



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**USO DE ESTRADIOL E GnRH NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM VACAS
NELORE (*Bos indicus*) SUBMETIDAS À IATF COM SÊMEN SEXADO**

Madson Atila Vidal e Silva

SÃO LUÍS – MA
2012

MADSON ATILA VIDAL E SILVA

**USO DE ESTRADIOL E GnRH NA INDUÇÃO DA OVULAÇÃO EM VACAS
NELORE (*Bos indicus*) SUBMETIDAS À IATF COM SÊMEN SEXADO**

Dissertação apresentada ao programa
de Mestrado em Ciência Animal da
Universidade Estadual do Maranhão
como requisito à obtenção do título de
Mestre em Ciência Animal

Área de Concentração: Conservação e Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior

SÃO LUÍS - MA
2012

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

Silva, Madson Átila Vidal e.

Uso de estradiol e GnRH na indução da ovulação em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à IATF com sêmen sexado/ Madson Átila Vidal e Silva.– São Luís, 2012.

76 f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2012.

Orientador: Prof. José Ribamar de Souza Torres Júnior

1. Inseminação artificial. 2. Bovinos. 3. Progesterona. I.Título

CDU: 636.2.082.453.5

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em -----/-----/-----pela
banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Orientador

Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Júnior

1º Membro

Prof. Dr. José Nélio de Sousa Sales

2º Membro

Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos

Dedico este trabalho a toda minha
família em especial aos meus pais
Bernardo e Arlete.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a DEUS em que deposito toda minha fé, confiança e esperança, por estar sempre iluminando meu caminho, me tornando a cada dia mais uma pessoa digna e bondosa, dando forças e coragem para superar e enfrentar quaisquer obstáculos e adversidades.

Aos meus pais, Bernardo Alcantara e Silva e Arlete Moraes Vidal e Silva, pelos exercícios diários de amor, carinho, educação, humildade e responsabilidade até o momento, e por estarem sempre acreditando na minha pessoa, até mesmo de apoiarem nos momentos mais difíceis que já passei.

Ao restante de minha família em especial aos meus irmãos Marcio e Myllena Vidal e minha avó Aldenia, pelo apoio e carinho desde a infância até os dias atuais.

A minha namorada Josania Lopes, pela confiança depositada em minha pessoa, compreensão, paciência, incentivo, companheirismo, carinho e todo amor que sentimos um pelo outro.

A meu orientador de mestrado Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres pela chance oportuna de possibilitar o meu desenvolvimento pessoal e profissional na área de Reprodução Animal, pela amizade, honestidade e auxílio na realização desta dissertação.

Às empresas Ouro Fino Saúde Animal pela colaboração nos fármacos cedidos ao experimento intermediados pelo amigo Manoel Filho e João Paulo e a CRV Lagoa da Serra, em nome do gerente de área William Xavier e do Médico Veterinário Carlos Bacelar Pontes, pela grande ajuda em relação ao sêmen utilizado e pelo excelente serviço prestado em prol da pesquisa.

A FAPEMA, pelo suporte financeiro através da concessão de bolsa e também pelo financiamento do projeto no edital Universal FAPEMA N° 30/2010, processo 384/2011, sem o qual não conseguiria desenvolver este trabalho nestes 24 meses de projeto.

A UEMA por ceder em momentos cruciais o transporte para o deslocamento de material e de pessoas envolvidas na pesquisa.

Aos colegas de mestrado da UEMA e UFMA, pelos bons momentos vivenciados durante toda época de mestrado, em especial aos amigos Cícero Soares, José Herlon Martins, Carlos Eduardo e Sônia Lima.

Aos alunos de graduação do Curso de Zootecnia de Chapadinha, que fizeram grande esforço para estarem presentes em momentos importantes da pesquisa, dentre eles, Osias Júnior, Hans Miller, Hélyda e Itamara Gomes.

Ao professor Ricardo de Macêdo Chaves por estar sempre disposto a colaborar em todos os trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa e estar sempre de bem com a vida.

Ao professor Fernando Andrade Souza pelo apoio e conselhos dados em momentos importantes nos trabalhos a campo.

Aos proprietários das Fazendas Olho D'Água, Águas de Março e São Benedito pelos animais cedidos para os experimentos.

A toda a equipe da Fazenda Olho D'Água que ajudou durante os trabalhos, em especial a Dona Maria, o gerente Carlão, Netinho, Bruno, Magno e Delvan, sempre dispostos a colaborar no bom andamento dos serviços.

À equipe de curral da Fazenda Águas de Março em especial aos irmãos Celso e Capitão pela maravilhosa receptividade durante nossas visitas.

À equipe de funcionários da Fazenda São Benedito, pelo esforço, dedicação e compreensão da pesquisa, em especial ao gerente Toinho e sua família, Barbosa, Bastião e o Son.

Aos meus bons amigos da graduação, pelos momentos divertidos e saudosos que vivemos, em especial ao Marcos Rogério (Doutor), Valdimiro Braz, Werbeth Oliveira, Edmilson Wesley, Iza Martins, Douglas Dadalto, Aécio Macêdo, Evaldo Sá, entre outros, que se fossem citados todos provavelmente não caberiam nesta página de agradecimentos.

Ao Grupo de Reprodução Animal (GPBIO), no qual pude acompanhar de perto o início deste projeto e também por estar sempre colaborando com os alunos que vislumbram alcançar objetivos maiores, além de incentivar na formação de novos pesquisadores.

A todos que de forma direta ou indiretamente participaram e ajudaram no sucesso deste trabalho.

Muito Obrigado!!!

SILVA, M. A. V. **Uso de estradiol e GnRH na indução da ovulação em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à IATF com sêmen sexado.** Estradiol and GnRH in the induction of ovulation in Nelore (*Bos indicus*) inseminated with sex-sorted semen. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís – MA, 2012.

RESUMO

Objetivando avaliar o efeito do cipionato de estradiol (CE), benzoato de estradiol (BE) e a associação de cipionato de estradiol + GnRH como indutores de ovulação, 383 vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes foram submetidas a sincronização da ovulação e inseminadas com sêmen sexado. Dois experimentos foram realizados para avaliar a dinâmica folicular (Experimento 1) e taxa de concepção (TC; Experimento 2) dos protocolos propostos. No experimento 1, 39 fêmeas receberam 2 mg de benzoato de estradiol (BE) e um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) no dia zero (D0). No dia oito (D8), retirou-se o dispositivo e administrou-se 0,53 mg de prostaglandina (PGF2 α) e 300 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG). A partir desse momento os animais foram distribuídos homogeneamente em três tratamentos de acordo com o indutor de ovulação utilizado: Grupo CE (aplicado 1 mg no D8); Grupo BE (aplicado 1mg no D9) e Grupo CE+GnRH (aplicado 1mg de CE no D8 e 8 μ g de GnRH no D10, respectivamente). Exames ultra-sonográficos foram realizados a cada 12 horas da retirada dos dispositivos até o momento da ovulação. A análise estatística foi realizada através dos aplicativos PROC GENMOD e PROC GLM do SAS. Os resultados dos grupos CE, BE e CE+GnRH respectivamente, para as variáveis diâmetro máximo do folículo ovulatório (FO; 12,3 \pm 0,3; 11,8 \pm 0,5; 12,1 \pm 0,4 mm), taxa de ovulação (92,3%; 92,3%; 100,0%) e momento da ovulação (60,0 \pm 2,8; 64,0 \pm 2,9; 64,1 \pm 3,0 h), não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$). No experimento 2, 344 animais foram submetidos aos mesmos tratamentos e inseminados em tempo fixo com sêmen sexado no intervalo de 60 horas após a retirada dos dispositivos. Não houve interação entre as variáveis classificatórias (réplica, categoria animal, escore corporal, partidas de sêmen e número de usos do dispositivo) na taxa de concepção. Também não houve efeito dos tratamentos na taxa de concepção (CE=45,2% vs. CE+GnRH=39,1% vs. BE=34,2%; $P=0,09$). Portanto, conclui-se que a associação de cipionato de estradiol com GnRH não influenciou a dinâmica folicular nem a taxa de concepção em vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes submetidas à IATF com sêmen sexado, podendo se utilizar benzoato ou cipionato de estradiol como indutores.

Palavras-chave: bovinos, sincronização, dinâmica folicular, inseminação.

SILVA, M. A. V. **Estradiol and GnRH in induction of ovulation of Nelore (*Bos indicus*) inseminated with sex-sorted semen.** Uso de cipionato de estradiol e GnRH na indução da ovulação em vacas Nelore (*Bos indicus*) submetidas à IATF com sêmen sexado. 2012. 76 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís – MA, 2012.

ABSTRACT

Aiming to evaluate the efficiency of estradiol cypionate (EC), estradiol benzoate (EB) and estradiol cypionate plus GnRH on induction of ovulation, 383 lactating Nelore (*Bos indicus*) cows were synchronized and inseminated with sex-sorted semen. Two experiments were conducted to evaluate the follicular dynamics (Experiment 1) and conception rates (CR; Experiment 2). In experiment 1, 39 animals received 2 mg of estradiol benzoate (EB) and a progesterone intravaginal device (P4) on day zero (D0). In day eight (D8), withdrew the device and administered 0,53 mg of prostaglandin (PGF2 α) and 300 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG). Thereafter the animals were homogeneously allocated in three treatments according the ovulation inducer: EC (1 mg applied in D8); Group EB (1 mg applied in D9) and Group EC+GnRH (1 mg of EC applied in D8 and 8 μ g of GnRH in D10, respectively). Ultrasound examinations were performed every 12 hours starting in device withdrawal until the time of ovulation. Statistical analysis was performed with PROC GENMOD and PROC GLM of SAS. The results for EC, EB and EC+GnRH respectively, for the variables maximum diameter of the ovulatory follicle (FO; 12.3 \pm 0.3; 11.8 \pm 0.5; 12.1 \pm 0.4 mm), ovulation rate (92.3%; 92.3%; 100.0%) and moment of ovulation (60.0 \pm 2.8; 64.0 \pm 2.9; 64.1 \pm 3.0h), were similar (P>0,05). In experiment 2, 344 animals were submitted to the same treatments as previously reported and timed inseminated with sex-sorted semen at 60 to 64h after devices withdrawal. No interactions between independent variables (replicate, animal category, body condition score, semen batch and previous use of progesterone device) were observed. There was no effect of treatment on conception rate (EC= 45.2% vs. EC+GnRH= 39.1% vs. EB=34.2%; P=0,09). In conclusion, the association of estradiol cypionate plus GnRH not influenced the follicular dynamics neither the conception rates in lactating Nelore (*Bos indicus*) cows timed inseminated with sex-sorted semen, showing that is possible to use estradiol benzoate or cypionate as ovulation inducers.

Keywords: cattle, synchronization, follicular dynamics, insemination

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	HIPÓTESE	19
3	OBJETIVOS	20
3.1	Geral.....	20
3.2	Específicos.....	20
4	JUSTIFICATIVA	21
5	REVISÃO DE LITERATURA	23
5.1	Dinâmica folicular no ciclo estral de fêmeas bovinas.....	23
5.2	Protocolos de sincronização de ovulação.....	25
5.3	Indutores de ovulação.....	28
5.4	Biotechnology do sêmen sexado.....	31
5.5	Inseminação Artificial com Sêmen sexado	36
6	MATERIAL E MÉTODOS	39
6.1	Animais.....	39
6.2	Instalações e manejo nutricional.....	40
6.3	Protocolo base para inseminação artificial em tempo fixo.....	42
6.4	Delineamento experimental.....	42
6.4.1	Experimento 1: Dinâmica folicular e taxa de ovulação de vacas Nelore (<i>Bos indicus</i>) tratadas com diferentes indutores de ovulação.....	42
6.4.2	Experimento 2: Taxa de concepção de vacas Nelore (<i>Bos indicus</i>) tratadas com diferentes indutores de ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com sêmen sexado....	44
6.5	Sêmen e avaliação seminal.....	45
6.6	Análise estatística.....	46
7	RESULTADOS	48
8	DISCUSSÃO	52
9	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Escore de condição ovariana (ECO) adaptado de Madureira & Pimentel.....	39
TABELA 2	Análise das partidas de sêmen sexado utilizadas em experimento da taxa de concepção em vacas Nelore com diferentes de ovulação. Paranarama e Lagoa do Mato (MA), 2012.....	45
TABELA 3	Diâmetro do folículo dominante na remoção do dispositivo (D8), diâmetro máximo do folículo dominante (FD) e ovulatório (FO), momento da ovulação e taxa de ovulação em vacas Nelore (Bos indicus) lactantes tratadas com diferentes indutores de ovulação, Bacabal (MA), 2012.....	48
TABELA 4	Chance de concepção (P/IA%) com base nas variáveis classificatórias em vacas Nelore tratadas com diferentes indutores de ovulação. Parnarama e Lagoa do Mato (MA), 2012.....	50
TABELA 5	Taxa de concepção em vacas Nelore (Bos indicus) com sêmen sexado em diferentes tratamentos com indutores de ovulação, Parnarama e Lagoa do Mato (MA), 2012.....	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Município de Bacabal (MA).....	40
FIGURA 2	Municípios de Parnarama e Lagoa do Mato (MA).....	41
FIGURA 3	Protocolo base de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo.....	42
FIGURA 4	Representação esquemática dos protocolos de sincronização da ovulação para acompanhamento da dinâmica folicular ovariana.....	43
FIGURA 5	Representação esquemática dos protocolos de sincronização da ovulação e do momento das inseminações.....	44
FIGURA 6	Distribuição das ovulações em horas após a retirada dos dispositivos intravaginais de P4.....	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

a.C: antes de Cristo
AMP: Adenosina Monofosfato
BE: Benzoato de estradiol
CE: Cipionato de estradiol
d.C: depois de Cristo
DNA: Ácido desoxirribonucléico
E₂: Estradiol
ECC: Escore de condição corporal
eCG:Gonadotrofina coriônica eqüina
ECO: Escore de condição ovariana
FD:folículo dominante
FO: folículo ovulatório
FSH:Hormônio folículo estimulante
GnRH: Hormônio liberador das gonadotrofinas
h: horas
IA: Inseminação artificial
IATF: inseminação artificial em tempo fixo
IGF: Fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1
IGFBP: Proteínas ligadoras do fator de crescimento semelhante à insulina
IM: intramuscular
Km/h: Quilômetros por hora
LH: hormônio luteinizante
LHR: Receptores de LH
mg: miligrama
mm: milímetros
NRC: National Research Council (Conselho Nacional de Pesquisa)
P₄: Progesterona
pH: Potencial hidrogeniônico
PGF_{2α}: Prostaglandina
psi: pound force per square inch (libra força por polegada quadrada)
RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro
sptz: espermatozóides
US: ultra-som
UI: unidade internacional

1 INTRODUÇÃO

O efetivo nacional do rebanho bovino brasileiro chegou a 212,8 milhões de cabeças ao final do ano de 2011, tendo aumento de 1,6% em relação ao ano de 2010, o que consolidou o Brasil como detentor do maior rebanho comercial do mundo, de acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011). Neste contexto, a região Nordeste se destacou como a que apresentou o maior crescimento, de 2,9% no período, seguida por Sudeste (2,8%) e Norte (2,7%).

Considerando este efetivo populacional, cerca de 80% do rebanho é constituído por animais de raças zebuínas (*Bos indicus*), tendo como características favoráveis à comprovada adaptabilidade ao clima e ambiente predominante no Brasil, sendo que dentre elas, podemos dar destaque a raça Nelore, que abrange cerca de 90% desta população (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE, 2012).

A predominância do grupo genético *Bos indicus* se deve à sua maior adaptabilidade às condições climáticas, no que diz respeito a altas temperaturas e umidade, além da disponibilidade de alimentos por meio da sazonalidade quali-quantitativa da produção de plantas forrageiras encontradas no País. Porém, apesar dessas características adaptativas dos zebuínos às condições tropicais, na grande maioria dos rebanhos brasileiros observa-se comprometimento nos índices reprodutivos, principalmente devido ao prolongamento do período de anestro pós-parto. Além da baixa eficiência reprodutiva, o rebanho brasileiro apresenta baixo número de vacas inseminadas artificialmente (apenas 6% das vacas em idade reprodutiva). Historicamente, a inseminação artificial revelou-se como a ferramenta mais eficiente do melhoramento genético, tanto em bovinos de leite quanto em bovinos de corte (BARUSELLI et al., 2008).

