

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DO MOMENTO DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN  
SEXADO NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES DE DOADORAS DA RAÇA  
NELORE (*Bos indicus*) SUPEROVULADAS**

**JÚLIA GLEYCI SOARES**

**São Luís  
2011**

JÚLIA GLEYCI SOARES

**EFEITO DO MOMENTO DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN  
SEXADO NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES DE DOADORAS DA RAÇA  
NELORE (*Bos indicus*) SUPEROVULADAS**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Ciência Animal como requisito  
parcial para obtenção do título de  
Mestre em Ciência Animal.

**Area de concentração:**  
Reprodução Animal

**Orientador:**  
Profa. Dra. Alessandra Corallo Nicacio

**São Luís  
2011**

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

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

Biblioteca da Universidade Estadual do Maranhão

Soares, Júlia Gleyci.

Efeito do momento da Inseminação Artificial com Sêmen Sexado na Produção de Embriões de Doadoras da Raça Nelore (*Bos indicus*) Superovuladas / Júlia Gleyci Soares. – São Luís, 2011.

77 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

Programa de Pós-Graduação: Ciência Animal

Área de concentração: Reprodução Animal

Orientador: Profa Dra. Alessandra Corallo Nicacio

1. Nelore. 2. Sêmen Sexado. 3. Superovulação em Tempo Fixo. 4. Embriões. 5. Oócitos. I. Título.

CDU: 636.291.082



Universidade Estadual do Maranhão  
Centro de Ciências Agrárias  
Curso de Medicina Veterinária  
Comissão de Ética e Experimentação Animal – CEEA

DECISÃO DA CEEA/CMV/UEMA

DATA DA ENTRADA DO PEDIDO: 01/09/2010

NÚMERO DO PROCESSO: 28/2010

NÚMERO DO PARECER: 28/2010

DATA DO PARECER: 17/09/2010

TÍTULO DO PROJETO: Utilização de Sêmen sexado em protocolo para superovulação e transferência de embrião de nelore (*Bos Indicus*).

OBJETIVO: Adequar um protocolo para utilização da sêmen sexado na transferência de embriões em doadoras *Bos indicus*.

CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA: Serão utilizado 16 fêmeas multíparas *Bos indicus* serão submetidas as diferentes tratamentos, sendo 4 animais em cada grupo.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Júlia Gleyci Soares (orientada) e Alessandra Corallo Nicacio (orientadora).

EQUIPE/COLABORADORES: Pietro Sampaio Baruselli e Nelcio Antonio Tonizza de Carvalho e Claudiney de Melo Martins.

- APROVADO
- APROVADO COM RECOMENDAÇÃO
- EM PENDÊNCIA PARA ADEQUAÇÃO DE SUGESTÕES
- NÃO APROVADO

PARECER/RECOMENDAÇÃO: Projeto aprovado por atender as normas da Resolução do CFMV nº 879/2008 e a Lei nº 11794/2008 que tratam dos procedimentos Éticos na Experimentação Animal.

ASSINATURA PRESIDENTE

DATA: 20 / 09 / 2010

  
Prof. Dr. Alana Lúcia de Sousa  
MV / UEMA / 9357

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SOARES, Júlia Gleyci

Título: Efeito do momento da Inseminação Artificial com Sêmen Sexado na Produção de Embriões de Doadoras da Raça Nelore (*Bos indicus*) Superovuladas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Dissertação de mestrado defendida e aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:



---

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli  
Departamento de Reprodução Animal – Universidade de São Paulo



---

Prof. Dr. José Ribamar de Sousa Torres Júnior  
Universidade Federal do Maranhão



---

Profa. Dra. Alessandra Corallo Nicacio  
Universidade Federal do Pampa  
(Orientadora)

*A Deus dedico, pelo dom da vida.  
Aos meus pais, pelo infinito apoio incondicional.  
Aos meus irmãos, por serem tão especiais.  
À minha tia Selma e minha prima Sarah, pelo constante afeto.  
Aos meus avós, pelo exemplo de simplicidade.*

## *AGRADECIMENTOS*

*A Deus, por iluminar todos os meus passos, permitindo que mesmo nos caminhos mais tortuosos eu tenha conforto, na fé de que Ele é o verdadeiro caminho.*

*À minha família, minha base, em especial aos meus pais: Telma e Gregório, pela educação que me proporcionaram, amor e apoio em tudo na minha vida.*

*À Professora Doutora Alessandra Corallo Nicacio, pela orientação, disponibilidade em cruzar o país para acompanhar os experimentos, paciência, coragem e determinação em trabalhar e repassar seus conhecimentos.*

*Ao pesquisador Doutor Nélcio Antonio de Tonizza Carvalho, por ser fundamental na realização deste trabalho, auxiliando em todas as etapas, por sua solicitude e boa vontade nas diversas viagens, profissionalismo, caráter, companheirismo e apoio.*

*À Professora Doutora Ana Lúcia Abreu Silva, pelos conselhos responsáveis pela oportunidade de adentrar no mestrado em Ciência Animal, pelo exemplo de professora atuante em prol dos alunos e da universidade, e pela colaboração neste trabalho.*

*Ao Professor Doutor Pietro Sampaio Baruselli, admirável pesquisador, pela colaboração essencial para execução deste trabalho, sempre contribuindo todas as vezes que foi solicitado.*

*Ao mestrado em Ciência Animal, pelo auxílio concedido durante o curso.*

*Aos Professores do mestrado, pelos ensinamentos.*

*Aos Professores membros da banca examinadora, pela gentileza em aceitarem o convite e por suas contribuições para o trabalho.*

*À Fazenda São Luís Eldorado, pela gentileza em disponibilizar os animais para execução deste trabalho, em especial, Sr. Ibrahim, Paulo, Lorival, Lúcia e Ronaldo.*

*Ao Mestre Claudiney e sua esposa Priscila, pelo auxílio durante as colheitas de embriões, pela agradável e enriquecedora oportunidade de trabalharmos juntos.*

*Ao VRA, pelas excelentes disciplinas que tive a oportunidade de cursar e experiência adquirida em laboratórios, contribuindo para meu crescimento profissional.*

*Aos pós-graduandos do VRA: Marcílio, Manoel e Zé Nélio que auxiliaram na análise estatística, Renata e Flávia pela paciência e aprendizados nos laboratórios.*

*Aos pós-graduandos do mestrado em Ciência Animal: Aline, Arannadia, Érico, Lidiane, Manoel, Paulinha e Takashi pela convivência prazerosa, em especial Andréa, Joicy, Herlon, Lucélia e Ysieux, pelos momentos divertidíssimos e pela amizade.*

*Aos grandes amigos: Ana Patricia, Fernando, Kaio, Priscila e Verônica, pela amizade sincera e verdadeira.*

*Aos funcionários: Carol, Patrícia e Dona Socorro pelo trabalho indispensável.*

*Aos estagiários Lucas e André, que contribuíram nos trabalhos na fazenda.*

*Ao PROCAD, em nome da Profa Dra Alana Lislea, pelo auxílio em minhas viagens à São Paulo e ao Paraná.*

*Às empresas que colaboraram: OuroFino Saúde Animal, WTA, Sexing Technologies Brazil, sem as quais, não poderia ser possível a realização deste experimento.*

*À FAPFEMA e à CAPES pela bolsa concedida.*

*A todos que contribuíram de alguma forma para concretização desta dissertação.*

*Muito obrigada.*



SOARES, J.G. **Efeito do momento da Inseminação Artificial com Sêmen Sexado na Produção de Embriões de Doadoras da Raça Nelore (*Bos indicus*) Superovuladas.** [Timing effect of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with Nelore (*Bos indicus*) superovulated donors]. 2011. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

## RESUMO

Foi avaliado o efeito do momento da IATF com sêmen sexado na produção de embriões de doadoras da raça Nelore (*Bos indicus*) superovuladas. Para tanto, foram utilizadas 16 doadoras cíclicas, com idade entre 4 e 10 anos, e pós parto superior a 40 dias. Os animais foram homoganeamente divididos em quatro grupos experimentais, de acordo com o momento da IATF (12 e 24 vs. 18 e 30h após a administração de pLH) e o tipo de sêmen utilizado (convencional vs. sexado). Os grupos foram divididos da seguinte forma: IATF com sêmen convencional 12 e 24h (GSC12/24) e, 18 e 30h (GSC18/30); IATF com sêmen sexado 12 e 24h (GSS12/24) e, 18 e 30h (GSS18/30). O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2, sendo que todos os animais, em suas respectivas categorias, foram submetidos a todos os tratamentos (delineamento “cross-over”) num total de quatro réplicas, com intervalo de 42 dias entre réplicas e 16 repetições por tratamento. As doadoras foram sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona (P<sub>4</sub>) durante 7 dias. No dia de inserção do dispositivo (D0) foi administrado 2,0mg i.m. de Benzoato de Estradiol. Do D4 ao D7, as doadoras foram tratadas com oito doses decrescentes de FSH (133mg i.m.; 12/12h). No D6, todos os animais receberam duas aplicações de PGF<sub>2α</sub> (0,53mg i.m.) após cada aplicação de FSH. Na última dose de FSH (D7) o dispositivo de P<sub>4</sub> foi removido e, as doadoras receberam a administração de pLH 12h mais tarde (25mg i.m.; D8). As estruturas embrionárias foram colhidas sete dias após a aplicação do pLH (D15) e, foram quantificadas e classificadas quanto à morfologia e qualidade (IETS, 1998). As variáveis foram analisadas pelo procedimento proc GLM do SAS<sup>®</sup>. Nos grupos GSC12/24, GSC18/30, GSS12/24 e GSS18/30 foram recuperados, respectivamente: total de estruturas embrionárias (2,9 ± 1,1, 3,4 ± 0,8, 2,6 ± 1,2, 4,1 ± 1,3); óocitos não fecundados (0,0 ± 0,0, 0,1 ± 0,1, 1,7 ± 1,2, 0,4 ± 0,2); embriões transferíveis (2,6 ± 1,0, 2,7 ± 0,7, 0,5 ± 0,3, 2,2 ± 1,0); congeláveis (2,4 ± 1,0, 2,7 ± 0,7, 0,5 ± 0,3, 2,0 ± 1,0) e degenerados (0,3 ± 0,1, 0,7 ± 0,4, 0,4 ± 0,3, 1,5 ± 0,8). Não houve diferenças entre os grupos (P > 0,05). Como não foi verificada interação entre os tratamentos, foi possível avaliar os efeitos principais (tipo de sêmen e momento da inseminação). Não foi encontrada diferença para nenhuma das variáveis analisadas entre os efeitos principais (P > 0,05). Os resultados obtidos não confirmaram a hipótese de que o atraso em seis horas na IATF com sêmen sexado em protocolos de superovulação resulta em aumento na produção de embriões viáveis obtidos de doadoras da raça Nelore.

Palavras-Chave: Nelore, Sêmen sexado, Superovulação em Tempo Fixo, Embriões, Óocitos.

SOARES, J.G. **Timing effect of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with Nelore (*Bos indicus*) superovulated donors.** [Efeito do Momento da Inseminação Artificial Utilizando Sêmen Sexado na Produção de Embriões de Doadoras da Raça Nelore (*Bos indicus*) Superovuladas]. 2011. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.

### ABSTRACT

The effect of the moment of TAI with sex-sorted sperm in embryo production of Nelore (*Bos indicus*) superovulated donors was evaluated. To this end, 16 cycling donors were used, aged between 4 and 10 years, and postpartum than 40 days. The animals were divided evenly into four groups, according to the moment of TAI (12 and 24 vs. 18 and 30h after administration of pLH) and type of sperm used (conventional vs. sex-sorted). The groups were divided as follows: TAI with conventional sperm 12 and 24h (CSG12/24) and, 18 and 30h (CSG18/30); TAI with sex-sorted sperm 12 and 24h (SSG12/24) and, 18 and 30h (SSG18/30). The design was completely randomized, in a 2x2 factorial scheme, with all the animals in their respective categories, submitted to all treatments (randomized *cross-over*) in a total of four replicates, with an interval of 42 days between replicates and 16 repetitions per treatment. Donors were synchronized with intravaginal progesterone device (P<sub>4</sub>) for 7 days. On the day of device insertion (D0) was administered 2.0mg i.m. of Estradiol Benzoate. From D4 to D7, all donors were treated with 8 decreasing doses of FSH (133mg i.m.; 12/12h). On D6, all animals received two applications of PGF<sub>2α</sub> (0.53mg i.m.) after each application of FSH. At the last dose of FSH (D7) the P<sub>4</sub> device was removed and, donors received the administration of pLH 12h later (25mg i.m.; D8). The embryonic structures were collected seven days after application of LHp (D15) and, were quantified and classified according to morphology and quality (IETS, 1998). The variables were analyzed by Proc GLM procedure of SAS<sup>®</sup>. In groups GSC12/24, GSC18/30, GSS12/24 and GSS18/30 were recovered, respectively: total of embryonic structures ( $2.9 \pm 1.1$ ,  $3.4 \pm 0.8$ ,  $2.6 \pm 1.2$ ,  $4.1 \pm 1.3$ ); unfertilized oocytes ( $0.0 \pm 0.0$ ,  $0.1 \pm 0.1$ ,  $1.7 \pm 1.2$ ,  $0.4 \pm 0.2$ ); transferable embryos ( $2.6 \pm 1.0$ ,  $2.7 \pm 0.7$ ,  $0.5 \pm 0.3$ ,  $2.2 \pm 1.0$ ); freezable ( $2.4 \pm 1.0$ ,  $2.7 \pm 0.7$ ,  $0.5 \pm 0.3$ ,  $2.0 \pm 1.0$ ) and degenerate ( $0.3 \pm 0.1$ ,  $0.7 \pm 0.4$ ,  $0.4 \pm 0.3$ ,  $1.5 \pm 0.8$ ). There were no differences between groups ( $P > 0.05$ ). As there was no interaction between treatments, it was possible to evaluate the main effects (type of sperm type and moment of insemination). As verified between groups, no difference was found for any of the variables analyzed between the main effects ( $P > 0.05$ ). The results did not confirm the hypothesis that the delay in six hours in the FTAI with sex-sorted sperm in superovulation protocols results in increased production of viable embryos obtained from Nelore donors.

**Keywords:** Nelore, Sex-sorted sperm, Fixed-Time Superovulation, Embryos, Oocytes.

## SUMARIO

|          |   |    |
|----------|---|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....   | 18 |
| <b>2</b> | <b>HIPOTESE</b> .....   | 21 |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....  | 22 |
| 3.1      | Geral.....  | 22 |
| 3.2      | Específicos.....  | 22 |
| <b>4</b> | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....  | 23 |
| 4.1      | Dinâmica folicular e controle endócrino do ciclo estral.....  | 23 |
| 4.2      | Controle do crescimento folicular e da ovulação em programas de superovulação de doadoras zebuínas..... | 26 |
| 4.3      | Sêmen Sexado.....   | 31 |
| 4.4      | Utilização de sêmen sexado em programas de superovulação para produção de embriões.....                 | 36 |
| <b>5</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 40 |
| 5.1      | Animais.....  | 40 |
| 5.2      | Instalações e manejo nutricional.....   | 40 |
| 5.3      | Delineamento experimental.....  | 41 |
| 5.4      | Protocolo para superovulação e inseminação artificial em tempo fixo... ..                               | 41 |
| 5.5      | Avaliações ultrassonográficas.....  | 44 |
| 5.6      | Avaliação das taxas de ovulação e de recuperação das estruturas embrionárias.....                       | 44 |
| 5.7      | Colheita e avaliação das estruturas embrionárias.....   | 45 |
| 5.8      | Breve descrição do procedimento de sexagem.....   | 45 |
| 5.9      | Análise estatística.....  | 46 |
| <b>6</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | 47 |
| 6.1      | Resposta folicular, taxa de ovulação e distribuição das ovulações.....                                  | 47 |
| 6.2      | Recuperação das estruturas embrionárias.....  | 47 |
| <b>7</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | 53 |
| <b>8</b> | <b>CONCLUSÕES</b> .....   | 59 |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b> .....  | 60 |

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Estruturas embrionárias obtidas das doadoras pertencentes aos grupos GSC12/24, GSC18/30, GSS12/24 e GSS18/30 ( $P > 0,05$ ). Santa Helena - PR, 2010..... 49
- Tabela 2 - Efeito do tipo de sêmen (convencional vs. sexado) e do momento da inseminação (12 e 24 vs. 18 e 30h após a administração de pLH) na produção de estruturas embrionárias de doadoras Nelore superovuladas. Santa Helena - PR, 2010..... 52

## LISTA DE QUADROS

|  |    |
|--|----|
| Quadro 1 - Protocolo para superestimulação do crescimento folicular em doadoras da raça Nelore, com aplicação de 133mg de FSH..... | 42 |
|--|----|

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Doadoras da raça Nelore da Fazenda São Luís Eldorado. Santa Helena – PR..... 40
- Figura 2 - Representação esquemática do protocolo de superovulação utilizado nos grupos sêmen convencional e sexado com inseminações realizadas 12 e 24h após a administração de pLH (GSC12/24 e GSS12/24)..... 43
- Figura 3 - Representação esquemática do protocolo de superovulação utilizado no grupo sêmen convencional e sexado com inseminações realizadas 18 e 30h após a administração de pLH (GSC18/30 e GSS18/30)..... 43

