

**PEDRO LEOPOLDO JERÔNIMO MONTEIRO JUNIOR**

**MOMENTO IDEAL DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM  
TEMPO FIXO COM SÊMEN SEXADO NA PRODUÇÃO  
*in vivo* DE EMBRIÕES BOVINOS**

**RECIFE**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**PEDRO LEOPOLDO JERÔNIMO MONTEIRO JUNIOR**

**MOMENTO IDEAL DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM  
TEMPO FIXO COM SÊMEN SEXADO NA PRODUÇÃO  
*in vivo* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciência Veterinária.

Orientadora:  
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Madalena Pessoa Guerra

**RECIFE  
2011**

Ficha Catalográfica

M772a Monteiro Junior, Pedro Leopoldo Jerônimo  
Momento Ideal da Inseminação Artificial em Tempo Fixo com Sêmen Sexado  
na Produção *in vivo* de Embriões Bovinos/ Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro  
Junior.  
-- 2010.  
51f. : il.

Orientadora: Maria Madalena Pessoa Guerra.  
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) –  
Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento  
de Medicina Veterinária, Recife, 2010.  
Referências.

1. Pardo suíço 2. Sêmen 3. Sexagem  
4. Superovulação I. Guerra, Maria Madalena Pessoa,  
Orientadora II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

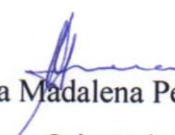
**MOMENTO IDEAL DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM  
TEMPO FIXO COM SÊMEN SEXADO NA PRODUÇÃO  
*in vivo* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Dissertação de Mestrado elaborada e defendida por

**PEDRO LEOPOLDO JERÔNIMO MONTEIRO JUNIOR**

Aprovada em 18 de Fevereiro de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Madalena Pessoa Guerra/UFRPE  
Orientadora

  
Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu/UFRPE

  
Prof. Dr. Gustavo Férrer Carneiro/UFRPE

  
Dra. Sildivane Valcácia Silva

## **DEDICATÓRIA**

**Ao meu Avô, Leopoldo Jerônimo Monteiro (in memorian), minha inspiração,**

**que há mais de 12 anos não está entre nós, mas tenho certeza**

**que no lugar em que ele estiver estará me assistindo e**

**me apoiando... em cada passo.**

**Aos meus Pais, Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro e Lúcia Angélica Corrêa**

**de Figueirêdo Monteiro, a quem devo apenas uma simples coisa: a Minha Vida**

**Eu Dedico**

## AGRADECIMENTOS

Dependendo do que a banca disser, pode ser o fim de uma jornada, o término de um passo, o alcance de mais um objetivo, ou mesmo da realização de um projeto de vida. Sensações essas que me deixam bastante satisfeito, mas tenho certeza que isso não é uma conquista minha, e sim de um grupo com quem compartilho, porque sei que, se essas pessoas não fizessem parte da minha vida, nada disso estaria acontecendo. Desta forma eu agradeço:

A Deus, por ter me dado capacidade física e mental para cumprir essas etapas que venho cumprindo ao longo dos anos. Lembrando que há um ano atrás, enquanto a ciência não fundamentava mais um bom prognóstico para um problema de saúde que meu Pai teve, a força divina atuou;

À UFRPE, que, além da Graduação e da Residência, está me dando também a oportunidade de me tornar um Mestre em Ciência Veterinária;

À FACEPE, por ter concedido bolsa de estudo durante estes dois anos de muito estudo e muito aprendizado. Pois sem ela as dificuldades teriam aumentado ainda mais;

Ao Sr. José Maria Andrade, o qual não tenho palavras para agradecer. Pois abriu as portas das Fazendas Cachoeirinha e Bela Vista, não cedendo apenas os animais, mas também recursos financeiros para realização deste estudo. Sabendo que era uma pesquisa e que poderia dar tudo errado. Devido à sua ocupação, durante este tempo foram poucas conversas, mas muito aprendizado;

À Profa. Dr<sup>a</sup>. Maria Madalena Pessoa Guerra, que mais uma vez acreditou no meu potencial e aceitou me orientar, me ensinar, confiando na capacidade dos “Androlabianos” para realização deste trabalho;

Ao Dr. Gustavo Ferrer Carneiro, foram muitas conversas e aprendizados. Soube tranquilizar nos momentos de “desespero”. Deu apoio na escolha do tema e viabilizou o treinamento prático de MOET;

Em especial ao Claudiney, mas também à Priscila, ao Denis, à Dona Reni e ao Sr. Daniel, essas pessoas através da indicação da Dr<sup>a</sup>. Isabel abriram as portas para mim. Não somente a porta do conhecimento técnico de MOET, e sim a da casa para me receber e me dar hospedagem durante aproximadamente 20 dias. Mineiros incríveis que aprendi a admirar;

A Dr<sup>a</sup>. Isabel Souza, que através de Dr. Gustavo sempre esteve à disposição. Seja para viabilizar o treinamento, para compra de material, ou na hora de consultar assuntos inerentes ao trabalho;

Ao Dr. Paulo Jorge Valença (Médico Veterinário), Seu Hélio, Dona Teresinha, Cabeção e Claudio, que fizeram papel de atores coadjuvantes, mas, sem eles eu não estaria defendendo esta dissertação;

Ao Prof. Airon Melo, pela formulação da razão dos animais;

Aos meus Pais, Pedro Leopoldo Jerônimo Monteiro e Lúcia Angélica Corrêa de Figueirêdo Monteiro, por sempre ter me dado apoio em qualquer decisão que tomasse, seja ela relacionada à vida profissional ou não. Algumas bastante decisivas. Digamos que tive a sorte de ser filho deles;

À minha Avó, que bem quietinha no canto dela ficava sempre a lamentar minhas idas e vindas ao longo desta jornada;

Aos meus irmãos, Leopoldo Jerônimo Monteiro Neto e Carolina Corrêa de Figueirêdo Monteiro, que apesar das desavenças de irmãos sempre estivemos e estaremos juntos, para o que der e vier;

A Edna Michelly, essa segue a minha trajetória há bastante tempo, desde da graduação. Digamos que, ao longo dos anos, deixou de ser apenas uma amiga e passou a ser uma irmã;

A André Mariano Batista, companheiro e amigo que participou de todos os processos, desde a preparação do projeto até a participação na redação da dissertação. Esse cidadão tem um futuro brilhante como pesquisador. Tenho certeza que ainda vou assistir muitas palestras dele;

A Fernanda Lavínia, chegou no final do processo como quem não queria nada, mas parece que veio para ficar. Mesmo assim acabou participando diretamente, pois sem nem hesitar deixou de dançar São João para acordar cedo e se sujar em um curral no inverno de Garanhuns. Espero que seja eterno;

A todos os indivíduos que fazem ou fizeram parte do Androlab, alguns contribuindo mais outros menos, Felipe “Gordo”, Sildivane, Adriana Trindade, Ellen, Vitor, Lawrence, Álvaro, Lucinha, Clarissa, Felipe “Monstro”, Patrícia, Lorena, Dani, Zoraide, Profa. Érica, Prof<sup>a</sup>. Shirley, Diogo, Lígia, Kaline;

Ao Dr. José Augusto Bastos Afonso, à Dr<sup>a</sup>. Carla Lopes de Mendonça e ao Dr. Nivaldo Azevedo Costa, pois sempre costumo falar que não existe “ex-orientador”, sendo assim, com muito orgulho posso dizer que sou e sempre serei orientado deles;

À CBG, que apesar de ter terminado a residência, os amigos que lá fiz indiretamente ou diretamente acabaram por me ajudar;

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da UFRPE, que contribuíram para aquisição deste título;

Aos Amigos, Emmanuel, Samantha, Thiago, Carla, Fabrício, Bárbara, Riquinho, Paulinho, Felipe, Bilau, Alonso, Rafael CBG, Fábio CBG, Eduardo Guaraná, Flávia, Júlio, Marco “Franja” e Dr. Osvaldo, que não participaram diretamente, mas nos momentos de relaxamento para aquisição de combustível e assim seguir a caminhada, foram indispensáveis;

À Renata Alapenha e Erico. Dois cunhados que tenho com muito carinho e torço para que tudo de certo com meus irmão;

Ao Prof. Leúcio, que não teve participação direta no trabalho, mas na hora de conversas informais e formais sempre esteve a ajudar. Inclusive no apoio e na torcida nas horas das decisões. Foram algumas tranquilas tardes de conversas na Parasitárias;

Aos Tios Edmar, Paulo, Hélio e Helinho e as Tias Ana, Ignês, Jane, Sidoni, Nana e Leila amigos da família e sei que na hora que qualquer um necessitar sempre estarão prontos para ajudar;

Aos (as) primos (as) Hermano, Miloca, Elise, Lisa, Carol, Sara, Paula e Estela, que participaram sempre, se interessando pelos projetos em execução e os a serem executados;

Dona Ivanise, Seu Antônio, Flávia e Zé, pois acabaram entrando na minha vida, através de Fernanda, também no meio da jornada, mas que são pessoas a quem tenho muito respeito, carinho e admiração;

Aos funcionários da UFRPE, Alcir, Joana, Dona Sônia e Guiomar, que sempre estiveram por ali nos ajudando e brincando;

Ao Pessoal da Emepa-PB, Paula Lemos, Dr. Ricardo, Seu Zé Nilson, João, Alex, Gugu, Salvino, Gilvan, Sueli, Seu Cícero, JPS, Bá, Seu Barto. Ao longo da trajetória estas pessoas apareceram em meu caminho e tive o prazer de conhecê-los e conviver um pouco;

A Seu Luiz e Dona Maria, plantar tomate, montar irrigação e comer uma galinha de capoeira com cuscuz foram atividades que realizamos sempre em conjunto. Sempre e eternamente na Fazenda Água Branca. Os anos passarão, mas por mim essas duas pessoas são imortalizadas naquele lugar;

Ao meu “Bebê Dara” (in memoriam), que muitas vezes me fez repensar o sentimento e a comunicação animal;

Aos animais, que ao longo desta jornada, utilizei-os em prol da ciência, mesmo sem saber se eles gostariam.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

A – Adenina

BE – Benzoato de Estradiol

D – Dias

DNA – Ácido Desoxiribonucleico

DPBS – Solução Salina Tamponada Fosfatada

eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina

EUA – Estados Unidos da América

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

FSH-p – Hormônio Folículo Estimulante de Extrato de Pituitária de Suíno

h – Horas

IA – Inseminação Artificial

IAs – Inseminações Artificiais

IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo

IETS – Sociedade Internacional de Tecnologias de Embrião

Km – Quilômetro

mg – Miligrama

MOET – Transferência de Embrião por Multipla Ovulação

P<sub>4</sub> – Progesterona

PIV – Produção *in vitro* de Embriões

PGF<sub>2α</sub> – Prostaglandina F<sub>2α</sub>

SOV – Superovulação

Sptz – Espermatozóides

T – Timina

TTR – Teste de Termo Resistência

°C – Graus Celsius

% - Percentual

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO CIENTÍFICO

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> – Desenho esquemático do protocolo de sincronização de estro e superovulação em vacas <i>Bos taurus</i> doadoras de embrião inseminadas em dois momentos de acordo com o grupo experimental.....	50

## LISTA DE GRÁFICOS

	<b>Página</b>
<b>Gráfico 1</b> – Distribuição das ovulações de vacas <i>Bos indicus</i> , da raça Nelore submetidas a tratamentos superovulatórios com retirada de dispositivo de P <sub>4</sub> 24 h e aplicação de LH 48 ou 60h após a primeira aplicação de PGF <sub>2α</sub> . Fonte: Martins (2007).....	19
<b>Gráfico 2</b> – Distribuição das ovulações de vacas <i>Bos taurus</i> da raça Holandesa submetidas a tratamentos superovulatórios com retirada de dispositivo de P <sub>4</sub> 24 e 36 h, e aplicação de LH 48 ou 60 h após a primeira aplicação de PGF <sub>2α</sub> . Fonte: Martins (2007).....	21
<b>Gráfico 3</b> – Diferença de conteúdo de DNA, em valores percentuais, entre espermatozoides portadores de cromossomos X e Y de diversas espécies domésticas e silvestres. Adaptado de Garner (2006).....	23
<b>Gráfico 4</b> – Diferença média percentual entre população de espermatozoides bovinos, obtidos de quatro reprodutores <i>Bos taurus</i> (Holandês, Jersey, Angus e Hereford) e um reprodutor <i>Bos indicus</i> (Brahman), portadores de cromossomos X e Y, determinado por citometria de fluxo. Adaptado de Garner (1983).....	24

