4,1$	38,7 $\pm 3,7$	37,6 $\pm 4,3$	32,5 $\pm 2,4$	35,3 $\pm 2,1$	38,0 $\pm 2,8$	34,3 $\pm 2,5$	0,64
Móveis	74,0 $\pm 3,2^a$	62,3 $\pm 1,4^b$	64,6 $\pm 1,6^{ab}$	67,0 $\pm 2,7^{ab}$	74,1 $\pm 3,2^a$	74,0 $\pm 2,0^a$	62,0 $\pm 5,5^b$	59,1 $\pm 4,9^b$	0,01
Progr.	36,1 $\pm 3,9$	32,1 $\pm 4,4$	31,3 $\pm 5,5$	30,5 $\pm 7,7$	28,3 $\pm 5,4$	31,6 $\pm 4,8$	31,0 $\pm 6,0$	24,5 $\pm 3,4$	0,91
Rápidos	61,8 $\pm 3,1^a$	57,0 $\pm 1,0^{ab}$	55,0 $\pm 2,5^{ab}$	53,0 $\pm 4,1^{ab}$	57,1 $\pm 4,5^{ab}$	56,6 $\pm 1,4^{ab}$	49,0 $\pm 6,0^{bc}$	41,6 $\pm 3,5^c$	0,03
POPE	95,1 $\pm 0,7$	97,8 $\pm 0,7$	97,7 $\pm 0,6$	97,6 $\pm 0,8$	96,1 $\pm 0,6$	96,8 $\pm 0,7$	97,3 $\pm 0,5$	96,1 $\pm 0,6$	0,06
E/N	72,5 $\pm 3,7$	74,3 $\pm 4,0$	78,0 $\pm 2,9$	81,6 $\pm 2,6$	83,1 $\pm 2,9$	83,3 $\pm 2,3$	79,8 $\pm 3,0$	79,6 $\pm 3,8$	0,12

VAP = velocidade média da trajetória; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade linear progressiva; ALH = amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF= Frequência de batimento flagelar cruzado; STR = Retilinearidade; LIN = Linearidade; Móveis = espermatozoides móveis; Progressivos = espermatozoides com motilidade progressiva; Rápidos = Espermatozoides com velocidade rápida; POPE = Integridade acrossomal; E/N = Integridade da membrana plasmática.

No Experimento 3, não houve diferença ( $P=0,29$ ) na P/IA entre as diferentes quantidades de espermatozoides presentes na palheta de sêmen sexado refrigerado, nem no grupo controle. A P/IA do grupo 2M foi de 47,2% (84/178), do grupo 3M foi 47,9% (82/171), do grupo 4M foi 56,1% (96/171) e do grupo controle foi 52,2% (83/159). Nesse experimento, observou-se diferença na P/IA entre as fazendas [fazenda 1 = 46,0% (74/161)<sup>ab</sup>; fazenda 2 = 38,1% (40/105)<sup>b</sup>; fazenda 3 = 55,9% (231/413)<sup>a</sup>;  $P=0,004$ ] e da presença (56,2%; 271/482) ou não (37,6%; 74/197) de estro ( $P<0,001$ ).

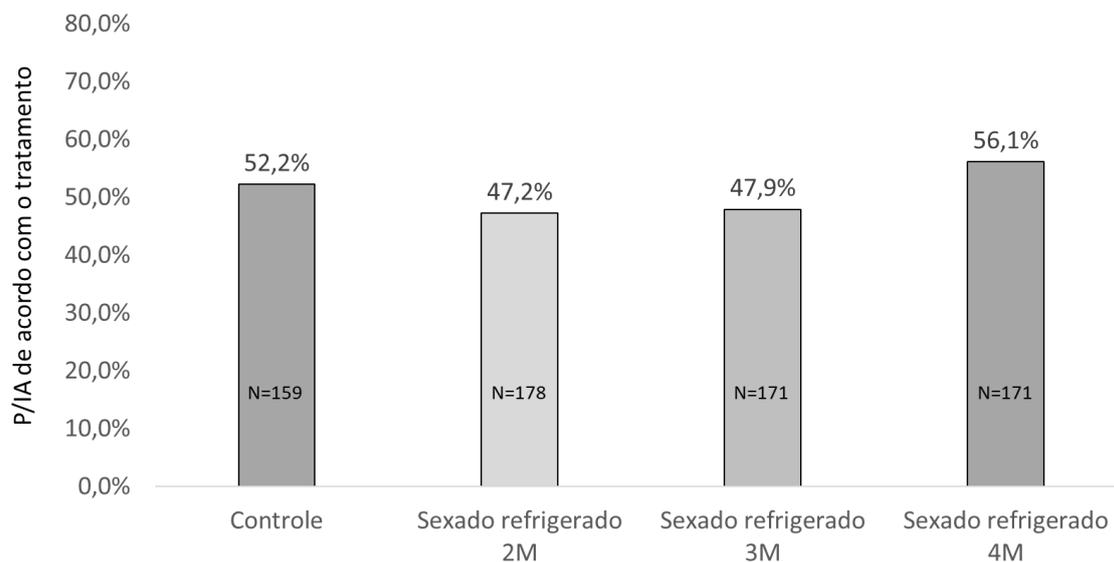


Figura 9. P/IA de fêmeas Nelore inseminadas com sêmen convencional congelado (25 milhões de espermatozoides por palheta) e com sêmen sexado refrigerado contendo 2 milhões (2M), 3 milhões (3M) ou 4 milhões (4M) de espermatozoides por palheta ( $P=0,29$ ).