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Distribuição das ovulações sincronizadas após a administração de pLH em doadoras da raça Nelore superovuladas. Santa Helena - PR, 2010..... 48
- Gráfico 2 - Taxa de recuperação das estruturas embrionárias obtidas das doadoras pertencentes aos grupos GSC12/24, GSC18/30, GSS12/24 e GSS18/30. Santa Helena - PR, 2010..... 48
- Gráfico 3 - Número de estruturas embrionárias, embriões transferíveis e congeláveis obtidos das doadoras pertencentes aos grupos GSC12/24, GSC18/30, GSS12/24 e GSS18/30. Santa Helena - PR, 2010..... 50
- Gráfico 4 - Número de mórula, blastocisto inicial e blastocisto obtidos das doadoras pertencentes aos grupos GSC12/24, GSC18/30, GSS12/24 e GSS18/30. Santa Helena - PR, 2010..... 50
- Gráfico 5 - Número de estruturas embrionárias, embriões degenerados e oócitos não fecundados obtidos das doadoras pertencentes aos grupos GSC12/24, GSC18/30, GSS12/24 e GSS18/30. Santa Helena -PR, 2010..... 51

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

|                |  |
|----------------|--|
| %              | porcentagem  |
| ±              | mais ou menos  |
| ≥              | maior ou igual   |
| ≤              | menor ou igual   |
| ®              | marca registrada   |
| β              | beta   |
| °C             | graus Celsius  |
| μm             | micrômetros  |
| AMPc           | adenosina monofosfato cíclico                                |
| BE             | benzoato de estradiol  |
| CE             | cipionato de estradiol                                       |
| CL             | corpo lúteo  |
| CLs            | corpos lúteos  |
| DNA            | ácido desoxirribonucleico                                    |
| DPBS           | Dulbecco's phosphate buffered saline                         |
| E <sub>2</sub> | estradiol  |
| eCG            | gonadotrofina coriônica equina                               |
| epm            | erro padrão da média   |
| esptz          | espermatozóide(s)  |
| FAO            | Organização das nações unidas para agricultura e alimentação |
| FIV            | fecundação <i>in vitro</i>                                   |
| FSH            | hormônio folículo estimulante                                |
| GnRH           | hormônio liberador de gonadotrofinas                         |
| gr             | grama  |
| h              | horas  |
| hCG            | gonadotrofina coriônica humana                               |
| IA             | inseminação artificial                                       |
| IAs            | inseminações artificiais                                     |



|                   |   |
|-------------------|---|
| IATF              | inseminação artificial em tempo fixo  |
| IATFs             | inseminações artificiais em tempo fixo  |
| IETS              | International Embryo Transfer Society<br>(Sociedade Internacional de Transferência de Embriões) |
| IGF               | fator de crescimento semelhante à insulina  |
| IGFBP-4           | proteínas ligadoras de fator de crescimento semelhante a insulina-4                             |
| im                | intra muscular  |
| km                | quilômetros   |
| LH                | hormônio luteinizante   |
| LHr               | receptor para o LH  |
| MAPA              | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento   |
| mg                | miligrama   |
| MHz               | megaHertz   |
| mL                | mililitro   |
| mm                | milímetro   |
| mRNA              | ácido ribonucleico mensageiro   |
| ng/ml             | nanogramas por ml   |
| NRC               | Nutritional Requirements Council  |
| P                 | nível de significância  |
| P <sub>4</sub>    | progesterona  |
| PGF <sub>2α</sub> | prostaglandina F 2 alfa   |
| pLH               | hormônio luteinizante de pituitária suína   |
| pH                | potencial hidrogeniônico  |
| PO                | puro de origem  |
| Psi               | unidade de pressão sistema Inglês   |
| s                 | segundos  |
| SFB               | soro fetal bovino   |
| SOV               | superovulação   |
| SOVTF             | superovulação e inseminação em tempo fixo   |

|    |                           |
|----|---------------------------|
| TE | transferência de embriões |
| UI | unidades internacionais   |
| US | ultrassom                 |
| VE | valerato de estradiol     |

## 1 INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um dos principais destaques do agronegócio brasileiro no cenário mundial. No Brasil, o rebanho de bovinos de corte que é representado principalmente pela raça Nelore (*Bos indicus*) e seus cruzamentos, perfazem um efetivo de 202,2 milhões de cabeças (IBGE, 2009). Além disso, desde 2004, o país assumiu a liderança mundial nas exportações de carne e embutidos, sendo responsável por um quinto da carne comercializada internacionalmente e por vendas para mais de 180 países (MAPA, 2011). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2011) as exportações brasileiras de carne bovina representarão cerca de 60% do comércio mundial em 2018/2019.

A produção global anual de carne deverá crescer para 463 milhões de toneladas até 2050 ante 228 milhões de toneladas produzidas atualmente, seguida por forte crescimento da demanda global por produtos pecuários até 2050 devido a aumentos populacionais (FAO, 2011). Portanto, serão necessários investimentos substanciais no setor pecuário para ampliar a produção, o que deverá estar associado ao controle da produtividade. Nesse contexto, a utilização das biotecnologias da reprodução torna-se imprescindível para a multiplicação e distribuição dos animais com mérito genético.

Dentre as biotecnologias disponíveis, a transferência de embriões (TE) tem sido amplamente aplicada em todo o mundo. Por meio desta ferramenta é possível aumentar o número de descendentes obtidos de doadoras de alto valor genético, propagando genética desejável de maneira segura (BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2006). Aliado à esta tecnologia, o uso de sêmen sexado em bovinocultura de corte e leite é de suma importância para o desempenho do agronegócio, pois possibilita aumentar a produção de bezerros de gêneros específicos (GARNER et al., 2006). O controle da proporção de sexos permite maior velocidade no progresso genético, maior produtividade, maior bem-estar e redução no impacto ambiental devido a eliminação do sexo indesejado (RATH et al., 2009).

A produção de embriões para TE pode ser obtida pelo uso de protocolos de superovulação (SOV), pela fecundação *in vitro* (FIV) ou pela técnica de clonagem. Os protocolos tradicionais de SOV baseados na detecção do estro apresentam limitações, especialmente importantes em doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus* de alta produção, devido às dificuldades na detecção do estro inerentes a estas categorias (BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2003). Em função disso, foram desenvolvidos protocolos hormonais para controlar a emergência da onda de crescimento folicular e a ovulação, e para permitir o início de tratamentos superestimulatórios e a inseminação artificial em momento pré-determinado, sem a necessidade de detecção de cio (BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2006).

O controle do momento da ovulação, juntamente com protocolos de SOB, pode ser realizado por meio do atraso na remoção de dispositivos de liberação de progesterona/progestágeno e posterior administração de hormônio luteinizante de glândula pituitária suína (pLH) para indução da ovulação (NOGUERIA et al., 2002; BARUSELLI et al., 2006). Nestes protocolos, a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus* superestimuladas deve ser realizada 12 e 24 após a administração de pLH, quando o sêmen convencional é utilizado (BARUSELLI et al., 2006; BÓ et al., 2006). No entanto, o mesmo procedimento pode apresentar limitações com o emprego do sêmen sexado.

Vários fatores como o número de inseminações, qualidade do sêmen, número de espermatozoides por inseminação e local de deposição do sêmen podem afetar a produção de embriões seguida de IA com sêmen sexado (SARTORI et al., 2004; SCHENK et al., 2006; PEIPPO et al., 2009; LARSON et al., 2010).

Em estudos recentes com sêmen sexado em fêmeas da raça Nelore foram verificadas correlações positivas entre o momento da realização da IA após a detecção do estro (SÁ FILHO et al., 2010) ou da IATF após a remoção do dispositivo de P<sub>4</sub> (SALES et al., 2010) e a taxa de prenhez. As IAs ou IATFs realizadas próximas às ovulações resultaram em maiores taxas de prenhez. Este resultado, porém, é desconhecido em protocolos de SOV.

Diante do exposto, o presente estudo foi conduzido para avaliar o efeito do momento da IATF com sêmen sexado na produção de embriões de doadoras Nelore (*Bos indicus*) superovuladas.

## **2 HIPÓTESE**

O atraso em seis horas na IATF com sêmen sexado em protocolos de superovulação resulta em aumento na produção de embriões viáveis obtidos de doadoras da raça Nelore.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

- Avaliar o efeito do momento da IATF com sêmen sexado na produção de embriões de doadoras da raça Nelore (*Bos indicus*) superovuladas.

#### **3.2 Específicos**

- Acompanhar a dinâmica folicular para determinar a resposta ao tratamento de superestimulação do crescimento folicular, o momento e a taxa das ovulações;
- Avaliar a produção de estruturas embrionárias viáveis obtidas com o uso de sêmen convencional ou sexado, de acordo com o momento das inseminações (12 e 24 ou 18 e 30 horas após a administração de pLH).

## 4 REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1 Dinâmica folicular e controle endócrino do ciclo estral

O conhecimento da dinâmica folicular e do padrão de comportamento das ondas de crescimento folicular é de fundamental importância para programas de reprodução, tais como no emprego de protocolos de superovulação (SOV), sincronizações do ciclo estral e ovulação (SILVA et al., 2001).

Em bovinos, o desenvolvimento folicular ocorre em padrão de ondas, sendo cada onda de crescimento folicular caracterizada pelo recrutamento de um grupo de pequenos folículos (emergência folicular) que iniciam uma fase comum de crescimento por cerca de três dias (GINTHER et al., 2003).

A emergência de cada onda de crescimento folicular é causada pelo aumento na concentração sérica do hormônio folículo estimulante (FSH; ADAMS et al., 2008; ADAMS et al., 1992a; ADAMS et al., 1992b; GINTHER et al., 1999; GINTHER et al., 1997; GINTHER et al., 1996; GONG et al., 1995; GONG et al., 1996; HAMILTON et al., 1992; MIHM; AUSTIN, 2002; MIHM et al., 2002; SUNDERLAND et al., 1994). Em torno de 10 a 50 folículos, com 2 a 3mm de diâmetro cada, emergem entre os dias 1 e 3 após o estro, podendo atingir diâmetros em torno de 4 a 6mm nos dias subsequentes (BÓ et al., 1994).

A seleção folicular é regulada sistemicamente pelo FSH e pelo hormônio luteinizante (LH; BEG et al., 2002; ANTONIOLLI, 2002), e localmente por fatores que modulam a ação das gonadotrofinas (GINTHER et al., 2001b). Com o desenvolvimento dos folículos ovarianos, ocorre aumento nas concentrações plasmáticas de estradiol ( $E_2$ ) e inibina, o que provoca a redução da secreção do FSH, por mecanismo de *feedback* negativo, para concentrações basais (FORTUNE et al., 2004). Na supressão final de FSH, apenas um folículo mantém crescimento contínuo (GINTHER et al., 2001), o qual passa a ser chamado dominante. Este possui maior atividade de proteases específicas para proteínas ligadoras do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-4 (IGFBP-4) do que os outros folículos, denominados



subordinados. Essas enzimas potencializam a ação das gonadotrofinas na estimulação do crescimento e diferenciação folicular (RIVERA; FORTUNE, 2001; RIVERA et al., 2001 apud MORAES et al., 2001), assim o folículo dominante torna-se dependente de LH (GINTHER et al., 2001a), enquanto os subordinados entram em processo de atresia (ADAMS et al., 2008; FINDLAY, 1994; LUCY et al., 1992; GINTHER et al., 1999; GINTHER et al., 1997; MIHM et al., 2002; MIHM; AUSTIN, 2002), estabelecendo-se então, o fenômeno de divergência folicular.

O diâmetro médio do folículo dominante no momento da divergência é de 6,3mm (GIMENES et al., 2005a) em animais da raça Nelore e 8,5mm em animais da raça Holandesa (GINTHER et al., 1996). Outros estudos demonstram que não há grande variação quanto ao diâmetro do folículo subordinado (5,3 a 5,9mm) e do folículo dominante (5,4 a 6,3mm) em animais *Bos indicus* (GIMENES et al., 2005a; SARTORELLI et al., 2005; CASTILHO et al., 2006).

Gimenes et al. (2005b) realizaram estudo para verificar o diâmetro que os folículos de novilhas *Bos indicus* (das raças Nelore, Gir e cruzadas Nelore x Gir) adquirem capacidade ovulatória. Os autores verificaram que 33% das novilhas ovularam folículos com diâmetros entre 7,0 e 8,4mm, e que esta taxa de ovulação aumentou proporcionalmente à medida que os folículos alcançaram diâmetros entre 8,5 e 10,0mm (80%) e superiores a 10,0mm (90%).

O LH estimula a Adenosina Monofosfato cíclico (AMPC) nas células da granulosa em folículos com mais de 9mm de diâmetro, que adquirem receptores para LH e, portanto, capacidade ovulatória (JOLLY et al., 1994). A presença de receptores para LH nas células da granulosa de folículos dominantes, após a divergência folicular, sugere efetiva participação deste hormônio na fase final do desenvolvimento e maturação folicular (FIGUEIREDO et al., 2000).

O folículo ovulado sofre mudanças estruturais e funcionais e dá origem a uma estrutura denominada corpo lúteo (CL; BINELLI, 2000). Esta estrutura é responsável pela secreção de progesterona (P<sub>4</sub>), hormônio

essencial para ciclicidade normal da vaca (BÓ et al., 2000). Enquanto houver concentrações elevadas na circulação, a P<sub>4</sub> é responsável por bloquear a liberação de GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas) e das gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH), de modo que o animal não apresenta estro (ANTONIOLLI, 2002), em função, principalmente, da inibição das ondas pulsáteis de LH (HAFEZ, 1995).

Também, o diâmetro do CL parece ser menor em *Bos indicus* (zebuínos) que em *Bos taurus* (taurinos), já que nesta última subespécie, a capacidade ovulatória se inicia em folículos com pelo menos 10mm de diâmetro (SARTORI et al., 2001). O diâmetro dos CLs de zebuínos variam de 17 a 21mm (RHODES et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 1997), ao passo que em taurinos são relatados diâmetros entre 20 e 30mm (GINTHER et al., 1989; KASTELIC et al., 1990).

O período de atividade do CL é chamado de fase luteínica, perfazendo um total de 16 a 17 dias em bovinos (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A duração desta fase é que determina o número de ondas e, por conseguinte, a duração do ciclo estral. Sendo assim, quanto maior o período de atividade do CL, maior o número de ondas foliculares e, conseqüentemente, maior a duração do ciclo estral (FORTUNE, 1994; BORGES et al., 2001). Mais de 95% dos bovinos apresentam ciclos estrais com duas ou três ondas foliculares (ADAMS et al., 2008), podendo ocorrer variação (FIGUEIREDO et al., 1997; RHODES et al., 1995), contudo, a maioria apresenta o mesmo padrão de ondas em ciclos consecutivos (ADAMS et al., 2008). Vacas da raça Nelore são caracterizadas pela predominância de ciclos com duas (BÓ et al., 2003; FIGUEIREDO et al., 1997) e três ondas (BORGES et al., 2004), enquanto as novilhas da mesma raça são caracterizadas por apresentar ciclos com três ondas de crescimento folicular (BÓ et al., 2003; FIGUEIREDO et al., 1997).

Após a fase luteínica, se não houver fecundação, o útero secreta Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) que causa a luteólise - regressão do CL - levando à diminuição na concentração sérica de P<sub>4</sub> (< 1ng/mL), o que permite o aumento na frequência dos pulsos de LH (GOODMAN; KARSCH, 1980; KARSCH, 1987).

A luteólise culmina com o rápido crescimento do folículo dominante, que passa a secretar quantidades maiores de  $17\beta$ -estradiol que, por sua vez, atua no sistema nervoso central causando a manifestação do estro. Em seguida, ocorre o início de novo ciclo, a partir do surgimento de nova onda de crescimento folicular, com a liberação de novo pico de FSH (FORTUNE et al., 1988). As altas concentrações de  $E_2$ , sob baixas concentrações de  $P_4$  ( $< 1,0$  ng/mL), provocam o pico pré-ovulatório de LH e, conseqüentemente, a ovulação (CUPP et al., 1995; SHORT et al., 1979; STUMPF et al., 1989; SUNDERLAND et al., 1994). A ovulação é causada pela ruptura da parede folicular, induzida pelo pico pré-ovulatório de LH que ocorre junto a uma onda de FSH (CAVALIERI et al., 1997; KANEKO et al., 1991; MIHM et al., 2002).

#### **4.2 Controle do crescimento folicular e da ovulação em programas de superovulação de doadoras zebuínas**

O tratamento superovulatório pode ser definido como o método de estimular diversos folículos ovarianos em estágio terciário e os folículos que se tornariam atrésicos a se desenvolverem até o estágio pré-ovulatório, com subsequente ovulação (REICHENBACH et al., 2002). O aumento do número fisiológico de ovulações obtidas por este tratamento deve complementar-se com a IA (CABODEVILA; TORQUATI, 2001).

O objetivo da SOV é obter o máximo de embriões fecundados e transferidos com alta probabilidade de ocorrência de prenhez (MAPLETOFT et al., 2002). Os primeiros protocolos desenvolvidos para a superestimulação do crescimento folicular de doadoras bovinas utilizavam o cio natural. O tratamento superovulatório era iniciado entre 8 a 12 dias após a manifestação do estro, coincidindo com a emergência da segunda onda de crescimento folicular (BÓ, 2002).