O melhoramento genético, baseado na seleção de indivíduos com maior desenvolvimento ponderal, rendimento de carcaça, produção leiteira, melhor conversão alimentar e precocidade sexual, possibilita o aumento da produtividade, tanto de carne quanto de leite. Assim, a eficiente multiplicação

de animais superiores proporciona maior retorno econômico da atividade pecuária. No entanto, a multiplicação e distribuição desse material genético somente são possíveis com adequado manejo, sem o comprometimento da eficiência reprodutiva do rebanho (PINEDA, 2004).

As técnicas que permitem realizar a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) são fundamentadas, principalmente, na adequação de protocolos que para induzir e/ou sincronizar o estro no período após o parto e/ou próximo a puberdade. Esses protocolos possibilitam a utilização de progesterona ou progestágenos, aliados a outros hormônios que preconizam induzir a emergência de ondas foliculares sincronizadas, controlando a duração do crescimento folicular até o estágio pré-ovulatório e a ovulação sincronizada em todos os animais simultaneamente. Portanto, os protocolos para IATF promovem uma ação exógena conjunta que manifesta alterações endócrinas, simulando os acontecimentos fisiológicos da fêmea. Entretanto, vale enfatizar que o conhecimento dos eventos neuroendócrinos associados ao ciclo estral, assim como dinâmica do desenvolvimento folicular são de extrema importância para que se possa aperfeiçoar a utilização dos hormônios e atingir a máxima eficiência (BARUSELLI, 2005).

No manejo reprodutivo das espécies domésticas, sobretudo de bovinos, algumas melhorias marcantes conduziram a altas expectativas e elevada demanda por novas tecnologias que pudessem atender às necessidades do mercado em desenvolvimento. Desde então houve grande interesse por técnicas que pudessem prever ou controlar o sexo dos bezerros nascidos, principalmente por inseminação artificial e transferência de embriões. De maneira comercial, em gado de corte há uma valorização do sexo masculino devido à maior conversão alimentar e, em gado de leite, o nascimento de fêmeas é economicamente mais viável para a produção (BARUSELLI et al., 2007; SEIDEL JR, 2003).

Nos dias atuais a separação dos espermatozoides pelo “sexo” cromossômico (cromossomos X e Y) já é possível devido ao desenvolvimento da citometria de fluxo, que é uma técnica com capacidade de separar em torno de 10 milhões de células espermáticas de cada sexo por hora, com 90% de

acurácia (JOHNSON, 2000; SEIDEL JR, 2003). Assim, espera-se que em poucos anos haja ampla difusão comercial do sêmen sexado em muitos países e, principalmente no Brasil, que possui o maior rebanho comercial do mundo.

A separação dos espermatozoides “machos” (com o cromossomo Y) dos espermatozoides “fêmeas” (com o cromossomo X) é possível devido às diferenças no conteúdo do DNA dessas células, visto que o espermatozoide X possui cerca de 4% mais cromatina que o espermatozoide Y (GARNER, 2001).

A sexagem de sêmen permite manipular a intensidade na seleção de machos e fêmeas, e o impacto de seu uso tem sido considerado maior em sistemas de produção do que em programas de melhoramento genético, especialmente em bovinos de corte (KINGHORN et al., 1991; VILLANUEVA et al., 1995).

Em vários estudos, tem-se investigado o potencial uso do sêmen sexado em sistemas de produção de bovinos, sendo apontados como fatores limitantes para sua maior aplicabilidade em larga escala: o custo extra da dose de sêmen sexado, a menor capacidade de fertilização do sêmen sexado em relação ao convencional e a precisão na definição do sexo do futuro produto (HOHENBOKEN, 1999; SEIDEL JR, 2003; MADALENA & JUNQUEIRA, 2004).

Além destes, a dificuldade de se intensificar a seleção de fêmeas sem comprometer a intensidade de seleção dos machos, visando aumentar o ganho genético, tem sido outro fator limitante do uso do sêmen sexado em programas de melhoramento. Segundo Kinghorn (2003), com modelos simples, seria difícil prever um ganho extra de mais de 5% por geração em relação a uma situação com metade dos animais de cada sexo.

Uma alternativa para contornar as limitações do uso de sêmen sexado em programas de melhoramento seria a combinação por meio de estratégias de acasalamento dirigido usando mais racionalmente os animais geneticamente superiores. Por exemplo, obtendo menos candidatos machos à seleção, mas de modo que estes fossem geneticamente superiores e, concomitantemente, aumentando a intensidade de seleção de fêmeas (NEVES et al., 2009).

Atualmente, várias pesquisas estão sendo publicadas relacionando a taxa de concepção com sêmen sexado em vacas de corte e de leite sincronizadas e inseminadas em tempo fixo. Porém, é sabido que uma das possíveis razões da diminuição dos índices de fertilidade após o uso de sêmen sexado é o menor tempo de viabilidade, associado com diferentes padrões de motilidade espermática (SCHENK et al., 2006).

Alguns autores relataram que o sêmen sexado necessita de menor tempo para a capacitação intrauterina devido ao processo de separação por citometria de fluxo (LU et al., 2004). Uma das possibilidades de diminuir a variação do momento da ovulação é o emprego de técnicas de sincronização, o que poderia colaborar na eficiência de programas de inseminação artificial com sêmen sexado. Vacas de corte e de leite sincronizadas com progestágenos e estradiol ovulam cerca de 70-72h após a retirada dos implantes (SOUZA et al., 2006, BARUSELLI et al., 2006).

Em programas de IATF, comumente administra-se pequenas doses de estradiol concomitante à remoção dos implantes de progestágenos ou 24 horas após, para induzir a ovulação (BÓ et al., 2002). Alternativamente, a ovulação pode ser induzida com hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) ou com hormônio luteinizante (LH) 12 horas antes ou no momento da IATF (PURSLEY et al., 1995; GEARY et al., 2001; MARTINEZ et al., 2002; MARQUES et al., 2003).

Recentes pesquisas apontam a necessidade de estudar de forma integrada os efeitos maternos, juntamente com as características do sêmen a ser introduzido no trato reprodutivo da fêmea (BARUSELLI et al., 2007). No caso do sêmen sexado, sabe-se que sua taxa de fertilização pelos métodos convencionais tem sido inferior ao sêmen não sexado (ANDERSSON et al., 2004; SARTORI et al., 2004; SEIDEL et al., 1999; SCHENK et al., 2006).

A exata causa das baixas taxas de fertilização do sêmen sexado permanece ainda desconhecida, mas é provavelmente devido aos procedimentos de manipulação e separação espermática laboratorial (SEIDEL JR, 2007). Estes fatores ocasionam menor tempo de viabilidade, associado com diferentes padrões de motilidade espermática no sêmen sexado (SCHENK

et al., 2006). No trabalho de Lu et al. (2004) foi relatado que o sêmen sexado necessita de menor tempo para a capacitação intra-uterina devido a possível pré-capacitação durante o processo de separação no citômetro de fluxo. Além disso, ocorre substituição do plasma seminal e longo tempo de espera entre a colheita do ejaculado e o congelamento. Por estas razões, atualmente se considera inviável produzir comercialmente doses de sêmen sexado com concentração superior a 3.0×10^6 espermatozoides viáveis por dose inseminante.

Segundo Dobrowolski et al. (1970), menos de 1% dos espermatozoides inseminados estão disponíveis no local de fertilização 24 horas após a inseminação. Caso a fêmea seja inseminada muito cedo, a reserva espermática poderá sofrer depleção antes mesmo que a ovulação ocorra, havendo alto índice de oócitos não fertilizados. Por outro lado, se a inseminação for realizada tardiamente, os oócitos poderão retomar a meiose e estarem envelhecidos ao contato com os espermatozoides. Em ambos os casos, deve ser dada a devida importância à sincronia entre o momento da inseminação e a ovulação.

Assim, objetiva-se neste estudo avaliar diferentes indutores de ovulação em protocolos de IATF, na dinâmica folicular e taxa de concepção com a utilização de sêmen sexado em vacas lactantes da raça Nelore (*Bos indicus*).

2 HIPÓTESE

A associação de cipionato de estradiol com GnRH proporciona maior sincronização da ovulação e potencializa a concepção de vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes submetidas à IATF com sêmen sexado.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Verificar os efeitos do tratamento com diferentes indutores de ovulação sobre a taxa de concepção e ovulação em vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes submetidas à Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) utilizando sêmen sexado.

3.2 ESPECÍFICOS

Promover maior sincronização de ovulação com a administração de cipionato de estradiol associado ao GnRH em vacas *Bos indicus* submetidas à IATF.

Reduzir o intervalo entre a inseminação e as ovulações, potencializando a concepção de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF com sêmen sexado.

4 JUSTIFICATIVA

A utilização da inseminação artificial (IA) na pecuária nacional vem cada dia ganhando espaço, por dispensar a aquisição e manutenção de reprodutores no rebanho, além de ser de baixo custo. A técnica de IA também é simples e de fácil assimilação, o que elimina a necessidade de especialistas em reprodução para sua realização, requerendo treinamento mínimo. Estes fatores popularizaram o uso da IA, garantindo à técnica praticidade e economicidade, podendo ainda se tornar ainda mais vantajosa com a evolução de novas técnicas.

Com a adoção da IATF, o controle reprodutivo do rebanho fica mais fácil. Esta técnica traz como vantagem principal a inseminação em momentos pré-definidos. Isto é possível pelo uso de hormônios que sincronizam o estro e a ovulação, permitindo inseminar um maior número de fêmeas em menor tempo. Além disso, permite programar a inseminação e o nascimento de bezerros, aumentar o a progênie proveniente de IA no início da estação de nascimentos, visando obter um melhor aproveitamento da mão-de-obra.

Diante da necessidade de melhorias no manejo produtivo e atender as expectativas de mercado, se desenvolveu a tecnologia da sexagem de sêmen bovino por citometria de fluxo, que se encontra em aplicação comercial no Brasil desde 2004. Desde então, a técnica vem passando por aperfeiçoamentos fundamentados em pesquisas científicas, as quais permitiram estabelecer alguns parâmetros técnicos que são importantes para atingir resultados satisfatórios. O grande diferencial desta tecnologia é a acurácia na determinação do sexo, cujas pesquisas apontam médias de 92,3%, com garantia acima de 85%.

A sexagem apresenta grandes vantagens para a pecuária, sendo direcionada para produção de fêmeas nos rebanhos leiteiros, minimizando o número de machos nascidos, reduzindo o descarte e aumentando a fonte de renda. Já na pecuária de corte, é usual o direcionamento para a produção de machos, essencialmente pelo interesse no alto desempenho para ganho de peso.

Atualmente, a literatura ainda é restrita em informações relacionadas a recursos para otimizar o tempo de exposição do oócito ao sêmen sexado em fêmeas bovinas, principalmente *Bos indicus*. Contextualizando as pesquisas anteriormente citadas, há necessidade de estudos adicionais delineados com objetivo de implantar protocolos que sincronizem melhor a ovulação em vacas da raça Nelore (*Bos indicus*). Além disso, se busca atender às necessidades e mecanismos biológicos pertinentes ao sêmen sexado, de modo a aplicá-los de maneira racional objetivando alcançar melhor desempenho nos programas reprodutivos, o que contribui significativamente com o desenvolvimento tecnológico nacional e internacional.

5 REVISÃO DE LITERATURA

5.1 DINÂMICA FOLICULAR NO CICLO ESTRAL DE FÊMEAS BOVINAS

O controle do ciclo estral da fêmea bovina é coordenado por uma complexa interação neuroendócrina, conhecida como eixo hipotálamo – hipófise – ovário – útero. Além disso, mecanismos intra-ovarianos estabelecem uma dinâmica folicular que permite o desenvolvimento de um folículo maduro capaz de ovular em momento propício e posteriormente produzir uma célula capaz de fecundar (CALLEJAS, 2001).

Esse ciclo é composto por quatro fases, que além de expressarem mudanças na mucosa vaginal com a presença de células nucleadas, leucócitos e células cornificadas em cada período, exibem variações nas concentrações hormonais de esteroides gonadais e conseqüentemente de gonadotrofinas. Em associação a essas mudanças cíclicas é possível observar alterações comportamentais, como no caso do estro, período no qual as fêmeas aceitam a monta pelo macho ou mesmo por outras fêmeas. É nesta fase do ciclo que ocorre a ovulação na maioria das espécies domésticas, sendo a exceção a espécie bovina, no qual a ovulação ocorre em torno de 10 a 12 horas após o desaparecimento dos sinais de estro. Em fêmeas bovinas no estro observa-se intensa irrigação da mucosa vaginal e abertura da cérvix que possibilita a passagem dos espermatozóides (GONZÁLEZ, 2001).

O acompanhamento diário das estruturas ovarianas por ultrassonografia tem mostrado que os bovinos apresentam ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral. A este processo de contínuo crescimento e regressão folicular, dá-se o nome de dinâmica folicular (BORGES, 2004). O ciclo estral em bovinos tem duração média de 21 dias, com variações entre 17 a 24 dias, e apresenta geralmente de duas a três ondas de crescimento folicular (GINTHER et al., 1996), sendo raramente uma ou quatro ondas. O número de ondas por ciclo estral parece estar associado com o comprimento do ciclo e com a duração da fase luteínica (GINTHER et al., 1989).

Vacas e novilhas podem ter duas ou três ondas por ciclo, com um folículo tornando-se dominante em cada uma delas. Por isso, uma população de pequenos, médios e grandes folículos é encontrada em cada ovário, durante todos os dias do ciclo estral (BORGES et al., 2001).

Cada onda de crescimento folicular é caracterizada por um grupo de pequenos folículos que são recrutados (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias (GINTHER et al., 2003). Após esta fase apenas um continua seu desenvolvimento (folículo dominante), enquanto os outros entram em processo de atresia (folículos subordinados), estabelecendo-se então, o fenômeno da divergência folicular (LUCY et al., 1992). Este mecanismo fisiológico que permite esse folículo dominante ovular sozinho é devido ao mesmo sintetizar inibina, hormônio cuja função é realizar retroalimentação negativa para liberação de FSH, por meio de um efeito direto na hipófise (FLORIANI, 2006).

Posterior à divergência, e na presença de altos níveis de progesterona, que promove a redução da frequência na pulsatilidade do LH, o folículo dominante torna-se anovulatório. A partir deste momento começa o processo de atresia e perda de dominância, dando início a uma nova onda de crescimento folicular (GINTHER et al., 1989). Porém, quando o folículo dominante esta presente no momento da regressão luteínica este culmina com a ovulação (FORTUNE et al., 2004). É interessante ressaltar que menos de 0,1% dos folículos se desenvolvem a partir da fase pré-antral até a ovulação (WEBB et al., 2007; MORAES et al., 2008).

O crescimento do folículo dominante em ambiente com baixa concentração de progesterona promove o aumento das concentrações de estrógenos, pelo qual desencadeia o mecanismo de retroalimentação positiva para a secreção de GnRH e o conseqüente pico de LH, promovendo a ovulação (FORTUNE, 1993). Segundo observações de Jolly et al. (1994), o LH estimula o AMP cíclico em células da granulosa somente em folículos com mais de 9 mm de diâmetro, provando então que folículos com mais de 9 mm de diâmetro adquirem receptores para LH e portanto capacidade ovulatória. (BÓ et.al, 2000).

A expressão de receptores de LH em células da granulosa está associada à dominância folicular (BAO & GARVERICK, 1998). Contudo, há dados discrepantes quanto à expressão dos receptores de LH (LHR) em células da granulosa ao redor do desvio folicular em bovinos. Em estudos de Beg et al. (2001), foi detectado a expressão de RNAm do LHR em maior concentração em futuros folículos dominantes em comparação aos seus subordinados antes do desvio folicular, sugerindo que a expressão precoce de LH em células da granulosa seria um evento importante para a seleção folicular, embora não esteja claro se o aumento da expressão de LHR seja a causa ou consequência do processo de dominância.

Existem três tipos de fenômenos dentro de cada onda folicular, caracterizados de maneira morfológica e endócrina, que são a emergência (recrutamento), seleção (desvio) e dominância folicular, onde as gonadotrofinas hipofisárias, FSH e LH, atuam na manifestação, manutenção e suspensão destes eventos (GINTHER et al., 1996). O conhecimento destes eventos é de extrema importância na aplicação correta em programas de manipulação exógena da reprodução, tais como protocolo de superovulação, sincronização do ciclo estral e ovulação (SILVA et al., 2001).