No Experimento 4, não houve interação entre os tratamentos e o TLab para P/IA ( $P=0,18$ ). Entretanto, houve diferença entre os tratamentos avaliados ( $P=0,01$ ). O grupo Controle apresentou P/IA de 62,5% (65/104)<sup>a</sup>, o grupo Sexado Refrigerado 2M de 50,4% (67/133)<sup>ab</sup> e o grupo Sexado Refrigerado 4M de 43,22% (51/118)<sup>b</sup>. Não houve diferença na P/IA entre os diferentes TLab, sendo 53,8% (64/119) para 24h e 50,4% para 48h (119/236;  $P=0,37$ ). Também foi verificada diferença na taxa de prenhez entre os touros [touro 1 = 56,8% (104/183) vs touro 2 = 45,9% (79/172);  $P=0,03$ ] e presença (119/192) ou não de estro (64/163;  $P<0,001$ ). Ainda, foi verificada diferença de acordo com a ECC ( $P=0,04$ ). As fêmeas ECC de 2,5 tiveram menor taxa de concepção (36,8%; 21/51)<sup>b</sup> quando comparadas às de escore de 3,5 (61,73%; 50/81)<sup>a</sup>. As fêmeas com ECC de 2,75 (54,9%; 56/102)<sup>ab</sup> e de 3,0 (48,7%; 56/115)<sup>ab</sup> não diferiram dos demais grupos.

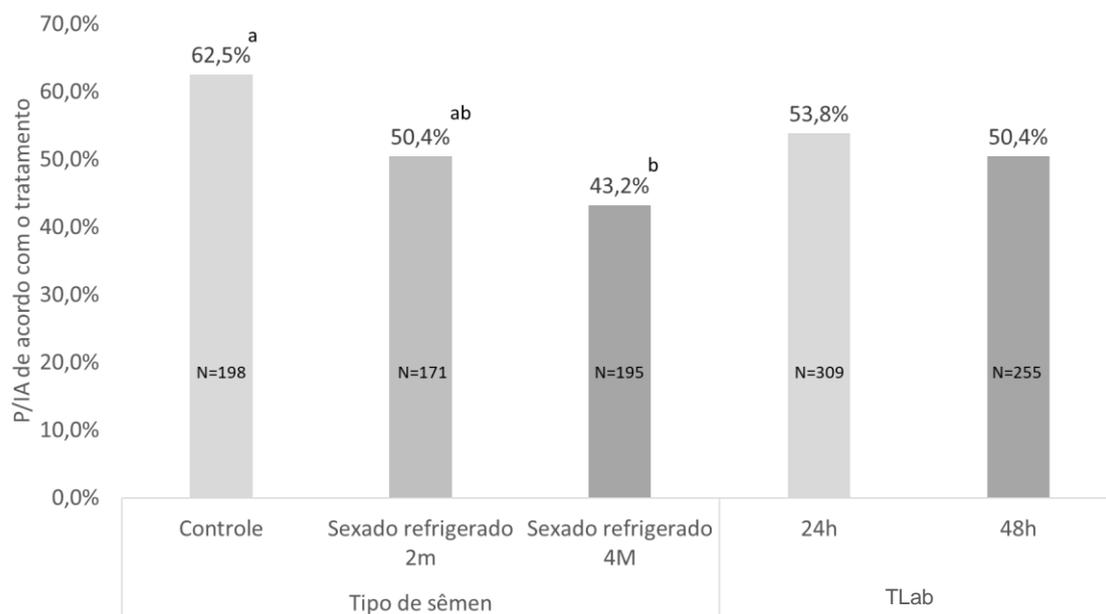


Figura 10. P/IA de fêmeas Nelore inseminadas com sêmen convencional congelado (25 milhões de espermatozoides por palheta), sêmen sexado refrigerado contendo 2 milhões (2M) ou sêmen sexado refrigerado contendo 4 milhões (4M) de espermatozoides por palheta ( $P=0,01$ ), 24 ou 48 horas ( $P=0,37$ ) após a liberação do sêmen no laboratório.

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo traz uma nova perspectiva para utilização de sêmen sexado em fêmeas de corte submetidas à protocolos de indução da ovulação para IATF. As hipóteses do estudo foram confirmadas e os resultados mostram que é possível inseminar as fêmeas com sêmen sexado refrigerado no mesmo momento em que seria realizada a IATF com sêmen convencional congelado. Ainda, pode-se verificar que é possível reduzir a quantidade de espermatozoides na palheta sem prejudicar a P/IA e aumentar o tempo entre a liberação do sêmen no laboratório de sexagem (TLab) e a IA na fazenda.