A ausência do folículo dominante no início do tratamento aumenta a eficácia dos protocolos superovulatórios (MAPLETOFT et al., 2002; ADAMS, 1994). Nasser et al. (1993) obtiveram maior resposta superovulatória quando os tratamentos com gonadotrofina foram iniciados no dia da emergência da

onda de crescimento folicular do que 1 ou 2 dias após. Dessa forma, alternativas para controlar a emergência da onda de crescimento folicular em estágios aleatórios do ciclo estral, sem a necessidade de detecção do estro, para estabelecer o “cio base”, facilitariam o manejo das doadoras e, possivelmente, aumentariam a eficiência dos programas de SOV/TE.

Tratamentos com GnRH resultam em ovulação do folículo dominante e emergência de nova onda de crescimento folicular após 1 a 2 dias (PURSLEY et al., 1995). Porém, a administração de GnRH em estágios aleatórios do ciclo estral induziu ovulação em apenas 45,7% (16/35) de novilhas *Bos taurus* x *Bos indicus* (BARUSELLI et al., 2000). Também foram observadas baixas taxas de prenhez após a administração de GnRH em rebanho *Bos indicus* mantido em regiões tropicais (FERNANDES et al., 2001). Os resultados desses estudos sugerem que o GnRH apresenta baixa eficácia em sincronizar e induzir a ovulação e, conseqüentemente, a emergência da nova onda de crescimento folicular em *Bos indicus*.

Nesta subespécie, o tratamento eletivo para a indução e sincronização da emergência da nova onda de crescimento folicular é a associação de E<sub>2</sub> e P<sub>4</sub>. A P<sub>4</sub> é hormônio imprescindível para a regulação do funcionamento do sistema reprodutor feminino, atuando sinergicamente com os estrógenos em diversas funções fisiológicas, dentre elas, o crescimento das glândulas uterinas e a estimulação das glândulas endometriais para secreção do fluido endometrial - o qual é necessário à nutrição do blastocisto antes da implantação (HAFEZ, 2004). Em programas de superovulação de doadoras zebuínas, podem ser utilizadas diversas fontes exógenas de P<sub>4</sub> (ex: CIDR<sup>®</sup>, DIB<sup>®</sup>, Cronipress<sup>®</sup>, Sincrogest<sup>®</sup>, dentre outros) sem que ocorram alterações na produção de embriões (BARROS; NOGUEIRA, 2005; BARUSELLI et al., 2006; NOGUEIRA; BARROS, 2006).

Na presença de elevadas concentrações de P<sub>4</sub>, a administração de diferentes ésteres de estradiol, incluindo o Benzoato de estradiol (BE), Valerato de estradiol (VE) e Cipionato de estradiol (CE), é capaz de induzir a regressão de folículos antrais (BÓ et al., 1995). O VE e o CE apresentam meia vida longa, resultando na indução de uma nova onda de crescimento folicular mais tardia e

menos sincronizada (BÓ et al., 1995; COLAZO et al., 2003, 2005) que o 17 $\beta$  estradiol (BÓ et al., 1995) ou o BE (BÓ et al., 2002).

Carvalho (2004) verificou que a administração de 2mg de BE associado ao dispositivo de P<sub>4</sub> induziu atresia folicular e emergência sincrônica de uma nova onda de crescimento folicular em novilhas *Bos indicus*, *Bos taurus indicus* e *Bos taurus*. Foi verificado também que as novilhas *Bos indicus* apresentaram maior número de folículos recrutados no início da onda de crescimento folicular que novilhas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus*, sugerindo maior resposta em tratamentos superestimulatórios para a primeira subespécie.

No intuito de promover o crescimento de múltiplos folículos, aplicações exógenas de FSH ou de fármacos que mimetizem sua ação, como a Gonadotrofina Coriônica equina (eCG), são amplamente utilizadas em programas de SOV/TE (BARROS; NOGUEIRA, 2001) em vacas, búfalas, ovelhas e cabras (JAINUDEEN et al., 2004). Na maioria destes programas, são efetuadas oito aplicações de FSH com intervalos de 12 horas, para aumentar o recrutamento dos pequenos folículos (BÓ, 2002), e reverter a atresia de folículos acima de 1,7mm. Enquanto isso, o LH estimula a produção de andrógenos na teca interna, que são precursores da produção de estrógenos pelas células da granulosa estimuladas pelo FSH (BÉNYEI; BARROS, 2000).

Diferenças entre genótipos incluem reduzida capacidade para a secreção de LH e maior sensibilidade a gonadotrofinas exógenas em *Bos indicus* (zebuínos) comparado à *Bos taurus* (europeus; CAVALIERI et al., 1997). As doadoras zebuínas são mais sensíveis aos fármacos utilizados nos protocolos de SOV em comparação às de raças europeias. Animais da raça Nelore (zebuínos) possuem ovários, folículos e CLs menores, o que pode estar relacionado à exigência de menor concentração de FSH para a indução da superestimulação do crescimento folicular (VISINTIN et al., 1999).

Santiago et al. (1999), não observaram diferenças entre os tratamentos com diferentes doses de FSH, o que indica que a utilização de 250UI (Unidades Internacionais; 4,16 embriões viáveis por doadora) foi tão eficaz quanto 500UI de FSH (3,15 embriões viáveis por doadora) para superestimulação do crescimento folicular de novilhas da raça Nelore. De

forma semelhante, Baruselli et al. (2003), avaliaram o protocolo de superovulação e inseminação artificial em tempo fixo (SOVTF) em doadoras da raça Nelore utilizando diferentes doses de FSH (100, 133 ou 200mg) e não verificaram diferença nos resultados para embriões transferíveis ( $7,7 \pm 7,4$ ;  $5,6 \pm 4,1$  e  $6,5 \pm 7,7$  respectivamente).

Na tentativa de aumentar o número de embriões (D'OCCHIO et al., 1997; VAN De LEEMPUT et al., 2001) ou ainda viabilizar a IATF após a superovulação (BARROS; NOGUEIRA, 2001, 2005; BARUSELLI et al., 2006), foram utilizadas estratégias para atrasar o pico pré-ovulatório de LH, uma vez que folículos que não ovulam após a superestimulação com FSH, podem não ter se desenvolvido normalmente e/ou não possuem quantidade suficiente de receptores, necessitando de mais tempo para poderem responder ao LH (D'OCCHIO et al., 1997; LIU et al., 1998). Nesse contexto, foi verificado o efeito de atrasar a indução da ovulação com pLH de 12 para 24h após a última aplicação de FSH em doadoras Nelore. Este atraso resultou em aumento no número de embriões degenerados e diminuição no número de embriões transferíveis e congeláveis. Dessa forma, para doadoras da raça Nelore, o momento ideal para a indução da ovulação com pLH na SOVTF é de 12h após a última aplicação de FSH (BARUSELLI et al., 2005). Porém, em doadoras da raça Holandesa de alta produção, a indução da ovulação com pLH 24h após a última injeção de FSH resultou em resposta superovulatória melhor, e maior número de embriões transferíveis (MARTINS et al., 2005; RODRIGUES et al., 2005).

A partir dos resultados supracitados foi desenvolvido o protocolo denominado P-36 (BARROS; NOGUEIRA, 2001; 2005), no qual a fonte de  $P_4$  é mantida por até 36 horas após a primeira aplicação de  $PGF_{2\alpha}$  e a ovulação é induzida com LH exógeno, administrado 12h mais tarde. Esta administração exógena de LH permite controlar o momento da ovulação, que ocorre entre 24 e 36h após sua aplicação (NOGUEIRA; BARROS, 2003). Conseqüentemente, a IA é realizada em tempo fixo (IATF) 12 e 24h após a aplicação de LH. Estes tratamentos hormonais foram eficazes em controlar o momento da ovulação de

forma a permitir a IATF, eliminando a necessidade de detecção do estro (BARROS; NOGUEIRA, 2001; MELO et al., 2004a).

Concomitantemente, Melo et al. (2004b) observaram que oócitos fecundados e cultivados *in vitro* obtidos de vacas tratadas com o protocolo P-36 e, submetidas à aspiração folicular após a retirada da fonte de P<sub>4</sub>, apresentaram tanto as taxas de clivagem como de blastocisto semelhantes às aquelas obtidas a partir de ovários provenientes de matadouro (grupo controle). Dessa forma, os autores concluíram que o protocolo P-36 permite a SOVTF e não afeta a viabilidade dos oócitos.

Zanenga et al. (2003) utilizaram uma variação do protocolo P-36, avaliando a retirada antecipada (24h após a PGF<sub>2α</sub>, denominado P-24) do dispositivo de P<sub>4</sub> em vacas da raça Nelore submetidas à SOVTF. Os resultados são sugestivos de que a retirada antecipada do dispositivo de P<sub>4</sub> também é viável para programas de superovulação e transferência de embriões em *Bos indicus*. O controle farmacológico da ovulação, com o objetivo de viabilizar a IATF de doadoras *Bos indicus* superovuladas favoreceu a programação precisa das atividades de sincronização, colheita e transferência de embriões (NOGUEIRA et al., 2003; ZANENGA et al., 2003; BARUSELLI et al., 2003).

Apesar do desenvolvimento de protocolos eficientes que permitiram a SOVTF em programas comerciais de TE, é importante ressaltar que alguns fatores podem afetar a resposta superovulatória em bovinos. O cortisol endógeno liberado pelo estresse pode suprimir o pico de LH e a ovulação ou diminuir a resposta superovulatória, o que poderia ser confundido com a sensibilidade para gonadotrofinas exógenas (COSTA et al., 2001). Além disso, a variabilidade na resposta das doadoras ao tratamento superovulatório com gonadotrofinas continua a ser a principal fonte de variação nos programas de SOVTF/TE (NOGUEIRA et al., 2002; MAPLETOFT et al., 2002; BARROS; NOGUEIRA, 2004). Em vacas da raça Nelore, foi descrito efeito significativo da doadora no número de CLs no dia da colheita, na taxa de recuperação, no total de estruturas recuperadas e no número de embriões transferíveis e congeláveis (BARUSELLI et al., 2003).

### 4.3 Sêmen sexado

A definição do sexo anteriormente à concepção permite que a indústria pecuária produza melhor proporção entre machos e fêmeas, para obter vantagens sobre as limitações e influências do sexo, proporcionando, assim, práticas economicamente flexíveis de manejo ao produtor (RATH; JOHNSON, 2008). Com o advento das biotecnologias reprodutivas, a sexagem apresenta histórico otimista, porém, repleto de decepções (GARNER; SEIDEL Jr., 2008).

Na primeira metade do século XX, os avanços em ciências biológicas, especialmente em genética, resultaram em numerosas descobertas, incluindo a identificação dos cromossomos sexuais. Os gametas contêm metade dos cromossomos das células somáticas. Assim, dos 60 cromossomos da célula somática de bovinos, o espermatozóide (haplóide) possui 29 cromossomos autossômicos mais o cromossomo-X - produzindo fêmeas, ou o cromossomo-Y – produzindo machos (GARNER; SEIDEL Jr., 2008).

A separação dos espermatozóides contendo o cromossomo X daqueles contendo o cromossomo Y é possível por meio da detecção de pelo menos uma diferença fenotípica entre essas células (MOTA, 2004), que pode se basear em: sensibilidade ao pH (EMMENS, 1960; SHETTLES, 1970), carga elétrica da superfície da membrana (KNAACK et al., 1973; KANEKO et al., 1984), morfologia do núcleo e cabeça (SHETTLES, 1960, 1961; VAN MUNTER et al., 1999), antígenos de superfície (KOO et al., 1973; ALI, 1987; HENDRIKSEN, 1999; BLECHER et al., 1999), velocidade de migração (ERICSSON et al., 1973; SARKAR, 1984), diferenças no conteúdo de DNA e densidade (MEISTRICH, 1982, *apud* WINDSOR et al., 1993).

Na década de 80 iniciaram-se, em mamíferos, as tentativas para a seleção do sexo pela identificação das diferenças na quantidade de cromatina entre os espermatozóides com cromossomo X ou Y por citometria de fluxo (JOHNSON; PINKEL, 1986; JOHNSON et al., 1987). A aplicação recente de determinadas metodologias celulares modernas levou ao desenvolvimento de um sistema de citometria de fluxo capaz de diferenciar e separar



espermatozóides com cromossomos X e Y vivos, em quantidades adequadas para a IA (GARNER; SEIDEL Jr., 2008).

A sexagem de espermatozóides pela citometria de fluxo tem sido aplicada a uma variedade de espécies mamíferas, incluindo carneiros (CATT et al., 1996; CRAN et al., 1997; HOLLINGSHEAD et al., 2004; HOLLINGSHEAD et al., 2001), coelhos (JOHNSON et al., 1989), porcos (JOHNSON et al., 1991; ABEYDEERA et al., 1998; MARTINEZ et al., 2001ab; MAXWELL et al., 2004), cavalos (BUCHANAN et al., 2000; LINDSEY et al., 2002), alces (SCHENK; DEGROOFT, 2003), gatos (POPE et al., 2008), golfinhos (O'BRIEN; ROBECK, 2006), humanos (FUGGER, 1999), primatas não-humanos (O'BRIEN et al., 2002; O'BRIEN et al., 2005; O'BRIEN et al., 2003) e cães (MEYERS et al., 2008).

Nos bovinos, o espermatozóide com cromossomo X contém, aproximadamente, 4% mais DNA que o espermatozóide com cromossomo Y. Apesar de ser uma diferença pequena, é possível medir o conteúdo de DNA de cada um dos espermatozóides com precisão suficiente para distinção entre espermatozóides com cromossomo X e Y (SEIDEL, 2007).

O conteúdo de DNA do sêmen é determinado pelo uso de sondas fluorescentes. O corante *Hoechst 33342* foi escolhido por ser o menos tóxico entre os corantes de DNA com potencial de penetração na membrana plasmática de células vivas (JOHNSON et al., 1987). Sua ação é ligar-se, seletivamente, a regiões ricas em DNA, permitindo a detecção de pequenas diferenças em seu conteúdo (KLINC; RATH, 2006). Assim, o espermatozóide com cromossomo X recebe cerca de 4% mais corante vinculado ao seu DNA, do que o espermatozóide com cromossomo Y. Tal corante fluoresce quando exposto a um específico comprimento de onda de luz, normalmente fornecida por raio laser. A fluorescência é detectada e analisada por computador fornecendo medida da quantidade de DNA da célula analisada (GARNER, 2006).

A eficácia da sexagem dos espermatozóides não depende só das relativas diferenças do DNA, mas também da capacidade de orientação precisa desses gametas pelo citômetro de fluxo (GARNER, 2006).

Para tanto, o processo de sexagem se inicia com a quebra do fluxo de fluidos em poucas gotas, por um cristal piezoelétrico que vibra, formando cerca de 70.000 a 80.000 gotas por segundo. Cerca de um terço dessas gotículas contém um espermatozóide, cerca de dois terços estão vazias e algumas gotas contêm dois ou mais espermatozoides. A gotícula que contém o espermatozóide com o cromossomo X analisado pelo computador recebe uma carga elétrica positiva. A gotícula que contém o espermatozóide com o cromossomo Y recebe uma carga negativa. Se a gota não contém nenhum espermatozóide, espermatozoides danificados, ou espermatozoides indistinguíveis em relação ao conteúdo de DNA, nenhuma carga é acrescentada (SEIDEL, 2007).

As gotículas, então, a uma velocidade de cerca de 80 km por hora, passam por campos elétricos com um lado positivo e o outro negativo. Dessa forma, as gotículas positivamente carregadas e contendo o espermatozóide com cromossomo X, avançam em direção ao campo negativo, as gotículas com os espermatozoides com cromossomo Y, negativamente carregados, avançam em direção ao campo positivo, e aquelas com nenhuma carga seguem em uma terceira direção. Deste modo, três fluxos de gotículas são produzidos e colhidos em tubos diferentes. Ao final do processamento, em média, obtém-se 20% de espermatozoides com cromossomo X, 20% de espermatozoides com cromossomo Y e 60% danificados ou não sexados por alguma razão (SEIDEL, 2007).

A acurácia do processo de sexagem é de, aproximadamente, 90%, podendo variar entre 87% e 95% dependendo do operador, velocidade e variações individuais do ejaculado (MOCÉ et al., 2006; FREITAS, 2007).

O método de sexagem pelo citômetro de fluxo apresenta limitações, pois os espermatozoides são sexados um de cada vez, ao invés de serem vários ao mesmo tempo (GARNER, 2006), tornando o processo lento e caro. Atualmente, a produção de uma palheta de sêmen sexado bovino demora cerca de 9 minutos, que se traduz em aproximadamente sete palhetas por hora na concentração de  $2 \times 10^6$  espermatozoides por dose (GARNER; SEIDEL, 2008).

Além da baixa longevidade desses espermatozoides, frescos e criopreservados (MOCÉ et al., 2006), o processo de sexagem promove danos às células, deixando-as mais sensíveis ao processo de criopreservação (HOLLINSHEAD et al., 2003). Esses danos ao sêmen ocorrem devido ao estresse químico e físico aos quais os espermatozoides são expostos durante a sexagem (SEIDEL, 2003). A avaliação da viabilidade espermática revelou que alguns danos mecânicos provocados nos espermatozoides (GARNER, 2006; GARNER et al., 2002) levam a menor capacidade de fecundação após a inseminação artificial (*in vivo*) ou fecundação *in vitro*, com menores taxas de desenvolvimento embrionário (SARTORI et al., 2004). Além disso, este processo pode causar mudanças na membrana do espermatozoide, induzindo-o a uma “pré-capacitação”, resultando na redução da vida útil do sêmen (MAXWELL et al., 1998).