5.2 PROTOCOLOS DE SINCRONIZAÇÃO DA OVULAÇÃO

Com o intuito de evitar problemas de detecção de estros em rebanhos de cria, foram desenvolvidos protocolos de sincronização, cuja vantagem era permitir a inseminação de um grande número de animais em um período de tempo pré-estabelecido, sendo que estes tratamentos são conhecidos como protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), que tem como base fundamental a combinação de hormônios, com o objetivo de manipular os eventos fisiológicos e comportamentais (BARUSELLI & MARQUES, 2002).

Programas de sincronização da ovulação para IATF possuem vários propósitos, dentre eles, a indução da emergência de uma onda folicular de forma sincronizada, o controle da duração do crescimento folicular e da fase

luteínica até alcançar o estágio pré-ovulatório, a sincronização da retirada da progesterona tanto exógena, como endógena e indução da ovulação sincronizada em todos os animais tratados (BARUSELLI et al., 2004).

Deste modo, os protocolos hormonais de indução do estro servem de ferramenta para aumentar os índices reprodutivos. Dentre as principais vantagens destacam-se a redução do intervalo parto/concepção, concentração dos partos, antecipação da concepção na temporada de monta, padronização dos lotes de bezerros e aumento da eficiência nos índices de desmame (peso ao desmame e número de animais desmamados), refletindo diretamente na racionalização da mão-de-obra e no custo/benefício da atividade (BARTOLOMEU et al., 2003; GONÇALVES et al., 2004).

No entanto, para se escolher um protocolo de sincronização deve-se tomar certas precauções diante de alguns aspectos, como a categoria animal e o escore de condição corporal (ECC), sendo este último um dos fatores que mais interfere na chance de gestação. Em fêmeas bovinas ao início de protocolo de sincronização, o baixo escore de condição corporal influencia diretamente na taxa de concepção de maneira insatisfatória (CUTAIA et al., 2003).

Em vacas no pós-parto, a aplicação de protocolos hormonais possibilita que a maior parte do rebanho retome a atividade ovariana cíclica e posteriormente se torne gestante em um período reduzido de tempo (BARUSELLI et al., 2006). Para isto, métodos práticos de sincronização da ovulação possuem certo grau de repetibilidade, além de minimizar algumas interferências do ambiente. Estas características do controle exógeno da dinâmica folicular possibilitam a obtenção de elevadas taxas de prenhez em diferentes regiões e sistemas de manejo.

O exemplo mais significativo do efeito dos protocolos de sincronização sobre a eficiência do manejo é a observação de estros. Com a adoção de programas de IATF esta atividade não se torna mais necessária na prática de campo, pois a mesma vem ser uma opção de manejo cujo objetivo principal é eliminar a detecção de estros, produzindo resultados finais iguais ou superiores a IA convencional (DISKIN et al., 2002; MAPLETOFT et al., 2002).

Diante das considerações, diversas linhas de tratamentos hormonais têm sido usualmente utilizadas no Brasil para sincronização da ovulação e IATF. Em linhas gerais, estes consistem na utilização de dispositivos de progesterona ou implantes contendo progestágenos, associados a tratamentos com estradiol, com o objetivo de sincronizar a emergência da onda de crescimento folicular (BÓ et al., 1995; VASCONCELOS et al., 1994). Um dos tratamentos mais utilizados consiste na aplicação de benzoato de estradiol (BE; 2,0 mg; i.m.) no momento da inserção de um dispositivo/implante de P₄ (Dia 0), seguido da aplicação de PGF₂ α no momento da retirada do dispositivo/implante (Dia 8 ou 9) e aplicação de 1,0 mg de BE 24 horas após, sendo a IATF realizada 30 a 36 horas após o BE (54 a 60 horas após a retirada dos dispositivos).

Sá Filho (2003) trabalharam com novilhas cruzadas *Bos taurus indicus* x *Bos taurus* cíclicas, os quais se administraram duas injeções de PGF₂ α antes de retirar o dispositivo de P₄, obtendo maior taxa de concepção em relação às que receberam PGF₂ α apenas na retirada (64,0% vs. 39,9%), o que levou o autor a sugerir que a antecipação da luteólise permitiu elevação nos pulsos de LH e conseqüente aumento no diâmetro do folículo dominante e do CL.

Alguns autores relatam que os tratamentos com progestágenos ou progesterona, associados a estradiol-17 β ou benzoato de estradiol, induzem atresia folicular seguida de indução do crescimento sincrônico de uma nova onda folicular em torno de 3 a 4 dias após (BÓ et al., 1994). Em pesquisa realizada em novilhas *B. indicus*, *B. indicus* x *B. taurus* e *B. taurus* tratadas com dispositivo intravaginal de progesterona associado a 2mg de benzoato de estradiol no dia 0, não foi verificada diferença significativa no dia da emergência da onda de crescimento folicular entre os grupos genéticos estudados (CARVALHO et al., 2004).

Deve-se considerar, ainda, que o sucesso no controle exógeno do ciclo estral e da ovulação em bovinos depende essencialmente de seu *status* fisiológico na ocasião da sincronização, como por exemplo, o estado nutricional

e o período pós-parto, entre outros, requerendo estratégias específicas para cada situação (REINCHERBACH et al., 2002).

5.3 INDUTORES DE OVULAÇÃO

Para viabilizar um programa de inseminação artificial em tempo fixo em bovinos, é necessário sincronizar eficientemente as ovulações, diminuindo o intervalo interovulatório entre as fêmeas tratadas. Diante dessa necessidade foi consolidado o uso de indutores de ovulação, dentre os quais destacam-se o benzoato de estradiol (BE), cipionato de estradiol (CE) e o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e o Hormônio Luteinizante (LH).

Inicialmente, pesquisadores estudaram o efeito da administração de estrógenos 24 horas após a retirada dos dispositivos de progesterona, visando induzir um pico de LH sincronizado (MACMILLAN & BURKE, 1996; HANLON et al., 1997, MARTINEZ et al., 1998).

Nesse contexto, verificou-se que o BE aumentou a taxa de sincronização das ovulações P4 que estas ocorreram em torno de 70h após a remoção dos dispositivos de progesterona (SALES et al., 2012). Esses resultados foram confirmados por pesquisas realizadas em *Bos indicus* criados a campo no Brasil (MARQUES et al., 2003).

Baseado nestas observações foi recomendada a realização da IATF em torno de 16 horas antes da média das ovulações, ou seja, 30h após a administração do BE, quando este era administrado 24 horas após a remoção do dispositivo. (LAMMOGLIA et al., 1998; BURKE et al., 2001; MARTINEZ et al., 2002a).

Nos tratamentos em vacas de corte no pós-parto, o BE tem sido bastante utilizado, pois promove a liberação de um pico de LH, dentro de um intervalo de 24 a 30h, enquanto com a administração de GnRH este mesmo pico é induzido em torno de 15 minutos após sua aplicação (LAMMOGLIA et al., 1998).

Já o tratamento com GnRH em dia aleatório do ciclo estral promove a ovulação do folículo presente, desde que este esteja na fase de crescimento

final, dominante ou pré-ovulatório. Após a ovulação, ocorre a emergência de uma nova onda de crescimento folicular em torno de 24 a 48h (PURSLEY et al., 1995; TWAGIRAMUNGU et al., 1995; BODENSTEINER et al., 1996).

Em outro experimento, Pursley et al. (1995) detectaram ovulação (90%) das vacas e 54% das novilhas Holandesas que receberam GnRH, independentemente da fase do ciclo estral em que se realizou o tratamento.

Alguns estudos avaliaram o emprego de análogos do GnRH, seguido da aplicação de prostaglandina depois de 7 dias e administração de uma nova dose de GnRH (protocolo "ovsynch") (PURSLEY et al., 1995; WILTIBANK, 1997). Nestes mesmos trabalhos demonstraram que a sincronização da ovulação, pode ser consideravelmente aumentada com uma segunda dose de GnRH 36-48 horas após a aplicação de prostaglandina, sendo que essa segunda aplicação de GnRH vem colaborar com a eficiência da inseminação artificial em tempo fixo, realizada de 16 a 24 horas após, pois sincroniza a ovulação em curto período de tempo.

A utilização de protocolos de sincronização de estro com o uso de GnRH no início de uma nova onda de crescimento folicular ou para promover a ovulação de um folículo dominante no momento da IA ou antes dela, têm sido desenvolvidos para gado de corte e de leite. Quando administrado em estágios aleatórios do ciclo estral, o GnRH determina a ovulação do folículo dominante com mais de 9 mm e induz a emergência de uma nova onda de crescimento folicular dentro de 1 a 2 dias em vacas e novilhas após o tratamento. No entanto, associações hormonais que utilizam GnRH e prostaglandina (PGF₂ α), quando empregadas em animais que estão ciclando, resultam em percentagem de prenhez superior à de fêmeas em anestro e novilhas.

Estudos revelaram que 85% de vacas e apenas 54% de novilhas respondem a primeira injeção de GnRH (PURSLEY et al., 1995; MARTINEZ et al., 1999). Na maioria das pesquisas citadas até o momento não se recomenda o emprego da sincronização da ovulação com GnRH/PGF₂ α /GnRH (protocolo "Ovsynch") em novilhas, pois estas apresentam baixa resposta ovulatória à primeira aplicação GnRH, e porque a ausência de ovulação inicial não sincroniza o desenvolvimento de uma nova onda de crescimento folicular

(PURSLEY et al., 1995). A baixa resposta a este protocolo se traduz em índices de prenhez para novilhas que não superam os 20% (BRAGANÇA, 2007).

Em trabalho com vacas holandesas, Vasconcelos (1998) obteve 64% de taxa de ovulação após a primeira aplicação de GnRH em 156 animais tratados em diferentes períodos do ciclo estral. Este autor observou variação das taxas de ovulação conforme a época do ciclo estral em que as fêmeas foram tratadas, com menores índices nos animais que se encontravam entre os dias 1 e 4 (23%), e maiores taxas naqueles que estavam entre os dias 5 e 9 (96%). Já as taxas de ovulação após a segunda dose de GnRH (87%) não foram influenciadas pela fase do ciclo estral, mas variaram ($P < 0,01$) de acordo com a resposta à primeira aplicação do hormônio (92% quando houve ovulação e 79% quando não houve ovulação). Foram observadas ovulações entre a aplicação de prostaglandina e a segunda dose de GnRH (6%) e 7% dos animais não ovularam decorridas 48 horas da aplicação da segunda dose de GnRH.

Em alguns estudos avaliando a resposta folicular após a primeira administração de GnRH, foi observado que a mesma influencia diretamente na eficiência da sincronização da ovulação. Diante disso, animais que não respondem a este tratamento e que se encontram no final da fase de diestro, manifestam o estro e a ovulação prematuramente e representam, tipicamente, de 8% a 10% dos animais tratados. Animais com estro e ovulação prematuros, quando inseminados em tempo fixo, apresentam baixas taxas de concepção. Esse fenômeno já foi relatado em bovinos de leite e em bovinos de corte (VASCONCELOS et al., 1999; GEARY et al., 2000; DEJARNETTE et al., 2001).

Quando se utiliza o cipionato de estradiol em alguns protocolos, observa-se igual eficiência em relação a aplicação de BE, como foi demonstrado em estudo de Meneghetti et al. (2005), que trabalhou com diferentes doses do hormônio na avaliação da taxa de prenhez de vacas Nelore paridas. Ressaltando este resultado, Penteado et al. (2006) concluíram que a dose de 1,0 mg de cipionato de estradiol (ECP) apresentou taxa de prenhez semelhante ao de BE aplicado 24 horas após e melhor resultado em relação a

dose de 0,5 mg de cipionato de estradiol. Na comparação dos dois estudos citados, o tempo da permanência do dispositivo de P4 (9 dias; MENEGHETTI et al., 2005 vs. 8 dias; PENTEADO et al., 2006) pode ter sido o motivo da diferença dos resultados, pois tiveram um período de crescimento folicular maior aqueles animais que permaneceram 24 horas a mais com o dispositivo, o que pode permitir o uso de uma dose menor de cipionato de estradiol. De fato, a utilização do cipionato de estradiol em protocolos de IATF é recomendável, devido diminuir do número de passagens dos animais ao curral, consequentemente diminuindo o grau de estresse dos mesmos.

5.4 BIOTECNOLOGIA DO SÊMEN SEXADO

No início do século 20, a determinação do sexo ainda era atribuído apenas ao cromossomo X, sendo que a classificação do macho era determinada por X0 e a da fêmea XX, porém, em 1914, foi descoberto por Bridges que o sexo masculino era determinado pela associação de um cromossomo X, com outro morfologicamente distinto, denominado de Y (MOTA, 2004). Após essa descoberta a seleção do sexo nos animais domésticos tornou-se um dos principais objetivos quando a capacidade de sexagem dos espermatozóides foi atingida (GARNER & SEIDEL, 2008).

Um dos primeiros estudos de pré-seleção sexual foi conduzido com base na separação de espermatozóides de coelhos e suínos por centrifugação. A seguir, várias pesquisas foram realizadas utilizando diferentes técnicas de pré-seleção, sendo que no final da década de 60, a utilização do citômetro de fluxo aumentou o interesse em mensurar o DNA das células através de muitas propostas, especialmente para o diagnóstico de câncer. Na reprodução, esse método foi utilizado para avaliar alterações espermáticas associadas a danos genéticos (JOHNSON e WELCH, 1999).

No entanto, Moruzzi (1979) deu especial atenção ao DNA, ao evidenciar diferenças entre os espermatozóides portadores de cromossomos X e Y. Em seguida, construiu-se o citômetro de fluxo com alta resolução, ortogonalmente configurado e usado para mostrar a diferença de 3,2% no

conteúdo de DNA do núcleo de espermatozóides de camundongos (PINKEL et al., 1982).

O conteúdo de DNA do sêmen é determinado através da utilização de corantes fluorescentes, sendo que 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). Este tipo de coloração vem ligar seletivamente a regiões ricas de DNA permitindo a detecção de pequenas diferenças do conteúdo de DNA (KLINC & RATH, 2006).

Deste modo, o espermatozóide X recebe cerca de 4% mais corante vinculado ao seu DNA, do que o espermatozóide Y. Tal corante fluoresce apenas quando exposto a uma específica onda de luz, normalmente, fornecida por raio laser. A fluorescência é medida por um detector e analisado por computador fornecendo uma medida exata do teor do conteúdo de DNA (GARNER, 2006).

Após a inovação no citômetro de fluxo feita por Morruzi no final da década de 70, teve-se início aos primeiros nascimentos de produtos com sêmen sexado, com base no conteúdo de DNA dos espermatozóides, onde foram observados em coelhas cirurgicamente inseminadas no oviduto (JOHNSON et al., 1989). Desde então, foi constatada variação no conteúdo de DNA dos espermatozóides X e Y, com diferença de 2,8% no homem; 3,0% no coelho; 3,6% no suíno; 3,7% no garanhão; 3,8% no bovino; 3,9% no cão; e 4,2% nos ovinos (JOHNSON e WELCH, 1999), originando nascimentos de produtos com sexo pré-selecionado (BUCHANAN et al., 2000; O'BRIEN et al., 2003; HOLLINSHEAD et al., 2004; DE GRAAF et al., 2007).

Desde esta época a tecnologia do sêmen sexado foi aplicada, tendo maior expansão após o estabelecimento do conteúdo de DNA (GARNER, 2006). Com o emprego da biotecnologia da sexagem do sêmen ocorreu o rápido avanço genético, além da produção de animais do sexo desejado, buscando produzir mais com menor custo (FREITAS, 2007).

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). A acurácia do processo de seleção é de, aproximadamente, 90%, podendo variar entre 87% e 95% dependendo do operador, velocidade e variações individuais do ejaculado (FREITAS, 2007; MOCÉ et al., 2006). Um fator importante na sexagem dos espermatozóides é a qualidade do ejaculado, que possui influência direta na velocidade do processo, que por sua vez interfere diretamente na pureza do sêmen, ou seja, quando a velocidade é baixa pode-se ter pureza de mais de 93% e quando rápida pode chegar a 87 (SEIDEL JR, 2003).