A congelação de sêmen teve grande impacto na difusão da tecnologia de inseminação artificial no mundo todo. Os primeiros estudos datam de 1949, quando os cientistas ingleses Polge, Smith e Parkes descobriram os efeitos crioprotetores do glicerol (POLGE; SMITH; PARKES, 1949). A criopreservação permite que o sêmen seja transportado por longas distâncias e que seja armazenado por tempo indefinido. Contudo, durante o processo de criopreservação há grande perda de células espermáticas e da viabilidade celular (SILVA et al., 2020). Durante o processo de criopreservação, pode ocorrer alteração na função espermática e lesões nas membranas do espermatozoide induzidas pelo frio e pela descongelação (HOLT, 2000; BORGES et al., 2011). É bem descrito que as principais injúrias na membrana dos espermatozoides ocorrem entre 5°C e 15°C (revisado por STORNELLI et al., 2005). Murphy et al., (2016) verificaram que sêmen refrigerado mantido a 15°C mantinham motilidade superior quando comparado com o sêmen refrigerado mantido à 5°C, 22°C ou 32°C durante 5 dias. Em outro estudo, Murphy et al., (2018) confirmaram que a motilidade total é superior no sêmen refrigerado armazenado por 4 dias a 15°C quando comparado a 5°C ou 28°C. Ainda, os autores verificaram que o sêmen refrigerado mantido a 15°C com 5 milhões de espermatozoides na palheta obteve resultado similar na taxa de não retorno quando comparado ao sêmen congelado convencional. Contudo, quando o sêmen refrigerado foi mantido a 5°C, a taxa de não retorno foi inferior quando comparada aos dois grupos anteriores. Os dados dos Experimentos 2 e 4 também não mostram diferença quando a inseminação foi realizada 24 ou 48 horas após a liberação do sêmen pelo laboratório e o sêmen foi mantido entre

15°C e 20°C. Silva et al., (2020) observou taxa de prenhez similar às 24 ou 48 horas após o processamento do sêmen refrigerado convencional mantido a 5°C. Contudo, apesar de Murphy et al., (2018) verificarem taxa de não retorno similar em inseminações realizadas 24 ou 48 horas após o processamento em sêmen mantido a 5°C, a NRR com essa temperatura foi inferior à do sêmen refrigerado mantido a 15°C e ao sêmen congelado.

No presente estudo, a P/IA das fêmeas inseminadas com sêmen sexado refrigerado 48 horas ou 54 horas após a retirada do dispositivo intravaginal de progesterona não diferiu do grupo controle. Esses resultados contrastam com os trabalhos com sêmen sexado congelado (SOUZA et al., 2007; SALES et al., 2011; NEVES, 2010), que mostram ser necessário um atraso no momento da inseminação (de 48 para 60 horas após a retirada do dispositivo) para obtenção de melhores resultados. Neves (2010) avaliou o melhor momento para inseminar com sêmen sexado congelado em relação à ovulação e verificou que a IATF deveria ocorrer entre 0 e 12 horas antes da ovulação. O autor verificou também que a P/IA nesse intervalo não foi diferente da P/IA em vacas recém ovuladas. Portanto, o presente estudo indica que é possível realizar o protocolo de IATF sem alterações de horário de inseminação com o sêmen sexado refrigerado.

Na literatura científica internacional não existem valores de referência das variáveis analisadas pelo CASA para qualidade espermática no sêmen sexado refrigerado em bovinos. Possivelmente, a menor fertilidade dos espermatozoides sexados tenha causa multifatorial, já que os espermatozoides são células complexas que precisam da integridade e funcionalidade de vários atributos para fertilizar com sucesso o oócito (CARVALHO; SARTORI; DODE, 2014). No presente estudo foi verificada menor STR, LIN, VSL e espermatozoides com motilidade progressiva no sêmen sexado em relação ao sêmen convencional. Da mesma maneira, Carvalho et al., (2018) encontraram maior percentual de motilidade progressiva no sêmen convencional congelado em relação ao sêmen sexado congelado com até 8 horas de incubação após o descongelamento. Essas características estão relacionadas à linearidade do movimento da célula. Mortimer & Mortimer (1990) sugerem que espermatozoides hiperativados nadam com movimento lateral exacerbado, o que coincide com o achado do presente estudo. Apesar das características relacionadas à hiperativação citadas acima, o BCF foi menor no sêmen sexado em relação ao sêmen convencional refrigerado,

contrariamente ao esperado para espermatozoides hiperativados (CASTANHEIRA et al., 2021). Portanto, não foi possível inferir nesse estudo que a sexagem por citometria de fluxo induziu a hiperativação. De acordo com diversos autores (MORTIMER, 1997; VERSTEGEN et al., 2002; MARQUEZ & SUAREZ, 2007; SOUSA, 2007), para que se caracterize a presença de células hiperativadas na amostra, é preciso que seja observado aumento do ALH e da VCL, bem como diminuição da LIN. Marquez & Suarez (2004) relatam que a perda de linearidade da célula está relacionada com batimento flagelar assimétrico. Segundo Arruda (2000), quanto maiores forem os valores dos parâmetros STR, LIN e a velocidade rápida, melhor deverá ser a qualidade espermática para o sêmen equino criopreservado. Holt et al. (1997) encontraram correlação significativa entre linearidade espermática (LIN) e fertilidade de suínos inseminados a campo. Ainda, o presente estudo encontrou maior percentual de espermatozoides com membrana plasmática íntegra no sêmen sexado refrigerado em relação ao convencional refrigerado. Esse dado está alinhado à informação de que o citômetro de fluxo descarta as células mortas ou com patologia (VISHWANATH; MORENO, 2018). No presente estudo não se verificou diferença no percentual de acrossomos íntegros entre os tratamentos, contrariamente ao observado por Carvalho et al., (2018) que encontraram maior percentual de acrossomos íntegros no sêmen não sexado (convencional) congelado com até 8 horas de incubação após descongelação. Na avaliação da viabilidade espermática ao longo do tempo, foi verificado menor percentual de espermatozoides móveis e rápidos somente a partir de 72 horas após a saída do laboratório. Esse dado é similar ao de Murphy et al., (2016) que verificaram queda linear decrescente na motilidade de espermatozoides mantidos refrigerados. Porém, os autores verificaram que o sêmen ainda apresentava 60% de espermatozoides móveis no terceiro dia após o processamento quando mantido a 15°C, similar aos resultados obtidos no presente estudo. Esses resultados sugerem que a intervalo entre a saída do laboratório e a IA pode ser maior do que 48 horas, devido a manutenção da qualidade espermática verificada até 84 horas.