Apesar desses entraves, resultados promissores (SEIDEL Jr. et al., 1996; SEIDEL Jr. et al., 1997) levaram a comercialização do sêmen sexado para a IA. Desde que a tecnologia dos protocolos de sincronização sem necessidade de detecção do estro permitiu a IATF, diretrizes para o uso do sêmen sexado em associação aos protocolos de IATF estão sendo desenvolvidas (SALES et al., 2010).

Em experimento com novilhas e vacas, Seidel Jr. (2007) encontraram menores taxas de concepção com sêmen sexado em vacas do que em novilhas. Em diversos experimentos, a inseminação de novilhas com sêmen sexado resultou em taxas de prenhez de 60% a 90% do que foi alcançado com sêmen convencional congelado (GARNER, 2006; RATH et al., 2008; GARNER; SEIDEL Jr., 2008; SEIDEL Jr.; SCHENK, 2008; SCHENK et al., 2009).

Outra abordagem foi realizada para avaliar o local de deposição do sêmen. Em experimento realizado por Seidel Jr. et al. (1996), o sêmen sexado foi depositado profundamente no corno uterino ipsilateral ao ovário com o maior folículo (determinado por ultrassonografia). De vinte e nove novilhas inseminadas, 14 foram diagnosticadas como prenhes com 4 semanas de gestação, e 12 (41%) com 8 semanas.

A viabilidade do sêmen fresco, após processo de sexagem, também foi estudada. Inseminações realizadas dentro de 12h do processo de sexagem levaram a taxas de concepção de 50% (SEIDEL Jr. et al., 1996). Porém, a fertilidade diminuiu consideravelmente, devido aos processos de sexagem, refrigeração e transporte dos espermatozóides, quando as inseminações foram realizadas com 17h ou mais após a sexagem (SEIDEL Jr. et al., 1997).

Outro fator abordado foi o atraso no momento da IA com sêmen sexado. O momento adequado para IA em relação ao início do estro ou à ovulação, em vacas inseminadas com sêmen convencional tem sido estudado por diversos grupos (RANKIN et al., 1992; PURSLEY et al., 1998; DRANSFIELD et al., 1998; ROELOFS et al., 2006; HOCKEY et al., 2009). Estudos demonstram que o atraso na IA (mais de 12h após o início do estro) tende a resultar em melhores taxas de fecundação, porém diminui a qualidade embrionária quando comparada com inseminações realizadas próximas ao início do estro (SAACKE, 2008; DALTON et al., 2001). Portanto, a identificação do melhor momento para a realização da IATF utilizando sêmen sexado pode representar aumento da fertilidade e, assim, a ampla utilização deste procedimento em rebanhos de leite e corte (SALES et al., 2011).

Melhores resultados têm sido relatados quando a IATF com sêmen sexado foi realizada mais tarde do que o horário tradicional (SCHENK et al., 2009; SALES et al., 2010). Além disso, evidências mostram que a inseminação com sêmen sexado deve ser realizada mais próxima do momento da ovulação, uma vez que o processo de sexagem gera uma reduzida meia-vida no trato reprodutivo da fêmea e possível pré-capacitação do espermatozóide (MAXWELL 2004, VAZQUEZ et al., 2009; PEIPPO et al., 2009).

Uma abordagem para superar as limitações do baixo número de espermatozóides produzidos pelo processo de sexagem foi utilizar o sêmen sexado na Fecundação *in vitro* (FIV). Experimentos realizados tiveram 90% dos nascimentos do sexo masculino, porém não alcançaram sucesso financeiro, em função da inviabilidade do uso desta técnica comercialmente (CRAN et al., 1995). Além disso, embriões bovinos provenientes de sêmen sexado tiveram as expressões paternas de mRNA alteradas (MORTON et al., 2007) e

desenvolveram-se menos que embriões provenientes de sêmen convencional (LU et al., 1999). Em virtude destes resultados, o uso de sêmen sexado bovino na FIV também precisa ser otimizado, para que possa expandir sua utilização (GARNER; SEIDEL, 2008).

#### **4.4 Utilização de sêmen sexado em programas de superovulação para produção de embriões**

O sexo do bezerro é um dos fatores determinantes para o desempenho da bovinocultura. Em fazendas produtoras de leite, o bezerro macho tem pouco ou nenhum valor zootécnico, já em fazendas comerciais de corte, este se torna mais interessante devido ao seu maior potencial de produção. A produção em escala comercial, de doses de sêmen com espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y, aumentará os benefícios da utilização da IA, conferindo-lhe papel decisivo no progresso genético entre gerações, de acordo com as necessidades de cada programa de melhoramento genético e com a aptidão do rebanho (LIMA, 2006; BARUSELLI, et al., 2007).

Diversos estudos têm sido realizados avaliando o uso de sêmen sexado na IA ou IATF (SEIDEL, et al., 2008; DEJARNETTE et al., 2008; BORCHERSEN et al., 2009; SCHENK et al., 2009; SALES et al., 2010), porém, poucos trabalhos têm relatado a produção de embriões provenientes de sêmen sexado em protocolos de superovulação. Nestes trabalhos, o número de embriões transferíveis recuperados de doadoras inseminadas com sêmen sexado, tem sido menor que aqueles obtidos de doadoras inseminadas com sêmen convencional (PEIPPO et al., 2009; LARSON et al., 2010; SARTORI et al., 2004; SCHENK et al., 2006).

Em estudo recente, Peippo et al. (2009) avaliaram a produção de embriões em novilhas e vacas da raça Holandesa inseminadas com sêmen sexado (cromossomo X; 2 milhões de esptz/dose) e sêmen convencional (15 milhões de esptz/dose). As superovulações foram induzidas com oito doses decrescentes de FSH (dias 8-12 do ciclo estral), e as inseminações realizadas

12h após o início do estro. Foi verificado que nos grupos inseminados com sêmen convencional, foram produzidos 65,5% e 64,5% de embriões transferíveis para novilhas e vacas, respectivamente. Porém, nos grupos inseminados com sêmen sexado, obtiveram 53,9% e 21,1% de embriões transferíveis em novilhas e vacas, respectivamente. A proporção de embriões transferíveis (do sexo feminino) produzidos, aproximadamente dobrou quando as inseminações foram realizadas com espermatozoides sexados comparado às inseminações com sêmen convencional (96,4% vs. 41,1% em novilhas e 81,1% vs. 39,8% em vacas).

Sartori et al. (2004) realizaram experimento para determinar as taxas de fecundação e a qualidade dos embriões em novilhas da raça Holandesa superovuladas e inseminadas com duas doses diferentes de sêmen sexado vs. sêmen convencional. Os animais foram sincronizados com dispositivo intravaginal de progesterona - CIDR<sup>®</sup> (D0 - D9) associado à injeção de BE (2,5mg) no D1, e administração de PGF<sub>2α</sub> (25mg) 12h após a retirada do CIDR<sup>®</sup>. As fêmeas foram superovuladas (D6 – D9) com 8 doses decrescentes de FSH (300mg) em intervalo de 12h. As inseminações foram realizadas após a detecção do cio, em diferentes momentos, conforme os grupos: S20-1X (IA 12h, com 20 milhões esptz sexados); S10-2X (IA 12 e 24h, com 10 milhões esptz sexados cada) e U10-2X (IA 12 e 24h, com 10 milhões esptz não-sexados cada). O número e o percentual de embriões viáveis recuperados foram semelhantes entre os grupos S20-1X e S10-2X (63,5% e 61,9%), porém menores do que no grupo U10-2X (90,9%).

O alto percentual de oócitos não fecundados provenientes de doadoras inseminadas com sêmen sexado é fator recorrente. Em novilhas e vacas inseminadas com sêmen sexado foram encontradas proporções de 21,1 e 56,0% de oócitos não fecundados, e nos grupos controle (sêmen convencional) 10,6% e 14,4%, respectivamente. Conseqüentemente, vacas inseminadas com sêmen sexado produziram menores proporções de embriões transferíveis e maiores proporções de oócitos não fecundados que vacas inseminadas com sêmen convencional (PEIPPO et al., 2009).

Em outro estudo, Schenck et al. (2006) avaliaram o efeito do tipo de sêmen (sexado vs. convencional) e de diferentes doses de sêmen sexado na quantidade e qualidade de embriões produzidos em vacas e novilhas de corte, e em novilhas de leite superovuladas. Em vacas e novilhas de corte, verificou-se que o grupo inseminado com sêmen convencional apresentou maior porcentagem de embriões (69%), quando comparado aos grupos que receberam sêmen sexado com  $10 \times 10^6$  esptz/dose (49%) e com  $2 \times 10^6$  esptz/dose (40%). Já com novilhas de leite, o número de embriões transferíveis foi menor no grupo que recebeu sêmen sexado na dose de  $2 \times 10^6$  esptz/dose comparado com o grupo que recebeu sêmen convencional na dose de  $40 \times 10^6$  esptz/dose. Porém, o grupo que recebeu sêmen sexado na dose de  $10 \times 10^6$  esptz/dose apresentou número similar de embriões transferíveis comparado ao grupo que recebeu sêmen convencional na dose de  $40 \times 10^6$  esptz/dose.

Quando doadoras foram inseminadas com sêmen sexado 12 e 24h após a detecção do estro, o número de embriões transferíveis foi maior comparado com as doadoras que receberam apenas uma dose de sêmen sexado (SCHENK et al., 2006), indicando que duas inseminações com sêmen sexado foram mais eficazes do que apenas uma, para atingir produção de embriões similares àquelas do sêmen convencional. Com base em experimentos comparando o número de inseminações, mais embriões transferíveis resultaram de múltiplas inseminações (DONALDSON, 1985).

Larson et al. (2010) verificaram a hipótese de que quatro inseminações com sêmen sexado ( $2,1 \times 10^6$  esptz por palheta de 0,25mL) em doadoras superestimuladas produziriam um percentual e quantidade de embriões transferíveis similar ao alcançado com sêmen convencional. O número total de embriões por colheita foi similar entre os tratamentos convencional e sexado ( $10,9 \pm 1,8$  vs.  $10,5 \pm 1,6$ ), mas o número de embriões Grau 1 foi maior para o convencional ( $4,3 \pm 0,8$  vs.  $2,3 \pm 0,7$ ). Contrariamente, o número médio de oócitos não fecundados foi maior para o sexado ( $5,6 \pm 1,0$  vs.  $3,0 \pm 1,2$ ). Além disso, os autores relataram que as taxas de fecundação e o percentual de embriões transferíveis foram afetados pela época do ano e pela doadora. Os autores concluíram que doadoras superestimuladas inseminadas

quatro vezes com sêmen sexado tiveram menos embriões Grau 1 e mais oócitos não fecundados que àquelas inseminadas com sêmen convencional.



## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Animais

Foram utilizadas dezesseis (n=16) fêmeas bovinas multíparas da raça Nelore (*Bos indicus*), puras de origem (PO; Figura 1), com idade entre 4 e 10 anos. Os animais apresentavam escore de condição corporal entre 3,5 a 4,5 (escala de 1 a 5, onde 1 = muito magra e 5 = muito gorda) e pós-parto superior a 40 dias. Todas as doadoras estavam ciclando, o que foi verificado pela presença de CL no primeiro dia do protocolo de superovulação, avaliado por exame ultrassonográfico.



Figura 1 – Doadoras da raça Nelore da Fazenda São Luís Eldorado – PR.

### 5.2 Instalações e manejo nutricional

O experimento foi realizado no período de novembro de 2009 a maio de 2010, na fazenda São Luís Eldorado, localizada no município de Santa Helena, no centro da Costa Oeste do estado do Paraná, às margens do lago de Itaipu, a uma latitude 24°51'37" sul e a uma longitude 54°19'58" oeste, estando a uma altitude de 258 metros.

Os animais foram mantidos sob as mesmas condições de ambiente e alimentação, em sistema extensivo, com livre acesso à água, e suplementação mineral *ad libitum* em cocho coberto, de acordo com as

exigências de manutenção e produção, fornecidas pelo NRC (2001). Os procedimentos com os animais foram aprovados pela comissão de ética e experimentação animal da Universidade Estadual do Maranhão (Processo 28/2010).

### 5.3 Delineamento experimental

Os animais (n=16) foram homogeneamente divididos em quatro grupos experimentais, de acordo com o momento da IATF (12 e 24 vs. 18 e 30h após a administração de pLH) e o tipo de sêmen utilizado [convencional ( $20 \times 10^6$  esptz/dose) vs. sexado ( $2 \times 2,1 = 4,2 \times 10^6$  esptz/dose)]. Os grupos foram divididos da seguinte forma: IATF com sêmen convencional 12 e 24h (GSC12/24); IATF com sêmen convencional 18 e 30h (GSC18/30); IATF com sêmen sexado 12 e 24h (GSS12/24) e IATF com sêmen sexado 18 e 30h (GSS18/30).

O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 2x2, sendo que todos os animais, em suas respectivas categorias, foram submetidos a todos os tratamentos (delineamento “cross-over”) num total de quatro réplicas, com intervalo de 42 dias entre réplicas e 16 repetições por tratamento, objetivando minimizar os efeitos individuais sobre o resultado final.

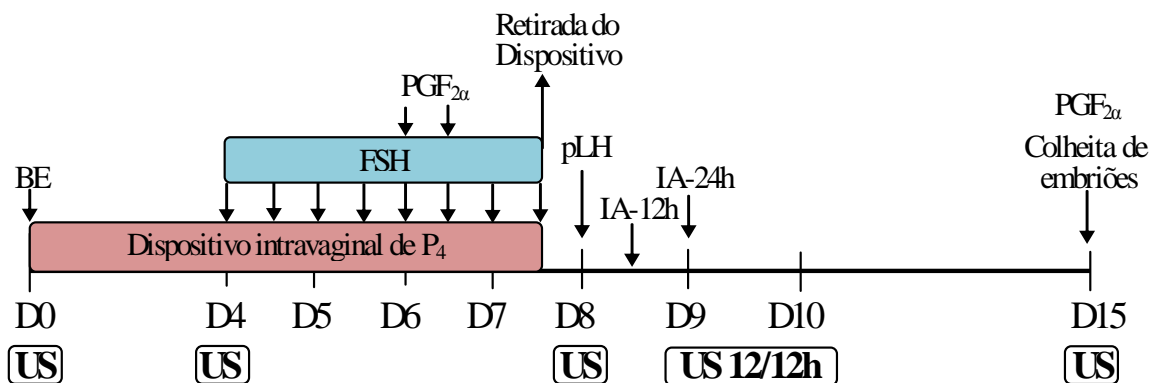
### 5.4 Protocolo para superovulação e inseminação artificial em tempo fixo

As doadoras foram sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona (P<sub>4</sub>; 1 gr; Sincrogest<sup>®</sup>, Ouro Fino Saúde Animal, Brasil) durante 7 dias. No dia de inserção do dispositivo (Dia 0 = D0; manhã) foi administrado 2,0mg de Benzoato de Estradiol por via intramuscular (i.m.; BE; Sincrodiol<sup>®</sup>, Ouro Fino Saúde Animal, Brasil). Entre o D4 e D7, todas as doadoras foram tratadas com oito subdoses decrescentes de FSH (totalizando 133mg i.m.; Folltropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Animal Health, Canadá) com intervalos de 12h, para superestimulação do crescimento folicular (Quadro 1).

Quadro 1 – Protocolo para superestimulação do crescimento folicular em doadoras da raça Nelore, com aplicação de 133mg de FSH.