As vantagens do sêmen sexado para a produção de bovinos são várias, no entanto, devem-se salientar alguns fatores que limitam sua utilização em larga escala. A técnica de citometria de fluxo induz as alterações na membrana espermática, acelerando o processo de reação acrossômica no espermatozóide após a criopreservação (pré-capacitação) (MOCÉ et al., 2006). Segundo Maxwell et al. (2004) e Mocé et al. (2006), este processo acarreta uma redução da sobrevivência do espermatozóide sexado. Este fato justifica a deposição do sêmen próximo do local da fertilização, assim como no momento mais próximo possível à ovulação, podendo este fato constituir-se em solução objetivando o aumento das taxas de prenhez. Contudo mais pesquisas ainda são necessárias para elucidar tais dúvidas (MOCÉ et al., 2006).

As desvantagens que envolvem o processo de sexagem promovem danos às células, deixando-as mais sensíveis ao processo de criopreservação (HOLLIINSHEAD et al., 2003). Tal processo de seleção causa danos ao sêmen, devido ao estresse químico e físico aos quais os espermatozóides são submetidos durante a sexagem (SEIDEL JR, 2003), o que leva a uma menor capacidade de fecundação dos espermatozóides após a inseminação artificial *in vivo*, ou na fecundação *in vitro*, além de menores taxas de desenvolvimento embrionário comparados aos não-sexados (SARTORI et al., 2004).

A sexagem espermática pela técnica de citometria de fluxo é uma biotecnologia valiosa que atualmente já manifesta impacto nas criações comerciais. Porém, os efeitos do processamento sobre a integridade das células espermáticas ainda não são totalmente conhecidos. Acredita-se que a baixa fertilidade apresentada por algumas partidas de sêmen sexado seja

devido ao comprometimento de estruturas espermáticas durante o procedimento de separação (“sorting”) das populações de células X e Y (SUH et al., 2005).

Segundo Hossepian de Lima (2006), a aplicabilidade comercial da sexagem dos espermatozóides depende do estabelecimento de uma metodologia que além de ser compatível com o processo de congelação, minimize a perda de espermatozóides durante o processo e não reduza o poder fecundante dos mesmos. Considerando estes aspectos, é necessário avaliar a qualidade não somente em relação à acuidade de sexagem, mas também no que diz respeito à viabilidade dos espermatozóides portadores do cromossomo X ou Y.

Para o sucesso da sexagem é preciso levar em conta a susceptibilidade dos gametas quanto à adição da sonda fluorescente, a exposição ao laser, a alta diluição, a elevada pressão, e a resistência às severas mudanças na composição dos meios que ocorre durante o processo de sexagem (MAXWELL et al., 1998). O sucesso comercial da separação dos cromossomos X e Y pela citometria de fluxo têm estimulado novos interesses no desenvolvimento de outros, talvez mais eficazes métodos na pré-seleção do sexo dos mamíferos (GARNER & SEIDEL, 2008). O desenvolvimento de técnicas eficientes para a sexagem de espermatozóides também representa importante recurso para a reprodução assistida em espécies ameaçadas de extinção (SEIDEL & JOHNSON, 1999).

Em relação à eficiência do sistema de sexagem, em condições ótimas, podem ser produzidas 10 doses de sêmen sexado de bovinos na concentração de 2×10^6 espermatozóides por dose para cada sexo, em intervalo de uma hora (GARNER, 2006). No entanto, atualmente, a produção de uma palheta de sêmen sexado leva-se cerca de 9 minutos, que se traduz em aproximadamente sete palhetas por hora na concentração de 2×10^6 espermatozóides por dose (GARNER & SEIDEL, 2008).

Devido a algumas desvantagens apresentadas anteriormente, o método de sexagem pelo citômetro de fluxo ainda tem uma grande limitação no mercado, pois os espermatozóides são sexados um de cada vez, ao invés de

serem vários ao mesmo tempo (GARNER, 2006), tornando o processo caro, além da baixa longevidade desses espermatozóides, frescos e criopreservados (MOCÉ et al., 2006). Diante dessas desvantagens a utilização de inseminação com doses de sêmen sexado na concentração convencional, tornou-se impraticável. Com isso, foram criadas duas maneiras para lidar com este problema, sendo que em ambas utilizam-se poucos espermatozóides por dose (geralmente 2×10^6 espermatozóides/dose). A primeira consiste na seleção de touros que, com baixas concentrações do sêmen, mas que apresentam uma boa fertilidade, e a segunda é o uso do sêmen de animais em boas condições de manejo (SEIDEL JR, 2007). Outra maneira de separar espermatozóides contendo o cromossomo X daqueles contendo o cromossomo Y é pela expressão dos antígenos de superfície das células (MOTA, 2004).

Em alguns estudos realizados como o de Blecher et al. (1999) relataram a identificação e o isolamento das proteínas específicas do sexo sendo possível a obtenção de anticorpos específicos do sexo masculino e do feminino. Neste estudo foram analisados espermatozóides bovinos, em que após a incubação foram detectados que os anticorpos antiproteínas específicas do sexo feminino promoveram aglutinação em 50% das células. Já nas células que não sofreram aglutinação produziram *in vitro* 106 embriões, sendo que destes somente 72 puderam ser sexados pela técnica de citogenética dos quais 92% eram do sexo masculino.

Alguns autores defendem a utilização do método imunológico para sexagem de sêmen, comentando que o mesmo necessita de equipamentos mais simples e menos caros, associado ao fato de relatos de que ao usar a técnica de citometria de fluxo, os corantes que se ligam ao DNA e são submetidos à excitação com feixe de laser, determinam efeitos negativos aos espermatozóides e, conseqüentemente, ao embrião (MCNUTT e JOHNSON, 1996).

Outras pesquisas compararam a eficácia entre os métodos imunológicos e de citometria de fluxo, onde foi constatado que, em virtude do método imunológico depender da expressão do gene pelos cromossomos X e Y, a sua eficiência é limitada (HENDRIKSEN, 1999). Todavia, existem relatos

de redução dos índices de fertilidade com uso de sêmen sexado devido ao menor tempo de viabilidade destas células, associado a diferentes padrões de motilidade (SCHENK et al., 2006), que pode ser explicado pelo fato de espermatozóides separados por citometria de fluxo necessitarem de menor tempo para a sua capacitação (LU e SEIDEL JR., 2004).

Por conseguinte, visando reduzir a variação no tempo de ovulação e melhorar a eficiência de programas de IA com sêmen sexado, as técnicas de sincronização do estro têm sido bastante utilizadas. No entanto, as taxas de concepção após o uso de sêmen sexado em vacas de corte e de leite submetidas à sincronização do estro e inseminação artificial em tempo fixo (IATF) têm sido pouco relatadas (SCHENK et al., 2006).

5.5 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN SEXADO

A Inseminação Artificial (IA) em bovinos com baixas doses de sêmen sexado ($\sim 1 \times 10^6$ espermatozóides) foi considerada impraticável no início dos anos 90, uma vez que a taxa máxima de sexagem de espermatozóides X e Y era de, aproximadamente, 300.000 espermatozóides por hora. Todavia, a criação de máquinas mais modernas e de técnicas separadoras de células à alta velocidade (10×10^6 espermatozóides por hora) aumentou a possibilidade de sua utilização na IA (LU et al., 1999).

Uma das causas da reduzida taxa de concepção com uso do sêmen sexado é a pequena concentração de espermatozóides por dose (BARUSELLI et al., 2007). Assim, visando estudar o efeito da sexagem na viabilidade espermática, Bodmer et al. (2005) trabalharam com IA em vacas em lactação inseminadas 12 horas após a detecção e cio, onde observaram taxas de concepção (30-40 dias após IA) similares entre os grupos sexado (27,5%) e convencional (28,1%).

Apesar dos resultados apresentados da literatura com vacas serem inconsistentes, a maioria das pesquisas realizadas com novilhas indica que a taxa de concepção após observação de estro e IA com sêmen sexado é de cerca de 70 a 90% da taxa atingida após o uso de sêmen convencional, sendo

que alguns autores ainda discutem que estes resultados dependem das condições de manejo das fazendas. Para dar resposta a esta discussão Seidel et al. (1999) realizaram vários experimentos, onde observaram que as taxas de concepção de novilhas holandesas inseminadas com sêmen sexado variaram de 40% a 68% e com sêmen convencional de 67% a 82%, relatando que um possível fator que poderia influenciar a taxa de prenhez utilizando sêmen sexado seria o local de deposição no útero.

Após relato desta possibilidade, Kurykin et al. (2007) realizaram inseminação com sêmen sexado ($2,2 \times 10^6$ spz/dose) no corpo do útero ou no corno uterino ipsilateral à ovulação em novilhas de leite. Não houve diferença significativa entre os tratamentos, indicando que o local de deposição do sêmen sexado parece não afetar as taxas de concepção.

Em vacas de leite, Andersson et al. (2004) observaram taxas de prenhez de 21,0% para o grupo de vacas inseminadas com sêmen sexado e de 46,0% para o grupo inseminado com sêmen convencional. No entanto, apesar da baixa concepção, a utilização do sêmen sexado aumentou a quantidade de bezerras fêmeas nascidas (sexado = 83,0%; convencional = 49,0%). Já em vacas da raça Nelore (*Bos indicus*), Baruselli et al. (2007) relataram que não existem diferenças nas taxas de concepção quando a IATF com sêmen sexado ($2,1 \times 10^6$ espermatozoides/dose) é realizada 60 horas após a retirada do implante de progestágeno, quando comparada ao uso do sêmen convencional, ratificando a hipótese de que a IATF próxima ao momento da ovulação aumenta a taxa de concepção do grupo de fêmeas inseminadas com sêmen sexado. Em outro estudo, Sousa et al. (2008) testaram o atraso de mais quatro horas na IATF com sexado (60 h vs. 64 h após a retirada do dispositivo de P4), sem sucesso, demonstrando que o mais adequado seria inseminar de 10 a 12 horas antes da ovulação.

Algumas pesquisas realizadas recentemente, dentre elas, a de Sales et al. (2011), que trabalhou com 339 vacas Nelore lactantes, teve como objetivo de avaliar o melhor momento de realizar a IATF com sêmen sexado em relação ao momento da ovulação. Neste trabalho os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 tratamentos (IA às 36, 48 e 60 horas após

retirada do dispositivo de P₄), no qual alcançaram taxas de concepção correspondentes a 5,4%, 19,4% e 37,9%, respectivamente. Nesta pesquisa pode-se observar que a maior taxa de concepção foi obtida nas vacas inseminadas entre 12 e 0 horas antes da ovulação, ou seja, no mínimo 60 horas após a retirada do dispositivo.

A partir destes resultados, os mesmos autores realizaram outro estudo desta vez no Texas (EUA), com o intuito de avaliar o efeito do atraso de 6 horas no momento da IATF com diferentes tipos de sêmen (sexado e convencional) em 420 novilhas Jersey cíclicas sincronizadas e inseminadas em tempo fixo, no qual foi observado que a maior taxa de concepção com sexado ocorreu nos animais que foram inseminados 60 h, ficando em torno de 31,4% (32/102; 60h) vs. 16,2% (17/105; 54h) ($P < 0,01$). Já para sêmen convencional estas variações de momento da IATF não afetaram os resultados de concepção, onde o grupo 54h alcançou 50,5% (51/101) vs. 51,8% (58/112) para o grupo 60 h ($P = 0,95$). Ao final destes trabalhos pode-se concluir que o atraso de 6h na IATF em relação ao protocolo convencional pode aumentar a taxa de concepção com sêmen sexado (SALES et al., 2011).

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Animais

Foram utilizadas durante a pesquisa 383 vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) lactantes, com período pós-parto de 60-90 dias, sendo as mesmas previamente selecionadas quanto ao escore de condição corporal (ECC) e escore de condição ovariana (ECO).

As fêmeas foram avaliadas quanto ao ECC, utilizando-se uma escala de um a cinco pontos, conforme metodologia adaptada por Lowman et al. (1976), sendo selecionadas aquelas que possuíam ECC entre 3 a 4. Outra forma de seleção dos animais foi a observação do ECO (Tabela 1), na qual foram avaliadas pela presença do corpo lúteo e pelo tamanho de folículos presentes visualizados ultra-sonograficamente em exames realizados antes do início dos protocolos de IATF, para minimizar o efeito individual sobre as variáveis estudadas, seguindo a escala proposta por Madureira & Pimentel (2005).

Tabela 1. Escore de condição ovariana (ECO) adaptado de Madureira & Pimentel (2005)

Escore ovariano	Características
1	Fêmeas ciclando, ovários com comprimento acima de 30mm, macios, presença de CL*, útero com turgidez acentuada, denotando a presença de folículos grandes (>10mm), estrógeno-ativos.
2	Fêmeas em anestro, ovários com comprimentos entre 15-30 mm, ausência de CL* e de turgidez no útero. Incluem-se nesta categoria, animais cujos folículos atingem a fase de dominância ($\geq 8,5$ mm), mas não ovulam.
3	Fêmeas em anestro, ovários pequenos, duros e lisos. Nesta categoria são incluídos animais cujos folículos não chegam até a divergência.

*CL: Corpo Lúteo

6.2. Instalações e manejo nutricional

O Experimento 1 foi realizado na fazenda São Benedito, localizada no município de Bacabal (MA), pertencente a Mesorregião Centro Maranhense, localizada na latitude 04°13'30" Sul e longitude 44°46'48" Oeste, com altitude de 38 m acima do nível do mar (Figura 1).



FIGURA 1. Município de Bacabal, Estado do Maranhão; Fonte: Wikipédia, 2012.

O experimento 2 foi conduzido nas Fazendas Olho D'Água e Águas de Março, localizadas respectivamente nos municípios de Parnarama e Lagoa do Mato (MA), sendo que ambos os municípios pertencem a Mesorregião Leste Maranhense. O município de Parnarama se localiza na latitude 05°40'55" Sul e longitude 43°05'34" Oeste com altitude de 89m, enquanto o município de Lagoa do Mato na latitude 06°02'49" Sul e longitude 43°31'33" Oeste, estando a uma altitude de 200m acima do nível do mar (Figura 2).

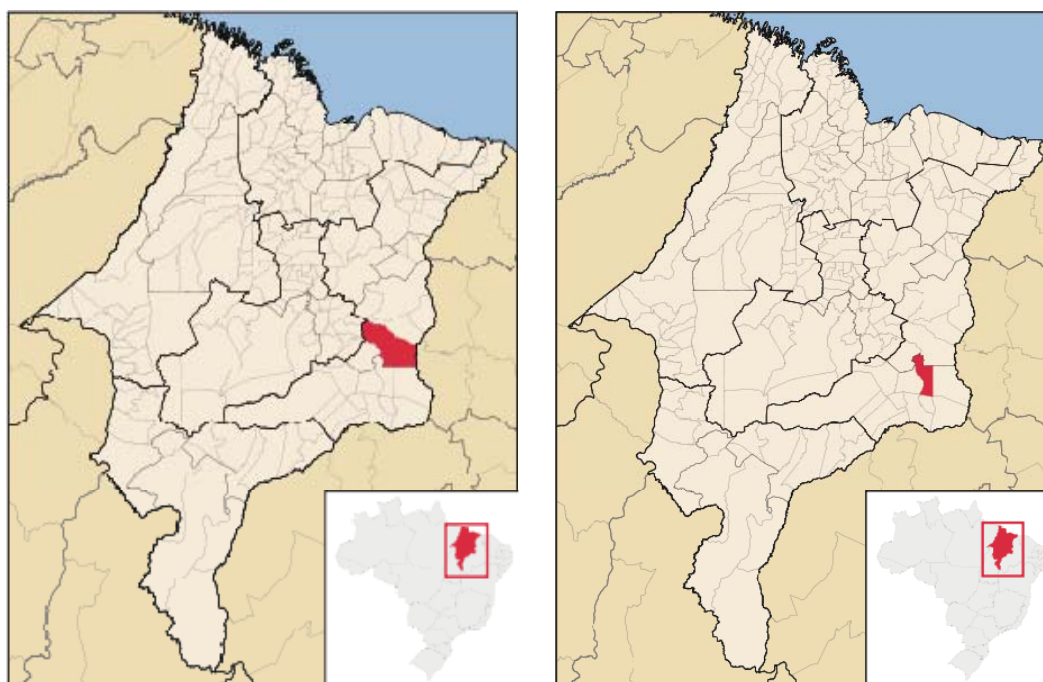


FIGURA 2. Municípios de Parnarama (à esquerda) e Lagoa do Mato (à direita), Estado do Maranhão; Fonte: Wikipédia, 2012.