Contudo, apesar da diferença verificada na análise laboratorial entre os tratamentos no Experimento 2a, a viabilidade espermática não foi afetada pelo processo de sexagem por citometria de fluxo, visto que nenhuma diferença foi

encontrada na P/IA do Experimento 2, visto que os resultados mostram P/IA foi similar entre os grupos de sêmen sexado e sêmen convencional, ambos refrigerados. Carvalho et al., (2010) verificam efeito similar em um estudo com sêmen sexado usado para fertilização *in vitro*. Os autores encontraram diferenças em características estruturais do espermatozoide bovino após a passagem pelo citômetro, porém, essas diferenças não reduziram a capacidade do sêmen produzir embriões *in vitro*.

No presente estudo, foi verificado efeito do touro na P/IA (Experimentos 2 e 4). Outros estudos evidenciaram que há uma variação considerável na fertilidade entre touros utilizados na inseminação com sêmen convencional (FRIGONI, 2020; ZANATTA, 2019) e com sêmen sexado (DEJARNETTE et al., 2011; SALES et al., 2011). No entanto, não há evidência de interação entre a fertilidade do touro e o processo de sexagem nem interação entre concentração espermática x sêmen sexado ou não e touro (SEIDEL, 2014). Essas informações corroboram com os resultados do presente estudo que não evidenciaram interação entre touros e os tratamentos para P/IA. Além do efeito de touros na fertilidade dos programas de inseminação artificial, nos diferentes experimentos desse estudo, outras variáveis impactaram a P/IA como, inseminador (Experimento 2), categoria (Experimento 1), fazenda (Experimento 3) e ECC (Experimento 4). Esses dados concordam com os obtidos por Frigoni (2020) que avaliou um banco de dados com mais de 300.000 informações e encontrou efeito dessas variáveis na P/IA.

Além disso, outros autores encontraram incremento na P/IA em fêmeas que manifestaram estro após o protocolo de sincronização na P/IA, tanto com sêmen convencional (SÁ FILHO et al., 2010c) quanto com sêmen sexado (SÁ FILHO et al., 2012). Além disso, Sá Filho et al., (2012) não encontraram interação entre o tipo de sêmen (sexado ou não) e a expressão de estro. No presente estudo também se constatou efeito positivo da expressão de estro na P/IA nos Experimentos 3 e 4, sem verificar interação entre o tipo de sêmen e a presença de estro em nenhum dos experimentos. Guner et al., (2022) concluíram que a manifestação do estro após protocolos de sincronização é importante para atingir maior P/IA.

A redução na quantidade de células por dose inseminante também é importante para viabilizar economicamente a utilização de sêmen sexado em

gado de corte. Farrell et al., (2022) não encontraram viabilidade econômica no uso de sêmen sexado para produção de carne, comparando a inseminação artificial com a monta natural em machos Simental na Nova Zelândia. Contudo, o uso de sêmen sexado nas matrizes geneticamente superiores aumenta o nível genético dos rebanhos com bom manejo, além de melhorar a performance econômica do rebanho. Os resultados obtidos no Experimento 3 mostram que é possível reduzir o número de espermatozoides na dose inseminante sem comprometer a P/IA. Murphy et al., (2016) encontraram que a redução na concentração espermática do sêmen fresco (mantido em temperatura ambiente) não impactou a motilidade no primeiro dia após a saída do laboratório, mas houve redução da taxa de não retorno. Xu (2014) encontrou relação de 94% na taxa de não retorno e na taxa de nascimento do sêmen sexado refrigerado com 1 milhão de espermatozoides em relação ao sêmen congelado, demonstrando que existe possibilidade de redução da concentração de espermatozoides na dose inseminante. Yang et al., (2018) avaliaram o resultado de inseminações com sêmen refrigerado com concentração entre 1,25 e 2 milhões de espermatozoides. Os autores compararam o sêmen refrigerado ao sêmen congelado (entre 15 e 20 milhões de espermatozoides na palheta) por 11 anos consecutivos, a maior parte dos mesmos reprodutores, e não encontraram diferença na taxa de não retorno (>38.000 inseminações com sêmen congelado e > 500.000 inseminações com sêmen refrigerado). Adicionalmente, Murphy et al, (2013) encontraram que o período de viabilidade espermática é inversamente relacionado à concentração espermática (entre 4 e 20 milhões de espermatozoides). Os autores relatam que quando armazenado em temperatura ambiente por 5 dias, os dados sugerem que a redução da quantidade de células na palheta pode reduzir o estresse oxidativo e aumentar o período de sobrevivência dos espermatozoides. Esses dados vão de encontro ao resultado obtido no Experimento 4, no qual a P/IA com a concentração de 4M de espermatozoides foi inferior ao sêmen convencional congelando. Entretanto, a P/IA com 2 milhões de espermatozoides na palheta não foi diferente à do grupo convencional congelado. Contudo, esses dados contrastam com os dados do Experimento 2, que obteve taxa de prenhez à IATF semelhante com sexado refrigerado 4M e sêmen convencional congelado, similar ao resultado do experimento 3 que não encontrou diferença entre o sêmen sexado refrigerado

com 2 milhões, 3 milhões ou 4 milhões de espermatozoides na palheta e o convencional congelado com 25 milhões de espermatozoides, quando a inseminação foi realizada 24 horas após a liberação do sêmen no laboratório. Assim, novos estudos são necessários para avaliar se a concentração de 4 milhões de espermatozoides na palheta pode prejudicar a P/IA no sêmen refrigerado. Além disso, foi possível reduzir a quantidade de espermatozoides na palheta sem prejudicar a P/IA, o que pode viabilizar economicamente o uso de sêmen sexado em rebanhos de corte comerciais.