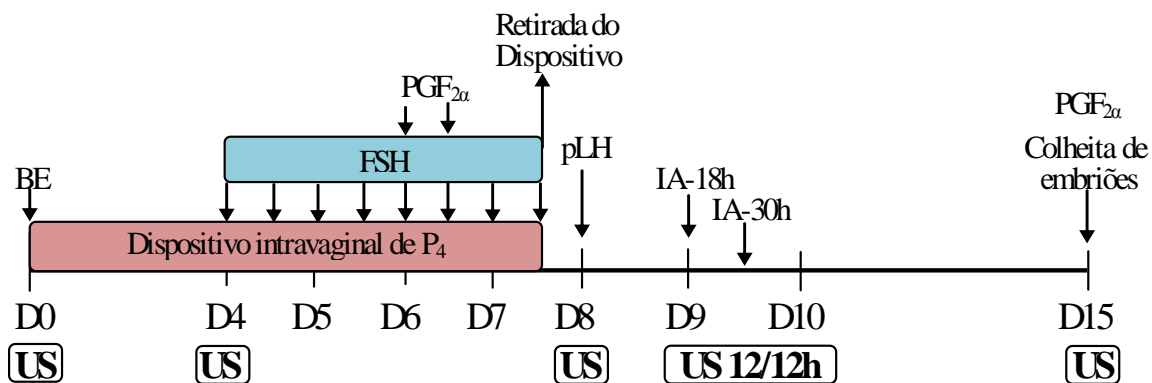
| Dia do protocolo | Manhã (7:00 horas)       | Tarde (19:00 horas)      |
|------------------|--------------------------|--------------------------|
| D4               | 20% da dose total de FSH | 20% da dose total de FSH |
| D5               | 15% da dose total de FSH | 15% da dose total de FSH |
| D6               | 10% da dose total de FSH | 10% da dose total de FSH |
| D7               | 5% da dose total de FSH  | 5% da dose total de FSH  |

No D6 (manhã e tarde), todos os animais receberam a aplicação de PGF<sub>2α</sub> (0,53mg i.m.; Sincrocio<sup>®</sup>, Ouro Fino Saúde Animal, Brasil) após cada aplicação de FSH. Na última dose de FSH (D7; tarde) o dispositivo de P<sub>4</sub> foi removido. No D8 (manhã), 12h após a retirada do dispositivo, as doadoras receberam a administração de pLH (25mg i.m.; Lutropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Animal Health, Canadá). As doadoras dos grupos GSC12/24 e GSS12/24 foram inseminadas com sêmen convencional e sexado, respectivamente, 12 e 24h após a administração de pLH (Figuras 2 e 4). Nos grupos GSC18/30 e GSS18/30 as inseminações com sêmen convencional e sexado, respectivamente, ocorreram 18 e 30h após a administração de pLH (Figuras 3 e 5). As inseminações foram realizadas com sêmen proveniente do mesmo touro da raça Nelore (Jamanta C2569 DA MN MANA/Sexing-Lagoa Technologies) e mesma partida (08/06/09), cujo ejaculado foi dividido proporcionalmente para produzir sêmen sexado e convencional. A colheita das estruturas embrionárias foi realizada pelo método não-cirúrgico de lavagem uterina sete dias após a aplicação do pLH, sempre pelo mesmo veterinário. Neste mesmo dia, todas as doadoras receberam a aplicação de PGF<sub>2α</sub> (0,53mg i.m.; Sincrocio<sup>®</sup>, Ouro Fino Saúde Animal, Brasil).



Legenda: US – Avaliações ultrassonográficas.

Figura 2 – Representação esquemática do protocolo de superovulação utilizado nos grupos sêmen convencional e sexado, com inseminações realizadas 12 e 24h após a administração de pLH (GSC12/24 e GSS12/24).



Legenda: US – Avaliações ultrassonográficas.

Figura 3 – Representação esquemática do protocolo de superovulação utilizado nos grupos sêmen convencional e sexado, com inseminações realizadas 18 e 30h após a administração de pLH (GSC18/30 e GSS18/30).

## 5.5 Avaliações ultrassonográficas

Foram realizados exames ultrassonográficos (Mindray® DP 2200 VET, China) com transdutor transretal linear de 7,5MHz, no D0, para aferir a ciclicidade das doadoras, verificada pela presença de CL. Posteriormente, outra avaliação foi efetuada no início do tratamento superovulatório (D4) para quantificar os folículos  $\geq 2\text{mm}$  de diâmetro. A resposta à superestimulação do crescimento folicular foi aferida no D8 pela contagem dos folículos potencialmente ovulatórios ( $\geq 8\text{mm}$ ). A partir do D9 foi acompanhada por 36 horas (12/12h) a dinâmica folicular para avaliação do número, e determinação do momento das ovulações. Foi considerada ovulação quando um folículo  $\geq 8\text{mm}$ , previamente observado, não estivesse mais presente na avaliação subsequente. O momento da ovulação foi considerado pelo momento em cada intervalo das avaliações ultrassonográficas (entre o D9 e D10, em intervalos de 12 horas: 24, 36, 48 e 60 após a administração de pLH) e a média determinada pela média ponderada das ovulações neste mesmo período.

## 5.6 Avaliação das taxas de ovulação e de recuperação das estruturas embrionárias

As taxa de ovulação foi calculada pela soma de todas as ovulações ocorridas entre o D9 e D10, dividido pelo número de folículos potencialmente ovulatórios ( $\geq 8\text{mm}$ ) detectados pela ultrassonografia no D8, e o valor obtido foi multiplicado por 100.

A taxa de recuperação de estruturas embrionárias foi obtida pelo número de estruturas embrionárias recuperadas no D15, dividido pelo número de ovulações detectadas ultrassonograficamente no D10, e o valor obtido foi multiplicado por 100.

## 5.7 Colheita e avaliação das estruturas embrionárias

As estruturas embrionárias (oócitos não fecundados/embriões) foram colhidas sete dias após administração de pLH, pelo método não cirúrgico de lavagem uterina, procedimento este, sempre realizado pelo mesmo veterinário. Para tanto, foi utilizado 1000mL de Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS - Flush<sup>®</sup>, Nutricell) suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB; Nutricell Nutrientes celulares, Brasil). O TQC Holding<sup>®</sup> (Bioniche Animal Health, Canadá) foi utilizado como meio de manutenção dos embriões. As estruturas embrionárias (oócitos não fecundados, embriões transferíveis, congeláveis e degenerados) foram quantificadas para o cálculo da taxa de recuperação. Os embriões viáveis foram classificados de acordo com os padrões de morfologia estrutural da International Embryo Transfer Society (IETS, 1998). Foram aferidas a quantidade e qualidade de embriões transferíveis (graus 1, 2 e 3) e de embriões congeláveis (graus 1 e 2) por tratamento.

## 5.8 Breve descrição do procedimento de sexagem

Após a colheita de sêmen, o ejaculado obtido foi dividido, sendo uma parte sexada e criopreservada e outra parte apenas criopreservada. O procedimento de sexagem foi realizado no Laboratório da Sexing Technologies, na CRV Lagoa, Sertãozinho – SP.

Os espermatozoides foram corados com 112.5M Hoechst 33342, em concentração de  $160 \times 10^6$  espermatozoides/mL, incubados a 34°C durante 45 minutos, cuja função foi penetrar na membrana celular e ligar-se a regiões específicas do DNA. Em seguida, ocorreu a filtragem em unidade gravitacional através de filtro de 50  $\mu\text{m}$  (CellTrics<sup>®</sup> #04-0042-2317; Partec GmbH, Alemanha), para remoção de debris ou espermatozoides aglutinados, formando uma solução final com concentração de  $80 \times 10^6$  espermatozoides/mL.

A separação das células espermáticas contendo o cromossomo X, foi realizada em citômetro de fluxo MoFlo<sup>®</sup>SX (DakoCytomation, Sexing Technologies, EUA), submetidos a 150mW de intensidade do laser, com 85-

90% de acurácia. Para classificação dos espermatozóides o equipamento operou com menos de 35 psi e aproximadamente 40 mil eventos/s, resultando em taxas de triagem que variaram de 5000-8000 espermatozóides/s.

Após a análise, foi adicionado diluidor Tris (20% de gema de ovo e 6% de glicerol) ao sêmen, sendo, então, envasado em palhetas de 0,25mL de cloreto de polivinil (sexados =  $2,1 \times 10^6$  espermatozóides/palheta ou não sexado =  $20 \times 10^6$  espermatozóides/palheta), seguindo para criopreservação.

## 5.9 Análise estatística

As análises de interações foram realizadas para avaliação dos efeitos principais de cada fator. As medidas de tendência central (média  $\pm$  epm) foram analisadas pelo teste de média e as comparações entre proporções pelo teste de Qui-quadrado exato de Fisher. Empregou-se para as análises o programa estatístico SAS for Windows Versão 9.2 (SAS Institute Inc., USA).

O momento das ovulações foi analisado pela ANOVA para medidas repetidas utilizando o procedimento GLM, utilizando-se, no modelo estatístico, os efeitos de doadora e tratamento. Os dados estão apresentados como médias e erro padrão da média ( $\pm$  epm).

Os dados foram analisados quanto à normalidade residual e homogeneidade de variância pelo Guia de Análise de Dados. A transformação de dados (Log<sub>10</sub>X ou SQRT X) foi empregada sempre que necessário. A distribuição Poisson foi assumida para as variáveis de resposta categórica. O procedimento GLIMMIX foi utilizado, com o efeito de doadoras como um efeito aleatório. O modelo estatístico foi utilizado para analisar o número total de estruturas embrionárias recuperadas, oócitos não fecundados, embriões totais, transferíveis, congeláveis e degenerados, doadora e tratamento. O nível de significância adotado foi de 5%.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Resposta folicular, taxa de ovulação e distribuição das ovulações

Quatro doadoras (n=4) foram excluídas da análise estatística por não apresentarem resposta satisfatória ao protocolo de SOV ( $\leq 1$  corpo lúteo no D15 ou nenhuma estrutura embrionária recuperada). Desta forma, os resultados apresentados são referentes a doze animais por grupo experimental.

Todos os grupos apresentaram, quando analisados conjuntamente,  $47,4 \pm 3,1$  folículos ( $\geq 2\text{mm}$ ) por doadora no início no tratamento superovulatório (D4). No mesmo sentido, observou-se resposta à superestimulação do crescimento folicular com FSH, obtendo-se  $13,0 \pm 2,1$  folículos potencialmente ovulatórios ( $\geq 8\text{mm}$ ; D8) por doadora. O número de CL e a taxa de ovulação foram de  $8,4 \pm 1,4$  e de  $61,2 \pm 3,1\%$ , respectivamente, e as ovulações ocorreram  $39,3 \pm 1,3\text{h}$  após a administração de pLH. A taxa de ovulação de acordo com o momento de sua observação após a indução com pLH foi de:  $7,6\%$  (31/407) às 24h,  $47,4\%$  (193/407) às 36h,  $28,0\%$  (114/407) às 48h e  $17,2\%$  (70/407) às 60h (Gráfico 1).

A análise conjunta dos grupos experimentais foi possível, pois, os tratamentos utilizados foram idênticos até o momento da indução da ovulação.

### 6.2 Recuperação das estruturas embrionárias

A taxa de recuperação das estruturas embrionárias foi respectivamente:  $48,4 \pm 13,7\%$  para o GSC12/24;  $62,7 \pm 13,6\%$  para o GSC18/30;  $28,2 \pm 9,2\%$  para o GSS12/24 e  $37,2 \pm 7,0\%$  para o GSS18/30 ( $P > 0,05$ ; Gráfico 2).



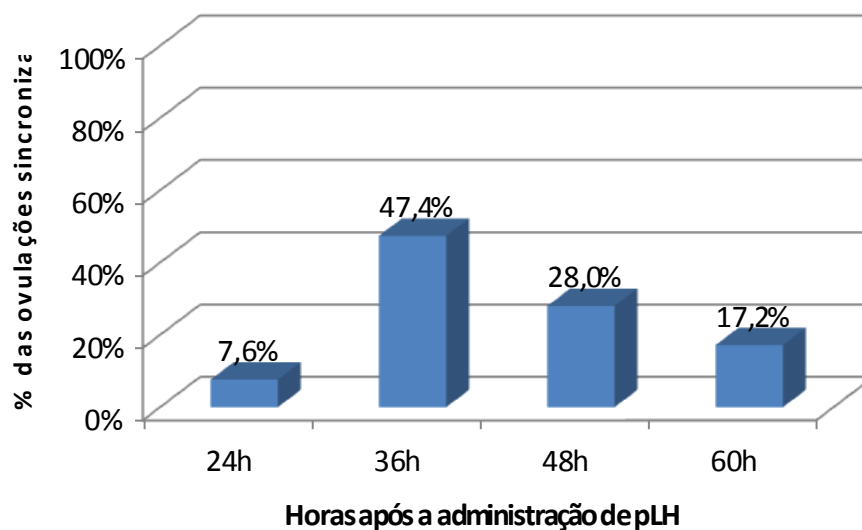


Gráfico 1 – Distribuição das ovulações sincronizadas após a administração de pLH em doadoras da raça Nelore. Santa Helena – PR, 2010.

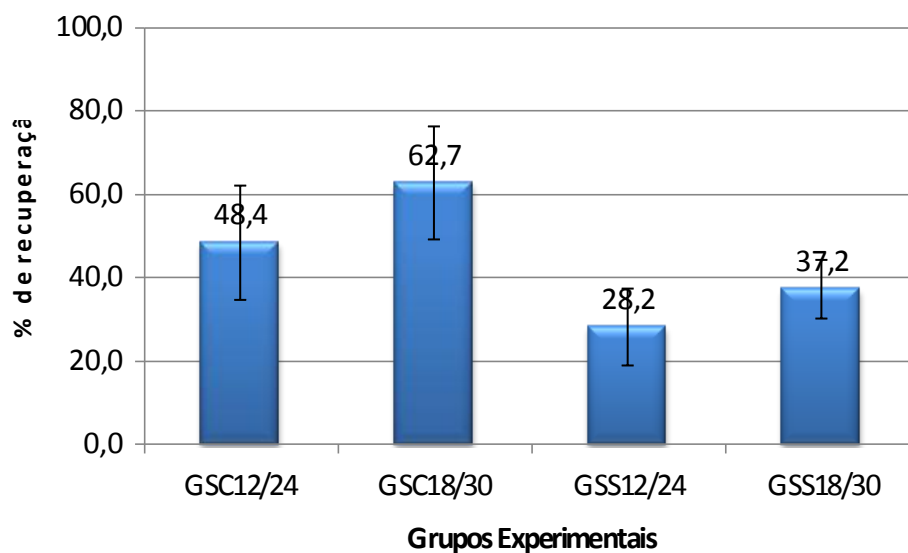


Gráfico 2 – Taxa de recuperação das estruturas embrionárias obtidas das doadoras pertencentes aos grupos GSC12/24, GSC18/30, GSS12/24 e GSS18/30. Santa Helena - PR, 2010.

O total de estruturas embrionárias recuperadas, oócitos não fecundados, mórula, blastocisto inicial, blastocisto, embriões transferíveis, congeláveis e degenerados, estão apresentados na Tabela 1 ( $P > 0,05$ ).

Tabela 1 – Estruturas embrionárias obtidas das doadoras pertencentes aos grupos GSC12/24, GSC18/30, GSS12/24 e GSS18/30 ( $P > 0,05$ ). Santa Helena - PR, 2010.

| Variáveis Analisadas   | Grupos Experimentais |           |           |           |
|------------------------|----------------------|-----------|-----------|-----------|
|                        | GSC12/24             | GSC18/30  | GSS12/24  | GSS18/30  |
| Total de estruturas    | 2,9 ± 1,1            | 3,4 ± 0,8 | 2,6 ± 1,2 | 4,1 ± 1,3 |
| Oócitos não fecundados | 0,0 ± 0,0            | 0,1 ± 0,1 | 1,7 ± 1,2 | 0,4 ± 0,2 |
| Mórula                 | 1,5 ± 0,7            | 1,6 ± 0,5 | 0,2 ± 0,1 | 1,1 ± 0,7 |
| Blastocisto inicial    | 0,1 ± 0,1            | 0,7 ± 0,4 | 0,2 ± 0,2 | 0,3 ± 0,2 |
| Blastocisto            | 0,7 ± 0,4            | 0,4 ± 0,2 | 0,2 ± 0,1 | 0,8 ± 0,6 |
| Embriões transferíveis | 2,6 ± 1,0            | 2,7 ± 0,7 | 0,5 ± 0,3 | 2,2 ± 1,0 |
| Embriões congeláveis   | 2,4 ± 1,0            | 2,7 ± 0,7 | 0,5 ± 0,3 | 2,0 ± 1,0 |
| Degenerados            | 0,3 ± 0,1            | 0,7 ± 0,4 | 0,4 ± 0,3 | 1,5 ± 0,8 |

Não foram verificadas diferenças entre os grupos ( $P > 0,05$ ), no entanto, o GSS18/30 apresentou numericamente mais estruturas embrionárias totais, embriões transferíveis e congeláveis que o GSS12/24 (Gráfico 3).

Além disso, o GSS18/30 apresentou resultados numericamente superiores para mórula e blastocisto em comparação ao GSS12/24 (Gráfico 4).

O grupo GSS12/24 produziu numericamente menos embriões degenerados e mais oócitos não fecundados que o GSS18/30 (Gráfico 5).

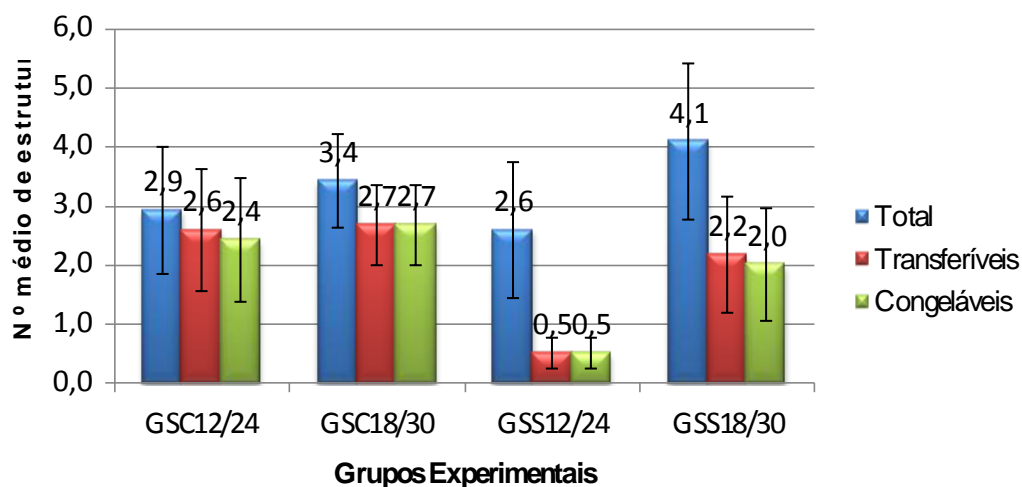


Gráfico 3 – Número de estruturas embrionárias, embriões transferíveis e congeláveis obtidos das doadoras pertencentes aos grupos GSC12/24, GSC18/30, GSS12/24 e GSS18/30. Santa Helena - PR, 2010.