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> – Número de ovulações, tempo médio e variação entre a primeira e a última ovulação (horas), de doadoras Red Angus e Red Brangus superovuladas com implante de P <sub>4</sub> retirado no D6,5 ou no D7, com ou sem a aplicação de GnRH. Fonte: Adaptação de Chesta et al. (2005).....	20
<b>Tabela 2</b> – Diferenças percentuais individual entre população de espermatozoides bovinos, obtidos de quatro reprodutores <i>Bos taurus</i> (Holandês, Jersey, Angus e Hereford) e um reprodutor <i>Bos indicus</i> (Brahman), portadores de cromossomos X e Y, determinado por citometria de fluxo. Adaptado de Garner (1983).....	23

## ARTIGO CIENTÍFICO

<b>Tabela 1</b> – Produção de embriões de vacas <i>Bos taurus</i> superovuladas e inseminadas com sêmen convencional (12 e 24 h após LH; G1) ou sêmen sexado (12 e 24 h após LH; G2) (24 e 48 h após LH; G3).....	51
---	----

## RESUMO

O desenvolvimento da biotecnologia da reprodução vem contribuindo decisivamente para o aumento da produção e da produtividade na pecuária bovina, ao possibilitar a exploração mais efetiva de animais de valor genético superior. A transferência de embrião por múltipla ovulação (MOET) possibilita a produção de mais de uma cria por fêmea por ano. Com a introdução do sêmen sexado em escala comercial, a MOET foi impulsionada, levando em consideração os fatores limitantes da fertilização *in vitro*, relacionados à criopreservação de embriões. Apesar dos consideráveis avanços no processo de sexagem espermática, a taxa de fertilidade obtida com uso deste tipo de sêmen ainda é menor do que aquela obtida com uso do sêmen convencional. Objetivou-se estudar o efeito do tipo de sêmen (convencional ou sexado) e do momento de inseminação artificial (IA) na taxa de fertilização de vacas *Bos taurus* superovuladas. Em dia aleatório do ciclo estral, correspondendo ao D0, as vacas (n=9) receberam um implante intravaginal de Progesterona (P<sub>4</sub>), associado a 3 mg de Benzoato de estradiol. No D4 teve início a estimulação folicular com 200 mg FSH-p, administrado em doses decrescentes, durante quatro dias, com duas aplicações diárias, a intervalo de 12 h. Juntamente com a 5<sup>a</sup> e a 6<sup>a</sup> dose de FSH foram administradas 0,150 mg d-Cloprostenol. O implante de P<sub>4</sub> foi retirado no D7,5 e no D8,5 foram administrados 25 mg de LH. As inseminações foram realizadas de acordo com o tipo de sêmen (convencional ou sexado) e o momento das IAs: G1= sêmen convencional e IAs 12 e 24 h após a administração de LH (grupo controle); G2= sêmen sexado e IAs 12 e 24 h após a administração do LH; G3= sêmen sexado e IAs 24 e 36 h após a administração do LH. Cada fêmea foi submetida a três tratamentos superovulatório (*cross-over*). No D15 os embriões foram coletados, pelo método não-cirúrgico, avaliados e classificados. O percentual de estruturas fertilizadas para os grupos G1, G2 e G3, foram de 60,87% (42/69), 10,00% (9/90) e 36,54% (19/52), respectivamente, sendo o G1 superior (p<0,05) aos G2 e G3, enquanto o G3 foi superior (p<0,05) ao G2. Desta forma, conclui-se que a inseminação artificial com sêmen sexado em vacas *Bos taurus* superovuladas pode ser procedida 24 e 36 h após a administração do LH. Todavia, mais estudos devem ser realizados visando obter taxa de fertilização semelhante àquela obtida com sêmen convencional.

**Palavras-chave:** pardo suíço, sêmen, sexagem, superovulação.

## ABSTRACT

The development of reproductive biotechnology has contributed to increase production and productivity of bovine livestock, enabling a more effective increase of production of genetically superior animal. Multiple Ovulation Embryo Transfer (MOET) enables the production of more than one calf per female per year. With the introduction of sexed semen in commercial scale, MOET increased its use, due to limiting factors of *in vitro fertilization*, associated with embryo cryopreservation. Despite considerable advances in the sexing process, fertility rate obtained using this type of semen is still less than that with use of conventional unsorted semen. The aim of this research was to study the effect of semen (unsorted or sorted) and Artificial Insemination (AI) time in the fertilization rate of superovulated *Bos taurus* cattle. Donors (n=9) were treated with intravaginal progesterone releasing device plus 3 mg estradiol benzoate at random stage of estrous cycle (Day 0). Superstimulation treatments began on Day 4, with 200 mg FSH-p, administered in decreasing doses, during four days with two applications daily, at 12 h interval. Along with the fifth and sixth FSH dose were administered 0,150 mg d-Cloprostenol. The intravaginal device was removed on the D7,5 and on D8,5 25 mg of LH were administered. The AI's were performed according to the type of semen (unsorted or X-sorted) and AI time: G1= unsorted semen and AI 12 and 24 h after received LH (Control Group); G2= X-sorted semen and AI 12 and 24 h after received LH; G3= X-sorted semen and AI 24 and 36 h after received LH. Each cow was submitted to three superovulatory treatments (cross-over experimental design). On D15 embryos were recovered by nonsurgical method, evaluated and classified. The percentage of fertilized ova to G1, G2 and G3 groups were 60.87% (42/69), 10.00% (9/90) and 36.54% (19/52), respectively, being G1 group superior ( $p<0,05$ ) than G2 and G3 groups, while G3 was superior than G2 ( $p<0,05$ ). It can be concluded that AI with sexed semen in superovulated *Bos taurus* cows can be administered 24 and 36 h after LH injection. However, further studies should be conducted to achieve fertilization rate similar to that obtained with unsorted semen.

**Keyword:** brown swiss, semen, sexing, superovulation.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
DEDICATÓRIA	
AGRADECIMENTOS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE GRÁFICOS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Transferência de Embrião por Múltipla Ovulação (MOET).....</b>	<b>16</b>
2.1.1 Número de Inseminações Artificiais (IAs) por doadoras.....	17
2.1.2 Utilização de indutores de ovulação.....	18
<b>2.2 Sêmen Sexado.....</b>	<b>22</b>
2.2.1 Diferenças entre espermatozoides.....	22
2.2.2 Métodos de sexagem.....	22
2.2.3 Citometria de fluxo.....	25
2.2.4 Utilização do sêmen sexado.....	26
<b>3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>30</b>
<b>4 ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>36</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da biotecnologia da reprodução vem contribuindo decisivamente para o aumento da produção e, principalmente, da produtividade na pecuária bovina, ao possibilitar a exploração mais efetiva de animais de valor genético superior, bem como preservar espécies ou raças em risco de extinção (VIANA, 2006). Assim, visando alcançar estes objetivos, os pesquisadores no decorrer do século passado desenvolveram técnicas relacionadas à reprodução animal, como a Inseminação Artificial (IA), Transferência de Embrião por Múltipla Ovulação (MOET) e Produção *in vitro* de Embriões (PIV). Entretanto, os protocolos e métodos utilizados ainda requerem aperfeiçoamentos (ADAMS, 1999).

Seguindo a evolução da aplicação das principais biotecnologias, é importante ressaltar inicialmente o papel da IA, sendo a primeira biotécnica adotada nos sistemas de produção animal brasileiro, visando à disseminação do germoplasma de touros de alto valor genético (RENESTO, 2004). No entanto, com o melhor entendimento do ciclo estral da fêmea bovina surgiu o desenvolvimento da MOET e da Fertilização *in vitro* (FIV), possibilitando, nos bovinos, a produção de mais de uma cria por fêmea por ano. Desta forma, a primeira biotécnica desenvolvida para isso foi a MOET e, posteriormente, a PIV.

A MOET, uma biotécnica mundialmente difundida apresenta um crescimento acentuado com mais de 500.000 embriões colhidos e transferidos ou congelados anualmente (THIBIER, 2000), sendo um importante instrumento para o melhoramento zootécnico, por acelerar e conferir maior precisão ao processo de seleção animal (REICHENBACH et al., 2002; PRADO et al., 2007). Noventa por cento das transferências de embriões com finalidade comercial em todo mundo são realizadas em bovinos tornando-se mais desenvolvida para esta espécie (CARDELLINO e OSÓRIO, 1999).

A MOET foi impulsionada, com a introdução do sêmen sexado em escala comercial, levando em consideração os fatores limitantes da FIV, relacionada à criopreservação de embriões (VIANA e CAMARGO, 2007).

O domínio da seleção do sexo através do germoplasma masculino constitui o grande desafio das pesquisas com processamento de sêmen dos próximos anos. A sexagem permite, sem dúvida, maior ganho genético, eficiência de produção e flexibilidade no manejo do rebanho, bem como a preservação de fêmeas ou machos, dependendo da demanda do mercado, resultando em maior ganho econômico (RUMPF et al., 2000).

Tendo em vista a importância da escolha do sexo dos animais na cadeia produtiva e o impacto da IA e da MOET no melhoramento genético, muitos pesquisadores têm procurado



estabelecer um protocolo que otimize o uso do sêmen sexado na IA e na MOET (BARUSSELI et al., 2007; BASTOS et al., 2007; MARTINS et al., 2007; MEIRELLES et al., 2007), uma vez que resultados obtidos com este tipo de sêmen, tanto na IA convencional quanto na Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) e na MOET, são bastante variados (BARUSSELI et al., 2007; BASTOS et al., 2007; MEIRELLES et al., 2007).

Diversos protocolos utilizando sêmen sexado têm testado variações no intervalo de tempo entre a IA e a ovulação (BARUSSELI et al., 2007), no local de deposição do sêmen e no número de doses utilizadas (BARUSSELI et al., 2007; MARTINS et al., 2007). A concentração da dose de sêmen utilizada é de, aproximadamente,  $2,0 \times 10^6$  espermatozoides/palheta, relacionada, por alguns autores, como causa da menor taxa de fertilização, quando se compara aos resultados com sêmen convencional, que utiliza a dose inseminante com, aproximadamente,  $10,0 \times 10^6$  espermatozoides (BARUSSELI et al., 2007).

Diante do exposto, objetivou-se com esta dissertação avaliar a taxa de fertilização de vacas *Bos taurus* superovuladas, inseminadas em diferentes tempos fixos com sêmen sexado.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Transferência de embrião por múltipla ovulação

Além da IA, a MOET é uma das biotécnicas da reprodução mais importantes para acelerar o melhoramento genético do gado zebuino (BARROS e NOGUEIRA, 2004), onde fêmeas de qualidade genética superior são superovuladas com hormônios gonadotróficos e seus oócitos são fecundados *in vivo*. Os embriões são colhidos das doadoras e transferidos para receptoras, fêmeas com potencial genético inferior (JAINUDEEN et al., 2004).

Injeções de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) ou de Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG) são amplamente utilizadas em programas de MOET, visando aumentar a produção de embriões de animais de melhor qualidade genética. Aplicações subcutâneas ou intramusculares de FSH estimulam o crescimento de folículos adicionais, os quais ovulam espontaneamente, sem a necessidade do Hormônio Luteinizante (LH) ou da Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) exógenos, em vacas, búfalas, ovelhas e cabras (JAINUDEEN et al., 2004).

Infelizmente, a variabilidade de resposta das fêmeas doadoras de embriões ao tratamento superovulatório com gonadotrofinas sempre foi um dos maiores problemas nos programas comerciais de MOET (ADAMS et al., 1993; ARMSTRONG, 1993). A alta variabilidade das respostas aos tratamentos gonadotróficos motivou a realização de estudos com a finalidade de formular protocolos com capacidade de estabilizar e racionalizar os programas de superovulação (SOV) (ANDRADE et al., 1999) alcançando, atualmente resultados mais repetitivos (MARTINS, 2007).

Nos últimos anos, com o recurso da ultrassonografia, uma melhor compreensão da função ovariana foi adquirida, aumentando, assim, a possibilidade de se controlar a emergência das ondas de crescimento folicular (BÓ et al., 2006). O início do tratamento superovulatório deve ser realizado no início de uma onda de emergência folicular, antes da seleção do folículo dominante, visando se obter o maior número de ovulações possível (BÓ, 2002).

Para tentar obter melhores resultados com a produção *in vivo* de embriões, diversos protocolos vêm sendo testados, visando avaliar: diferentes concentrações de FSH (BARATI et al., 2006; PRADO et al., 2007); indutores de ovulação com Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), com a finalidade de evitar a observação de estro (D'ÓCCHIO et al.,

1996; BARUSSELI et al., 2006); número de IA (BARROS e NOGUEIRA, 2001; BARUSSELI et al., 2006; MARTINS, 2007; LARSON et al., 2010); momento de realização da IA (DALTON et al., 2000); e imunização contra inibina (LI et al., 2009) e LH, com indução de ovulação através de LH ou hCG exógeno (BARROS e NOGUEIRA, 2001).