Os animais foram mantidos em condições similares de pastagem, manejo, com livre acesso a água e suplementação mineral *ad libitum* fornecido em cocho aberto, de acordo com as exigências de manutenção e produção, fornecidas pelo NRC (2001). Os procedimentos realizados nos animais foram aprovados pela Comissão de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão (Processo 08/2010).

6.3. Protocolo base de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo

Na Figura 3 está ilustrado o protocolo base de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) utilizado. No dia zero (D0), todos os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; 1 g; Sincrogest[®], Ouro Fino Saúde Animal, Brasil) e foram administrados 2mg de benzoato de estradiol (BE; I.M.; Sincrodiol[®], Ouro Fino Saúde Animal, Brasil). No dia oito (D8), foram removidos os dispositivos intravaginais de P4 e

administradas 300UI de Gonadotropina Coriônica Eqüina (eCG; I.M.; SincroeCG[®], Ouro Fino Saúde Animal, Brasil) juntamente com 0,53mg de prostaglandina F2 α (PGF_{2 α} ; I.M.; Sincrocio[®], Ouro Fino Saúde Animal, Brasil).

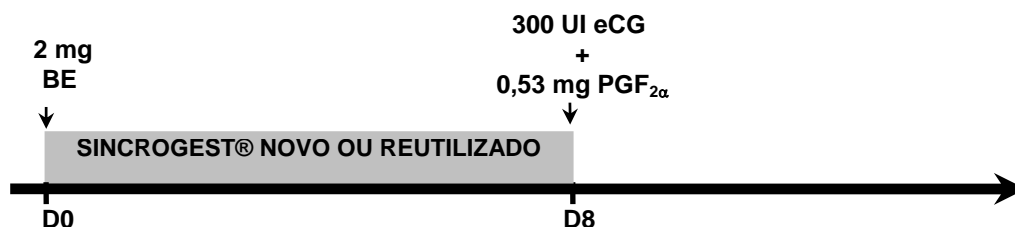


Figura 3. Protocolo base de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo.

Os dispositivos intravaginais de progesterona foram utilizados por duas vezes de oito dias cada, sendo distribuídos homogeneamente para cada tratamento em forma de réplicas similares.

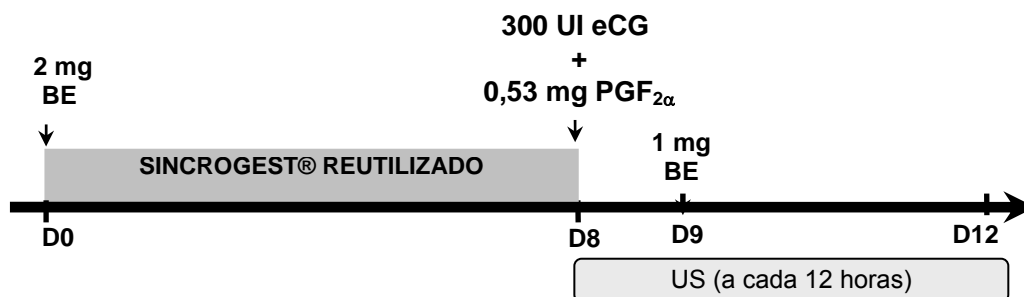
A partir do momento da retirada dos dispositivos (D8) os animais foram divididos homogeneamente de acordo com o período pós-parto e o escore de condição corporal em três grupos. Foi realizado um delineamento inteiramente casualizado, utilizando-se como tratamento experimental, o tipo de indutor de ovulação utilizado [Cipionato de Estradiol (CE) vs. Benzoato de Estradiol (BE) vs. Cipionato de Estradiol + Acetato de Buserelina (CE+GnRH)] conforme segue adiante.

6.4. Delineamento experimental

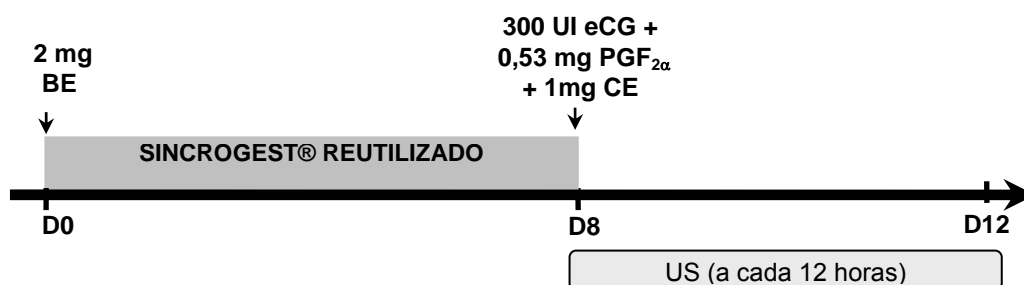
6.4.1. EXPERIMENTO 1: Dinâmica folicular e taxa de ovulação de vacas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com diferentes indutores de ovulação.

No experimento 1 as vacas Nelore (39) foram distribuídas homogeneamente em três tratamentos, conforme ilustrado na figura 4:

Tratamento BE



Tratamento CE



Tratamento CE+GnRH

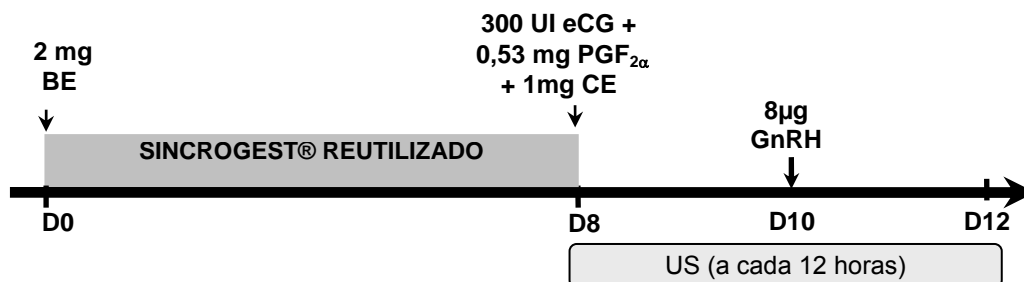


FIGURA 4. Representação esquemática dos protocolos de sincronização da ovulação para acompanhamento da dinâmica folicular ovariana. Tratamento BE: 1 mg de benzoato de estradiol aplicado no D9. Tratamento CE: 1 mg de cipionato de estradiol aplicado no momento da retirada dos dispositivos (D8). Tratamento CE+GnRH: 1 mg de cipionato de estradiol aplicado no D8 + 8 µg de acetato de Buserelina aplicado no D10. Os animais de todos os tratamentos foram submetidos a exames ultra-sonográficos via transretal a cada 12 horas do D8 até o D12.

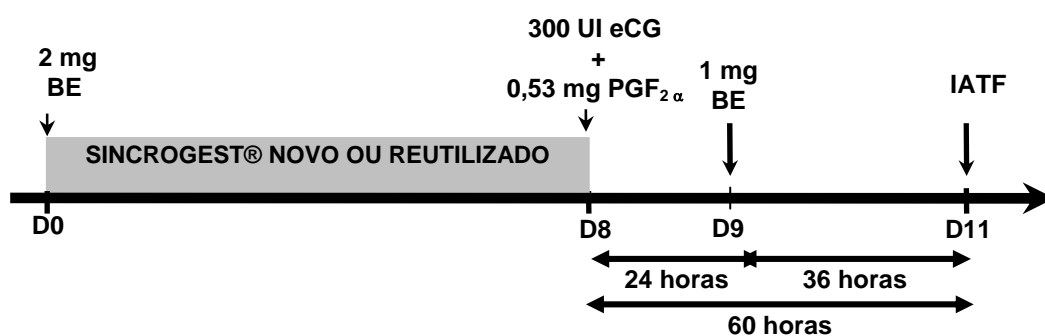
Os exames ultrassonográficos foram realizados com auxílio de um ultra-som (CHISON D600VET, USProducts Eletromedicina, Brasil) equipado com transdutor linear transretal de 5,0 MHz. Foi aferida a população folicular por meio da quantificação e mensuração (diâmetro em milímetros) de todos os

folículos > 6 mm. A ovulação foi definida como o desaparecimento do folículo dominante identificado na avaliação anterior.

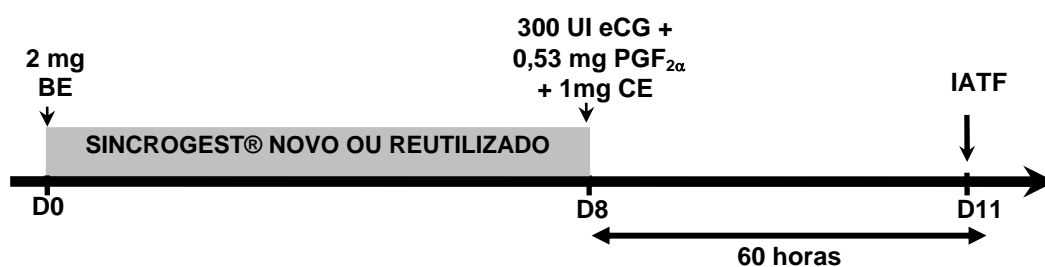
6.4.2. EXPERIMENTO 2: Taxa de concepção de vacas Nelore (*Bos indicus*) tratadas com diferentes indutores de ovulação para inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com sêmen sexado.

No experimento 2 as vacas Nelore (344) foram alocadas em tratamentos similares aos do experimento 1. As inseminações foram realizadas de 60 a 64 horas após a remoção dos dispositivos intravaginais (figura 5).

Tratamento BE



Tratamento CE



Tratamento CE+GnRH

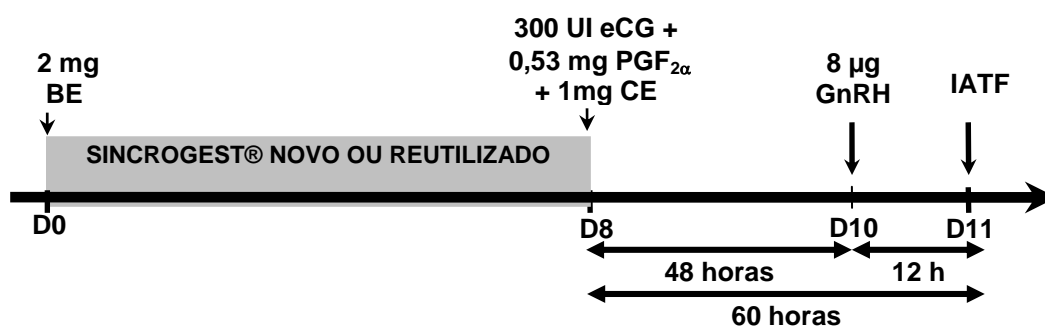


FIGURA 5. Representação esquemática dos protocolos de sincronização da ovulação e do momento das inseminações. Tratamento BE: 1 mg de benzoato de estradiol aplicado no D9. Tratamento CE: 1 mg de cipionato de estradiol aplicado no momento da retirada dos dispositivos (D8). Tratamento CE+GnRH: 1 mg de cipionato de estradiol aplicado no D8 e 8 µg aplicado no D10. As inseminações foram realizadas no intervalo de 60-64 horas após a retirada dos dispositivos (D11).

As fêmeas foram submetidas ao diagnóstico de gestação por ultrassonografia 30 dias após a IATF (US; CHISON D600VET[®], USPBrasil Eletromedicina, Brasil).

6.5 Sêmen e avaliação seminal

Foi utilizado sêmen sexado proveniente de reprodutor da raça Nelore (*Bos indicus*) oriundo de central de inseminação. Quatro partidas de sêmen foram utilizadas e distribuídas homoganeamente entre os tratamentos. A avaliação seminal foi realizada no Laboratório Sexing Technologies pertencente à empresa CRV Lagoa da Serra, localizada em Sertãozinho – SP. Os resultados da análise das partidas de sêmen utilizadas no experimento estão descritas na tabela abaixo (Tabela 2).

Tabela 2. Análise das partidas de sêmen.

Partidas de sêmen	A	B	C	D
Variáveis				
Motilidade (%)	80	80	85	85
Defeitos primários	6	5	3	3
Defeitos secundários	3	2	11	14
Volume inicial do ejaculado	5,8	9	4,9	6,9
Concentração inicial	1478	1862	1860	2222
Motilidade				
Pós-descongelamento (%)	50	60	60	60
Motilidade após 3 horas (%)	40	40	40	35
Pureza (%)	85	87	90	87
Resultado do exame				
Bacteriológico (%)	0	0	0	0
Média do pH do ejaculado	6,6	6,6	6,7	6,9
Média de células mortas do ejaculado	18	10	12	11

As características do sêmen utilizado atendem aos padrões de normalidade para a espécie bovina, preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (HENRY & NEVES, 1998). A longevidade dos espermatozoides de cada partida de sêmen foi avaliada pelos testes de termorresistência lento, de acordo com Vogler et al. (1991).

6.6 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com auxílio do software Statistical Analysis System for Windows SAS[®] (SAS, 2001). Através do aplicativo GUIDED DATA ANALYSIS do SAS[®], os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias, sendo verificada a necessidade de transformação dos dados (logaritmo na base 10 – $\text{Log}_{10} X$; Raiz quadrada – $\text{RQ } X$; Quadrado – X^2), de tal modo que esses atendam às pressuposições da análise de variância.

As variáveis diâmetro máximo do folículo dominante, diâmetro máximo do folículo ovulatório e momento da ovulação foram analisadas pelo aplicativo PROC GLM do SAS[®] e as diferenças entre os tratamentos foram avaliadas pelo teste Duncan. A dispersão das ovulações foi comparada pelo teste de Bartlett (PROC SUMMARY NWAY do SAS[®]). As taxas de concepção/ovulação foram analisadas como distribuição binomial por meio da função LOGIT do aplicativo PROC GENMOD do SAS[®].

A chance de concepção com base nas variáveis classificatórias (odds ratio) foi gerada por regressão logística pelo PROC LOGISTIC dos SAS[®].

O nível de significância adotado para rejeitar H₀ (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05 ($p < 0,05$) foi considerado efeito das variáveis classificatórias e das suas interações.

As variáveis classificatórias (independentes) consideradas no modelo estatístico para verificação dos efeitos e interações foram: réplica, categoria animal, escore corporal, partidas de sêmen e número de usos do dispositivo de P4. As variáveis resposta (dependentes) analisadas de acordo

com os procedimentos experimentais foram diâmetro folicular, momento de ovulação, taxa de ovulação e taxa de concepção à IATF.

7 RESULTADOS

Não houve efeito significativo do indutor de ovulação no desenvolvimento folicular final ou na taxa e ovulação. Em ambos os tratamentos a taxa de ovulação foi superior a 90%. Conforme descrito na Tabela 3, tanto o cipionato como o benzoato de estradiol foram eficientes em induzir a ovulação. De modo similar, a associação de cipionato de estradiol e GnRH não potencializou a taxa de ovulação em vacas Nelore (Tabela 3).

Tabela 3. Diâmetro do folículo dominante na remoção do dispositivo (D8), diâmetro máximo do folículo dominante (FD) e ovulatório (FO), intervalo retirada do dispositivo/ ovulação e taxa de ovulação em vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes tratadas com diferentes indutores de ovulação. Bacabal – MA, 2012

	Tratamento			Valor de <i>P</i>
	BE	CE	CE+GnRH	
Número de animais	13	13	13	
Diâmetro do FD no D8 (mm)	10,3±0,5	10,2±0,4	10,4±0,4	0,97
Diâmetro máximo do FD (mm)	11,8±0,4	12,2±0,3	12,3±0,4	0,65
Diâmetro máximo do FO (mm)	11,8±0,5	12,3±0,3	12,1±0,4	0,74
Intervalo retirada/ ovulação (h)	64,0±2,9	60,0±2,8	64,1±3,0	0,52
Taxa de ovulação (%)	92,3 (12/13)	92,3 (12/13)	100,0 (13/13)	0,61

(*P*>0,05)

Independentemente do tratamento, a maioria das ovulações ocorreu entre 54 e 66 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona, demonstrando uma média de $62,7 \pm 2,9$ horas. Em relação à dispersão das ovulações, percebeu-se, também, que não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos (Figura 6).