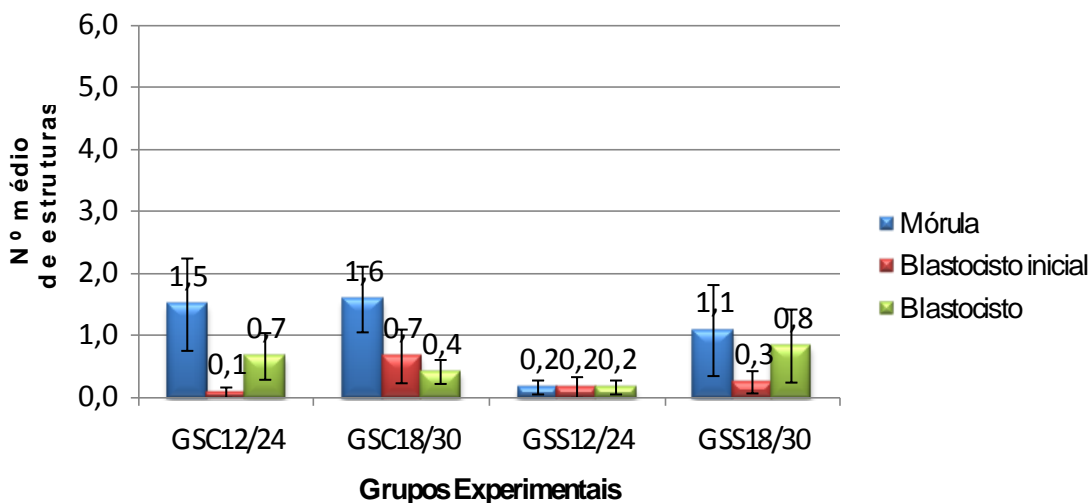


Gráfico 4 – Número de mórula, blastocisto inicial e blastocisto, obtidos das doadoras pertencentes aos grupos GSC12/24, GSC18/30, GSS12/24 e GSS18/30. Santa Helena – PR, 2010.

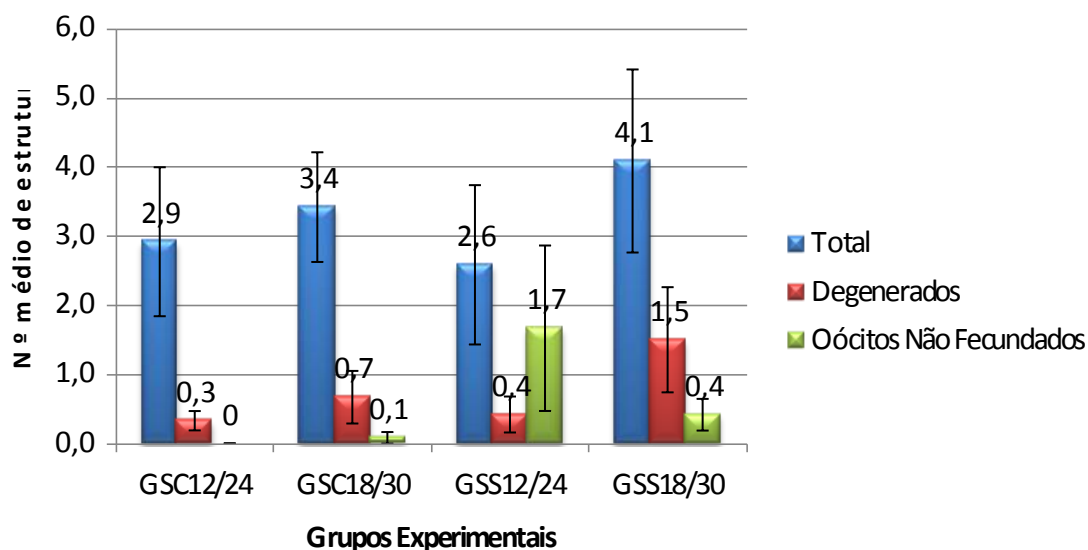


Gráfico 5 – Número de estruturas embrionárias, embriões degenerados e óocitos não fecundados obtidos das doadoras pertencentes aos grupos GSC12/24, GSC18/30, GSS12/24 e GSS18/30. Santa Helena - PR, 2010.

Como não foi verificada interação entre os tratamentos, foi possível avaliar os efeitos principais (tipo de sêmen: convencional vs. sexado e momento da inseminação: 12 e 24 vs. 18 e 30h após a administração de pLH). Assim como entre os grupos (GSC12/24 vs. GSC18/30 vs. GSS12/24 vs. GSS18/30), não foi verificado diferença para nenhuma das variáveis analisadas (tipo de sêmen: convencional vs. sexado e momento da inseminação: 12/24 vs. 18/30h;  $P > 0,05$ ). Os resultados estão sumarizados na Tabela 2.

Tabela 2 – Efeito do tipo de sêmen (convencional vs. sexado) e do momento da inseminação (12 e 24 vs. 18 e 30h após a administração de pLH) na produção de estruturas embrionárias de doadoras da raça Nelore (*Bos indicus*) superovuladas. Santa Helena - PR, 2010.

| Variáveis Analisadas                           | Efeitos Principais |            |            |            | Efeitos (P > 0,05) |            |           |
|--|--------------------|------------|------------|------------|--------------------|------------|-----------|
|  | Tipo de Sêmen      |            | Momento IA |            | Sêmen              | Momento IA | Interação |
|  | Convencional       | Sexado     | 12-24h     | 18-30h     |                    |            |           |
| Total de Estruturas                            | 3,2 ± 0,7          | 3,3 ± 0,9  | 2,8 ± 0,8  | 3,8 ± 0,8  | 0,6346             | 0,5470     | 0,7905    |
| Oócitos não fecundados                         | 0,0 ± 0,0          | 1,0 ± 0,6  | 0,8 ± 0,6  | 0,3 ± 0,1  | 0,4665             | 0,4079     | 0,2379    |
| Mórula   | 1,5 ± 0,4          | 0,6 ± 0,4  | 0,8 ± 0,4  | 1,3 ± 0,4  | 0,2090             | 0,5818     | 0,4679    |
| Blastocisto inicial                            | 0,4 ± 0,2          | 0,2 ± 0,1  | 0,1 ± 0,1  | 0,5 ± 0,2  | 0,4947             | 0,1583     | 0,6694    |
| Blastocisto                                    | 0,5 ± 0,2          | 0,5 ± 0,3  | 0,4 ± 0,2  | 0,6 ± 0,3  | 0,8676             | 0,5336     | 0,2331    |
| Blastocisto expandido                          | 0,2 ± 0,2          | 0,0 ± 0,0  | 0,2 ± 0,2  | 0,0 ± 0,0  | 0,2332             | 0,4667     | 0,5144    |
| Embriões transferíveis                         | 2,6 ± 0,6          | 1,3 ± 0,5  | 1,5 ± 0,6  | 2,4 ± 0,6  | 0,2194             | 0,4769     | 0,3883    |
| Embriões congeláveis                           | 2,5 ± 0,6          | 1,3 ± 0,5  | 1,5 ± 0,6  | 2,3 ± 0,6  | 0,1604             | 0,3785     | 0,3328    |
| Degenerados                                    | 0,5 ± 0,2          | 1,0 ± 0,4  | 0,4 ± 0,1  | 1,1 ± 0,4  | 0,3345             | 0,1119     | 0,5947    |
| Taxa de ovulação                               | 60,8 ± 4,1         | 61,7 ± 4,7 | 57,1 ± 5,0 | 65,4 ± 3,6 | 0,7730             | 0,3906     | 0,4381    |
| Taxa de recuperação de estruturas embrionárias | 55,5 ± 9,5         | 32,7 ± 5,7 | 38,3 ± 8,3 | 50,0 ± 7,9 | 0,1670             | 0,7036     | 0,9421    |

## 7 DISCUSSÃO

A associação de  $E_2$  e  $P_4$  proporcionou a presença de folículos  $\geq 2\text{mm}$  no início do tratamento superovulatório, assim como descrito em outros estudos, que postulam que o tratamento com progestágeno associado ao estradiol, em bovinos, provoca atresia do folículo dominante, e resulta na emergência de nova onda de crescimento folicular 3 a 4 dias após (ADAMS et al., 1994; BÓ et al., 1995). Da mesma forma, a superestimulação do crescimento folicular com FSH induziu folículos  $\geq 2\text{mm}$  a atingirem o diâmetro de  $8\text{mm}$  (folículos potencialmente ovulatórios;  $13,0 \pm 2,1$  folículos/doadora) ao final do tratamento.

Os indutores de ovulação, quando administrados ao final do tratamento com  $P_4$ ,  $E_2$  e  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , sincronizam a ovulação dos folículos  $\geq 8\text{mm}$  presentes que responderam à superestimulação, possibilitando o emprego da IATF (BARUSELLI, 2004). No mesmo sentido, no presente estudo, a aplicação de pLH 12 horas após a retirada do dispositivo de  $P_4$  induziu e sincronizou as múltiplas ovulações nos quatro grupos experimentais.

O conhecimento do momento da ovulação e sua variabilidade são importantes para as estratégias de inseminação, sendo vitais para determinar o momento ideal para realizar a IA. Este momento deve favorecer o acesso do espermatozóide ao oócito recém-ovulado. Do contrário, ignorar o tempo de transporte dos espermatozóides no trato reprodutivo feminino, levará ao risco dos gametas masculinos encontrarem um oócito envelhecido (SAACKE, 2008). Conforme verificado em doadoras *Bos indicus*, o intervalo médio entre a administração de pLH e as ovulações é de 30 a 32,8h variando de 24 a 60h após a administração de pLH (revisado por BARUSELLI et al., 2006; MARTINS, 2007). No presente estudo, também com doadoras *Bos indicus*, a maioria das ovulações ocorreu entre 36 e 48h após a administração de pLH ( $39,3 \pm 1,3\text{h}$ ), o que indica que as inseminações realizadas 18 e 30h foram mais próximas das ovulações do que as realizadas 12 e 24h.

A importância de realizar as inseminações próximas do momento das ovulações nos programas de SOV que utilizam espermatozóides sexados

se deve, principalmente, à qualidade inferior do sêmen sexado comparado ao convencional. O processo de sexagem espermática resulta em alguns danos ao espermatozóide que provavelmente comprometem a fecundação do oócito (SARTORI et al., 2004; SEIDEL; GARNER, 2002). Dentre eles, pode-se mencionar: redução da vida funcional (LU et al., 2004; MAXWELL, 2004; PEIPPO et al., 2009), “pré-capacitação” e reduzido número de espermatozóides nas palhetas em comparação com o sêmen convencional (VAZQUES, et al., 2009; SCHENK et al., 2009). Além disso, no teste de termo-resistência o sêmen sexado apresentou declínio mais acelerado de motilidade comparado ao sêmen convencional (RATH et al., 2003).

Melhores resultados têm sido relatados quando as inseminações com sêmen sexado foram realizadas mais tardiamente do que as tradicionalmente recomendadas para IATF (SALES et al., 2010). Em trabalhos recentes, esse conceito tem sido suportado pelo aumento nas taxas de prenhez quando o sêmen sexado foi utilizado 16-24h (SÁ FILHO et al.; 2010) e 18-24h (SCHENK et al., 2009) após o início do estro ou quando as inseminações foram realizadas próximas da ovulação (HOCKEY et al., 2009; NEVES, 2010).

O efeito do atraso em 6h na IATF com sêmen sexado foi estudado em novilhas cíclicas da raça Jersey (CREPALDI et al., 2009) e em vacas da raça Nelore em lactação (SOUZA et al., 2008). Nas duas raças e categorias ocorreu aumento na taxa de prenhez quando a inseminação com sêmen sexado foi realizada às 60h em comparação àquelas realizadas às 54h após a retirada do dispositivo de P<sub>4</sub>. De forma complementar, Schenk et al. (2009) obtiveram maior taxa de prenhez ao inseminar novilhas com sêmen sexado, 67-68h após a remoção do CIDR<sup>®</sup>. Estes resultados obtidos em programas de IATF sugerem a necessidade de atrasar também o momento da inseminação com sêmen sexado nos protocolos de SOV (DALTON et al., 2000; SARTORI et al., 2004).

No presente estudo, o atraso em 6 horas (de 12/24 para 18/30h após a indução da ovulação) promoveu uma sincronização mais apropriada entre a IATF e o momento da ovulação, que ocorreu  $39,3 \pm 1,3$ h após a

aplicação de pLH. Este resultado - de acordo com os trabalhos supracitados - poderia favorecer o desempenho do espermatozóide sexado. Porém, a hipótese de que o atraso em seis horas na IATF com sêmen sexado em protocolos de superovulação resulta em aumento na produção de embriões obtidos de doadoras da raça Nelore não foi confirmada. Não foram verificadas diferenças na produção de estruturas embrionárias, embriões transferíveis e congeláveis entre as doadoras inseminadas com sêmen sexado 18-30 ou 12-24h após administração de pLH.

Este resultado pode estar relacionado à utilização de um reduzido número de animais, levando a considerar que tenha sido baixo o suficiente para gerar análise estatística limitada dos dados. Desta forma, não foi possível verificar as possíveis diferenças entre os tratamentos e conseqüentemente, subestimar os resultados.

Da mesma forma, também não foram verificadas diferenças para as variáveis supracitadas ao analisar os efeitos principais (tipo de sêmen e momento da inseminação). Estes resultados diferem de outros, onde a utilização de sêmen sexado em programas de superovulação tem gerado produção inferior de embriões transferíveis, comparado aos resultados obtidos com sêmen convencional (PEIPPO et al., 2009; LARSON et al., 2010; SÁ FILHO et al., 2010; SARTORI et al., 2004; SCHENK et al., 2006).

Os danos provocados ao sêmen sexado aliados a inseminações realizadas em momento inadequado, ou seja, mais distantes das ovulações, podem explicar, no presente estudo, a maior – mesmo que numérica – quantidade de oócitos não fecundados recuperados no GSS12/24 em relação ao GSS18/30. Este resultado pode ser indicativo de que a IATF com sêmen sexado (de menor viabilidade), realizada mais próxima das ovulações, permitiu maior fecundação e, desta forma, menor recuperação de oócitos não fecundados no GSS18/30. Maiores quantidades de oócitos não fecundados resultantes de protocolos de SOV podem estar associadas ao momento inadequado da IATF (SARTORI et al., 2004; SCHENK et al., 2006; PARANACE et al., 2003).



Porém, não foram verificadas diferenças na produção de oócitos não fecundados entre os diferentes grupos experimentais (GSC12/24, GSC18/30, GSS12/24 e GSS18/30). Este resultado difere de outros estudos, nos quais os autores verificaram aumento significativo no número de oócitos não fecundados recuperados de doadoras superovuladas e inseminadas com sêmen sexado em relação às inseminadas com sêmen convencional (SARTORI et al., 2004; SCHENK et al., 2006). Peippo et al. (2009) encontraram maior proporção de oócitos não fecundados em novilhas (11%) e vacas (42%) que foram inseminadas com sêmen sexado comparado às inseminadas com sêmen convencional.

Vários autores afirmaram que o número de espermatozoides por palheta e o local de deposição do sêmen no trato genital feminino, não são os fatores que determinaram a maior quantidade de oócitos não fecundados obtidos de doadoras submetidas ao protocolo de SOV com sêmen sexado (SARTORI et al., 2004; SCHENK et al., 2006; PEIPPO et al., 2009; LARSON et al., 2010). O presente estudo corrobora com estes autores, já que o número de embriões ou de oócitos não fecundados não foi afetado pela dose inseminante – uma vez que foi utilizada a mesma dose de sêmen sexado nos GSS12/24 e GSS18/30.

De forma semelhante, outros estudos revelaram que inseminações múltiplas de  $2,1 \times 10^6$  espermatozoides em 12 e 24 h podem ter mantido número adequado de espermatozoides no trato reprodutivo para fecundar o oócito na mesma proporção que doses maiores ( $20 \times 10^6$  esptz/mL; SCHENK et al., 2006). Da mesma forma, DeJarnette et al. (2008) não encontraram aumento significativo nas taxas de prenhez com 3,5 ou  $5 \times 10^6$  esptz por dose comparado a  $2,1 \times 10^6$  esptz por dose em novilhas e vacas submetidas à IATF. Recentemente, Larson et al. (2010) utilizaram quatro inseminações com sêmen sexado ( $\geq 2,1 \times 10^6$  esptz/mL) após a superovulação, e não conseguiram aumentar a produção de embriões e a taxa de fecundação após o aumento no número de espermatozoides.

Contrariamente ao verificado no número de oócitos não fecundados, o número de embriões degenerados foi maior, mesmo que numericamente,

para o GSS18/30 em comparação ao GSS12/24. Pode-se deduzir que este resultado foi devido à maior fecundação quando a IATF com sêmen sexado foi realizada 6 horas mais tarde, porém, em função dos danos provocados ao espermatozóide no processo de sexagem, esta maior fecundação resultou em maior número de estruturas degeneradas. Sartori et al. (2004) encontraram aumento no percentual de embriões degenerados nos grupos inseminados com sêmen sexado, quando foram analisadas estruturas fecundadas. Esses achados foram ainda associados à baixa taxa de fecundação do sêmen sexado, o que provocou diminuição no número de embriões viáveis recuperados.