### 2.1.1 Número de Inseminações Artificiais (IAs) por doadoras

Em doadoras de embriões, *Bos taurus* ou *Bos indicus*, convencionalmente são realizadas duas IAs com intervalo de 12 h entre elas (D'ÓCCHIO et al., 1996; SARTORI et al., 2004; BARUSELLI et al., 2006; MARTINS, 2007). No entanto, na tentativa de diminuição de custo e trabalho, assim com alcançar taxas desejáveis com o uso de sêmen sexado, pesquisas vêm sendo realizadas. Nogueira et al. (2007) realizaram estudo com indução de ovulação (LH) e duas (12 e 24 h após o LH) ou três (12, 24 e 36 h após o LH) inseminações em vacas Nelore superovuladas, onde não encontraram diferença ( $p>0,05$ ) entre os tratamentos.

Realizando estudo com uma única IA, em fêmeas superovuladas, a 0, 12 e 24 h após o início do cio, Dalton et al. (2000) obtiveram taxa de fertilização de 29%, 60% e 81%, respectivamente, com diferença significativa ( $p<0,01$ ) entre os grupos. Trabalhando com fêmeas *Bos indicus*, Martins (2007) utilizou protocolo com indutor de ovulação com uma (16 h após aplicação de LH) e duas inseminações (12 e 24 h após a aplicação do LH; grupo controle), sem evidenciar diferença entre os grupos, ressaltando a viabilidade do uso de uma única IA.

Pesquisando a utilização de sêmen sexado em vacas superovuladas, Sartori et al. (2004) tentaram realizar apenas uma IA com sêmen sexado em maior concentração do que o disponível no mercado atualmente. Todavia, estes autores não conseguiram melhorar os índices de fertilidade, uma vez que o resultado com sêmen convencional foi superior àquele obtido com sêmen sexado. Enquanto, Larson et al. (2010) aumentaram o número de IA para tentar viabilizar a utilização de sêmen sexado em animais da raça Angus, realizando quatro IAs. Todavia, também não conseguiram obter resultado semelhante ao uso do sêmen convencional.

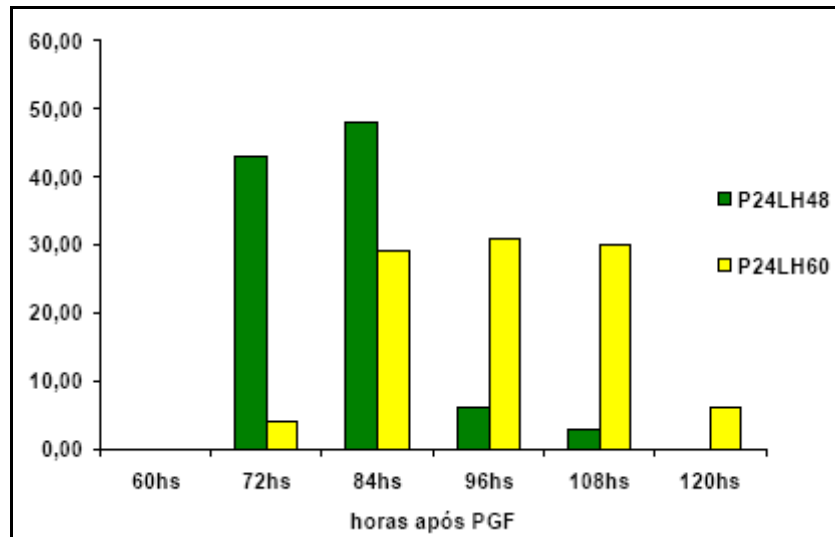
### 2.1.2 Utilização de indutores de ovulação

Estudando três diferentes momentos de aplicação de LH em novilhas da raça Brahman superovuladas, D'Ócchio et al. (1996) utilizaram protocolo com dispositivos de Progesterona ( $P_4$ ) e implante de Deslorelina (D -7), e a SOV foi iniciada oito dias depois, com duas aplicações diárias durante quatro dias. O implante de  $P_4$  foi removido no 3º dia da SOV, juntamente com a segunda dose de FSH. As fêmeas foram divididas em quatro grupos: 1) sem indução de ovulação, com IAs realizadas 12 e 24 h após o início do estro (Controle); 2) com aplicação de LH 12 h após a última aplicação de FSH; 3) com aplicação de LH 24 h após a última aplicação de FSH; e 4) com aplicação de LH 36 h após a última aplicação de FSH. Nos grupos em que as ovulações foram induzidas, as IAs foram realizadas 12 e 24 h após a aplicação de LH. No número de estruturas totais e embriões transferíveis, tanto para o grupo em que o LH foi administrado 24 h após a última aplicação de FSH quanto para o grupo controle apresentaram os melhores resultados. No entanto, não se constatou diferença significativa entre eles, apesar do resultado ter sido numericamente maior ao encontrado nos grupos em que foram administrados LH 12 e 36 h após a última aplicação de FSH.

Já Barros e Nogueira (2001), utilizando LH para induzir a ovulação em fêmeas *Bos indicus* superovuladas e submetidas a IATF, também não evidenciaram aumento no número de estruturas viáveis, mas mostraram que pode realizar protocolo de SOV excluindo a observação de estro.

Martins (2007) utilizou protocolo com associação de implante de  $P_4$  e Benzoato de Estradiol (BE) (D0), iniciando a SOV quatro dias depois (D4), e a retirada do dispositivo de  $P_4$  realizada juntamente com a primeira aplicação do último dia de FSH (D7; manhã). Duas doses de Prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) foram administradas juntamente com as duas aplicações de FSH do D6. Neste estudo, foram testados dois momentos de aplicação de LH (48 e 60 h) após a primeira aplicação de  $PGF_{2\alpha}$  (D6), em vacas *Bos indicus* da raça Nelore, onde se observou maior número de embriões transferíveis ( $6,2 \pm 1,0 \times 3,1 \pm 0,5$ ) no grupo de fêmeas em que o LH foi administrado 48 h após a primeira aplicação da  $PGF_{2\alpha}$ . Ultrassonografias foram realizadas a cada 12 h (Gráfico 1), a partir da aplicação do LH, assim como foi constatada diminuição no intervalo entre a primeira e a última ovulação ( $15,0 \pm 2,1$  e  $21,0 \pm 1,7$  h), para as aplicações de LH 48 e 60 h após a primeira aplicação de  $PGF_{2\alpha}$ , respectivamente. Neste estudo, o autor observou, ao utilizar o protocolo com aplicação de LH 48 h após a aplicação da  $PGF_{2\alpha}$ , maior número de ovulações entre 72 e 84 h após a aplicação do  $PGF_{2\alpha}$ .

Ao realizarem estudos com protocolos de indução de ovulação em doadoras Nelore (*Bos indicus*) superovuladas, Nogueira et al. (2007) observaram que 75% das ovulações ocorreram entre 24 e 36 h após a administração de LH.



**Gráfico 1** – Distribuição das ovulações de vacas *Bos indicus*, da raça Nelore submetidas a tratamentos superovulatórios com retirada de dispositivo de P<sub>4</sub> 24 h e aplicação de LH 48 ou 60h após a primeira aplicação de PGF<sub>2α</sub>. Fonte: Martins (2007).

Realizando protocolos de SOV em vacas e novilhas das raças Red Angus e Red Brangus, Chesta et al. (2005) testaram dois diferentes momentos de retirada do dispositivo de P<sub>4</sub>, além de aplicação ou não de GnRH, sendo o dispositivo retirado 12 ou 24 h e o GnRH administrado 48 h após a primeira aplicação de PGF<sub>2α</sub>. Quanto à retirada do dispositivo, não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ). No entanto, o protocolo que utilizou GnRH apresentou diferença no tempo de ocorrência da primeira e da última ovulação. Os grupos com retirada do dispositivo de P<sub>4</sub> 12 e 24 h após a PGF<sub>2α</sub> com uso de GnRH apresentaram 53,0 h e 7,6 h, e aquele que não utilizou GnRH de 50,2 h e 53,8 h, respectivamente, considerando o intervalo entre a primeira e a última ovulação (Tabela 1).

Martins et al. (2005) realizaram estudos com 16 fêmeas doadoras de embriões da raça Holandesa, em delineamento “cross-over”, com aplicação de LH em dois momentos distintos (48 e 60 h após a aplicação da PGF<sub>2α</sub>). Os animais foram submetidos ao seguinte protocolo: dispositivo de P<sub>4</sub> e BE no primeiro dia (D0), no quarto dia (D4) foi iniciada a SOV, a qual foi realizada durante quatro dias. A aplicação da PGF<sub>2α</sub> foi realizada juntamente com as duas administrações de FSH do penúltimo dia (D6) e a retirada do dispositivo foi realizada junto

com a penúltima ou com a última aplicação de FSH (D7), de acordo com o grupo experimental. Os autores não observaram diferença entre os grupos quanto à retirada de dispositivo, mas com relação ao momento de aplicação do LH, o grupo que foi aplicado 60 h após a  $\text{PGF}_{2\alpha}$  foi superior ao de 48 h após, quando se levou em consideração o número de embriões grau I, transferíveis e congeláveis.

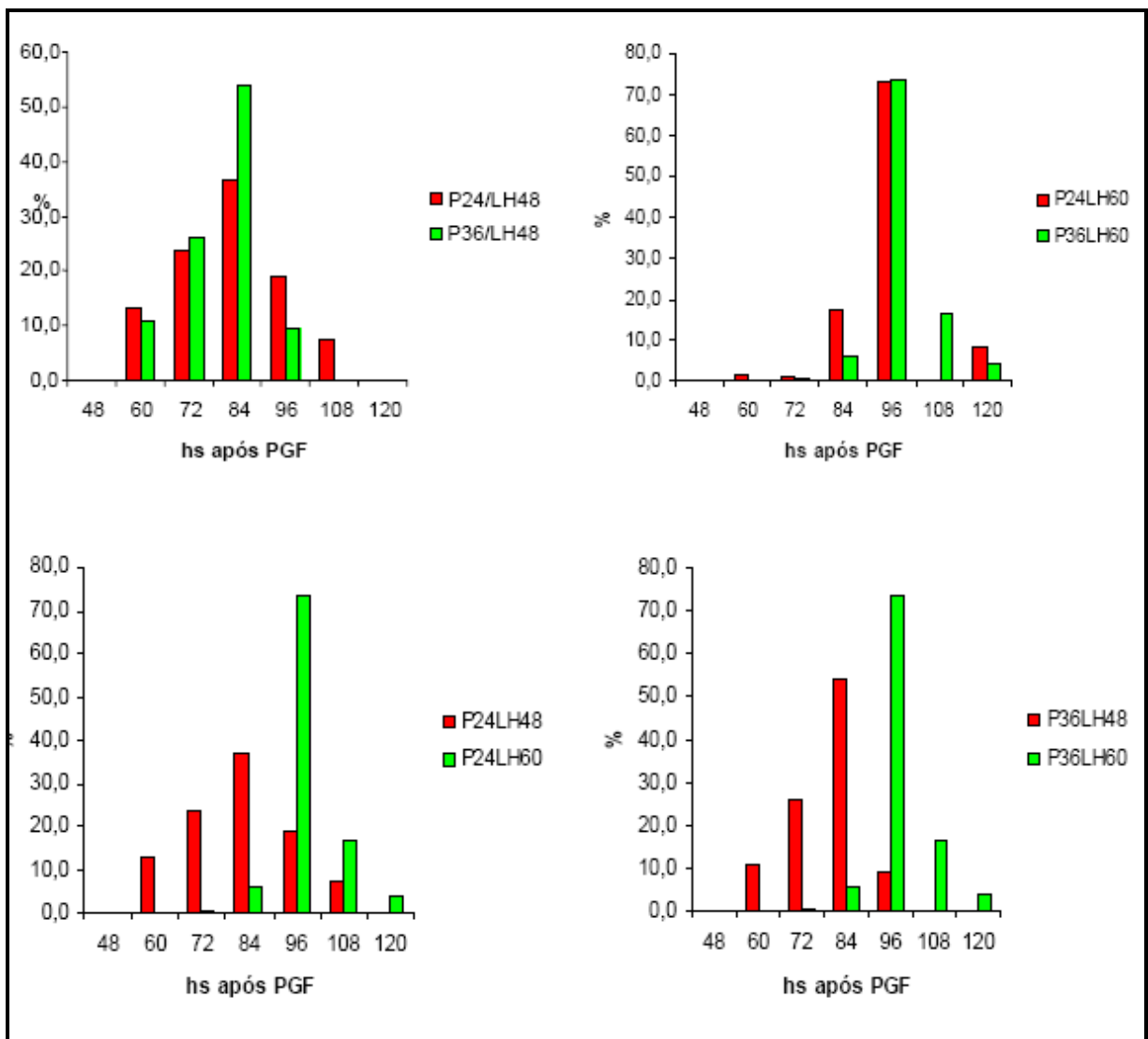
**Tabela 1** – Número de ovulações, tempo médio e variação entre a primeira e a última ovulação (horas), de doadoras Red Angus e Red Brangus superovuladas com implante de  $\text{P}_4$  retirado no D6,5 ou no D7, com ou sem a aplicação de GnRH. Fonte: Adaptação de Chesta et al. (2005)

Momento da Retirada do Dispositivo	GnRH	N	Nº. de Ovulações (Média)	Tempo de Ovulações (h)	
				Média	Variação
D6,5 (P12)	Não	13	15,2 ± 2,2	79,4 ± 2,0	50,2 <sup>b</sup>
D6,5 (P12)	Sim	14	16,6 ± 1,6	77,1 ± 2,0	53,8 <sup>b</sup>
D7 (P24)	Não	12	18,1 ± 2,3	83,6 ± 2,0	53,0 <sup>b</sup>
D7 (P24)	Sim	14	17,9 ± 2,4	79,1 ± 0,7	7,6 <sup>a</sup>

Martins (2007) acompanhou, através de ultrassonografia, após aplicação do LH, vacas *Bos taurus* da raça Holandesa superovuladas. O protocolo utilizado neste trabalho foi de colocação de dispositivo de  $\text{P}_4$  e aplicação de BE (D0), com início do tratamento superovulatório no quarto dia (D4), e duração de quatro dias (até o D7), com duas aplicações diárias. No terceiro dia da aplicação do FSH foram administradas duas doses de  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , juntamente com duas doses de FSH (manhã e tarde). Os animais foram divididos em quatro grupos, de acordo com a retirada do dispositivo de  $\text{P}_4$  e aplicação do LH: 1) 24 h e 48 h (P24 LH48); 2) 36 h e 48 h (P36 LH48); 3) 24 h e 60 h (P24 LH60); e 4) 36 h e 60 h (P36 LH60). Todos os horários foram baseados na primeira aplicação de  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (Gráfico 2). Sendo assim observou-se que nos protocolos com LH60, 75% das ovulações ocorreram em intervalo de 12 h, entre 24 a 36 h após a aplicação do indutor de ovulação.