## 6. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo permitem concluir que o processo de sexagem não comprometeu a P/IA, nem os parâmetros laboratoriais em relação ao sêmen convencional, quando a inseminação foi realizada com sêmen refrigerado. Também, os dados demonstram que é possível inseminar com sêmen sexado refrigerado 48 horas após a retirada do dispositivo de progesterona sem reduzir a P/IA, semelhantemente ao momento utilizado rotineiramente com o sêmen congelado convencional. Ainda, os dados são indicativos de que é possível reduzir a quantidade de espermatozoides na palheta para 2 milhões sem prejudicar a P/IA. Por fim, a inseminação com sêmen sexado refrigerado pode ser realizada por até 48 horas após a liberação do sêmen no laboratório sem comprometer a P/IA, confirmando as hipóteses iniciais do presente estudo.

## 7. IMPLICAÇÕES PRÁTICAS DO TRABALHO

O uso de sêmen refrigerado em um país de dimensão continental como o Brasil é bastante complexo. Muitas das adversidades são conhecidas pelos usuários dos programas de IA e de IATF, como por exemplo, a dificuldade logística na entrega do sêmen refrigerado após a liberação no laboratório. Entretanto, atualmente é possível viabilizar a logística de transporte utilizando avião comercial, por se tratar de sêmen refrigerado que não usa nitrogênio líquido como forma de armazenamento. Outras adversidades, porém, são também relatadas, como a organização e o processo de coleta de um reprodutor específico no dia correto para realização da inseminação artificial na fazenda. No caso do sêmen sexado, existe a necessidade de programar com o laboratório de sexagem as datas e os horários de produção das doses para inseminação artificial. A escolha do reprodutor para ser utilizado no programa de IATF também é um processo complexo, pois é necessário que o ejaculado esteja com qualidade para processamento em um dia específico e programado, diferentemente do que se verifica com sêmen o congelado. As centrais de coleta de sêmen para inseminação artificial fazem estoque de sêmen congelado durante o ano e aproveitam cada oportunidade de coleta com qualidade para congelação.

No presente estudo, foram selecionados 3 reprodutores por experimento e foi mantido pelo menos um touro “reserva” para eventuais necessidades devido a possíveis problemas na coleta e na qualidade espermática. Em dois dos experimentos (Experimentos 1 e 3) não foi necessária a utilização do touro reserva. Entretanto, no Experimento 2 foi utilizado o touro reserva devido problemas detectados em um dos touros. No Experimento 4 foi possível utilizar apenas dois touros devido a problemas com a coleta e qualidade espermática de outros 2 reprodutores disponibilizados para o estudo. Contudo, mesmo com as dificuldades relatadas, o sêmen sexado refrigerado apresentou diversas vantagens em relação ao sêmen sexado congelado quando usado na IATF. Foi possível inseminar grandes quantidades de animais dentro do período proposto no estudo que foi de até 48 horas após a saída do sêmen do laboratório de sexagem. Além disso, não foi necessária nenhuma alteração no protocolo de IATF tradicional nas fazendas, mantendo o momento convencional de

inseminação (48 horas após a retirada do dispositivo de P4). Também, os estudos realizados não evidenciaram diferenças na P/IA do sêmen sexado refrigerado em relação ao sêmen convencional congelado, o que demonstra ser possível determinar o sexo da cria sem perder eficiência reprodutiva. Além disso, foi possível reduzir a concentração de sêmen sexado na palheta sem prejudicar a P/IA, o que pode reduzir o custo da sexagem e possibilitar maior adesão dos produtores à tecnologia da IATF com emprego do sêmen sexado. Na estação de monta 22/23 foram realizados dois projetos comerciais que suportam os resultados do presente estudo. Ambos os projetos apresentaram resultados satisfatórios, sendo um deles com 56% de P/IA com sêmen sexado refrigerado.

Por fim, é importante ressaltar que a técnica de inseminação artificial tem como objetivo a disseminação de genética superior associado a elevada eficiência reprodutiva. Portanto, deve-se sempre selecionar touros melhoradores para a aplicação da técnica, evitando a utilização de sêmen refrigerado de reprodutores com genética inferior ou desconhecida. A escolha equivocada do reprodutor em programas de inseminação artificial compromete significativamente o melhoramento genético, podendo prejudicar a produtividade e a lucratividade do rebanho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, R. P. **Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide equino pelo uso de microscopia de epi fluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)**. 121f. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ASBIA. **Índex ASBIA-Importação, exportação e comercialização de sêmen**. 2023.

BARUSELLI, P. S.; CAMPOS FILHO, E. P.; CREPALDI, G. A.; PANAZZOLLO, S. G.; ZANATTA, G. M.; COLLI, M. H. A.; MINGOTI, R. D.; CRUZ, G. C.; CASTRO, M. W. New strategies to improve pregnancy rate at TAI using sex-sorted semen. **Animal Reproduction**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. v. 14, n. 3, p. 711, res. A067, 2017.