Diante das adversidades provocadas pelo processo de sexagem, torna-se necessário o desenvolvimento de melhores sistemas para a sexagem de espermatozóides. Espera-se que com a evolução da técnica, ocorra diminuição no custo (GARNER; SEIDEL, 2008) e aumento na fertilidade do sêmen bovino sexado (AMAN; SEIDEL, 1982). Larson et al. (2010) utilizaram sêmen sexado a 50 psi de pressão, e afirmaram que esta pressão no processo de sexagem é mais prejudicial ao espermatozóide do que 40 psi. A redução da pressão fluídica de 50 para 40 psi (ou menos), para a sexagem espermática, aumentou as taxas de prenhez com sêmen sexado da maioria dos touros (SCHENK et al., 2009), e foi consideravelmente menos nociva, o que foi verificado pelo aumento na proporção de espermatozóides sexados viáveis (SUH et al., 2005).

Com os avanços na técnica de sexagem, será possível a obtenção de resultados semelhantes ou próximos daqueles obtidos com sêmen convencional. De acordo com Peippo et al. (2009), que avaliaram a produção de embriões em novilhas e vacas da raça Holandesa superovuladas, a qualidade dos embriões após a fecundação bem sucedida com espermatozóides sexados é semelhante à qualidade dos embriões provenientes de sêmen convencional. No mesmo estudo, a proporção média de embriões de qualidade 1, entre os embriões transferíveis, não foi significativamente diferente entre os grupos que foram inseminados com

sêmen sexado e os grupos inseminados com sêmen convencional, tanto em novilhas quanto em vacas.

Apesar da semelhança na produção de embriões transferíveis e congeláveis obtidos de doadoras da raça Nelore inseminadas com sêmen sexado ou convencional 12-24h ou 18-30h após a administração de pLH, nossos resultados inferem que o atraso em 6 horas para a IATF em protocolo de SOV pode ser aplicado em outros estudos como alternativa para melhorar a produção de embriões com o uso de sêmen sexado.

## 8 CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo não confirmaram a hipótese proposta, e permitiram concluir que:

- As doadoras responderam ao tratamento de superestimulação do crescimento folicular, com satisfatória taxa e sincronização das ovulações.
- A produção de estruturas embrionárias não foi afetada pelo tipo de sêmen (convencional vs. sexado) ou pelo momento da IATF (12-24 ou 18-30 h após a indução da ovulação).
- Não foram verificadas diferenças significativas na produção de embriões de doadoras da raça Nelore superovuladas submetidas ao atraso de seis horas na IATF com sêmen sexado (de 12 e 24 para 18 e 30 h após a administração de pLH).

## REFERÊNCIAS

ABEYDEERA, L. R.; JOHNSON, L. A.; WELCH, G. R.; WANG, W. H.; BOQUEST, A. C.; CANTLEY, T. C. Birth of piglets preselected for gender following in vitro fertilization of in vitro matured pig oocytes by X and Y chromosome bearing sperm sorted by high speed flow cytometry. **Theriogenology**, v. 50, p. 981–8, 1998.

ADAMS, G. P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, v. 41, p. 19-24, 1994.

ADAMS, G. P.; BÓ, G. A.; MARTINEZ, M.; CACCIA, M.; TRIBULO, H.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, J. The effect of estradiol-17 $\beta$  and progesterone treatment on superovulatory response in beef cows. **Theriogenology**, v. 41, p. 153, 1994.

ADAMS, G. P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 72-80, 2008.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; GINTHER, O. J. Effect of progesterone on growth of ovarian follicles, emergence of follicular waves and circulating follicle stimulating hormone in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility** v. 95, n. 2, p. 627-640, 1992a.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, p. 177-188, 1992b.

ALI, J. I. Separation of bovine X from Y chromosome bearing spermatozoa using monoclonal H-Y antibodies. **Dissertations Abstracts International**, v. 47, p. 2689, 1987.

AMANN, R. P.; SEIDEL Jr., G. E. Prospects for sexing mammalian sperm. Boulder, CO: **Colorado Associated University Press**; 1982.

ANTONIOLLI, C. B. **Desenvolvimento folicular, ondas foliculares e manipulação**. 2002. 15f. Seminário (Seminário apresentado na disciplina de Endocrinologia da Reprodução do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 56, p. 1483–96, 2001.

- BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Superovulação em zebuínos de corte. In: Primeiro simpósio internacional de reprodução animal aplicada. Londrina. **Proceedings...** 2004. p. 212-22.
- BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Superovulation in zebu cattle: protocol P-36. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 23, p. 5-9, 2005.
- BARUSELLI, P. S. **Manual Prático de Inseminação Artificial em Tempo Fixo**. Biogenesis, Brasil, 56f., 2004.
- BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; VALENTIM, R.; BERBER, R. C. A.; CARVALHO FILHO, A. F. Aumento da taxa de prenhez em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo "Ovsynch" com inovulação em tempo fixo. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 28, p. 216, 2000.
- BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; NASSER, L. F. T.; SILVA, R. C. P.; MENEGATTI, J. A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I. C. C. Adequação da dose de FSH (Folotropin-v) em protocolos de superovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 244-245, 2003.
- BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M.; BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 77-88, 2006.
- BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; REIS, E. L.; NASSER, L. F.; BÓ, G. A. Novos avanços nos tratamentos de superovulação em doadoras de embriões bovino. In: Anais VI simpósio internacional de reprodução animal. **Proceedings...** CD-ROM; 2005.
- 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, p. 374-381, 2007.
- BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 120-126, 2002.
- BENYEI, B.; BARROS, C.C.W. Effect of superovulation on performance of bovine embryo donors imported from temperate zone to tropical climate during the first two years of adaptation. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, n. 4, p. 366-371, 2000.
- BINELLI, M. Estratégias anti-luteolíticas para a melhora da sobrevivência embrionária em bovinos. In: MADUREIRA E.H., BARUSELLI, P.S. **Controle**

**farmacológico do ciclo estral em ruminantes**, São Paulo, FUNVET, 2000, p. 99-114.

BLECHER, S. R.; HOWE, R.; LI, S.; DETMAR, J.; BLAHUT, L. M. A new approach to immunological sexing of sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1309-21, 1999.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-pointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v. 57, p. 53-72, 2002.

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

BÓ, G. A., ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Exogenous control of follicular development in cattle. **Theriogenology**, v. 43, p. 31-40, 1995b.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Follicular waves dynamic alter estradiol 17  $\beta$  treatment of heifers with or without a progesterone implant. **Theriogenology**, v. 41, p. 1555-1569, 1994.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of progestogen plus estradiol-17 $\beta$  treatment with on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, v.45, p. 897-910, 1996.

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.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MARTINEZ, M. F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 307-326, 2003.

BÓ, G. A.; BERGFELT, D. R.; BROGLIATTI, G. M.; PIERSON, R. A.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. Local versus systemic effects of exogenous estradiol-17 $\beta$  on ovarian follicular dynamics in heifers with progestogen implants. **Animal Reproduction Science**, v. 59, p. 141-157, 2000.

BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; ROCHA JUNIOR, V. R.; RUAS, J. R. M.; GIOSO, M. M.; FONSECA, J. F.; CARVALHO, G. R.; MALFFILI, V. V. Dinâmica folicular e momento da ovulação em vacas não lactantes das raças Gir e Nelore durante duas estações do ano. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 3, p. 346-354, 2004.

BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; ROCHA JUNIOR, V. R.; CARVALHO, G. R. Ovarian follicular dynamics in crossbred Holstein-Zebu heifers. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 595-604, 2001.

BUCHANAN, B. R.; SEIDEL Jr, G. E.; MCCUE, P. M.; SCHENK, J. L.; HERICKHOFF, L. A.; SQUIRES, E. L. Insemination of mares with low numbers of either sexed or unsexed spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1333-44, 2000.

CABODEVILA, J.; TORQUATRI, S. Superovulação de Fêmeas bovinas. In: PALMA, G.A. **Biotechnología de la Reproducción** 1ª edição INTA, Argentina, p. 79-108, 2001.

CARVALHO, J. B. P. **Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR) em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus***. 2004, 122p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

CASTILHO, C.; GARCIA, J. M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G. P.; BRITO, L. F. C. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first postovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.189-96, 2006.

CATT, S. L.; CATT, J. W.; GOMEZ, M. C.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilized by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. **Veterinary Record**, v. 139, p. 494-5, 1996.

CAVALIERI, J.; RUBIO, I.; KINDER, J. E.; ENTWISTLE, K. W. Synchronization of estrus and associated endocrine changes in *Bos Indicus* cows. **Theriogenology**, v. 47, p.801- 814. 1997.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R. J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. **Theriogenology**, v. 60, p. 855-65, 2003.

COLAZO, M. G.; MARTINEZ, M. F.; SMALL, J.A.; KASTELIC, J. P.; BURNLEY, C. A.; WARD, D. R. Effect of estradiol valerate on ovarian follicle dynamics and superovulatory response in progestin-treated cattle. **Theriogenology**, v. 63, p. 1454-68, 2005.

COSTA, L. L.; SILVA, J. C.; SILVA, J. R. Superovulatory response embryo quality and fertility after treatment with different gonadotrophins in native cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 1, p. 65-77, 2001.



CRAN, D. G.; MCKELVEYWAC, KING, M. E.; DOLMAN, D. F.; MCEVOY, T. G.; BROADBENT, P. J. Production of lambs by low dose intrauterine insemination with flow cytometrically sorted and unsorted sperm. **Theriogenology**, v. 47, p. 267, 1997.

CRAN, D. G.; JOHNSON, L. A.; POLGE, C. Sex preselection in cattle: a field trial. **Veterinary Record**, p. 495–6, 1995.

CREPALDI, G. A.; SALES, J. N. S.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; BARUSELLI, P. S. Momento da ovulação e taxa de prenhez de novilhas Jersey submetidas à inseminação artificial em tempo fixo com sêmen sexado em diferentes momentos. VIII Simposio Internacional de Reproduccion Animal (IRAC), Córdoba, Argentina. **Proceedings...** p. 16, 2009.

CUPP, A. S.; STUMPF, T.T.; KOJIMA, F.N.; WERTH, L.A.; WOLFE, M.W.; ROBERSON, M.S.; KITTOCK, R. J.; KINDER, J.E. Secretion of gonadotrophins change during the luteal phase of the bovine oestrus cycle in the absence of corresponding changes in progesterone or 17 $\beta$  estradiol. **Animal Reproduction Science**, v. 37, n. 2, p. 109-119, 1995.

DALTON, J. C.; NADIR, S.; BAME, J. H.; NOFTSINGER, M.; NEBEL, R. L.; SAACKE, R. G. Effect of time of insemination on number of accessory sperm, fertilization rate, and embryo quality in nonlactating dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2413-8, 2001.

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. 1778–85, 2008.

DISKIN, M. G.; SREENAN, J. M. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 59, p. 463–8, 1980.

D'OCCHIO, M. J.; SUDHA, G.; JILELLA, D.; WHITE, T.; MACLELLAN, L. J.; WALSH, J.; TRIGG, T. E.; MILLER, D. Use of 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. 601-13, 1997.

DONALDSON, L. E. Effect of insemination regimen on embryo production in superovulated cows. **Veterinary Record**, v. 117, p.35–7, 1985.

DRANSFIELD, M. B.; NEBEL, R. L.; PEARSON, R. E.; WARNICK, L. D. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1874-82, 1998.

EMMENS, C. W. Insemination pH and sex ratio in rabbits. **J. Hered.**, v. 51, p. 156-157, 1960.

ERICKSSON, R.J.; LANGEVIN, C.N.; NISHINO, M. Isolation of fractions rich in human Y sperm. **Nature**, London, v. 246, p. 241-4, 1973.

FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations. BASE de dados **FAOSTAT**. Disponível em <http://www.fao.org>>. Acesso em 20 de março de 2011.

FERNANDES, P.; TEIXEIRA, A. B.; CROCCI, A. J. BARROS, C. M. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF2alpha and estradiol benzoate (EB). **Theriogenology**, v.55, p. 1521-32, 2001.

FIGUEIREDO, R. D.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

FIGUEIREDO, M. M. N.; FONSECA, F. A.; TORRES, C. A. A.; GALIMBERT, A. M.; ALMEIDA, C. A. Dinâmica folicular ovariana de vacas leiteiras no pós-parto após tratamentos com buserilina (GnRH) e cloprostenol (PGF2 $\alpha$ ). **Revista Brasileira de Zootecnia** v. 29, n. 3, p. 725-731, 2000.

FINDLAY, J. K. Peripheral and local regulators of folliculogenesis. **Reproduction, Fertility Development**, v. 6, n. 2, p. 127-39, 1994.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of dominant follicle. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 109-126, 2004.

FORTUNE J. E.; SIROIS J.; QUIRK, S. M. The growth and differentiation of ovarian follicular during the bovine estrous cycle. **Theriogenology**, v. 29, n. 1, p. 95-109, 1988.

FREITAS, C. P. **Variações Metodológicas na Congelação de Sêmen Bovino Sexado** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), 2007.

FUGGER, E. F. Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-chromosome bearing sperm. **Theriogenology**, v. 52, p. 1345-440, 1999.

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

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

GARNER, D. L.; SUH, T. K. Effect of Hoechst 33342 staining and laser illumination on viability of sex-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 57, p. 746, 2002.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M.; BARUSELLI, P. S. Estudo ultrassonográfico da divergência folicular em novilhas *Bos indicus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (Suppl 1), p. 210, 2005a.

GIMENES, L. U.; CARVALHO, N. A. T.; SÁ FILHO, M. F.; SANTIAGO, L. L.; CARVALHO, J. B. P.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Capacidade ovulatória em novilhas *Bos indicus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 209, 2005b.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle Selection in Monovular Species. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 638-647, 2001b.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 239-257, 2003.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; KOT, K.; MEIRA, C.; BERGFELT, D. R. Association and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 524-9, 2003.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: Role of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 1, p. 197-205, 2001a.

GINTHER O. J.; BERGFELT, D. R.; BEG, M. A.; KOT, K. Follicle selection in cattle: relationships among growth rate, diameter ranging, and capacity for dominance. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 345-50, 2001b.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle: establishment of follicle deviation in less than 8 h through depression of FSH concentrations. **Theriogenology**, v. 52, p. 1079-93, 1999.

GINTHER, O. J.; KOT, K.; KULICK, L. J.; WILT BANK, M. C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v. 48, p. 75–87, 1997.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 223- 230, 1989.

GINTHER, O. J.; WILT BANK, M. C.; FRICKE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, n. 6, p. 1187-1194, 1996.

GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Effect of chronic treatment with a gonadotropin-release hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, p. 263-270, 1995.

GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Suppression the secretion of the follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-release hormone agonist. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 68-74, 1996.

GOODMAN, R. L.; KARSCH, F. J. Pulsatile secretion luteinizing hormone: differential suppression by ovarian steroids. **Endocrinology**, v. 107, n. 5, p. 1286-1290, 1980.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 6ª ed. Ed. Manole, 1995.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7ª ed. Barueri, SP: Ed. Manole, p. 160, 2004.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. Ciclos Reprodutivos. In: HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ª ed. Barueri, SP: Ed Manole, cap. 4, p. 55-67, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; JAINUDEEN, M. R.; Y. ROSNINA. Hormônios, fatores de crescimento e reprodução In: Hafez, E.S.E; Hafez, B.. **Reprodução Animal**, 7ª ed. Barueri, SP: Ed. Manole, p.33-55, 2004.

HAMILTON, S. A.; XU, Z. Z.; KIEBORZ, K. R.; YONGQUIST, R. S.; GARVERICK, H. A. Relationship between ovarian follicular dynamics and follicle-stimulating hormone levels during the bovine estrous cycle. **Journal of Animal Science**, v. 70, suppl. 1, p. 261-323, 1992.

HAWK, H. W. Gamete transport in the superovulated cow. **Theriogenology**, v. 29, p. 125–42, 1988.

HENDRIKSEN, P. J. M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? **Theriogenology**, v. 52, p.1295-1307, 1999.

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, 2009.

HOLLINGSHEAD, F. K.; EVANS, G.; EVANS, K. M.; CATT, S. L.; MAXWELL, W. M. C.; O'BRIEN, J. K. Birth of lambs of a pre-determined sex after in vitro production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and refrozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, v. 127, p. 557-68, 2004.

HOLLINGSHEAD, F. K.; GILLIAN, L.; O'BRIEN, J. K.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, p. 351-359, 2003.

HOLLINGSHEAD, F. K.; O'BRIEN, J. K.; HE, L.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Pregnancies after insemination of ewes with sorted, cryopreserved ram spermatozoa. **Reproductive Biology**, v. 32, p. 20, 2001.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 20 de março de 2011.

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**, 7ªed. Barueri, Ed. Manole, p. 413-419, 2004.

JOHNSON, L. A. Sex preselection in swine: altered sex ratios in offspring of following surgical insemination of flow sorted X and Y-bearing sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v.26, p.309, 1991.