Realizando estudo em vacas da raça Holandesa, Sartori et al. (2001) separaram as fêmeas em três grupos e administraram indutor de ovulação quando o maior folículo estava com 7,0 (n=9), 8,5 (n=9,0) ou 10,0 mm (n=10) de diâmetro. O acompanhamento ultrassonográfico foi realizado até 48 h após a aplicação do LH, sendo que vacas com folículos com 7,0 (0/9) e 8,5 mm (0/9) não ovularam, mas 80% (8/10) das com 10,0 mm ovularam.

Em experimento similar com novilhas *Bos indicus*, as quais foram divididas em três grupos e o LH aplicado em animais com o maior folículo apresentando 7,0-8,4 (n=9), 8,5-10,0 (n=10) e >10,0mm (n=10), Gimenes et al. (2005) observaram que 33,3% (3/9), 80% (8/10) e 90% (9/10) das fêmeas ovularam, respectivamente. A diferença dos resultados obtidos em *Bos taurus* (SARTORI et al., 2001) e *Bos indicus* (GIMENES et al., 2005) se deve aos animais de origem europeia ovularem folículos com maiores diâmetros do que os de origem asiática (BÓ et al., 2006).



**Gráfico 2** – Distribuição das ovulações de vacas *Bos taurus* da raça Holandesa submetidas a tratamentos superovulatórios com retirada de dispositivo de P<sub>4</sub> 24 e 36 h, e aplicação de LH 48 ou 60 h após a primeira aplicação de PGF<sub>2α</sub>. Fonte: Martins (2007).

## 2.2 Sêmen Sexado

### 2.2.1 Diferenças entre espermatozoides

O primeiro relato documentado estabelecendo a diferença entre espermatozoides de mamíferos portadores do cromossomo X ou Y foi em humanos, com uso de citometria de fluxo (OTTO et al., 1979, referenciado por GARNER, 2006). No entanto, a diferença do volume destas células não ficou restrita apenas à descrição em humanos, sendo realizada em outras espécies (PINKEL et al., 1979), onde foi constatado que o volume do DNA espermático encontrado no cromossomo X ou Y (Gráfico 3) variava entre as diversas espécies de animais domésticos e silvestres (GARNER, 2006).

Não foi por acaso que os primeiros experimentos com sexagem espermática foram realizados em Chinchilas (*Chinchilla Lanigera*), pois esta espécie apresenta uma considerável diferença de volume nos espermatozoides portadores de cromossomo X e Y (GARNER, 2001).

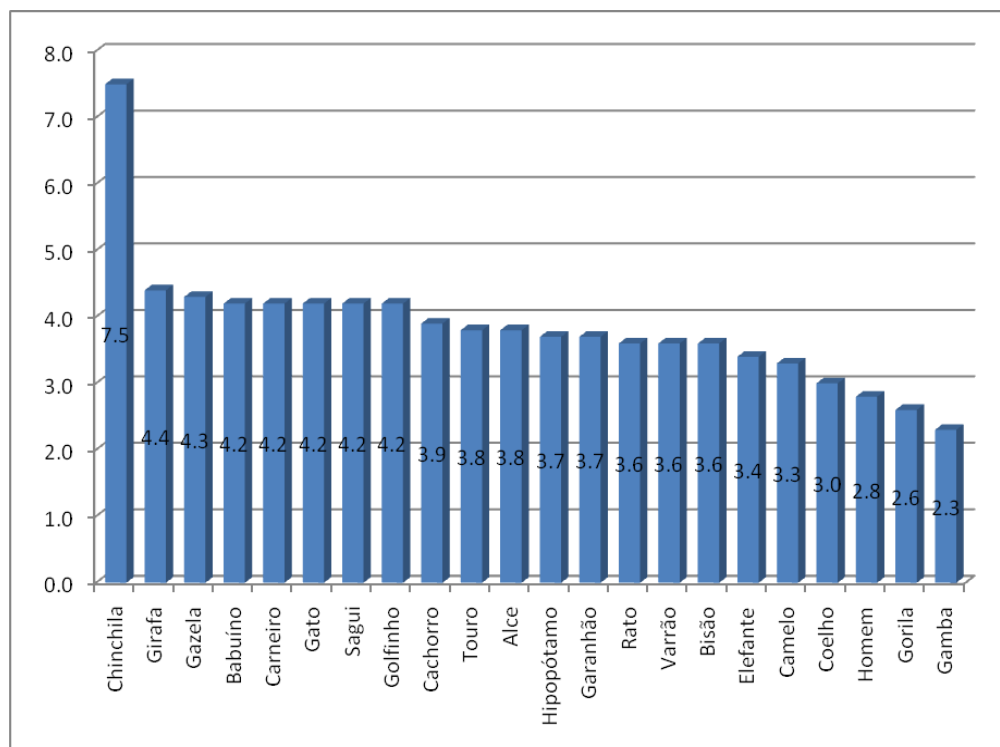
Observou-se também que, além do conteúdo de DNA, haviam diferenças entre o tamanho e o formato da cabeça espermática (GARNER, 2006). Garner et al. (1983) observaram que, em uma mesma espécie, como na bovina, tanto entre *Bos taurus* e *Bos indicus* quanto entre raças, existe diferença no conteúdo de DNA. Esses pesquisadores utilizaram cinco reprodutores de cinco raças diferentes (Holandês, Jersey, Angus, Hereford e Brahman) e avaliaram, por citometria de fluxo, a diferença do conteúdo de DNA. Desta forma, estabeleceram a diferença individual (Tabela 2) e média (Gráfico 4).

### 2.2.2 Métodos de sexagem

A separação de populações espermáticas, de acordo com o cromossomo que este possui, pode trazer benefícios em diferentes espécies: 1) em humanos, onde doenças ligadas aos cromossomos sexuais podem ser evitadas em indivíduos que apresentem predisposição genética; 2) em animais ameaçados de extinção, produzindo assim menor quantidade de macho e maior número de fêmeas, para poder proporcionar mais descendentes; 3) em animais de companhia, pois em se tratando de cavalo, às vezes alguns proprietários têm preferência por uma prole de determinado sexo; e 4) em animais de produção, aumentando assim a



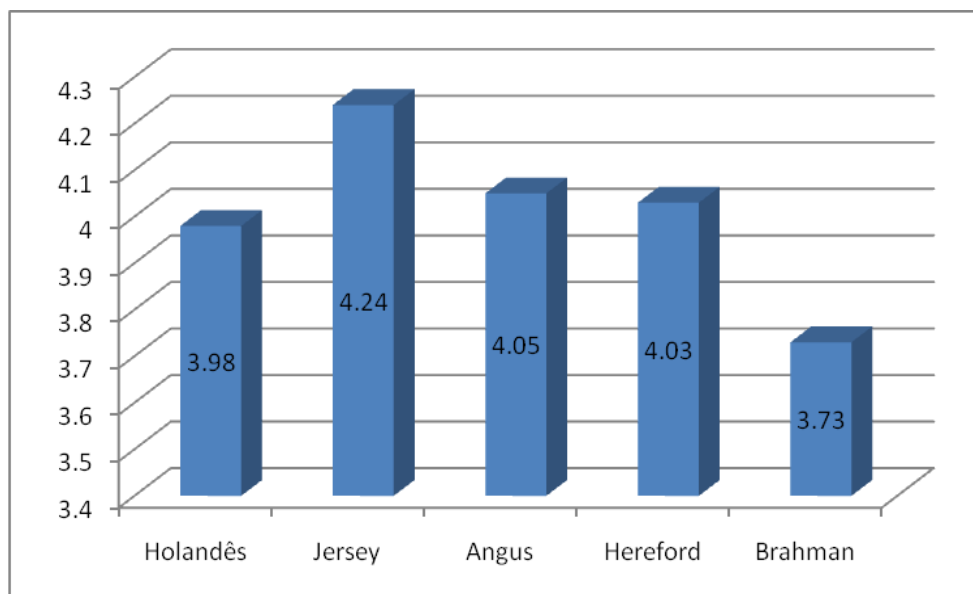
eficiência da produção de leite ou de carne, visando aumentar a oferta e atender à demanda de mercado (SEIDEL e JOHNSON, 1999).



**Gráfico 3** – Diferença de conteúdo de DNA, em valores percentuais, entre espermatozoides portadores de cromossomos X e Y de diversas espécies domésticas e silvestres. Adaptado de Garner (2006).

**Tabela 2** – Diferenças percentuais individual entre população de espermatozoides bovinos, obtidos de quatro reprodutores *Bos taurus* (Holandês, Jersey, Angus e Hereford) e um reprodutor *Bos indicus* (Brahman), portadores de cromossomos X e Y, determinado por citometria de fluxo. Adaptado de Garner et al. (1983)

Touro	Raças				
	Holandês	Jersey	Angus	Hereford	Brahman
1	4,11	4,30	4,15	3,98	3,78
2	3,89	4,19	4,07	4,01	3,72
3	4,01	4,23	3,99	4,11	3,82
4	3,92	4,24	3,96	4,07	3,63
5	4,01	4,22	4,07	3,98	3,70



**Gráfico 4** – Diferença média percentual entre população de espermatozoides bovinos, obtidos de quatro reprodutores *Bos taurus* (Holandês, Jersey, Angus e Hereford) e um reprodutor *Bos indicus* (Brahman), portadores de cromossomos X e Y, determinado por citometria de fluxo. Adaptado de Garner et al. (1983).

Nos bovinos, as fêmeas são essencialmente exclusivas para a produção de leite e de bezerras, enquanto que os machos são usualmente desejados para a produção de carne. A sexagem espermática ou de embriões surge para aumentar a velocidade do progresso genético (BORCHESSEN e PEACOCK, 2009), além de acrescentar vantagens no manejo e na eficiência dos animais de produção e, conseqüentemente, maior rentabilidade na atividade (HAMANO, 2007). Além disso, esta técnica representa também uma evolução no bem estar-animal e ajuda na redução do impacto ambiental, devido à eliminação do sexo não desejado (RATH et al., 2009).

A sexagem de embriões também pode ser realizada, porém determina o desperdício de estruturas embrionárias de sexo não desejado. Sendo assim, ao longo dos anos, algumas tentativas foram realizadas para separação de gametas masculinos portadores de cromossomos X e Y, com base na diferença do peso destas células, realizando, assim, centrifugação em gradiente de densidade (KOBAYASHI et al., 2004); na produção de anticorpo contra o antígeno H-Y, o qual está localizado na membrana plasmática da região da cabeça e da peça intermediária das células espermáticas portadores de cromossomo Y (TILBURG et al., 2006); e na citometria de fluxo, tendo em vista a diferença do conteúdo de DNA entre

espermatozoides portadores do cromossomos X ou Y. Sendo esta última, a técnica com mais acurácia e maior repetibilidade, e tornando-se a mais utilizada comercialmente (GARNER e SEIDEL JR, 2000).