BARUSELLI, P. S.; SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S.; AYRES, H.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; ARRUDA, R. P. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 374-381, 2007.

BARUSELLI, P. S. **Com desaceleração de 5% em 2022, mercado da IATF registra primeiro recuo em 20 anos**. Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 7a ed., 2023. Acesso <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>

BORGES, J. C.; SILVA, M. R.; GUIMARÃES, J. D.; ESPER, C. R.; FRANCESCHINI, P. H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, p. 303-314, 2011.

BORGES SILVA, J. C.; SILVA, M. R.; SILVA, R. G.; NOGUEIRA, E.; OLIVEIRA, L. O. F.; ABREU, U. G. P.; NICACIO, A. C.; RODRIGUES, W. B. Uso de sêmen refrigerado bovino: quebrando paradigmas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.43, n.2, p.284-288, abr./jun. 2019.

BORGES SILVA, J. C.; SILVA, M. R.; MARINHO, D. B.; NOGUEIRA, E.; SAMPAIO, D. C.; OLIVEIRA, L. O. F.; ABREU, U. G. P.; MOURA, G. B.; SARTORI FILHO, R. Cooled semen for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 28, p. 1004-1008, 2016.

BUCHER, A.; KASIMANICKAM, R.; HALL, J. B.; DEJARNETTE, J. M.; WHITTIER, W. D.; KAHN, W.; XU, Z. Fixed-time AI pregnancy rate following insemination with frozen-thawed or fresh-extended semen in progesterone supplemented CO-Synch protocol in beef cows. **Theriogenology**, v.71, n.7, p.1180-1185, 2009.

CARVALHO, J. O.; SARTORI, R.; MACHADO, G. M.; MOURÃO, G. B.; DODE, M. A. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. **Theriogenology**. Volume 74, Issue 9, p. 1521-1530, 2010.

CARVALHO, J. O.; SARTORI FILHO, R.; RODELLO, L.; MOURÃO, G. B.; BICUDO, S. D.; DODE, M. A. N. Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity to bind to oviductal cells. **Livestock Science**, v. 207, p. 30-37, 2018.

CARVALHO, J.; SARTORI, R.; DODE, M. Different ways to evaluate bovine sexed sperm *in vitro*. **Anim. Reprod.** 11, p. 199–206, 2014.

CASTANHEIRA, A. M.; QUEIROZ, J. S.; MENDES, C. M.; HAMILTON, T. R. D. S.; ASSUMPCÃO, M. E. O. D. Á. Avaliação do óxido nítrico em espermatozoides bovinos em diferentes padrões de hiperativação: resultados parciais. **Resumos**. 29. *SIICUSP*, 2021.

CREPALDI, G. A.; SALES, J. N. D. S.; GIROTTO, R. W.; CARVALHO, J. G. S.; BARUSELLI, P. S. Effect of induction of ovulation with estradiol benzoate at P4 device removal on ovulation rate and fertility in *Bos indicus* cows submitted to a TAI protocol. **Animal Reproduction Science**, v. 209, p. 106141, 2019.

CRESPILHO, A. M.; PAPA, F. O.; SANTOS, M. P.; SÁ FILHO, M. F. Use of cooled bull semen as strategy to increase the pregnancy rate in fixed time artificial insemination programs-case report. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 7, n. 4, pp.175-179, 2012.

CRESPILHO, A. M.; NICHI, M.; GUASTI, P. N.; FREITAS-DELL`AQUA, C. P.; SÁ FILHO, M. F.; MAZIEIRO, R. R.; FREITAS-DELL`AQUA, J. A.; PAPA, F.O. Sperm fertility 48 h of refrigeration: evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. **Animal Reproduction Science**, v.146, pp.126-133, 2014.

DEJARNETTE, J. M.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records, **Theriogenology**, Volume 71, Issue 1, pp. 49-58, 2009.

DEJARNETTE, J. M.; LEACH, M. A.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E.; CLEARY, C. R.; MORENO, J. F. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers; is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? **Journal of Dairy Science** 94, pp. 3477–3483, 2011.

FARRELL, L. J.; MORRIS, S. T.; KENYON, P. R.; TOZER, P. R. Simulating the profitability of male-sexed semen use in extensively farmed beef cow herds, **Livestock Science**, Volume 266, 105107, ISSN 1871-1413, 2022.

FREITAS, B. G.; MINGOTI, R. D.; MONTEIRO, B. M.; GUERREIRO, B. M.; CREPALDI, G. A.; RAMOS, L.; VASCONCELLOS, G. S.; SÁ-FILHO, M. F.; D'OCCHIO, M. J.; BARUSELLI, P. S. Relationship of body maturation with response to estrus synchronization and fixed-time AI in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Livestock Science**, Volume 251, 104632, ISSN 1871-1413, 2021.

FRIGONI, F. G. **Avaliação das variáveis envolvidas nos resultados da IATF para aumentar a eficiência reprodutiva em rebanhos de corte**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2020.

GARNER, D. L. Hoechst 33342: the dye that enabled differentiation of living X- and Y-chromosome bearing mammalian sperm. **Theriogenology**, 71, pp. 11-21, 2009.

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

GOOVAERTS, I. G.; HOFACK. G. G.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; NICHI, M.; DE KRUIF, A.; BOLS, P. E. Evaluation of epididymal semen quality using the Hamilton-Thorne analyser indicates variation between the two caudae epididymides of the same bull. **Theriogenology**. 15;66(2), pp.323-330, 2006.