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

JOHNSON, L. A.; FLOOK, J. P.; LOOK, M. V. Flow cytometry of X and E chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with HOECHST 33343. **Gamete Research**, v. 17, p.203-12, 1987.

JOHNSON, L. A.; PINKEL, D. Modification of a laser-based flow cytometer for high resolution DNA analysis of mammalian spermatozoa. **Cytometry**, v. 7, p. 268-73, 1986.

JOLLY, P. D.; TISDALL, D. J.; HEATH, D. A. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cAMP response to FSH and LH, and follicular atresia. **Biological Reproduction**, v. 51, p. 934-944, 1994.

KANECO, S.; OSHIO, S.; KOGAYASHI, T.; LIZUKA, R.; MOHRI, H. Human X- and Y- bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 124, p. 950-955, 1984.

KANEKO, H.; TERADA, T.; TAYA, K.; WATVNABE, G.; SASAMOTO, S.; HASEGAWAY, Y.; IGARASHI, M. Ovarian follicular dynamics and concentrations of estradiol-17  $\beta$ , progesterone, luteinizing hormone and follicle stimulating hormone during the periovulatory phase of the oestrus cycle in the cow. **Reproduction Fertility Development**, v. 3, n. 5, p. 529-535, 1991.

KARSCH, F. J. Central actions of ovarians steroids in feed back regulation of pulsatile secretion of luteinizing hormone. **Annual Review of Physiology**, v. 49, p. 365-382, 1987.

KASTELIC, J. P.; KNOPF, L.; GUNTHER, O. J. Effect of day of prostaglandin F2 treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, p. 169-180, 1990.

KLINC, P.; RATH, D. Application of flowcytometrically sexed spermatozoa in different farm animal species: a review. **Archives of Tierzycht, Dummerstorf**, v. 49, p. 41-54, 2006.

KNAACK, J.; NEHRING, H.; LORENZ, G. New result of experimental Sex control in cattle. **Tierzycht**, v. 7, n. 4, p. 156-9, 1973

KOO, G. C.; STACKPOLE, C. W.; BOYSE, E. A.; HAMMERLING, U.; LARDIS, M. P. Topographical, localization of the H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectronic microscopy. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 70, p. 1502-5, 1973.

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.

LIMA, V. F. M. H., Espermatózoide sexado bovino: Quando utilizá-lo? **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 213-224, 2006.

LINDSEY, A. C.; SCHENK, J. L.; GRAHAM, J. K.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L. Hysteroscopic insemination of low numbers of flow sorted fresh and frozen/thawed stallion spermatozoa. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, p. 121-7, 2002.

LIU, J.; SIROIS, J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 1527-32, 1998.

LU, K. H.; CRAN, D. G.; SEIDEL Jr., G. E. In vitro fertilization with flow cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 52, 1393–405, 1999.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, R. L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3615-26, 1992.

MAPA, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br>>. Acesso em: 20 de março de 2011.

MAPLETOFT, R. J.; STEWARD, K. B.; ADAMS, G. P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reproduction Nutrition Development**, v. 42, p. 601-611, 2002.

MARTINEZ, E. A.; GIL, M. A.; RIEKE, A.; MCCAULEY, T. C.; CANTLEY, T. C.; VAZQUEZ, J. M. Successful non-surgical deep intrauterine insemination in gilts and sows during metoestrus. Sixth international conference on pig reproduction. **Proceedings...**p. 133, 2001.

MARTINEZ, E. A.; VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; LUCAS, X.; GILL, M. A.; PARRILLA, I. Successful non-surgical intrauterine insemination with small numbers of spermatozoa in sows. **Reproduction**, v. 122, p. 289–96, 2001.

MARTINS, C. M. **Diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos taurus* e *Bos indicus***. 2007, 115p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

MARTINS, C. M.; CASTRICINI, E. S. C.; REIS, E. L.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Produção embrionária de vacas holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 3 (Supl 1), p. 286, 2005.

MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F. K.; BATHGATE, R.; DEGRAAF, S. P.; ERIKSSON, B. M. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**, v. 82–83, p. 79–85, 2004.

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

MELO, D. S.; FERREIRA, M. M. G.; MONTEIRO, F. M.; NOGUEIRA, M. F. G.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Manutenção de níveis sub-luteais de progesterona, após tratamento superestimulatório, pode diminuir a taxa de recuperação de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p.206, 2004a.

MELO, D. S.; FERREIRA, M. M. G.; MONTEIRO, F. M.; NOGUEIRA, M. F. G.; POTIENS, J. R.; BARROS, C. M. Protocolo P-36 não é deletério para oócitos de vacas Nelore (*Bos indicus*) doadoras de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 191, 2004b.

MEYERS, M. A.; BURNS, G.; ARN, D.; SCHENK, J. L. Birth of canine offspring following insemination of a bitch with flow-sorted spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 213, 2008.

MIHM, M. Follicle wave growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n 4, p. 191-200, 2002.

MIHM, M.; AUSTIN, E. J. The final stages of dominant follicle selection in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1, p.155–166, 2002.

MIHM, M.; CROWE, M. A.; KNIGHT, P. G.; AUSTIN, R. J. Follicle wave growth in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 4, p.191–200, 2002.

MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K.; SCHENK, J. L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, v. 66, p. 929-936, 2006.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, P. B. D. Controle do Estro e da Ovulação em Bovinos e Ovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, São Paulo: Livraria Varela, cap. 3, p. 25-55, 2001.

MORTON, K. M.; HERRMANN, D.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; MAXWELL, W. M. C.; RATH, D. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 931–40, 2007.

MOTA, A. V. **Sexagem de espermatozoides em mamíferos domésticos**. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP-Botucatu/SP, 2004.

NASSER, L.; ADAMS, G. P.; BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v. 40, p. 713–24, 1993.

NEVES, K. A. L. **Efeito do intervalo entre a inseminação e a ovulação na taxa de concepção de vacas Nelore inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado**. 2010, 89p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.



NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M. Adjusting sperm concentration used to inseminate superstimulated Nelore cows, in order to avoid decline in embryo production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 169, 2004.

NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M. Aspectos práticos e perspectivas futuras do modelo P-36 de superovulação em doadoras da raça Nelore. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34(supl. 1), p. 25-29, 2006.

NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, C. M. Timing of ovulation in Nelore cows superstimulated with P36 protocol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 509, 2003.

NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, B. J. P.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A.; D'OCCHIO, M. J.; BARROS, C. M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology**, v. 57, p. 1625-34, 2002.

NOGUEIRA, M. F. G.; BURATINI Jr, J.; BARROS, C. M. Embryo production and pregnancy rate in superstimulated nelore donors treated with hCG and LH to induce ovulation. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 196, 2004.

NOGUEIRA, M. F. G.; MELO, D. S.; CARVALHO, L. M.; FUCK, E. J.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Do high progesterone concentrations in embryos recipients synchronized with PGF<sub>2</sub> and eCG? **Theriogenology**, v. 61, p. 1283-1290, 2004.

NOGUEIRA, M. F. G.; PORTO, L. P. C.; BARROS, C. M. Dose-response trial in *Bos taurus* vs *Bos indicus* cows superstimulated with FSH, associated with controlled LH surge and fixed-time artificial insemination. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31 (sup.), p. 511, 2003.

O'BRIEN, J. K.; CRICHTON, E. G.; EVANS, K. M.; EVANS, G.; SCHENK, J. L.; STOJANOV, T. Sex ratio modification using sperm sorting and assisted reproductive technology-a population management strategy. 2nd international symposium on assisted reproductive technology for conservation and genetic management of wildlife. **Proceedings...** p. 224-31, 2002.

O'BRIEN, J. K.; ROBECK, T. R. Development of sperm sexing and associated assisted reproductive technology for sex preselection of captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 319-29, 2006.

O'BRIEN, J. K.; STOJANOV, T.; CRICHTON, E. G.; EVANS, K. M.; LEIGH, D.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric sorting of fresh and frozen-thawed spermatozoa in the lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). **American Journal of Primatology**, v. 66, p. 297-315, 2005.

O'BRIEN, J. K.; HOLLINGSHEAD, F. K. I.; EVANS, K. M.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Flow cytometric sorting of frozen-thawed spermatozoa in

sheep and non-human primates. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, p. 367–75, 2003.

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

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.

POPE, C. E.; CRICHTON, E. B.; GOMEZ, M. C.; DUMAS, C.; DRESSER, B. Birth of domestic cat kittens of predetermined sex after transfer of embryos produced by in vitro fertilization of oocytes with flow sorted spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 213–4, 2008.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cattle using GnRH and PGF<sub>2α</sub>. **Theriogenology**, v. 44, p. 915-23, 1995.

PURSLEY, R. J.; SILCOX, R. W.; WILTBANK, M. C. Effect of time of artificial insemination on pregnancy rates, calving rates, pregnancy loss, and gender ratio after synchronization of ovulation in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 2139-44, 1998.

RANKIN, T. A.; SMITH, W. R.; SHANKS, R. D.; LODGE, J. R. Timing of insemination in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 75, p. 2840-45, 1992.

RATH, D.; JOHNSON, L. A. Application and commercialization of flow cytometrically sex-sorted semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 338-346, 2008.

RATH, D.; SIEG, B.; LEIGH, J.; KLINC, P.; BESSELING, M.; KRÜGER, C.; WOLKEN, A.; FRENZEL, A.; WESTERMANN, P.; PROBST, S.; GROßFELD, R.; HADELER, K. G.; EHLING, C. Current perspectives of sperm sorting in domestic farm animals. 19th Meeting Association Europeenne de Transfert Embryonnaire. **Proceedings...** p. 125–128, 2003.

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: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 1ªed. São Paulo, Ed. Varela, p.153-160, 2002.

REIS, A. R. S.; REYES, A.; GAMBARINI, M. L.; RUMPF, R. Dinâmica folicular por ultra-sonografia em novilhas pré-púberes da raça Gir. **Archivos Latinoamericanos de Produccion Animal**, v. 13 (2), p. 51-55, 2005.

RHODES, F. M.; DEATH, G.; ENTWISTLE, K. W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 38, n. 4, p. 265-277, 1995.

RIVERA, G. M.; FORTUNE, J. E. Development of codominant follicles in cattle is associated with a follicle-stimulating hormone dependent insuline-like growth factor binding protein 4 protease. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 112-8, 2001.

ROCHE, J. F.; BOLAND, M. P.; MCGEADY, T. A. Reproductive wastage following artificial insemination of heifers. **Veterinary Record**, v. 109, p. 401-4, 1981.

RODRIGUES, C. A.; MANCILHA, R. F.; REIS, E. L.; AYRES, H.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Efeito do número de implantes de norgestomet e do momento da administração do indutor de ovulação em vacas holandesas superovuladas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (Suppl 1), p. 229, 2005.

ROELOFS, J. B.; GRAAT, E. A. M.; MULLAART, E.; SOEDE, N. M.; VOSKAMP-HARKEMA, W.; KEMP, B. Effect of insemination-ovulation interval on fertilization rates and embryo characteristics in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 66, p. 2173-81, 2006.

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

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; NICHII, M.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; BARUSELLI, P. S. Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. **Theriogenology**, v. 74, p.1636-1642, 2010.

SALES, J. N. S.; NEVES, K. A. L.; SOUZA, A. H.; CREPALDI, G. A.; SALA, R. V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; FARIA, M.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v. xx, p. 1-8, 2011. (in press)

SANTIAGO, L. L., TORRES, C. A. A., NOGUEIRA, E. T., BORGES, A. M. Resposta superovulatória de novilhas Nelore confinadas tratadas com duas doses diferentes de FSH. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Porto Alegre. **Anais...** p. 36, 1999.

- SARKAR, S. Motility, expression of surface antigen, and X and Y human sperm separation *in vitro* fertilization medium. **Fertility and Sterility**, v. 42, n. 6, p. 899-905, 1984.
- SARTORELLI, E. S.; CARVALHO, L. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J.; BARROS, C. M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. **Theriogenology**, v. 63, p. 2382–94, 2005.
- SARTORI, R.; FRICKE, P. M.; FERREIRA, J. C. P.; GINTHER, O. J.; WLTBANK, M. C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1403- 1409, 2001.
- SARTORI, R.; SOUZA, A. H.; GUENTHER, J. N.; CARAVIELLO, D. Z.; GEIGER, L. N.; SCHENK, J. L.; WLTBANK, M. C. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v.1, p. 86-90, 2004.
- SCHENK, J. L.; CRAN, D. G.; EVERETT, R. W.; SEIDEL Jr., G. E. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. **Theriogenology**, v. 71, p. 717–728, 2009.
- SCHENK, J. L.; DEGROFFT, D. L. Insemination of cow elk with sexed frozen sperm. **Theriogenology**, v. 39, p. 514, 2003.
- SCHENK, J. L.; SUH, T. K.; SEIDEL Jr., G. E. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology**, v. 65, p. 299–307, 2006.
- SEIDEL Jr, G. E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v. 68, p. 443–6, 2007.
- SEIDEL JR., E. G. Sexing mammalian sperm-interwiing of commerce, technology, and biology. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 145-56, 2003.
- SEIDEL Jr, G. E.; GARNER, D. L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. **Reproduction**, v. 124, p. 711– 4, 2002.
- SEIDEL Jr., G. E.; SCHENK, J. L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p. 129–138, 2008.
- SEIDEL Jr, G.E.; JOHNSON, L. A.; ALLEN, C. A.; WELCH, G. R.; HOLLAND, M. D.; BRINK, Z. Artificial insemination with X- and Y-bearing bovine sperm. **Theriogenology**, v. 45, p. 309, 1996.

- SEIDEL Jr, G. E.; ALLEN, C. H.; JOHNSON, L. A.; HOLLAND, M. D.; BRINK, Z.; WELCH, G. R. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of nonfrozen and sexed sperm. **Theriogenology**, v. 48, p. 1255–64, 1997.
- SEIDEL Jr, G. E. Overview of sexing sperm. **Theriogenology**, v. 68, p. 443–6, 2007.
- SHETTLES, L. B. Factors influencing sex ratios. **International Journal of Gynecology and Obstetrics**, v. 8, p. 643, 1970.
- SHETTLES, L. B. Human spermatozoa shape in relation to sex ratio. **Fertility and Sterility**, v. 12, p. 502-8, 1961.
- SHETTLES, L. B. Nuclear structure of human spermatozoa. **Nature**, v.8, p.643, 1960.
- SHORT, R. E.; CARR, J. B.; GRAVES, N. W.; MILMINE, W. L.; BELLOWS, R. A. Effect of clitoral stimulation and length of time and pregnancy rates in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 49, n. 3, p. 643-650, 1979.
- SILVA, A. R. R.; REYES, A.; GAMBARINI, M. L.; RUMPF, R.; OLIVEIRA, C. C.; OLIVEIRA FILHO, B. D. Estudo da dinâmica folicular em novilhas da raça Gir através de ultra-sonografia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 130-132, 2001.
- SOUZA, A. H.; MUNDIM, L.; VENTURIM, P.; AYRES, H.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S.; MARTINS, C. M.; BARUSELLI, P. S. Effect of the type of semen (sexed vs non-sexed) and time of AI on pregnancy rates in Nelore cows inseminated at fixed time. In: XXV Jubilee World Buiatrics Congress, **Hungarian Veterinary Journal**, Budapeste: Kiadó, 130:208, 2008.
- STUMPF, T. T.; DAY, M. L.; WOLFE, M. W.; CLUTTER, A. C.; STOTTS, J. A.; WOLFE, P. L.; KITTOK, R. J.; KINDER, J. E. Effects of estradiol on secretion of luteinizing hormone during the follicular phase of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 1, p. 91, 1989.
- SUH, T. K.; SCHENK, J. L.; SEIDEL Jr, G.E. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. **Theriogenology**, v. 64, p. 1035–48, 2005.
- SUNDERLAND, S. J.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, n. 3, p. 547-555, 1994.
- VAN DE LEEMPUT, E. E.; VOS, P. L. A. M.; HYTTEL, P.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; DIELEMAN, S.J. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin-treated heifers. **Theriogenology**, v. 55, p. 573-92, 2001.

VAN MUNSTER, E. B.; STAP, J.; HOEBE, R. A.; TE MEERMAN, G.J.; ATEN, J. A. Difference in sperm head volume as a theoretical basis for sorting X- and Y-bearing spermatozoa: Potentials and limitations. **Theriogenology**, v. 52, p. 1281-93, 1999.

VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; PARRILLA, I.; ROCA, J.; GIL, M. A.; VAZQUEZ, J. L. Birth of piglets after deep intrauterine insemination with flow cytometrically sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59, p. 1605–1614, 2003.

VISINTIN, J. A.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; MIZUTA, K.; CELEGHINI, E. C. C.; ASSUMPCÃO, M. E. O. A.; GUSMÕES, P. P. G.; CANDINI, P. H. Superovulação de novilhas da raça Nelore com diferentes doses de FSH/LH e congelamento de embriões pelo método one-step com etilenoglicol. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 5, 1999.

WINDSOR, D. P.; EVANS, G.; WHITE, I. G. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome bearing sperm: A review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, p. 155-71, 1993.

ZANENGA, C. A.; MARQUES, M. O.; SANTOS, I. C. C.; VALENTIN, R.; BARUSELLI, P. S. Comparação entre dois protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31(Suppl 1), p. 626–7, 2003.