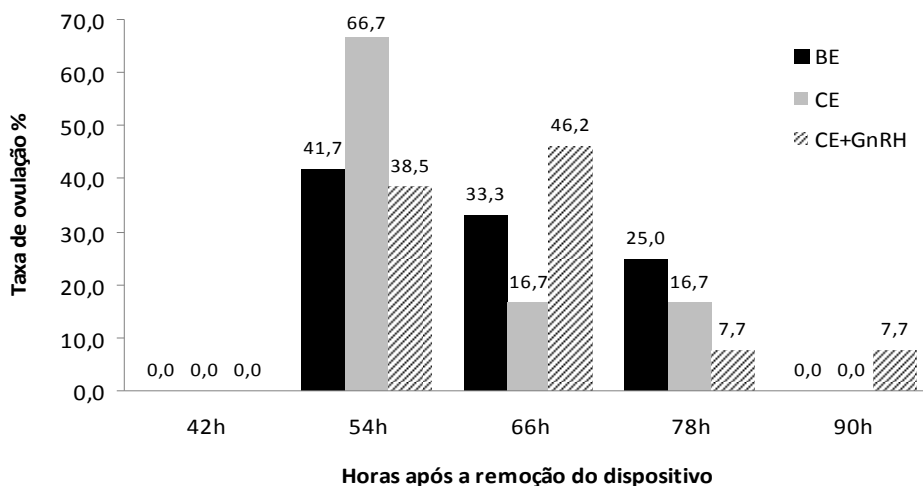


FIGURA 6. Distribuição das ovulações em horas após a remoção dos dispositivos intravaginais de P4.

($P>0,05$). Não houve diferença significativa entre a homogeneidade das variâncias para a variável momento da ovulação (Teste de Bartlett).

Em relação à taxa de concepção à IATF, não houve interação entre variáveis classificatórias (réplica, categoria animal, escore corporal, partidas de sêmen e número de usos do dispositivo de P4) demonstrando que as mesmas não interferiram na resposta aos tratamentos. Não houve fator de risco significativo para concepção à IATF com sêmen sexado (Tabela 4).

RESULTADOS

Tabela 4. Chance de concepção (P/IA%) com base nas variáveis classificatórias em vacas Nelore (*Bos indicus*) inseminadas com sêmen sexado após tratamento com diferentes indutores de ovulação. Parnarama e Lagoa do Mato – MA, 2012

Variável	P/IA% (n/n)	OR ajustada (95% IC)*	P
Réplicas			
1	39,0 (30/77)	Referente**	0,99
2	38,9 (35/90)	0,99 (0,53 – 1,86)	
3	39,3 (33/84)	1,01 (0,54 – 1,86)	
4	40,9 (38/93)	1,08 (0,58 – 2,00)	
Categoria Animal			
Primíparas	38,5 (20/52)	Referente**	0,86
Múltiparas	39,7 (116/292)	1,05 (0,57- 1,93)	
Escore Corporal			
Baixo a Moderado (2,5 a 3,0)	43,3 (55/127)	Referente**	0,27
Alto (>3,0)	37,3 (81/217)	0,78 (0,50 – 1,22)	
Partidas de Sêmen			
A	46,5 (40/86)	Referente**	0,21
B	42,9 (30/70)	0,86 (0,46 – 1,63)	
C	41,5 (17/41)	0,81 (0,38 – 1,73)	
D	33,33 (49/147)	0,57 (0,33 – 0,99)	
Uso dos dispositivos			
Novo	39,9 (73/183)	Referente**	0,89
Reutilizado 8 dias	39,1 (63/161)	0,97 (0,63 – 1,49)	

OR = *odds ratio* (razão de chance); IC = intervalo de confiança

**Referente = Grupo de referência para razão de chance ajustada.

Conforme apresentado na Tabela 5, também não foi observada diferença significativa entre indutores de ovulação na taxa de concepção com sêmen sexado em vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes (P=0,09).

TABELA 5. Taxa de concepção em vacas Nelore (*Bos indicus*) com sêmen sexado tratadas com diferentes indutores de ovulação, Parnarama e Lagoa do Mato – MA, 2012

Grupo	Prenhes/ Total	Taxa de Concepção (%)
BE	39/114	34,2
CE	52/115	45,2
CE+GnRH	45/115	39,1

(P>0,05)

8 DISCUSSÃO

Diante dos resultados alcançados nos experimentos 1 e 2, a hipótese de que a associação de dois indutores de ovulação (cipionato de estradiol + GnRH; CE+GnRH) proporcionaria maior sincronização da ovulação e consequente maior concepção após protocolo de IATF, foi rejeitada. A administração única do cipionato de estradiol (CE) ou o benzoato de estradiol (BE) foi suficiente para induzir a ovulação sincronizada e obter taxas de concepção satisfatórias com a utilização de sêmen sexado.

Os resultados aqui obtidos trazem uma nova informação à comunidade científica, abrindo perspectivas futuras para realização de novos estudos envolvendo protocolos de sincronização de estro/ovulação, pois até o momento não foram encontradas pesquisas com a utilização de CE como único indutor de ovulação para IATF com sêmen sexado.

A taxa de crescimento folicular e os diâmetros foliculares aqui observados foram similares quando utilizado BE ou CE isoladamente, ou CE associado ao GnRH. Estes dados estão de acordo com os achados de Crepaldi (2009), Sales et al (2012) e Andrade (2012) que observaram diâmetro dos folículos ovulatórios de $13,3 \pm 0,6$ mm, $13,1 \pm 0,4$ e $12,7 \pm 1,9$ mm respectivamente, aplicando BE, e $14,3 \pm 0,4$ mm, $13,9 \pm 0,4$ mm e $13,3 \pm 2,3$ mm respectivamente, empregando CE ($P > 0,05$).

Por outro lado, Sá Filho et al. (2011b), utilizando implantes auriculares de norgestomet em novilhas Nelore, observaram diferenças no diâmetro máximo de folículos ovulatórios quando induziram ovulação com BE ($9,0 \pm 0,5$ mm), CE ($8,6 \pm 0,4$ mm) ou GnRH ($9,9 \pm 0,4$) ($P < 0,0001$), ambos isoladamente .

Os resultados obtidos em nosso experimento também evidenciaram que a maior parte de suas ovulações concentrou-se entre 54 e 66 horas após a retirada do dispositivo de P4, com percentual de 66,7% para CE e 41,7% para BE ocorrendo neste intervalo. Já para o grupo CE+GnRH, 46,7% das ovulações ocorreram somente às 66 horas após a retirada do dispositivo de P4.

Em vários estudos, também foi possível verificar que o momento da ovulação ocorreu em média entre 54 e 66 horas após a remoção do dispositivo, com ovulações em menor proporção, ocorrendo até 78 horas, com taxas de ovulação em torno de 80 a 100% (CREPALDI, 2009; ANDRADE, 2012; SALES et al., 2012).

Na literatura científica, ainda existe uma série de discussões entre autores sobre a eficiência do cipionato de estradiol na indução da ovulação. Dentre eles, podemos citar trabalhos de Reis et al. (2004) e Martins et al. (2005), que observaram as ovulações aproximadamente 72 horas após o cipionato de estradiol, este administrado na retirada dos dispositivos de P4. Estes mesmos autores relatam em seus respectivos estudos que o cipionato de estradiol não seja tão eficiente para sincronizar as ovulações em animais que foram tratados com progesterona, devido o mesmo proporcionar uma maior dispersão no momento das mesmas. Porém estes resultados são contraditórios aos de Andrade (2012), Crepaldi et al. (2008), Colazo et al. (2003) e Sales et al. (2012), que verificaram ovulações ocorrendo de forma sincronizada em média de 66 a 78 horas após a remoção do dispositivo de P4, utilizando o BE e CE, respectivamente.

Para tentar explicar as diferentes respostas entre os indutores de ovulação, principalmente o cipionato de estradiol, Vynckier et al. (1990) buscaram determinar o perfil da liberação de 17β -estradiol durante o estro induzido com administração de 10 mg de BE e CE, no qual observaram que as concentrações plasmáticas de deste hormônio variavam bastante entre 16 a 66 horas antes da ovulação e que o CE induziu um pico de 17β -estradiol menor, além de ter surgido mais tardiamente, porém persistia por um intervalo maior até retornar aos níveis basais, quando comparado ao BE.

Em nosso estudo, além destes, também foi utilizado o GnRH, porém associado com o CE para induzir ovulação, o qual não confirmou a hipótese de que esta associação poderia diminuir o intervalo interovulatório, sincronizando melhor as ovulações. Em estudo semelhante, Sá Filho et al. (2011a) também não observaram efeito positivo do GnRH na sincronização da ovulação nem na taxa de concepção com sêmen convencional.

Souza et al. (2009), tratou vacas leiteiras com CE ou GnRH e concluiu que o diâmetro do folículo dominante ($13,6 \pm 0,4$ vs. $14,7 \pm 0,7$; $p=0,11$), momento da ovulação ($70,2 \pm 2,9$ vs. $72,9 \pm 2,1$; $p=0,70$) e taxa de ovulação ($84,0\%$ vs. $79,2$; $p=0,81$), não diferiram significativamente ($p>0,05$) entre os respectivos indutores de ovulação.

Em outro estudo, Souza et al. (2007) desta vez buscando verificar o efeito da suplementação de 17β -estradiol antes da segunda aplicação do GnRH em protocolo Ovsynch em vacas leiteiras concluiu que o mesmo melhora significativamente a sincronização do tamanho do folículo ovulatório, além de demonstrar que o estradiol é um fator limitante para fertilidade de vacas que ovularam folículos entre 15 a 19 mm, porém, não melhora a fertilidade de vacas que tenham maior ou menor diâmetro desse intervalo.

Lopes et al. (2000) obtiveram sucesso quando aplicaram o CE em substituição do GnRH também em protocolos Ovsynch em gado de leite. Além deste, Ambrose et al. (2001) verificaram que a administração de 0,5 mg de CE no momento da retirada do CIDR[®] sincronizou a ovulação em novilhas da raça holandesa que haviam recebido PGF 2α 24 horas antes da remoção do do dispositivo.

Segundo Ferreira (2010) uma das limitações do GnRH é que, apesar de atuar em folículos pré-ovulatórios, sincronizando a ovulação, este não consegue produzir um padrão liberatório de LH suficiente para que o folículo após a luteólise se desenvolva até atingir o estágio ovulatório.

Uma série de eventos biológicos tem sido observados em resposta a ativação do receptor de GnRH no ovário (HILLENSSJO e LEMAIRE, 1980). Neste sentido, tem sido descrito que os agonistas de GnRH exercem diversas ações nas células da granulosa ao longo das diferentes fases do desenvolvimento folicular.

Em um estudo de Takekida et al. (2003), o GnRH inibiu a atividade proliferativa de células da granulosa imaturas em folículos pequenos e médios, além de comprometer a esteroidogênese e a concentração de receptores de gonadotrofinas nesta mesma classe de folículos (HSUEH e JONES, 1981).

Estes trabalhos, entre outros, sugerem que o efeito direto do agonista de GnRH no ovário depende de sua responsividade ao LH (SINGH e KRISHNA, 2010).

Em particular, o GnRH somente exerce efeito estimulatório nos folículos pré-ovulatórios, induzindo maturação oocitária (HILLENSTJO e LEMAIRE, 1980) e ruptura folicular (EKHOLM et al., 1981). Além disso, há grande variação individual na magnitude da liberação de LH, após injeção de deslorelina (PADULA et al., 2002). Por essas razões, em nosso estudo decidiu-se aplicar o cipionato de estradiol antes do GnRH, no intuito de proporcionar melhor o desenvolvimento folicular até a ovulação.

Em outros estudos, Sá Filho et al. (2011a) e Pancarci et al. (2002) observaram que o ECP aumentou a ocorrência de estros e a taxa de concepção à IATF, quando comparado a fêmeas tratadas somente com GnRH. O estradiol atua primariamente no hipotálamo estimulando comportamento estral e secreção de LH, e também em outros tecidos alvo, como ovários e útero (BLACHE et al., 1991; LANGHOUT et al., 1991; BINELLI et al., 2009). Sugere-se ainda que o *prime* de estradiol atue na indução de receptores endometriais de progesterona, melhorando a fertilidade (ZELINNSKI; STORMSHAK, 1981).

Em trabalhos realizados anteriormente, como o de Pursley (1995), foi constatado que a ovulação com a aplicação do GnRH ocorre em média 32 horas após a administração. Este achado foi posteriormente confirmado por estudos de Bodensteiner et al. (1996) ($32,0 \pm 0,0$), Barros et al. (2000) ($31,7 \pm 1,8$) e Fernandes et al. (2001) ($32,8 \pm 1,6$ h). Em nosso estudo a ovulação do tratamento CE+GnRH ocorreu às $64,1 \pm 3,0$ horas após a retirada dos dispositivos, portanto, em torno de 16 horas após a aplicação de GnRH. É provável que esta variação seja devida ao folículo dominante já estar sob efeito do primeiro indutor de ovulação (CE). Isso mostra que a associação destes indutores não foi eficiente em melhorar a sincronização da ovulação.

Ainda se tratando das diferentes respostas aos indutores de ovulação, Ambrose et al. (2005) com o objetivo de verificar a eficácia de GnRH, pLH (LH suíno) e do cipionato de estradiol em protocolo Ovsynch modificado, observaram que o diâmetro do folículo dominante e a taxa de ovulação não

apresentaram diferença significativa, mas o momento da ovulação diferiu significativamente entre os respectivos tratamentos (57^a vs 102^b vs 66^a horas; P=0,03).

Alguns autores relataram que quanto maior for diâmetro do folículo dominante no dia da retirada do dispositivo, aumenta consideravelmente a probabilidade de prenhez em programas de IATF (PERRY et al., 2007; MENEGHETTI et al., 2009; SÁ FILHO et al., 2010; SÁ FILHO et al., 2012). Ainda, como efeito adicional, considera-se que elevadas concentrações plasmáticas de progesterona durante a permanência dos dispositivos interferem direta e negativamente no tamanho do folículo dominante, limitando seu crescimento (PERES et al., 2009).

Outros estudos dão suporte a esta afirmação, pois verificaram que altas concentrações de progesterona diminuem a capacidade ovulatória do folículo dominante (COLAZO et al., 2008). Neste sentido, a diminuição da concentração circulante de progesterona para valores subluteais aumenta a pulsatilidade de LH, que favorece o crescimento do folículo dominante (SÁVIO et al., 1993).

Tanto em nosso estudo, quanto no realizado por Crepaldi (2009), utilizou-se dispositivos intravaginais contendo 1g de progesterona (Sincrogest[®] e DIB[®], respectivamente) em vacas Nelore entre 60 e 90 dias pós-parto. Assim, o provável anestro puerperal (RUIZ-CORTEZ e OLIVERA-ANGEL, 1999), associado a adequados níveis exógenos de progesterona, podem ter contribuído decididamente para que o folículo dominante se desenvolvesse, o que conseqüentemente possibilitou uma resposta ovulatória ótima (90-100%).

Para dar mais ênfase a esta informação, Maio et al. (2008) explicaram em sua pesquisa que dispositivos intravaginais, sejam eles novos ou usados previamente por 8 ou 16 dias, são eficazes na manutenção das concentrações plasmáticas de P4 acima de 1ng/mL.

Com base nos dados do experimento 1, acerca da dinâmica ovariana, constatou-se que 83,4% dos animais do grupo CE ovularam entre 54 e 66 horas após a remoção dos dispositivos, com média em torno de 60 (60,0±2,8) horas. Assim, pode-se inferir que este intervalo médio das ovulações

ocorreu exatamente no momento das inseminações realizados no experimento 2, conferido índice de concepção de 45,2% (52/115) neste grupo. Os grupos BE e CE+GnRH tiveram suas ovulações em torno de 4 horas mais tarde (em média 64 horas). Diante desses resultados, podemos explicar o bom desempenho do grupo CE na taxa de concepção, apesar de não ter havido diferença significativa entre ambos os indutores ($P=0,09$).

Estes resultados consolidam as conclusões de Neves (2010) que obtiveram melhores resultados quando as fêmeas foram inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado em torno de 0 a 12 horas antes da ovulação (37,9%). Esta mesma pesquisa mostrou que, quando a IATF é realizada de 12,1 a 24 horas antes, a concepção reduz para 19,4% e, finalmente, aquelas que ovularam após 24 horas depois da IATF tiveram uma concepção de apenas 5,8%.