GUNER, B.; ERTURK, M.; DURSUN, M.; OZTURK, B.; YILMAZBAS-MECITOGLU, G.; KESKIN, A.; DIKMEN, S.; GUMEN, A. Effect of oestrous expression prior to timed artificial insemination with sexed semen on pregnancy rate in dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**. Zuchthygiene. pp. 342-348. 2023.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, v.1-3, pp. 03-22, 2000.

HOLT, C.; HOLT, W. V.; MOORE, H. D.; REED, H. B.; CURNOCK, R. M. Objectively measured boar sperm motility parameters correlate with the outcomes of on-farm inseminations: results of two fertility trials. **Journal of Andrology**, v. 18, pp. 312-23, 1997.

HÖTZEL, M. J.; LONGO, C.; BALCÃO, L. F.; CARDOSO, C. S.; COSTA, J. H. A survey of management practices that influence performance and welfare of dairy calves reared in southern Brazil. **PLoS One**. Dec 15;9(12):e114995, 2014.

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 of Reproduction** 41, pp. 199–203, 1989.

Leite, RF. **Análise lipídômica, metabólica e dos atributos espermáticos de touros com diferentes taxas de fertilidade e perfis de congelamento de sêmen**. Tese (Doutorado em Reprodução Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2022.

LU, K. H.; SEIDEL JR, G. E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage rates of bovine oocytes inseminated with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, 62, pp.819-830, 2004.

MAICAS, C.; HUTCHINSON, I. A.; KENNEALLY, J.; GRANT, J.; CROMIE, A. R.; LONERGAN, P.; BUTLER, S. T. Fertility of fresh and frozen sex-sorted semen in dairy cows and heifers in seasonal-calving pasture-based herds. **Journal of Dairy Science**, Volume 102, Issue 11, p.10530-10542, 2019.

MARQUEZ, B.; SUAREZ, S. S. Bovine Sperm Hyperactivation Is Promoted by Alkaline-Stimulated Ca<sup>2+</sup> Influx. **Biology of Reproduction**, v. 76, p.660–665, 2007.

MARQUEZ, B.; SUAREZ, S. S. Different Signaling Pathways in Bovine Sperm Regulate Capacitation and Hyperactivation. **Biology of Reproduction**, v. 70, Issue 6, p. 1626–1633, 2004.

MORTIMER, S. T.; MORTIMER, D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. **J. Androl.** 11:195, 1990.

MORTIMER, S. T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v.3, pp.403–439, 1997.

MORTIMER, S. T. Casa- Practical aspects. **J Androl**, p.515-524, 2000.

MURPHY, C.; HOLDEN, S. A.; MURPHY, E. M.; CROMIE, A. R.; LONERGAN, P.; FAIR, S. The impact of storage temperature and sperm number on the fertility of liquid-stored bull semen. **Reproduction, Fertility and Development**, 28, pp. 1349-1359, 2016.

MURPHY, E. M.; O' MEARA, C.; EIVERS, B.; LONERGAN, P.; FAIR, S. Optimizing storage temperature of liquid bovine semen diluted in INRA96, **Journal of Dairy Science**, v. 101, Issue 6, Pages 5549-5558, 2018.

MURPHY, C.; FAHEY, A. C.; SHAFAT, A.; FAIR, S. Reducing sperm concentration is critical to limiting the oxidative stress challenge in liquid bull semen. **Journal of Dairy Science**. 96, pp. 4447–4454, 2013.

NEVES, K. **Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

NORMAN, H. D.; HUTCHISON, J. L.; MILLER, R. H. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. **Journal Dairy Science**. 93 pp.3880–3890, 2010.

PAPA, M. P.; MAZIERO, R. M.; GUASTI, P. N.; JUNQUEIRA, C. R.; FREITAS-DELL`AQUA, C. P.; PAPA, F. O.; VIANA, F. P.; ALVARENGA, M. A.; CRESPILO, A. M.; DELL`AQUA JUNIOR, J. A. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. **Theriogenology**, v. 83, 107-113, 8, 2015.

PENFOLD, L. M.; HOLT, C.; HOLT, W. V.; WELCH, G. R.; CRAN, D. G. JOHNSON, LA. Comparative motility of X and Y chromosome-bearing bovine sperm separated on the basis of DNA content by flow sorting. **Molecular Reproduction and Development**, 50, pp. 323-327, 1998.

POLGE, C.; SMITH, A. V.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, p.164-666, 2000.

RESENDE, O. A.; ALVES, P. A. P. M.; FAJARDO, R. S. L.; ALMEIDA, J.; SILVA, O. R.; MELLO, M. R. B. Eficiência do sêmen refrigerado na IATF de vacas Girolando. In: ANNUAL MEETING OF THE BRAZILIAN EMBRYO TECHNOLOGY SOCIETY, 32., Florianópolis. **Proceedings...** Florianópolis: SBTE, p. 209, 2018.

SÁ FILHO, M. F.; CRESPILO, A. M.; SANTOS, J. E. P.; 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**, Volume 120, Issues 1–4, pp. 23-30, 2010c.

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 sexed semen in dairy heifers detected in estrus **Theriogenology**.74: 1636 – 1642, 2010a.

SÁ FILHO, M. F.; SALES, J. N. S.; GIROTTO, R. W.; PENTEADO, L.; CAMPOS FILHO, E. P.; BARUSELLI, P. S. Otimização do uso de sêmen sexado e redução de manejos em programas de IATF em vacas Nelore lactantes. **Acta Sci Vet**, p. 370, 2010b.