### 2.2.3 Citometria de fluxo

O sistema de citometria de fluxo analítico separava populações de células espermáticas de acordo com o seu DNA, mas sem viabilidade celular após a separação. No entanto, o sistema de citometria de fluxo ortogonal viabilizou a separação destes gametas para o seu posterior uso. Reajustes na forma de entrada da amostra, na angulação do detector de fluorescência e no corante de DNA utilizado foram realizados. Após essas modificações, Johnson et al., em 1987, referenciado por Garner (2001), separaram populações de espermatozoides portadores de cromossomos X ou Y, com 95% de acurácia e com maior viabilidade das células.

O corante utilizado no processo de sexagem é um bisbenzimidazole, denominado de Hoechst 33342, moderadamente solúvel em água (uma solução até 2% pode ser preparada) e relativamente sem efeito tóxico. Existe também o Hoechst 33258, uma bisbenzimidazole impermeável à membrana celular, não sendo útil no processo de sexagem espermática, mas pode ser utilizado na detecção de células lesionadas ou mortas (GARNER, 2009).

A membrana plasmática de espermatozoides vivos são altamente permeáveis ao Hoechst 33342, quando incubados a 35 °C (HAMANO, 2007), e este, por sua vez, se liga a quatro pares de base AT (Adenina-Timina) do ácido nucleico, ocupando completamente o menor sulco da dupla hélice de DNA. O corante fica estavelmente ligado por ligações de hidrogênio, interação de Van der Waals e interação eletrostática entre o corante e o DNA (GARNER, 2009). Em células espermáticas mortas, o corante penetra através da membrana plasmática e é removido rapidamente, eliminando, assim, esses espermatozoides da amostra de células sexadas (HAMANO, 2007).

As células espermáticas são coradas com Hoechst 33342 e, quando expostas ao raio laser, aquelas portadoras do cromossomo X emitem fluorescência mais brilhante devido ao seu maior conteúdo de DNA (GARNER e SEIDEL, 2000).

A diferença do conteúdo de DNA resultou no desenvolvimento de um método rápido e de alta resolução, que minimiza a variabilidade associada com a posição e a orientação da cabeça dos espermatozoides, forçando-os hidrodinamicamente a passarem, um a um, no

citômetro de fluxo, para serem mensurados. Este instrumento de orientação permitiu a mensuração acurada da fluorescência emitida pela superfície nuclear das células espermáticas (GARNER, 2006).

No entanto, esse processo causa danos às células espermáticas e, conseqüentemente, redução da taxa de fertilidade. Segundo Schenk et al. (1999), as principais causas dessa diminuição são explicadas por: 1) exposição do DNA das células espermáticas ao corante Hoechst 33342; 2) exposição à fluorescência; 3) velocidade de saída da célula (90 km/h); 4) tempo de espera das células no interior da gota; 5) desaceleração de 90 km/h para 0 km/h no encontro com a interface ar-líquido no interior do tubo; e 6) processo de centrifugação para aumentar a concentração.

Além de outros estudos para promover o aumento da qualidade e da eficiência do semên sexado por citômetro de fluxo, atualmente os seguintes critérios têm que ser considerados, visando à obtenção de taxas de fertilidade aceitáveis: 1) Os touros devem ser pré-testados e aqueles que apresentam queda no resultado, quando se utiliza a IA com sêmen convencional com baixa concentração espermática, devem ser eliminados do comércio de sexagem; 2) O espermiograma deve ser realizado em cada ejaculado, antes da submissão da amostra ao processo de sexagem; 3) Após a sexagem, alíquotas de sêmen devem ser avaliadas quanto a motilidade, morfologia e integridade da membrana e do acrossoma espermático, antes e após o teste de termotolerância, preferencialmente durante 6 h, sendo testado também quanto à contaminação microbiológica (RATH et al., 2009).

Pode-se dizer que ainda existem duas desvantagens práticas no uso do sêmen sexado: 1) Custo elevado da dose; e 2) Potencial de fertilidade reduzido, quando comparado ao sêmen convencional (SEIDEL JR, 2003).

#### 2.2.4 Utilização do sêmen sexado

Muitos pesquisadores têm procurado estabelecer protocolos para elevar a taxa de concepção, tanto na IA convencional quanto na IATF, e de estruturas fertilizadas, na MOET e na FIV com o uso de sêmen sexado (BARUSSELI et al., 2007; BASTOS et al., 2007; MARTINS et al., 2007; MEIRELLES et al., 2007), tentando, assim, identificar o fator primário dos baixos índices obtidos.

### *Uso na Inseminação Artificial*

Resultados variados têm sido encontrados pelos diversos pesquisadores que estudam a utilização de sêmen sexado na IA ou na IATF de vacas e novilhas. Com o objetivo de testar diferentes concentrações espermáticas, Bastos et al. (2007) realizaram IA pelo método convencional com observação de estro e obtiveram taxa de concepção de 34,1% e 64,7% para o sêmen sexado, na concentração de  $2,0 \times 10^6$  espermatozoides, e para o sêmen convencional, na dose de  $6,0 \times 10^6$  espermatozoides, respectivamente. Todavia, Barusseli et al. (2007) evidenciaram que o sêmen sexado de animais da raça Holandesa, na concentração de  $2,0 \times 10^6$  espermatozoides, apresentou resultado inferior àquele obtido com o sêmen convencional na concentração de  $10,0 \times 10^6$  espermatozoides. Corroborando esses pesquisadores, Seidel Jr e Schenk (2008) realizaram seis experimentos em novilhas (Holandesa e Angus) e vacas (Angus) em quatro estados diferentes dos Estados Unidos América (EUA), e concluíram que o processo de sexagem diminui a fertilidade das células espermáticas. Desta forma, estes autores confirmaram a hipótese de que a citometria de fluxo causa danos aos espermatozoides.

Seidel Jr e Schenk (2008), ao avaliarem o local de deposição do sêmen, no corpo do útero ou no corno uterino (metade da dose em cada corno), em novilhas Holandesas e vacas Angus em lactação, não encontraram diferenças significativas.

Visando depositar as doses de sêmen em horário mais próximo da ovulação, levando em consideração a diminuição do tempo de vida dos espermatozoides submetidos à citometria de fluxo, Barusseli et al. (2007) realizaram IATF em 389 vacas da raça Nelore usando sêmen convencional e sexado (54 ou 60 h depois da retirada do implante), sem evidenciarem diferença entre tratamentos. Segundo estes autores, a acurácia das amostras de sêmen sexado foi de 93,9%.

### *Uso na MOET*

Estudando a viabilidade de duas concentrações ( $10,0$  e  $20,0 \times 10^6$  espermatozoides) de sêmen sexado e uma de sêmen convencional ( $10,0 \times 10^6$  espermatozoides) em bovinos da raça Holandesa para uso na MOET, Sartori et al. (2004) obtiveram número superior de estruturas fertilizadas no grupo tratado com sêmen convencional. Ressalta-se que nas amostras de sêmen sexado contendo  $20,0 \times 10^6$  de espermatozoides foi realizada apenas uma IA 12 h após o

início do estro, enquanto nos outros dois tratamentos (sexado  $10,0 \times 10^6$  e convencional  $20,0 \times 10^6$  espermatozoides) foram realizadas duas inseminações (12 e 24 h) após o início do estro.

Schenk et al. (2006) pesquisaram o efeito de três concentrações espermáticas diferentes, em novilhas da raça Holandesa ( $n=98$ ), as quais foram inseminadas duas vezes com  $2,0$ ,  $20,0$  e  $40,0 \times 10^6$  de espermatozoides sendo com as duas primeiras concentrações com sêmen sexado e a última com convencional. Neste trabalho, os autores encontraram diferenças entre os três grupos estudados e obtiveram melhor resultado no grupo com sêmen convencional ( $40,0 \times 10^6$  espermatozoides), seguido pelo sexado de maior concentração ( $20,0 \times 10^6$  espermatozoides) e, por último, o de menor concentração espermática ( $2,0 \times 10^6$  espermatozoides). No mesmo trabalho, estes autores estudaram o efeito de duas diferentes concentrações ( $2,0$  e  $10,0 \times 10^6$  espermatozoides) de sêmen sexado e uma de sêmen convencional ( $40,0 \times 10^6$  espermatozoides) em vacas e novilhas da raça Angus, onde encontraram maior percentual de estruturas fertilizadas nas fêmeas onde foi usado o sêmen convencional. Todavia, estes autores não encontraram diferenças significativas no número de estruturas fertilizadas ao compararem duas concentrações de sêmen sexado.

Para tentar entender se a baixa concentração utilizada nas doses de sêmen sexado é um fator que compromete os resultados deste sêmen, An et al. (2010) realizaram um estudo em novilhas Holandesas, com ovulação simples, sem uso de protocolo hormonal, e utilizaram duas concentrações de sêmen convencional ( $2,0$  e  $10,0 \times 10^6$  espermatozoides) e uma de sexado ( $2,0 \times 10^6$  espermatozoides). Neste estudo não foi encontrada diferença ( $p>0,05$ ) na taxa de prenhez, sinalizando que em novilhas com ovulação simples a concentração espermática não é o fator que determina a diminuição da fertilidade. No entanto, no mesmo estudo, quando o teste com apenas uma concentração de sêmen convencional ( $10,0 \times 10^6$  espermatozoides) e uma de sexado ( $2,0 \times 10^6$  espermatozoides) foi realizado, o percentual de embriões transferíveis foi superior no grupo inseminado com sêmen convencional. As IAs com sêmen sexado foram realizadas na região intracornual profunda, sendo utilizadas pelo menos três doses de sêmen, pois a primeira IA (12 h após o início do estro) foi realizada com  $1,0 \times 10^6$  espermatozoides em cada corno uterino, enquanto a segunda foi realizada com  $2,0 \times 10^6$  espermatozoides em cada corno, sendo utilizada uma dose para cada. Quando os animais eram avaliados, 12 h após a segunda IA e constatava que ainda havia folículo pré-ovulatório, mais uma IA intracornual era realizada no corno ipsilateral ao folículo.

Estudando a relação entre concentração espermática e qualidade embrionária, Nadir et al. (1993) encontraram correlação positiva, pois a qualidade dos embriões foi melhor nos

animais submetidos a IA com maior concentração espermática, além de apresentar maior taxa de fertilização e maior quantidade de espermatozoides acessórios.

Levantando a hipótese de que se aumentassem o número de IA em animais superovulados conseguiriam igualar o número de estruturas fertilizadas com o uso de sêmen sexado e convencional, Larson et al. (2010) realizaram quatro IAs em doadoras da raça Angus (n=32), com delineamento em quadrado latino, sendo uma IA no momento da detecção do cio, duas IAs 12 h após e a última 24 h após. Tanto no grupo com sêmen sexado ( $2,1 \times 10^6$  espermatozoides) quanto no convencional ( $15,0 \times 10^6$  espermatozoides) foram utilizadas quatro IAs. O resultado do grupo tratado com sêmen sexado e convencional foi de 46,7% e 71,6%, respectivamente, para o número de estruturas fertilizadas. Desta forma, o sêmen sexado apresentou resultado inferior ao convencional.

Comparando a eficiência do sêmen sexado e convencional, em novilhas da raça Holandesa (n=10) superovuladas, Hayakawa et al. (2009) não encontraram diferenças estatísticas. No entanto, numericamente observaram menor número de estruturas transferíveis e maior número de estruturas não fertilizadas no grupo em que se utilizou sêmen sexado. No mesmo estudo, os autores acrescentaram um grupo com sêmen sexado refrigerado (n=45), onde também não observaram diferenças estatísticas entre os tratamentos, apesar de numericamente os grupos tratados com sêmen sexado terem apresentado menor número de embriões classificados com Grau 1. Os resultados de Peippo et al. (2009), utilizando sêmen congelado, corroboram o encontrado por Hayakawa et al. (2009) em novilhas, porém em vacas o sêmen sexado apresentou valor inferior ao convencional.

Peippo et al (2009) compararam a fertilidade de doses congeladas de sêmen sexado obtidas de três reprodutores da raça Holandesa, as quais foram utilizadas para IA em animais superovulados, sem evidenciarem diferença significativa entre touros.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. P.; KORT, K.; SMITH, C. A.; GINTHER, O. J. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates in heifers. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 73, p. 267-275, 1993.

ADAMS, G. P. Comparative pattern of follicle development and selection in ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility - Supplement**, Oxford, v. 54, p. 17-32, 1999.

ARMSTRONG, D. T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 39, p. 7-24, 1993.

AN, L.; WU, Z-H.; WU, Y-F.; ZHANG, X-L.; LIU, X.; ZHU, Y-B.; CHENG, W-M.; GAO, H-M.; GUO, M.; TIAN, J-H. Fertility in single-ovulation and superovulated dairy heifers after insemination with low dose sex-sorted sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 45, p. 344-355, 2010.

ANDRADE, J. C. O.; OLIVEIRA, M. A. L.; SANTOS FILHO, A. S.; WISCHRAL, A.; LIMA, P. F.; SOUZA, D. M. B. Diferentes protocolos de superovulação em vacas Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, p. 317-318, 1999.