Em relação aos indutores de ovulação utilizados para IATF, uma série de estudos têm sido abordados, convergindo-se opiniões e considerações técnicas acerca de seus efeitos sobre a dinâmica ovariana e taxas de concepção em fêmeas bovinas. No entanto, nas publicações atualmente disponíveis é citado apenas o benzoato como éster de estradiol utilizado para IATF com sêmen sexado em *Bos indicus* (SÁ FILHO et al., 2012; NEVES, 2010; SALES et al., 2011; BARUSELLI et al., 2007)

Em nosso estudo, os tratamentos com CE ou BE proporcionaram taxas de concepção similares, com tendência estatística de 11% em favor do CE ($P=0,09$).

Outras pesquisas, porém com sêmen convencional, mostram que não há diferença significativa entre BE e CE tanto na resposta folicular/ovulatória quanto na taxa de concepção (SALES et al., 2012; AYRES et al., 2006c). Ainda, há estudos que apontam o uso de cipionato de estradiol como uma estratégia prática vantajosa, pois o mesmo pode administrado na ocasião da remoção do dispositivo, reduzindo o número de manejos dos animais e otimizando a mão de obra sem comprometer os índices reprodutivos (ANDRADE, 2012; MELO et al., 2011)

Ainda em nosso estudo, o GnRH em associação com CE não melhorou a concepção. Em outra pesquisa, Sá Filho et al. (2010b) avaliaram o efeito da administração de GnRH no momento da detecção do estro de novilhas Jersey inseminadas com sêmen sexado, e mais uma vez concluíram que não houve efeito na concepção (GnRH = 47,2% vs. Controle = 51,2%; P=0,38).

Comparando este estudo com outro similar realizado recentemente por Sá Filho et al. (2011a), que trabalhou com os mesmos indutores de ovulação e associação de ambos, mas utilizando sêmen convencional, o mesmo obteve taxas de concepção de 56,2% (CE), 52,9% (CE+GnRH) e 39,0% (GnRH), não havendo resposta aditiva do GnRH e demonstrando também a necessidade de administrar fontes de estradiol para melhorar a fertilidade de vacas Nelore, sobretudo no período pós-parto.

Contextualizando estas e outras pesquisas anteriormente citadas, apesar de o GnRH potencializar o pico de LH, evitando atraso na ovulação (KAIM et al., 2003), os resultados, sobretudo em gado de corte têm, de modo recorrente, mostrado que não há efeito de sua administração na concepção de vacas ou novilhas (AMBROSE et al., 2005; AYRES et al., 2006a,b; PERRY e PERRY, 2008; SOUZA et al., 2009). Ainda existem poucos estudos que mostram sua importância em fêmeas *Bos indicus* (SÁ FILHO et al., 2010a), exceto em fêmeas leiteiras ou repetidoras de estro (KAIM et al., 2003; LEE et al., 1983).

Segundo Hawk (1983) as concentrações de estradiol no momento da inseminação são determinantes para o sucesso do transporte espermático e equilíbrio fisiológico do ambiente uterino. Kieborz-Loos et al. (2003) ressaltam que a produção de prostaglandina F_{2α}, mediada pela ocitocina e a consequente luteólise precoce, foram inibidas mais eficientemente pela exposição à progesterona, quando as fêmeas foram pré tratadas com estradiol, concluindo que o balanço proporcionado pela associação de progesterona e estradiol são determinantes do momento da liberação de PGF_{2α} e luteólise no pós-parto.

O avanço nos estudos da IATF com sêmen sexado vem permitindo diminuir as diferenças na taxa de concepção com diferentes tipos de sêmen (convencional vs. sexado). Esta afirmação confronta estudos anteriores que afirmam que a média da taxa de concepção com sêmen sexado alcança cerca de 80% do sucesso obtido com sêmen convencional (DE JARNETTE et al., 2008), sendo encontrados, em inseminação convencional percentuais de até 70% para novilhas e 83% para vacas (NORMAN et al., 2010). Na verdade, estes resultados são diretamente dependentes do manejo de sincronização e inseminação adotados e, principalmente das características fisiológicas dos touros doadores e das fêmeas inseminadas. Nesta perspectiva, deve-se dar atenção especial aos fatores fisiológicos que podem contribuir com esta evolução nos resultados alcançados com sêmen sexado. Entre os fatores acima citados, encontram-se diâmetro folicular ovulatório, ocorrência de estro, momento da inseminação (SÁ FILHO et al., 2011a), dose inseminante (DE JARNETTE et al., 2008), número de inseminações (SÁ FILHO et al., 2010), características individuais e raça do touro, bem como o cromossomo do espermatozóide depositado (X vs Y; BARUSELLI et al., 2007).

Para estudar outros fatores que interferem na chance de concepção com de sêmen sexado, no presente estudo avaliou-se o número de usos do dispositivo (dispositivo novo ou previamente utilizado por 8 dias), sendo que não houve diferença significativa. Também não houve efeito da categoria reprodutiva (múltiparas vs. primíparas; $P > 0,05$). Melo et al. (2012) também não observaram efeito do número de usos do dispositivo sobre a concepção com sêmen convencional em *Bos indicus* e cruzas. No entanto, diferentemente do nosso estudo, verificou-se que vacas múltiparas apresentaram maior taxa de concepção do que primíparas e nulíparas ($P < 0,0002$).

Finalmente, em nossa pesquisa, assim como em outros trabalhos utilizando sêmen sexado (SÁ FILHO et al., 2012) ou convencional (CREPALDI 2009; SALES et al., 2012 e SÁ FILHO et al., 2011b), conclui-se que eventuais variações no diâmetro folicular ou no momento da ovulação, não interferiram na taxa de concepção à IATF, quando se utilizou BE, CE ou CE+GnRH como indutores de ovulação em fêmeas *Bos indicus*.

9 CONCLUSÃO

A associação de cipionato de estradiol com GnRH não influenciou a dinâmica folicular nem a taxa de concepção em vacas Nelore (*Bos indicus*) lactantes submetidas à IATF com sêmen sexado, podendo se utilizar benzoato ou cipionato de estradiol como indutores.

REFERÊNCIAS

AMBROSE, J.D.; KASTELIC, J.P.; RAJAMAHENDRAN, R.; AALI, M.; DINN, N. Progesterone (CIDR)-based timed AI protocols using GnRH, porcine LH or estradiol cypionate for dairy heifers: Ovarian and endocrine responses and pregnancy rates. **Theriogenology**, v.53, p.1121–1134, 2005.

AMBROSE, D.J.; RAJAMAHENDRAN, R.; KASTELIC, J.P.; SMALL, J.A. Synchronization of ovulation and conception rates in Holstein heifers given an intravaginal progesterone-releasing device (CIDR), and estradiol cypionate, porcine LH or gonadotropin releasing hormone. **Archiv Fur Tierzucht**, v. 44, p. 77-79, 2001.

ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOSKINEN, E. et al. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology**, Stonehan, v. 61, p. 1583-1588, 2004.

ANDRADE, B.H.A. **Comparação entre diferentes indutores da ovulação e do momento da inseminação artificial sobre a taxa de concepção de vacas inseminadas em tempo fixo**. 2012, 70 p. Dissertação (Mestrado) Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS EXPORTADORAS DE CARNE. Pecuária: Rebanho Bovino Brasileiro. São Paulo, [S.1.:s.n., 2012?]. Disponível em: http://www.abiec.com.br/3_rebanhoasp. Acesso em: 28 jun. 2012.

AYRES, H.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PENTEADO, L.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Efeito do momento da inseminação e do tratamento com GnRH na IATF sobre a taxa de concepção de vacas de corte lactantes sincronizadas com e valerato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, 34 p.408, 2006a,b.

AYRES, H.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S.; PENTEADO, L.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Taxa de concepção de vacas Nelore lactantes sincronizadas com implante auricular de progestágeno associado ao Benzoato ou ao Cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, 34 p.410, 2006c.

BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, v.76, p.1903-1921, 1998.

BARROS, C.M.; MOREIRA, M.B.P.; FIGUEIREDO, R.A.; TEIXEIRA, A.B.; TRINCA, L.A. Synchronization of ovulation in beef cows (*Bos indicus*) using gnrh, PGF2 α and estradiol benzoate. **Theriogenology**, v. 53, n. 5, p. 1121-1134, 2000.

BARTOLOMEU, C.C. et al. Inseminação artificial em tempo fixo de vacas leiteiras mestiças Holando-Zebu no pós-parto com emprego de CIDR reutilizado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.426-427, 2003.

BARUSELLI, P. S.; JACOMINI, J. O.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A. Importância do emprego da eCG em protocolos de sincronização para IA, TE e SOV em tempo fixo.. In: 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2008, Londrina, PR. Anais do 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina, PR, 2008. v. 1. p. 146-167.

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

BARUSELLI, P.S.; AYRES H.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M.; GIMENES, L.U.; TORRES-JÚNIOR, J.R.S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. **Anais...** São Paulo, SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, 2006. v.1, p.113-132.

BARUSELLI, P. **Introdução da IATF no manejo reprodutivo de rebanhos bovinos de corte no brasil**. Simpósio Internacional de Reprodução animal, 5. 2005.

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

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O. Programas de sincronização da ovulação em gado de corte. In: **I Simpósio de Reprodução Bovina – Sincronização de Estros em Bovinos**, Porto Alegre-RS. Anais, p. 41-60, 2002.

BEG, M.A.; BERGFELT, D.R.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER, O.J. Follicular-fluid factors and granulosa-cell gene expression associated with follicle deviation in cattle. **Biology of Reproduction**, v.64, p.432-441, 2001.

BINELLI, M.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, M. A. C. M.; BERTA, C. M. Manipulation of ovarian and uterine function to increase conception rates in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 6, n.1, p.125-134, Jan/Mar. 2009.

BLACHE, D.; FABRE-NYS, C. J.; VERNIER, G. Ventromedial hypothalamus as a target for oestradiol action on proceptivity, receptivity and luteinizing hormone surge of the ewe. **Brain Res** 1991;546: 241–9.

BLECHER, S.R.; HOWIE, R.; LI, S.; DETMAR, J.; BLAHUT, L.M. A new approach to immunological sexing sperm. **Theriogenology**, 1999.

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

BÓ, G. A., ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J. Dinâmica folicular ovarica em el bovino. In MADUREIRA, E.H BARUSELLI, P.S **Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**, São Paulo, FUNVET, 2000, p.12-34.

BÓ, G. A.; ADAMS, GP.; CACCIA, M.,; MARTINEZ, M.; PIERSON, R.A.; MAPLELOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**. 1995; 39:193-204.

BÓ, G. A.; ADAMS, GP.; PIERSON, RA.; CACCIA, M.; TRIBULO, H.; MAPLETOFT, RJ. Follicular wave dynamics after estradiol-17b treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**; v. 41, p.1555-1569, 1994.

BODENSTEINER, K.J.; KOT, K.; WILTBANK, M.C.; GINTHER. O.J. Synchronization of emergence of follicular wave in cattle. **Theriogenology**, v. 45: p. 1115:1128, 1996.

BODMER, M; JANETT, F; HASSIG, M; DEN DAAS,N; HERT,P;THUN,R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. **Theriogenology**, v.64, p.1647-1655, 2005.

BORGES, A.M. Dinâmica folicular e momento da ovulação em vacas não lactantes das raças Gir e Nelore durante duas estações do ano. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**., Jun 2004, vol.56, no.3, p.346-354.

BORGES, A. M., TORRES, C. A. A., RUAS, J. R. M., ROCHA JÚNIOR, V. R., CARVALHO, G. R. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2001, v.53, n.5, p.595-604.

BRAGANÇA, J.F.M. Estratégias hormonais de indução/sincronização de estro em novilhas de corte entre 12 e 14 meses de idade. 2007. Tese (doutorado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007. Disponível em: <http://coralx.ufsm.br/ppgm/jose_francisco_manta.pdf>. Acesso em: 20 nov. 2007.

BUCHANAN, B.R.; SEIDEL JR, G.E.; MCCUE, P.M. Insemination of mares with low numbers of unsexed and sexed spermatozoa. **Theriogenology**, Stonehan, v. 53, p. 232-241, 2000.

BURKE, C.R. et al. Effects of maturity of the potential ovulatory follicle on induction of oestrus and ovulation in cattle with oestradiol benzoate. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.161–174, 2001.

CALLEJAS, S.S. Fisiologia del ciclo estral bovino. In: PALMA, G.A..Biotecnologia de la Reproducción. **Reprobiotec**, Argentina, cap. 4, p.37-49, 2001.

CARVALHO, J.B.P., REIS, E.L.; CARVALHO, N.A.T.; NICHI, M.; BARUSELLI, P.S. Follicular wave and luteal function in *Bos taurus*, *Bos indicus* and *Bos taurus Bos indicus* heifers treated with progesterone device. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ANIMAL REPRODUCTION, 14, 2004, Porto Seguro, 2004. v. 1. p.112.

COLAZO, M. G.; KASTELIC, J. P.; DAVIS, H.; RUTLEDGE, M. D.; MARTINEZ, M. F.; SMALL, J. A.; MAPLETOFT, R. J. Effects of plasma progesterone concentrations on LH release and ovulation in beef cattle given GnRH. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, p. 109–117, 2008.

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

CREPALDI, G.A. **Eficácia de diferentes protocolos de indução da ovulação e de intervalos de inseminação em vacas de corte submetidas à IATF**. 2009. 88 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

CREPALDI, G.A.; SALES, J.N.S.; GIROTTO, R.W.; AYRES, H.; SALLACARDOSO, P.B.; FARIA JUNIOR, S.P.; BARUSELLI, P.S. Momento da ovulação e taxa de concepção de vacas nelore tratadas com cipionato ou benzoato de estradiol para induzir a ovulação em protocolos de IATF. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, XXII, Guarujá. **Anais...** Guarujá: Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2008, p. 464.

CUTAIA, L. et al. Inseminación artificial a tiempo fijo utilizando dispositivos intravaginales com progesterona: critérios para la elección del tratamiento y factores condicionantes. In: **2º Simpósio de Reprodução de Bovinos**, Porto Alegre-RS, p.28-40, 2003.

DE GRAAF, S.P.; EVANS, G.; GILLAN, L. et al. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, Stoneham, v. 67, p. 217 - 227, 2007.

DEJARNETTE, J.M.; NEBEL, R.L.; MARSHALL, C.; 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 Dairy Science**; 91:1778-1785, 2008.

DEJARNETTE, J.N.; SALVERSON, R.L.; MARSHALL, C.E. Incidence of premature estrus in lactating dairy cows and conception rates to studing estrus or fixed-time inseminations after synchronization using GnRH and PGF2a. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 27-35, 2001.

DISKIN, M.G. et al. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.211–228, 2002.

DOBROWOLSKI, W.; HAFEZ, E.S.E. Transport and distribution of spermatozoa in the reproductive tract of the cow. **Journal of Animal Science**, v. 31, p. 940-3, 1970.

EKHOLM, C.; HILLENSJO, T.; ISAKSSON, O. Gonadotropin-releasing hormone agonists stimulate oocyte meiosis and ovulation in hypophysectomized rats. **Endocrinology** 1981, 108: 2022-2024.

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, n. 7, p. 1521-1532, 2001.

FERREIRA, A.D.M. **Reprodução da Fêmea Bovina: Fisiologia aplicada e Problemas mais comuns (causas e tratamentos)**. 1.ed. Juiz de Fora: Editar, 2010. 422 p.

FLORIANI, A. R. **Efeito de progesterona e benzoato de estradiol na dinâmica folicular e produção *in vitro* de embriões bovinos**. Universidade Federal de Minas Gerais Escola de Veterinária Programa dos Cursos de Pós-Graduação, 2006. Tese (Doutorado) - apresentada à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

FORTUNE, J.E. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v.65, p.648-654, 2001.

FORTUNE, J.E. Follicular dynamics the bovine estrous cycle: a limiting factor in improvement of fertility? **Animal Reproduction Science**, v.33, n.1-4, p.111-125, 1993.

FREITAS, C.P., **Variações Metodológicas na Congelação de Sêmen Bovino Sexado** Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), 2007.

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

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

GARNER, D.L. Sex-Sorting Mammalian Sperm: Concept to Application in Animals. **Journal of Andrology**, v. 22, n. 4, p. 519-26, 2001.

GEARY, T.W.; WHITTIER, J.C.; HALLFORD, D.M.; MACNEIL, M.D. Calf removal improves conception rates to the Ovsynch and Co-synch protocols. **Journal of Animal Science** v. 79, p.1-4, 2001.

GEARY; T.W. DOWNING, E.R.; BRUEMMER, J.E.; WHITTIER, J.C. Ovarian and estrous response of suckled beef cows to the select synch estrous synchronization protocol. **Prof. Anim. Sci**, v. 16, p. 1-5, 2000.