SÁ FILHO, M. F.; GIROTTO, R. W.; ABE, E. K.; PENTEADO, L.; CAMPOS FILHO, E. P.; MORENO, J. F.; SALA, R. V.; NICHI, M. BARUSELLI, P. S. Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. **Journal of Animal Science**, Volume 90, Issue 6, pp. 1816–1823, 2012.

SALES, J. N. S.; NEVES, K. A. L.; SOUZA, A. H.; CREPALDI, G. A.; SALA, R. V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; DE FARIA, M.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, Volume 76, Issue 3, pp. 427-435, 2011.

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

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

SEIDEL JR, G. E. Sexing mammalian sperm where do we go from here? Review. **Journal of Reproduction and Development**. 58, PP. 505–509, 2012.

SEIDEL JR, G. E. Update on sexed semen technology in cattle. **Animal**, v. 8 (Suppl. 1), 160–164, 2014.

SEIDEL, G. E.; DEJARNETTE, J. M. Applications and world-wide use of sexed semen in cattle, **Animal Reproduction Science**, Volume 246, 106841, ISSN 0378-4320, 2022.

SEIDEL JR, G. E.; WHITTIER, J. C. Beef production without mature cows. **J. Anim. Sci.** 93, 4244–4251, 2015.

SEIDEL, 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**, Volume 105, Issues 1–2, pp. 129–138, 2008.

SHARPE, J. C.; EVANS, K. M. Advances in flow cytometry for sperm sexing. **Theriogenology**, 71, 4–10, 2009.

SILVA, M. A. V.; SANTOS, C. S.; FRANÇA, I. G.; PEREIRA, H. G.; SÁ FILHO, M. F.; FREITAS, B. G.; GUERREIRO, B. M.; FAQUIM, A.; BARUSELLI, P. S.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S. Hormonal strategy to reduce suckled beef cow handling for timed artificial insemination with sex-sorted semen. **Theriogenology**, 114:159-164, 2018.

SILVA, J. C. B.; SILVA, M. R.; SILVA, R. G.; MASSONETO, J. F.; LORO, P. S.; ALVES, I. A. C.; NOGUEIRA, E.; NICACIO, A. C.; OLIVEIRA, L. O. F.; ABREU, U. G. P.; MARINHO, D. B. Sêmen refrigerado bovino em protocolos de IATF, o que sabemos até o momento?. **Embrapa Pantanal, Documento 166**. Corumbá, 2020.

SOUSA, D. B. **Variabilidade das sub-populações de espermatozóides avaliadas pela cinética em sistema computadorizado e combinação de sondas fluorescentes como parâmetro qualitativo do sêmen congelado de ovinos.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2007.

SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; TORRES-JR. J. R.; AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. Efeito do eCG e do cipionato de estradiol em protocolos para inseminação artificial em tempo fixo em vacas Holandesas de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**, 34:404, 2006.

SOUZA, A. H.; MUNDIM, L.; BENINE, L. E.; VENTURIN, P.; AYRES, H.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S.; MARTINS, C. M.; BARUSELLI, P. S. Effect of type of semen (sexed vs. non-sexed) and time of ai (54h vs. 60h) on pregnancy rates of nelore cows inseminated in a fixed time. **Acta Scientiae Veterinariae** 35 (Supl. 3) p.s1022, 2007.

SOUZA, A. H.; BESSOFF, H. J.; DANZEISEN, E. Effect of semen type (cooled-fresh vs. frozenthawed) on fertility of lactating dairy cows. **Journal of Animal Science**. Vol. 94, E-Suppl. 5, p.180, 2018.

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

STORNELLI, M. C.; TITTARELLI, C. M.; SAVIGNONE, C. A.; STORNELLI, M. A. Efecto de los procesos de criopreservación sobre la fertilidad seminal. **Analecta Veterinária**, v.25, p.28-35, 2005.

TARRAGÓ, O. F. B. **Sêmen refrigerado bovino reduz os danos espermáticos e aumenta a taxa de prenhez na IATF?** 85f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A.; DEWULF, J.; DE KRUIF, A. Comparison of three diluents for the storage of fresh bovine semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 912-922, 2005.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002.

VISHWANATH, R. SexedULTRA – raising the fertility bar of sexed sorted semen. In **Proceedings of the 25th Technical Conference on Artificial Insemination and Reproduction**, National Association of Artificial Breeders, September 2014, Wisconsin, USA, pp. 57–61.

VISHWANATH, R.; MORENO, J. F. Review: Semen sexing—Current state of the art with emphasis on bovine species. **Animal**, 12(Suppl. 1), pp. s85–s96, 2018.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. **Animal reproduction science**, v. 62, n. 1-3, p. 23-53, 2000.

WIEBKE, M.; PIEPER, L.; GÜRLER, H.; JANOWITZ, U.; JUNG, M.; SCHULZE, M. Effect of using liquid semen on fertility in German Holstein Friesian dairy cattle: A randomized controlled clinical trial. **Theriogenology**, 199 pp. 50-56, 2023.

XU, Z. Z. Application of liquid semen technology improves conception rate of sex-sorted semen in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Vol. 97 No. 11, pp. 7298–7304, 2014.

YANG, D. H.; STANDLEY, N. T.; XU, Z. Z. Application of liquid semen technology under the seasonal dairy production system in New Zealand. **Animal Reproduction Science**, Volume 194, pp. 2-10, ISSN 0378-4320, 2018.

Zanatta, G.M. **Produção embrionária utilizando touros de alta e baixa fertilidade**. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2019.