BARATI, F.; NIASARI-NASLAJI, A.; BOLOURCHI, M.; SARHADDI, F.; RAZAVI, K.; NAGHZALI, E.; THATCHER, W. W. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, p. 1149-1155, 2006.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Superovulação em Zabuínos de Corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1, 2004, Londrina, PR. **Anais...** Londrina: Conselho Regional de Medicina Veterinária e Zootecnia do Paraná, 2004. v.1., p. 212-222.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo Transfer in *bos indicus* cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 56, p. 1463-1496, 2001.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F. ; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BO, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 77-88, 2006.



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

BASTOS, A.; MEIRELLES, C.; SEGUI, M. S.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E. Comparação entre a fertilidade do sêmen sexado e sêmen convencional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba. **Anais...** CBRA, Curitiba: CBRA, 2007, p. 133.

BÓ, G. A. Sincronización del desarrollo folicular y luteal in grupos de donantes y receptoras de embriones bovinos. In: CURSO DE ABORDAGEM TEÓRICO-PRÁTICA DE NOVAS TÉCNICAS DE SINCRONIZAÇÃO SEM OBSERVAÇÃO DE CIO EM BOVINOS (IA E TE), 2, 2002, Cornélio Procópio-PR. **Anais....**, Cornélio Procópio: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2002, 1 CD-ROM.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; CHESTA, P. M.; MARTINS, C. M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 65, p. 89-101, 2006.

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

CARDELLINO, R.A.; OSÓRIO, J.C.S. **Melhoramento Animal**. Pelotas: Universitária, 1999. v.1, 152p.

CHESTA, P.; MARAÑA, D.; PERES, L.; BÓ, G. A. Effect of Time of Removal of a Progesterone Releasing Device and GnRH Treatment on the Interval to and Distribution of Ovulations in Superstimulated Beef Cows. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 18, p. 288-288, 2005.

DALTON, J. C.; NADIR, S.; BAME, J. H.; NOFTSINGER, M.; SAACKE, R. G. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, n.78, p. 2081-2085, 2000.

D'ÓCCHIO, M. J.; SUDHA, G.; JILLELLA, D.; WHYTE, T.; MACLELLAN, L. J.; WALSH, J.; TRIGG, T. E.; MILLER, D. Use of a GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47, p. 601-613, 1996.

GARNER, D. L. Sex-Sorting Mammalian Sperm: Conception to Application in Animals. **Journal of Andrology**, Lawrence, v. 22, p. 519-526, 2001.

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

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

GARNER, D. L.; GLEDHILL, B. L.; PINKEL, D.; LAKE, S.; STEPHENSON, D.; VAN DILLA, M. A.; JOHNSON, L. A. Quantification of the X- and Y-Chromosome-Bearing Spermatozoa of Domestic Animals by Flow Cytometry. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 28, p. 312-321, 1983.

GARNER, D. L.; SEIDEL JR, G. E. **Sexando espermatozoides do touro**. In: Topics in Bull Fertility, Chenoweth, P. J. (Ed.). Ithaca, 2000. Disponível em: <http://www.ivis.org>. Acesso em: 11 nov. 2008.

GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; SANTIAGO, L. L.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARROS, C. M.; BARUSELLI, P. S. Ovulatory Capacity in *Bos indicus* Heifers. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 209-209, 2005.

HAMANO, K. Sex Preselection in Bovine by Separation of X- and Y-Chromosome Bearing Spermatozoa. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 53, p. 27-38, 2007.

HAYAKAWA, H.; HIRAI, T.; TAKIMOTO, A.; IDETA, A.; AOYAGI, Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, p. 78-63, 2009.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Indução da Ovulação, Produção e Transferência de Embriões. In: Hafez, E. S. E; Hafez, B. **Reprodução Animal**. Barueri: Manole, 2004. Cap., 29, p. 413-419.

KOBAYASHI, J.; OGURO, H.; UCHIDA, H.; KOHSAKA, T.; SASADA, H.; SATO, E. Assessment of bovine X- and Y- bearing spermatozoa in fractions by discontinuous percoll gradients with rapid fluorescence *In situ* hybridization. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 50, p. 463-469, 2004.

LARSON, J. E.; LAMB, G. C.; FUNNELL, B. J.; BIRD, S.; MARTINS, A.; RODGERS, J. C. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 73, p. 698-703, 2010.

LI, C.; ZHU, Y. L.; XUE, J. H.; ZHANG, S. L.; MA, Z.; SHI, Z. D. Immunization against inhibin enhances both embryo quantity and quality in Holstein heifers after superovulation and insemination with sex-sorted semen. **Theriogenology**, Stoneham, v. 71, p. 1011-1017, 2009.

MARTINS, C. M.; CASTRICINI, E. C. S.; REIS, E. L.; TORRES-JUNIOR, J. R. S.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Embryo Production in Holstein Cows at Different Protocols of Superstimulation with Fixed Time Artificial Insemination. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 287-287, 2005.

MARTINS, C. M. **Diferentes Protocolos de Superovulação com Inseminação Artificial em Tempo Fixo em *Bos taurus* e *Bos indicus***. 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo.

MARTINS, C. M.; SOUZA, A. H.; OLIVEIRA, L. G.; AYRES, H.; GIMENES, L. U.; CREPALDI, G. A.; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Produção de Embriões em Vacas Nelore (*Bos Indicus*) Inseminadas em Tempo Fixo com Sêmen Sexado. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 3, p. 374-381, 2007.

MEIRELLES, C.; KOZICKI, L. E.; WEISS, R. R.; SEGUI, M. S. Inseminação intracornual profunda em bovinos com dose reduzida de sêmen. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba, PR. **Anais....** Curitiba: CBRA, 2007. p. 200.

NADIR, S.; SAACKE, R. G.; BAME, J.; MULLINS, J. DEGELOS, S. Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility and embryo quality in artificially inseminated cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, p. 199-204, 1993.

NOGUEIRA, M. F. G.; FRAGNITO, P. S.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. The effect of type of vaginal insert and dose of pLH on embryo production, following fixed-time AI in a progestin-based superstimulatory protocol in Nelore cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 655-660, 2007.

PINKEL, D.; DEAN, P.; LAKE, S.; PETERS, D.; MENDELSON, M.; GRAY, J.; VAN DILLA, M.; GLEDHILL, B. Flow cytometry of mammalian sperm: progress in DNA and morphology measurement. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, Baltimore, v. 27, p. 353-358, 1979.

PEIPPO, J.; VARTIA, K.; KANANEN-ANTTILA, K.; RÄTY, M.; KORHONEN, K.; HURME, T.; MYLLYMÄKI, H.; SAIRANEN, A.; MÄKI-TANILA, A. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 111, p. 80-92, 2009.

PRADO, F. R. A.; TONIOLLO, G. H.; OLIVEIRA, J. A. Superestimulação Ovariana em Vacas da Raça Gir Leiteiro com Uso de Diferentes Concentrações de FSH. **ARS Veterinaria**, Jaboticabal, v. 23, n. 3, p. 172-177, 2007.

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

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; SANTOS FILHO, A. S.; ANDRADE, J. C. O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002. Cap. 12, p. 153-160.

RENESTO, A. Associação das Biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultra-sonografia e superovulação na produção *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos. 2004. 59 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal.

RUMPF, R.; DODE, M. A. N.; FELICIANO SILVA, A. E. D. Avanços na Biotecnologia da Reprodução dos Bovinos. In: III SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 3, 2000, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFMG, 2000. p. 248-253.

SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C. Follicular Deviation and Acquisition of Ovulatory Capacity in Bovine Follicles. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 65, p. 1403-1409, 2001.

SARTORI, R.; SOUZA, A. H.; GUENTHER, J. N.; CARAVIELLO, D. Z.; GEIGER, L. N.; SCHENK, J. L.; WILTBANK M. C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 86-90, 2004.

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

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

SEIDEL JR, G. E. Sexing mammalian sperm – intertwining of commerce, technology and biology. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 79, p. 145-156, 2003.

SEIDEL JR, G. E.; JOHNSON, L. A. Sexing Mammalian Sperm – Overview. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 1267-1272, 1999.

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

THIBIER, M. The IETS statistics of embryo transfers in livestock in the world for the year 1999: A new record for bovine *in vivo*-derived embryos transferred. **Embryo Transfer Newsletter**, Savoy, v. 18, p. 24-28, 2000.

TILBURG, M. F. V.; MACHADO, O. L. T. ; SILVA, J. F. S.; MATTA, C. G. F.; FAGUNDES, B.; MATTA, M. F. R. Identificação de antígeno macho-específico de ovino. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 101, p. 231-233, 2006.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 3, p. 915-924, 2007.

VIANA, J. H. M. Estado atual da transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* de embriões (FIV) no Brasil e no mundo. **O Embrião**, Jaboticabal, n. 29, p. 1-3, out/nov/dez. 2006.

## **4 ARTIGO CIENTÍFICO**

**Avaliação do sêmen (convencional ou sexado) e do momento da  
inseminação artificial sobre a taxa de fertilização de vacas *Bos taurus*  
superovuladas**

*Assessment of semen (unsorted or sorted) and time of artificial insemination on  
superovulated *Bos taurus* cows*

MONTEIRO JR, P.L.J.<sup>1\*</sup>; BATISTA, A.M.<sup>1</sup>; ALMEIDA, F.C.<sup>1</sup>; CARNEIRO, G.F.<sup>1</sup>;  
SOARES, P.C.<sup>1</sup>; SANTOS, I.C.C.<sup>2</sup>; GUERRA, M.M.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil. CEP 52171-900. \* Autor para correspondência: pedromonteirojr@hotmail.com  
<sup>2</sup>TECNOPEC<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil

### RESUMO

Objetivou-se estudar o efeito do sêmen (convencional ou sexado) e do momento de inseminação artificial (IA) na taxa de fertilização de vacas *Bos taurus* superovuladas. Em dia aleatório do ciclo estral, correspondendo ao D0, as vacas receberam implante intravaginal de Progesterona (P<sub>4</sub>), associado a 3 mg de Benzoato de estradiol. No D4 teve início a estimulação folicular com 200 mg FSH-p, administrado em doses decrescentes, durante quatro dias, com duas aplicações diárias, a intervalo de 12 h. Juntamente com a 5ª e a 6ª dose de FSH foram administradas 0,150 mg d-Cloprostenol. O implante de P<sub>4</sub> foi retirado no D7,5 e no D8,5 foram administrados 25 mg de LH. As inseminações foram realizadas de acordo com o tipo de sêmen (convencional ou sexado) e o momento das IAs: G1= sêmen convencional e IAs 12 e 24 h após a administração de LH (grupo controle); G2= sêmen sexado e IAs 12 e 24 h após a administração do LH; G3= sêmen sexado e IAs 24 e 36 h após a administração do LH. Cada fêmea foi submetida a três tratamentos superovulatório (*crossover*). No D15 os embriões foram coletados, pelo método não-cirúrgico, avaliados e classificados. O percentual de estruturas fertilizadas para os grupos G1, G2 e G3, foram de 60,87% (42/69), 10,00% (9/90) e 36,54% (19/52), respectivamente, sendo o G1 superior (p<0,05) aos G2 e G3, enquanto o G3 foi superior (p<0,05) ao G2. Conclui-se que a inseminação artificial com sêmen sexado em vacas *Bos taurus* superovuladas pode ser procedida 24 e 36 h após a administração do LH. Todavia, mais estudos devem ser realizados visando obter taxa de fertilização semelhante àquela obtida com sêmen convencional.

**Palavras-chave:** pardo suíço, sêmen, sexagem, superovulação.

### ABSTRACT

The aim of this research was to study the effect of semen (unsorted or sorted) and Artificial Insemination (AI) time in the fertilization rate of superovulated *Bos taurus* cattle. Donors (n=9) were treated with intravaginal progesterone releasing device plus 3 mg estradiol benzoate at random stage of estrous cycle (Day 0). Superstimulation treatments began on Day 4, with 200 mg FSH-p, administered in decreasing doses, during four days with two applications daily, at 12 h interval. Along with the fifth and sixth FSH dose were administered

0,150 mg d-Cloprostenol. The intravaginal device was removed on the D7,5 and on D8,5 25 mg of LH were administered. The AI's were performed according to the type of semen (unsorted or X-sorted) and AI time: G1= unsorted semen and AI 12 and 24 h after received LH (Control Group); G2= X-sorted semen and AI 12 and 24 h after received LH; G3= X-sorted semen and AI 24 and 36 h after received LH. Each cow was submitted to three superovulatory treatments (cross-over experimental design). On D15 embryos were recovered by nonsurgical method, evaluated and classified. The percentage of fertilized ova to G1, G2 and G3 groups were 60.87% (42/69), 10.00% (9/90) and 36.54% (19/52), respectively, being G1 group superior ( $p < 0,05$ ) than G2 and G3 groups, while G3 was superior than G2 ( $p < 0,05$ ). It can be concluded that AI with sexed semen in superovulated *Bos taurus* cows can be administered 24 and 36 h after LH injection. However, further studies should be conducted to achieve fertilization rate similar to that obtained with unsorted semen.