GINTHER, O.J. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.239-257, 2003.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1187-1194, 1996.

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

GONZALEZ, F.H.D. **Endocrinologia da Reprodução**. Disponível em: www.ufrgs.br/favet/bioquimica. 65p. 2001.

GONÇALVES, P.B.D. et al. Anestro pós parto em vacas de corte. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2004. p.105-116.

HANLON, D.W.; WILLIAMSON, N.B.; WICHTEL, J.J.; STEFFERT, I.J.; CRAIGIE, A.L.; PFEIFFER, D.U. Ovulatory responses and plasma luteinizing hormone concentrations in dairy heifers after treatment with exogenous progesterone and estradiol benzoate. **Theriogenology**; v.47, p. 963-975, 1997.

HAWK, H.W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **Journal Dairy Science**, 1983; 66:2645– 60.

HENDRIKSEN, P.J.M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, p. 1295-1308, 1999.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2 ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Belo Horizonte: 1998, 49p.

HILLENSSJO, T.; LEMAIRE, W. J. Gonadotropin releasing hormone agonists stimulate meiotic maturation of follicle-enclosed rat oocytes in vitro. **Nature** 1980, 287:145-146.

HOHENBOKEN, W.D. Applications of sexed semen in cattle production. **Theriogenology**, v.52, n.8, p.1421-1433, 1999.

HOLLINSHEAD, F.K.; EVANS, G. EVANS, K. Birth of lambs of a pre-determined sex after in vitro production of embryos using frozen-thawed sex-sorted and re- frozen-thawed ram spermatozoa. **Reproduction**, Cambridge, v. 127, p. 557-568, 2004.

HOLLINSHEAD, 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 Developing**, 2003.

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. Espermatozóide sexado bovino: quando utilizá-lo? **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34 (Suplemento), Porto Alegre: UFRGS, p. 213-224, 2006.

HSUEH A. J.; JONES, P. B. Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. **Endocrine Review** 1981, 2:437-461.].

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa da Pecuária Municipal, v.38, 2010. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 20 de nov. 2011.

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

JOHNSON, L.A.; WELCH, G. R. Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency. **Theriogenology**, Stonehan, v. 52, p. 1323-1341,1999.

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**, Champaign, v. 41, p. 199-203, 1989.

JOLLY, P.D.; TISDALL, D.J.; HEATH, D.A apoptosis in bovine granulose cells in relation to steroid synthesis, cAMP, response to FSH and LH, and follicular atresia. **Biological Reproduction**, v. 51, p934-944, 1994.

KAIM, M.; BLOCH, A.; WOLFENSON, D.; BRAW-TAL, R.; ROSENBERG, M.; VOET,H.; FOLMAN, Y. Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses and conception rates. **Journal of Dairy Science**, 2003;86:2012–21.

KIEBORZ-LOSS, K.R.; GARVERICK, H.A.; KEISLER, D.H.; HAMILTON, S.A.; SALFEN, B.E.; YOUNGQUIST, R.S. et al. Oxytocin-induced secretion of prostaglandin F2 α in postpartum beef cows: effects of progesterone and estradiol-17 β treatment. **Journal of Animal Science**, 2003;81: 1830–6.

KINGHORN, B.P. Options for genetic improvement of Bali cattle - Assessing the strengths and weaknesses of alternative strategies option 1. Full program with all technologies and facilities available. In: ENTWISTLE, K.; LINDSAY, D.R. (Eds.) **Strategies to improve Bali cattle in Eastern Indonesia**. Canberra: ACIAR, 2003. p.58-71.

KINGHORN, B.P.; SMITH, C.; DEKKERS, J.C.M. Potential genetic gains with gamete harvesting and *in vitro* fertilization in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.74, n.2, p.611-622, 1991.

KLINC, P.; RATH, D. Application of flowcytometrically sexed spermatozoa in different farm animal species: a review **Archiv. Tierzucht, Dummerstorf**, 2006.

KURYKIN, J.; JAAKMA, Ü.; JALAKAS, M. et al. Pregnancy percentage following deposition of sexsorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. **Theriogenology**, Stonehan, v. 67, p. 754-759, 2007.

LAMMOGLIA, M.A. et al. Induced and synchronized estrus in cattle: dose titration of estradiol benzoate in peripubertal heifers and postpartum cows after treatment with an intravaginal progesterone-releasing insert and prostaglandin F2 α . **Journal of Animal Science**, v.76, p.1662-1670, 1998.

LANGHOUT, D. J.; SPICER, L. J.; GEISERT, R. D. Hormone, estradiol and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis and development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth protein synthesis. **Journal of Animal Science**, 1991, 69: 3321-3334.

LEE, C.N.; MAURICE, E.; AX, R.L.; PENNINGTON, J.A.; HOFFMAN, W.F.; BROW, M.D. Efficacy of gonadotropin-releasing hormone administered at the time of artificial insemination of heifers and postpartum and repeat breeder dairy cows. **Am J Vet Res**, 1983; 44:2160 –3.

LOPES, F. L.; ARNOLD, D. R.; WILLIAMS, J.; PANCARCI, S. M.; THATCHER, M. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Use of estradiol cypionate for timed insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 216, 2000.

LOWMAN, B. G. N.; SCOTT, N. A.; SOMERVILLE, S. H. **Condition scoring of cattle**. Edinburgh: The Edinburgh School of Agriculture, 1976. 5 p.

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

LU, K.H.; CRAN, D.G.; SEIDEL JR, G.E. In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, Stonehan, v. 52, p. 1393-1405, 1999.

LUCY, M. C. et al. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, p.3615-3626, 1992.

MADALENA, F.E.; JUNQUEIRA F.S. The value of sexed bovine semen. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.121, n.4, p.253-259, 2004.

MADUREIRA, E.H. PIMENTEL, J.R.V. IATF como uma ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. **Anais: Palestras**.

MAIO, J. R. G.; SALES, J. N. S.; CREPALDI, G. A.; BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, M. M.; SENEDA, M. M. Perfil plasmático de progesterona e taxa de prenhez à IATF de fêmeas bovinas tratadas com Sincrogest (Dispositivo Intravaginal de Progesterona). **A Hora Veterinária**, v. 165, p. 41-44, 2008.

MAPLETOFT, R.J. et al. Estrogen esters to synchronize follicular wave emergence and ovulation in CIDR-treated cattle. In: ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION, 2002, Albuquerque, New Mexico. **Proceedings...** Albuquerque: American Embryo Transfer Association, 2002. p.27-38.

MARQUES, M.O; REIS, E.L.; CAMPOS FILHO, E P; BARUSELLI, P.S. Efeitos da administração de eCG e de benzoato de estradiol para sincronização da ovulação em vacas *Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus* no período pós-parto. In: V SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 2003, Huerta Grande. v. 1, p. 392, 2003.

MARTINEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; MAPLETOFT, R.J.; The use of a progesterone-releasing device (CIDR-B) or melengestrol acetate with GnRH, LH, or estradiol benzoate for fixed-time AI in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 80, p.1746–51, 2002.

MARTÍNEZ, M.F. et al. The use of progestins in regimens for fixed-time artificial insemination in beef cattle. **Theriogenology**, v.57, p.1049–1059, 2002a.

MARTINEZ, M.F. et al. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Animal Reproduction Science*, v.57, p.23-33, 1999.

MARTÍNEZ, M.F.; KASTELIC, J.P.; ADAMS, G.P.; JANSEN, E.; OLSON, W.; MAPLETOFT, R.J. Alternative methods of synchronizing estrus and ovulation for fixed-time insemination in cattle. **Theriogenology**; p.350, 1998.

MARTINS, C. M.; CASTRICINI, E. S. C.; SÁ FILHO, M. F.; GIMENES, L. U.; BARUSELLI, P. S. Dinâmica folicular de vacas nelore tratadas com Cipionato ou Benzoato de estradiol em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 285, 2005.

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

MAXWELL, W.M.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F.K.; BATHGATE, R.; DE GRAAF, S.P.; ERIKSSON, B.M.; et al. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**. v.82-83, p.79–95, 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.

MCNUTT, T.L.; JOHNSON, L.A. Flow cytometric sorting of sperm: influence on fertilization and embryo/fetal development in the rabbit. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 43, p. 261-267, 1996.

MELO, P. C. H.; VALE, W. G.; ERNANE, W.; ROLIM FILHO, S. T.; RIBEIRO, H. F. L.; REIS, A. N.; SOUSA, J. S.; SILVA, A O A. Fixed timed artificial insemination (FTAI) through progestagen (CIDR) of 1st, 2nd, 3rd and 4th uses in bovine: II. Conception rate related to times of CIDR use, to the semen used, to artificial insemination technician and to farm management. **Livestock Research for Rural Development**, v.24, Article.62. 2012.

MELO, W. O.; SOUZA, J. A. T.; ELIAS, A. K. S.; ROCHA, I. J.; CONCEIÇÃO, E. J.; MARTÍNEZ, J. J. M.; VALARELLI, R.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S. Estradiol e prostaglandina na concepção de vacas nelore sincronizadas para IA em tempo fixo. **Archivos de Zootecnia**, v.60, p. 305 – 308, 2011.

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

MENEGHETTI, M.; LOSI, T.C.; MARTINS JR, A.P. et al. Uso de protocolo de IATF associado a diagnóstico precoce de gestação e ressincronização como estratégia para maximizar o número de vacas gestantes por IA em estação de monta reduzida. **Hora Vet.**, v.147, p.25-27, 2005.

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

MORAES, J.C.F.; DE SOUZA, C.J.H.; GONÇALVES, P.B.D. Controle do estro e ovulação em ruminantes. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.33-56.

MORUZZI, J.F. Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, New York, v. 57, p. 319-323, 1979.

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

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 em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo.

NEVES, H. H. R.; CARVALHEIRO, R.; FRIES, L. A.; QUEIROZ, S. A. Uso combinado de sêmen sexado e acasalamento dirigido sobre uma população de bovinos de corte submetida a seleção: estudo de simulação. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 38, p. 2368-2374, 2009.

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

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. **Nutrient requirements of dairy cattle**. 7.rev.ed. Washington, D.C.: 2001. 381p.

O'BRIEN, J.K.; HOLLINSHEAD, F.K.; EVANS, K.M. et al. Flow cytometric sorting of frozenthawed spermatozoa in sheep and non-human primates. **Reproduction, Fertility and Development**, Melbourne, v. 15, p. 367-375, 2003.

PADULA, A. M.; BORMAN, J. M.; WRIGHT, P. J.; MACMILLAN, K. L. Temporary suppression of pulsatile LH release following a single injection of a GnRH agonist (deslorelin) in ovariectomised Holstein dairy cows. **Animal Reproduction Science** 70 (2002) 37 – 47.

PANCARCI, S. M.; JORDAN, E. R.; RISCO, C. A.; SCHOUTEN, M. J.; LOPES, F. L.; MOREIRA, F.; THATCHER, W. W. Use of estradiol cypionate in a presynchronized timed artificial insemination program for lactating dairy cattle. American Dairy Science Association, 2002.

PENTEADO, L.; AYRES, H.; TORRES JUNIOR, J. R. S.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Taxa de concepção de vacas Nelore lactantes sincronizadas

com dispositivo intravaginal de progesterona associado ao benzoato ou ao cipionato de estradiol. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 401, 2006.

PERES, R. F. G.; CLARO JÚNIOR, I.; SÁ FILHO, O. G.; NOGUEIRA, G. P.; VASCONCELOS, J. L. M. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 72, p. 681-9, 2009.

PERRY, G.A.; PERRY, B.L. Effect of preovulatory concentrations of estradiol and initiation of standing estrus on uterine pH in beef cows. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 333-338, 2008.

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; ROBERTS, A. J.; MACNEIL, M. D.; GEARY, T. W. 2007. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifers. **Journal of Animal Science**. 85:684–689.

PINEDA, N. Base genética brasileira para ser multiplicada. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1., 2004, Londrina. **Anais...** Londrina: [s.n.], 2004. p. 15-20.

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

PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

REICHENBACH, HD.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: Gonsalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **BIOTÉCNICAS APLICADAS À REPRODUÇÃO ANIMAL**, 1ª ed. São Paulo, Ed. Varela, 2002 p. 153-160.

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

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

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

SÁ FILHO, M.F.; SANTOS, J.E.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; BARUSELLI P.S. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. **Theriogenology** 76 (2011a) 455–463

SÁ FILHO, M. F.; BALDRIGHI, J. M.; SALES, J. N. S.; CERPALDI, G. A.; CARVALHO, J. B. P.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin-based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science** 129 (2011b) 132-139.

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

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

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

SÁ FILHO, O. G.; VASCONCELOS, J. L. M.; SANTOS, R. M.; ROSSINI, L. C. C. Efeito do momento da aplicação de PGF₂ em protocolo de inseminação artificial com tempo fixo na taxa de concepção em novilhas de corte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v. 27, p. 3, 2003.

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

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

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

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

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

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

SEIDEL JR, G.E. Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. **Theriogenology**, v. 59, p. 585-598, 2003.

SEIDEL JR, G.E.; JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm - overview. **Theriogenology**, 1999.

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

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 da ultra-sonografia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p.130-132, 2001.

SINGH, P.; KRISHNA, A. Effects of GnRH agonist treatment on steroidogenesis and folliculogenesis in the ovary of cyclic mice. **Journal of Ovarian Research** 2010, 3:26.

SOUZA, A. H.; VIECHNIESK, S.; LIMA, F. A. SILVA, F. F.; ARAÚJO, R.; BÓ, G. A.; WILTBANK, M.C.; BARUSELLI, P.S. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**. V.72, n,1, p. 10-21, jul 1, 2009.

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

SOUZA, A.H.; GÜMEN, A.; SILVA, E.P.B.; CUNHA, A.P.; GUENTHER, J.N.; PETO, C.M.; CARAVIELLO, D.Z.; WILTIBANK, M.C. Supplementation with

Estradiol-17 β Before the Last Gonadotropin-Releasing Hormone Injection of the Ovsynch Protocol in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**. Vol. 90;No. 10, p. 4623-4634, 2007.

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

STATIC ANALYSIS, 8th International Symposium, SAS 2001, Paris, France, July 16-18, 2001, Proceedings. Lecture Notes in Computer Science 2126 Springer 2001, ISBN 3-540-42314-1.

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

TAKEKIDA, S.; MATSO, H.; MARUO, T. GnRH agonist action on granulosa cell at varying follicular stages. **Molecular and Cellular Endocrinology** 202 (2003) 155-164.

TWAGIRAMUNGU, H. et al. Synchronization of ovarian follicular waves with a gonadotropin-releasing hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v.73, p.3141–3151, 1995.

VASCONCELOS, J.L.M.; SILCOX, R.W.; ROSA, G.J.M.; PURSLEY, J.R.; WILTBANK, M.C. Synchronization rate, size of the ovulatory follicle, and pregnancy rate after synchronization of ovulation beginning on different days of the estrous cycle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 52, p. 1067-1078, 1999.

VASCONCELOS, J.L.M. **Avaliação do protocolo de sincronização de ovulação “Ovsynch” e de fatores relacionados à associação entre produção de leite e taxa de concepção**. Jaboticabal, 1998, 128p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista.

VASCONCELOS, J. L. M.; PURSLEY, J. R.; WILTBANK, M. C. Effects of synchromate B combined with Ngr. On follicular dynamics and time of ovulation. **Journal of Dairy Science**, v. 77 (Suppl. 1), p. 174, 1994 (abstract).

VILLANUEVA, B.; WOOLLIAMS, J.A.; SIMM, G. Strategies for controlling rates of inbreeding in MOET nucleus schemes for beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v.27, n.4, p.347- 363, 1995.

VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; DE KRUIF, A.; CORYN, M. Plasma estradiol-17 beta concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 beta benzoate and estradiol-17 beta cypionate--a

preliminary study. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 13, n. 1, p. 36-42, 1990.

VOGLER, C.J.; SAACKE, R.G.; BAME, J.H. Effect of scrotal insulation on viability of cryopreserved bovine semen. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.3827-35, 1991.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, P.C.; CAMPBELL, B.K. et al. Intraovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. **Theriogenology**, v.68, p.S22- S29, 2007.

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

ZELINSKI, M.B.; STORMSHAK, F. Temporal relationships between endometrial RNA polymerase activities and steroid hormone receptors following estradiol administration during the midluteal phase of the ovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, 1981; 24:119 –24