**Keyword:** brown swiss, semen, sexing, Superovulation.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo (FAO, 2008) e é responsável por, aproximadamente, 17% e 50% dos embriões transferidos produzidos *in vivo* e *in vitro*, respectivamente (VIANA, 2006). Com o uso do sêmen sexado em escala comercial, a Transferência de Embrião por Múltipla Ovulação (MOET) foi impulsionada levando em consideração os fatores limitantes da Fertilização *in vitro* (FIV), relacionados à criopreservação de embriões (VIANA e CAMARGO, 2007).

Apesar dos consideráveis avanços no processo de sexagem espermática, a taxa de fertilidade obtida com uso deste tipo de sêmen ainda é menor do que àquela obtida com uso do sêmen convencional (GARNER, 2006). Este resultado pode ser explicado pela exposição das células ao corante Hoechst 33342 e ao laser, pela velocidade que a célula atinge, seguida de rápida desaceleração, pela duração do processo, pela interface ar-líquido e pela centrifugação para aumentar a concentração (SCHENK et al., 1999).

Diversos estudos têm sido realizados visando utilizar o sêmen sexado na IA (BARUSSELI et al., 2007; MEIRELLES et al., 2007; SEIDEL JR e SCHENK, 2008), MOET (SARTORI et al., 2004; SCHENK et al., 2006; HAYAKAWA et al., 2009; PEIPPO et al., 2009; LARSON et al., 2010) e Produção *in vitro* de Embriões (LU et al., 1999; BEILBY et al., 2010; CARVALHO et al., 2010). No entanto, principalmente em se tratando da utilização do sêmen sexado para produção *in vivo* de embriões, os resultados ainda são inferiores dos obtidos com sêmen convencional.

Recentemente, com o recurso da ultrassonografia, avanços foram obtidos na compreensão da fisiologia ovariana. Com isso, diversos protocolos foram criados para uso na MOET, diminuindo, assim, a variação da resposta superovulatória (BÓ et al., 2006). Número



de estruturas recuperadas e embriões transferíveis obtidos de fêmeas submetidas a protocolos com indutores de ovulação e Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) foram semelhantes aos obtidos em protocolos tradicionais, com IA baseada na apresentação de estro (D'ÓCCHIO et al., 1996; BARROS e NOGUEIRA, 2001; CHESTA et al., 2005; MARTINS et al., 2005). No entanto, foi observada redução do intervalo entre a primeira e a última ovulação (CHESTA et al., 2005; MARTINS, 2007). Martins (2007) realizou acompanhamento ultrassonográfico de vacas *Bos taurus* superovuladas (raça Holandesa), a partir da aplicação do indutor de ovulação, e observou que aproximadamente 75% das ovulações ocorreram entre 24 e 36 h após aplicação do LH.

O processo de sexagem espermática causa danos aos espermatozoides, conseqüentemente diminui o tempo de vida destes no trato genital da fêmea. Contudo, acredita-se que para se obter maior número de estruturas fertilizadas, deve-se realizar as IAs com sêmen sexado no horário de maior ocorrência das ovulações. Sendo assim, objetivou-se estudar o efeito do tipo de sêmen (convencional ou sexado) e do momento de inseminação artificial (IA) na taxa de fertilização de vacas *Bos taurus* superovuladas.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local do Experimento e Animais

O experimento foi realizado no período de setembro de 2009 a outubro de 2010, na Fazenda Bela Vista (8°59'24.14"S de Latitude e 36°31'59.78"O de Longitude), com temperatura variando de 16,5 a 32,3°C e a umidade relativa do ar de 39 a 100% (INMET, 2010), situada no município de Brejão, na região do Agreste do Estado de Pernambuco. Foram selecionadas nove vacas da raça Pardo Suíço, com idade variando entre 4-8 anos, classificadas como aptas à reprodução após realização de exames clínicos e ginecológicos. O Escore de Condição Corporal (ECC) médio dos animais foi de  $3,4 \pm 0,2$  (escala de 1-5) e o peso corporal médio de  $617,1 \pm 56,3$  kg. As fêmeas foram criadas em regime semi-intensivo, alimentando-se de pastagem de *Brachiaria decumbens*, assim como foi fornecido suplementação alimentar de 1,5 kg/vaca/dia constituída de uma mistura de concentrado contendo Farelo de Trigo e Farelo de Soja, além de água e sal mineral fornecidos *ad libitum*. Dois meses antes do início do experimento, as vacas foram submetidas ao manejo nutricional para adaptação.

## 2.2 Superovulação (SOV) e Inseminação Artificial (IA)

O protocolo de SOV (Figura 1) consistiu da colocação de dispositivo de Progesterona (P<sub>4</sub>) (PRIMER<sup>®</sup>, Tecnopec, São Paulo, Brasil), associado a 3,0 mg de Benzoato de Estradiol (BE) (RIC-BE<sup>®</sup>, Tecnopec, São Paulo, Brasil) em dia aleatório do ciclo estral, o que correspondeu ao D0 do tratamento. Do D4 ao D7 foram administradas 200 mg FSH-p (Folltropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Animal Health, Ontario, Canadá), em doses decrescentes, com duas aplicações diárias (40, 40, 30, 30, 20, 20, 10 e 10 mg), a intervalo de 12 horas. No D6, juntamente com a 5<sup>a</sup> e a 6<sup>a</sup> aplicação do FSH, foram administrados 0,150 mg de d-Cloprostenol (Prolise<sup>®</sup>, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina). O dispositivo de P<sub>4</sub> foi retirado no momento da administração da última dose de FSH. Vinte e quatro horas após a retirada do dispositivo de P<sub>4</sub> foram administrados 25 mg de LH (Lutropin<sup>®</sup>, Bioniche Animal Health, Ontario, Canadá).

Três SOV foram realizadas em cada doadora, utilizando o delineamento experimental “*cross-over*”, totalizando 27 superovulações, visando anular a variação individual dos animais. O intervalo entre superovulações foi de, no mínimo, dois meses.

Para IA, as vacas (n=9) foram distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais, de acordo com o tipo do sêmen e os horários das IAs, sendo constituídos de: G1 (n=9) - duas IAs com doses de sêmen convencional ( $20.0 \times 10^6$  Sptz), realizadas 12 e 24 h após a administração de LH (grupo controle); G2 (n=9) - duas IAs com sêmen sexado ( $2.0 \times 10^6$  Sptz), realizadas 12 e 24 h após a administração do LH; G3 (n=9) - duas IAs com doses de sêmen sexado ( $2.0 \times 10^6$  Sptz), realizadas 24 e 36 h após a administração do LH.

Utilizou-se sêmen de uma mesma partida, obtida de um reprodutor da raça Pardo Suíço de uma central de sêmen comercial. Em todas as fêmeas, o sêmen foi depositado no corpo do útero, por via transcervical.

## 2.3 Coleta e Avaliação dos Embriões

No D15 foram realizadas as coletas de embriões pelo método não-cirúrgico. A lavagem uterina foi realizada utilizando 1000 mL de DPBS (Solução Salina Tamponada Fosfatada, Nutricell, São Paulo, Brasil), em circuito fechado com fluxo descontínuo

(REICHENBACH et al., 2002). As estruturas recuperadas foram separadas e classificadas de acordo com o manual da IETS (ROBERTSON e NELSON, 1998). Após a coleta dos embriões, procedeu-se a quantificação do número de Corpos Lúteos (CL) utilizando exame ultrassonográfico (US) (Falcon 100 Vet<sup>®</sup>, Pie Medical, Maastricht, Holanda), com transdutor linear de 6.0 MHz, por via transretal.

## 2.4 Análise Estatística

Os dados foram analisados por meio do programa computacional Statistical Analysis System (SAS, 2002), utilizando-se o procedimento PROC MIXED, para o número de estruturas coletadas, adotando-se o nível de significância de 5%, e contraste de médias pelo Teste de Tukey. Por conseguinte, extraíram-se, do universo de dados das estruturas coletadas, proporções relativas às estruturas fertilizadas, quando estas foram submetidas à análise de comparação de proporções das frequências de estruturas fertilizadas em seus respectivos tratamentos. As vacas que não responderam a superestimulação não foram lavadas e foram retiradas da análise estatística.

## 3 RESULTADOS

Das 27 superovulações realizadas, observou-se que apenas cinco vacas não apresentaram resultado compatível com a superestimulação ovariana, sendo uma no G1 e quatro no G3. Os resultados do experimento estão descritos na Tabela 1, onde se constata que não houve diferença estatística significativa no número de estruturas recuperadas entre grupos, cuja média total foi de  $9,59 \pm 6,89$  (211/22) estruturas por doadora.

Além disso, não foi encontrada diferença estatística significativa entre os grupos no número de estruturas recuperadas por lavado, total de estruturas fertilizadas, número de estruturas fertilizadas por lavado, assim como nas médias de embriões transferíveis e degenerados, ou de estruturas não fertilizadas, e qualidade embrionária. No entanto, foi constatada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os três grupos na porcentagem de estruturas fertilizadas, onde o G1 apresentou resultado superior ( $p < 0,05$ ) em relação aos demais grupos, enquanto o G3 foi superior ( $p < 0,05$ ) ao G2.

As médias do número de CLs observados ao exame de ultrassonografia não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre grupos, sendo de  $9,88 \pm 3,31$  no G1,  $9,22 \pm 3,31$  no G2 e  $10,00 \pm 4,53$  no G3.

#### 4 DISCUSSÃO

A resposta superovulatória observada neste estudo evidenciou que 18,51% (5/27) das vacas não responderam ao protocolo utilizado, o que pode ser atribuído à variabilidade da fêmea aos tratamentos estimulatórios (BÓ et al., 2006; ANDRADE et al., 1999). Todavia, as médias de estruturas recuperadas por lavado foram semelhantes às relatadas em novilhas (SARTORI et al., 2004; PEIPPO et al., 2009), e vacas (PEIPPO et al., 2009) *Bos taurus* da raça Holandesa.

É importante observar que a menor taxa de fertilização observada nas fêmeas inseminadas com sêmen sexado (G2 e G3), quando comparadas àquelas inseminadas com sêmen convencional (G1), também foi descrita por Larson et al. (2010), ao estudarem sêmen sexado em vacas da raça Angus na mesma concentração do presente estudo, no entanto realizando quatro inseminações; por Sartori et al. (2004), que utilizaram doses mais concentradas ( $10 \times 10^6$  e  $20 \times 10^6$  de espermatozoides) do que as do presente estudo em novilhas Holandesa; e por Schenk et al. (2006), em novilhas Holandesa inseminadas em tempo fixo, porém sem indutor de ovulação, em duas concentrações de sêmen sexado ( $2,0 \times 10^6$  e  $20 \times 10^6$  espermatozoides). Desta forma, a queda na taxa de fertilização observada neste trabalho utilizando sêmen sexado pode ser atribuída aos danos que as células espermáticas sofrem durante o processo de sexagem, determinando perda de algumas funções espermáticas, assim como redução de motilidade total, motilidade progressiva e número de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras (CARVALHO et al., 2010).

A indisponibilidade de sêmen sexado de diferentes touros da raça trabalhada no presente estudo obrigou a se trabalhar com um único indivíduo, sem prévia seleção, o que pode ter determinado a baixa taxa de fertilidade, uma vez que a tolerância dos espermatozóides de bovinos ao processo de sexagem por citometria de fluxo mostra-se bastante variada (ALOMAR et al., 2008; DEJARNETTE et al., 2008; GARNER, 2009), sendo necessária uma seleção dos indivíduos que apresentem melhores resultados na IA, com sêmen convencional, com baixa concentração de espermatozoide. Após a sexagem, alíquotas de sêmen devem ser avaliadas quanto à motilidade, morfologia e integridade da membrana e do acrossoma espermático, antes e após o teste de termotolerância, preferencialmente por 6 h, visando à obtenção de taxas de fertilidade aceitáveis (RATH et al., 2009).

A maior porcentagem de estruturas fertilizadas obtida com IA 24 e 36 h após LH (G3), em relação às obtidas com IA 12 e 24 h após LH (G2), pode ser explicado pelo fato das inseminações terem sido realizadas no horário de ocorrência do maior número de ovulações, uma vez que estudos demonstraram que a utilização de indutores da ovulação podem reduzir o intervalo entre a primeira e a última ovulação, sendo de 53 para 7,6 h (CHESTA et al., 2005), ou concentrar 75% das ovulações no intervalo de 24 a 36 h após a aplicação do LH (MARTINS, 2007). Entretanto, a ausência de estudos relatando o uso de sêmen sexado em vacas superovuladas com protocolos utilizando indutores de ovulação dificulta a comparação dos resultados deste estudo.

Por outro lado, evidências disponíveis apontam para uma falta de espermatozoides no local da fertilização, como a causa mais frequente de falhas na fertilização (SCHENK et al., 2006). Dalton et al. (2000), reportam taxas de fertilização obtidas com IA realizada entre 0 e 12 h após o início do estro menores quando comparadas às obtidas com IA realizada 24 h após o início do estro em vacas superovuladas, atribuindo isso à perda de espermatozoides no trato genital da fêmea, causada pelo fluxo retrógrado ou pela redução da capacidade fertilizante dos espermatozoides encontrados nos reservatórios do sistema genital feminino. Esse efeito também pode ser observado em vacas com ovulações simples, pois maiores taxas de prenhez são obtidas quando o intervalo entre a IA e a ovulação é menor que 16 h, quando comparados a intervalos de 16 a 32 h ou 32 a 48 h, como relatado por Hockey et al. (2010).

No presente estudo, observou-se grande número de embriões degenerados, sobretudo no grupo G1. Este resultado indica que, aliado aos danos espermáticos que diminuem a eficiência da fertilização, pode ter havido injúrias espermáticas, que possivelmente comprometeram o desenvolvimento embrionário pós-fertilização, como sugerido por SARTORI et al. (2004). Uma outra hipótese é que este resultado também estaria relacionado ao estresse térmico ao qual as doadoras foram expostas, devido às condições climáticas adversas da região durante o período do estudo onde a temperatura e a umidade relativa do ar máxima diária chegou a 32,3°C e a 100%, respectivamente.

Os efeitos do estresse térmico sobre a fertilidade pode estar associado à diminuição das taxas de fertilização (SARTORI et al., 2010), bem como, provavelmente, ao comprometimento da qualidade do oócito que pode alterar o desenvolvimento embrionário (EDWARDS et al., 2009). Este conceito foi demonstrado em novilhas superovuladas da raça Holandesa submetidas a estresse térmico de 42 °C por 10 h diárias, durante 7 dias, no início do estro, não sendo observado efeito significativo do estresse térmico sobre as taxas de fertilização. Entretanto as novilhas expostas ao estresse térmico tiveram um aumento no

número de embriões degenerados quando o útero foi lavado no D7 após o estro (PUTNEY et al., 1989).

O comprometimento da qualidade embrionária causada pelo estresse térmico também foi evidenciado em pesquisas relatando que períodos prolongados de temperatura e umidade elevadas determinam menores taxas de prenhez em vacas submetidas a IA, quando comparadas àquelas que receberam embriões produzidos em época do ano de maior conforto térmico, provando que o período de maior sensibilidade dos embriões consiste do momento da fertilização até os 7 dias de seu desenvolvimento (DROST et al., 1999).

o presente trabalho constatou a queda da qualidade de embriões coletados de vacas *Bos taurus* criadas em condições de clima tropical, haja vista a ocorrência de temperatura e umidade elevadas. No entanto, no que diz respeito à utilização de sêmen sexado, os resultados deste estudo sinalizam um caminho para se alcançar melhores resultados em vacas *Bos taurus* superovuladas.

## **5 CONCLUSÃO**

Em protocolos com indução de ovulação em vacas *Bos taurus* superovuladas e submetidas à inseminação artificial com sêmen sexado, as IAs podem ser realizadas 24 e 36 h após a administração de LH. No entanto, o presente estudo constatou que o sêmen convencional apresenta maior taxa de fertilidade quando comparado ao sêmen sexado.

## **6 AGRADECIMENTOS**

Ao Sr. José Maria Andrade, por proporcionar a estrutura física e financeira para o desenvolvimento do experimento; à Dra. Isabel Souza, pelo apoio pessoal e empresarial, através da TECNOPEC, para o desenvolvimento da pesquisa; e a FACEPE, pela concessão da bolsa de mestrado ao primeiro autor.

## 7 REFERÊNCIAS

ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE, F.; PAUL, D.; DONNAYA, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 48–61, 2008.

ANDRADE, J.C.O.; OLIVEIRA, M.A.L.; SANTOS FILHO, A.S.; WISCHRAL, A.; LIMA, P.F.; SOUZA, D.M.B. Diferentes protocolos de superovulação em vacas Nelore. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 317-318, 1999.

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.

BARROS, C.M.; NOGUEIRA M.F.G. Embryo Transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1463-1496, 2001.

BEILBY, K.H.; GRAAF, S.P.; GRUPEN, C.G. The effect of sperm and cryoprotectant concentration on the freezing success of sex sorted ram sperm for *in vitro* fertilization. **Theriogenology**, v. 74, p. 786-794, 2010.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; CHESTA, P.M.; MARTINS, C.M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 89-101, 2006.

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

CHESTA, P.; MARAÑA, D.; PERES, L.; BÓ, G.A. Effect of Time of Removal of a Progesterone Releasing Device and GnRH Treatment on the Interval to and Distribution of Ovulations in Superstimulated Beef Cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 288-288, 2005.

DALTON, J. C.; NADIR, S.; BAME, J. H.; NOFTSINGER, M.; SAACKE, R. G. The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 2081-2085, 2000.

DEJARNETTE, J.M.; NEBEL, R.L.; MARSHALL, C.E.; MORENO, J.F.; MCCLEARY, C.R.; LENZ, R.W. Effect of Sex-sorted Sperm Dosage on Conception Rates in Holstein Heifers and Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1778-1785, 2008.

D'ÓCCHIO, M.J.; SUDHA, G.; JILLELLA, D.; WHYTE, T.; MACLELLAN, L.J.; WALSH, J.; TRIGG, T.E.; MILLER, D. Use of a GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. **Theriogenology**, v. 47, p. 601-613, 1996.

DROST, M.; AMBROSE, J.D.; THATCHER, M-J.; CANTRELL, C.K.; WOLFSDORF, K.E.; HASLER, J.F.; THATCHER, W.W. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in florida. **Theriogenology**, v. 52, p. 1161-1167, 1999.

EDWARDS, J. L.; BOGART, A. N.; RISPOLI, L. A.; SAXTON, A. M.; SCHRICK, F. N. Developmental competence of bovine embryos from heatstressed ova. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 563-570, 2009.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. 2008. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Acessado em: 03 fev. 2011.

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

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

HAYAKAWA, H.; HIRAI, T; TAKIMOTO, A.; IDETA, A.; AOYAGI, Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 71, p. 78-63, 2009.



HOCKEY, C.D.; MORTON, J.M.; NORMAN, S.T.; MCGOWAN, M.R. Improved prediction of ovulation time may increase pregnancy rates to artificial insemination in lactating Dairy Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 239-248, 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA – INMET. Dados: temperatura e umidade (máxima, mínima e média) mensais e precipitação pluviométrica das estações de Arcoverde-PE e Garanhuns-PE adquiridos junto a sede do INMET em Recife, Pernambuco. 2010.

LARSON, J.E.; LAMB, G.C.; FUNNELL, B.J.; BIRD, S.; MARTINS, A.; RODGERS, J.C. Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 73, p. 698-703, 2010.

LU, K.H.; CRAN, D.G.; SEIDEL JR, G.E. In vitro Fertilization with Flow-Cytometrically-Sorted Bovine Sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1393-1405, 1999.

MARTINS, C.M.; CASTRICINI, E.C.S.; REIS, E.L.; TORRES-JUNIOR, J.R.S.; GIMENES, L.U.; SÁ FILHO, M.F.; BARUSELLI, P.S. Embryo Production in Holstein Cows at Different Protocols of Superstimulation with Fixed Time Artificial Insemination. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 287-287, 2005.

MARTINS, C.M. **Diferentes Protocolos de Superovulação com Inseminação Artificial em Tempo Fixo em *Bos taurus* e *Bos indicus***. 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.

MEIRELLES, C.; KOZICKI, L.E.; WEISS, R.R.; SEGUI, M.S. Inseminação intracornual profunda em bovinos com dose reduzida de sêmen. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17, 2007, Curitiba, PR. **Anais.... CBRA**, p. 200, 2007.

PEIPPO, J.; VARTIA, K.; KANANEN-ANTTILA, K.; RÄTY, M.; KORHONEN, K.; HURME, T.; MYLLYMÄKI, H.; SAIRANEN, A.; MÄKI-TANILA, A. Embryo production from superovulated Holstein-Friesian dairy heifers and cows after insemination with frozen-thawed sex-sorted X spermatozoa or unsorted semen. **Animal Reproduction Science**, v. 111, p. 80-92, 2009.

PUTNEY, D.J.; MULLINS, S.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; GROSS, T. S. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 19, p. 37-51, 1989.

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

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. **Transferência e criopreservação de embriões bovinos**. In: GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*, São Paulo: Varela, p. 153-160, 2002.

ROBERTSON, I.; NELSON, R.E. In: STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embrião (IETS)**. 3ª Ed. p.112-113. 1998.

SAS INSTITUTE. SAS: User's guide: statistics. Version 8.2 6<sup>th</sup> ed. Cary: SAS Institute Inc., 2002.

SARTORI, R.; BASTOS, M.R.; WILTBANK, M.C. Factors affecting fertilization and early embryo quality in single and superovulated dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 151-158, 2010.

SARTORI, R.; SOUZA, A.H.; GUENTHER, J.N.; CARAVIELLO, D.Z.; GEIGER, L.N.; SCHENK, J.L.; WILTBANK M.C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 86-90, 2004.

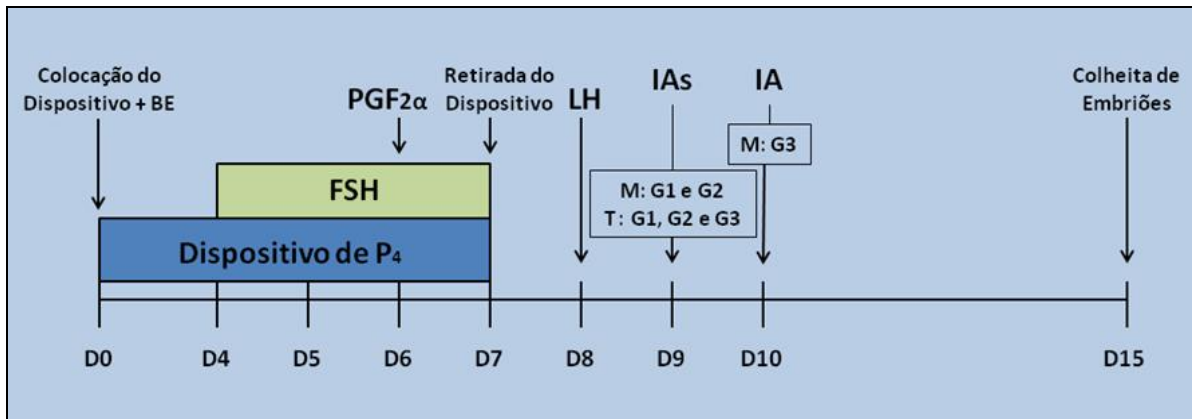
SCHENK, J.L., SUH, T.K., CRAN, D.G., SEIDEL JR., G.E. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 52, p. 1375–1391, 1999.

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

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

VIANA, J. H. M. Estado atual da transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* de embriões (FIV) no Brasil e no mundo. **O Embrião**, n. 29, p. 1-3, out/nov/dez. 2006.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 915-924, 2007.



**Figura 1** – Desenho esquemático do protocolo de sincronização de estro e superovulação em vacas *Bos taurus* doadoras de embrião, inseminadas em dois momentos de acordo com o grupo experimental. P<sub>4</sub> – Progesterona; BE – Benzoato de Estradiol; PGF<sub>2α</sub> – Prostaglandina F<sub>2α</sub>; FSH – Hormônio Folículo Estimulante durante 4 dias, duas vezes/dia; LH – Hormônio Luteinizante; G1 e G2 – IAs D9 manhã e tarde; G3 – IAs D9 tarde e D10 manhã.

**Tabela 1** – Produção de embriões de vacas *Bos taurus* superovuladas e inseminadas com sêmen convencional (12 e 24 h após LH; G1) ou sêmen sexado (12 e 24 h após LH; G2) (24 e 48 h após LH; G3)

	Tratamento		
	G1 (n=8)	G2 (n=9)	G3 (n=5)
Total de Estruturas Recuperadas	69	90	52
Estruturas Recuperadas por Lavado	8,63 ± 5,37	10,00 ± 7,23	10,40 ± 11,25
Total Estruturas Fertilizadas	42	9	19
Estruturas Fertilizadas por Lavado	5,25 ± 6,84	1,00 ± 1,00	3,80 ± 7,43
Percentual de Estruturas Fertilizadas (%)	60,87 <sup>a</sup>	10,00 <sup>c</sup>	36,54 <sup>b</sup>
Total de Embriões Degenerados	5,38 ± 6,41	0,67 ± 1,00	1,40 ± 3,13
Total de Estruturas Não Fertilizadas	2,38 ± 2,56	9,00 ± 7,45	6,60 ± 3,44

<sup>a,b,c</sup> Letras diferentes na mesma linha, diferença significativa (p<0,05).