

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

**AVALIAÇÃO DO LOCAL DE DEPOSIÇÃO DO SÊMEN SEXADO NA
PRODUÇÃO *in vivo* DE EMBRIÕES DA RAÇA NELORE**

Naia de Britto e Alves

São Luís – MA
2014

NAIA DE BRITTO E ALVES

Avaliação do local de deposição do sêmen sexado na produção *in vivo* de embriões da raça Nelore

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

Área: Conservação e Reprodução Animal
Orientador: Prof. Dr. Fernando Andrade Souza

São Luís – MA
2014

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

Alves, Naia de Britto e .

Avaliação do local de deposição do sêmen sexado na produção *in vivo* de embriões da raça Nelore / Naia de Britto e Alves. – São Luís, 2014.

63f

Dissertação (Mestrado) – Curso de Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Andrade Souza

1.*Bos indicus*. 2.Embriões. 3.Superovulação. I.Título

CDU: 636.291.082



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

DECISÃO DA CEEA/CMV/UEMA

DATA DA ENTRADA DO PEDIDO: 01/09/2010

NÚMERO DO PROCESSO: 28/2010

NÚMERO DO PARECER: 28/2010

DATA DO PARECER: 17/09/2010

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

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

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

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

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

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

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

ASSINATURA PRESIDENTE

DATA: 01/09/2010


Prof. Dr. Altoni Lúcio de Sousa
MV / UEMA / 9357

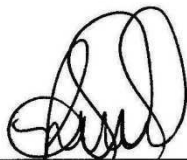
FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Naia de Britto e Alves

Título: Avaliação do local de deposição do sêmen sexado na produção *in vivo* de embriões da raça Nelore

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

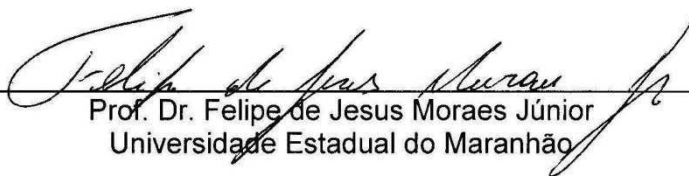
Dissertação de mestrado defendida e aprovada em 14/03/2014 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:



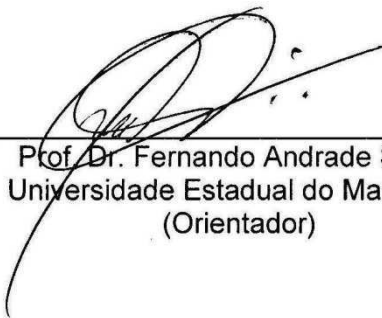
Prof.ª Dr.ª Ricarda Maria dos Santos
Universidade Federal de Uberlândia



Prof. Dr. Ricardo de Macedo Chaves
Universidade Estadual do Maranhão



Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior
Universidade Estadual do Maranhão



Prof. Dr. Fernando Andrade Souza
Universidade Estadual do Maranhão
(Orientador)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter iluminado os passos no meu caminho;

À minha família, pessoas nas quais posso me basear e que nunca medem esforços nas horas de ajuda e também nas de desespero;

Ao Prof. Dr Fernando Andrade Souza, pela coragem na orientação de uma desconhecida, por todos os conhecimentos partilhados, toda a paciência e todos os prazos concedidos;

Ao Prof. Dr. Ricardo de Macêdo Chaves, por ter me dado a primeira oportunidade no Mestrado;

À Prof^a. Dr^a Rita de Maria Seabra Nogueira de Candanedo Guerra pelos conselhos sobre a vida acadêmica;

À Prof^a. Dr^a. Ana Lúcia Abreu Silva, por toda a colaboração e ajuda no projeto;

Ao Prof. Dr. José de Ribamar Torres Júnior pela ajuda e apoio durante o experimento;

À Prof^a. Dr^a Anali Linhares Lima, pela orientação no mundo da estatística;

Ao meu marido, Rafael Pinto, por toda a ajuda, apoio, amor, carinho e paciência nos momentos que o mundo parecia ruir;

Ao Sr. Alves, pela disponibilização da fazenda, dos animais e dos seus ajudantes: Zominho e Fábio;

Ao LABRA, por todos os momentos de diversão, ensinamento, conhecimento e pesquisa ali vividos;

Ao LABRA *produções*, Sâmara Costa, Diego Santos, Paula Miranda, Maysa Gonçalves, Giovani de Abreu, Ylana Galiza, Israel Pires, Elzivânia Gomes, pessoas que se tornaram verdadeiros amigos durante esta jornada;

À Sâmara, graduanda (agora pós – graduanda) mais orientadora que eu já conheci, por todo o apoio, ajuda e puxões de orelha recebidos, uma amizade sincera e verdadeira que entrou na minha vida;

Aos amigos de longa data, Ana Flávia Arruda, Pablo Noletto, Luisa Deragon, Dandara Balby, Tatiana Lodovici, Angelina Leite, Raphaela Duailibe, que compreenderam os longos momentos de ausência e colaboraram, cada um do seu jeito, para que eu chegasse onde estou;

À Universidade Estadual do Maranhão, pelo acolhimento e oportunidades oferecidas;

À FAPEMA e CAPES pelo apoio imprescindível para a realização do projeto;

À todos, que por algum motivo, contribuíram na realização deste projeto, ou que em algum momento da minha vida fizeram algo que me fez ser a pessoa que sou hoje;

Muito obrigada!

Avaliação do local de deposição do sêmen sexado na produção *in vivo* de embriões da raça Nelore

Autora: Naia de Britto e Alves

Orientador: Prof. Dr. Fernando Andrade Souza

RESUMO

Objetivou-se com estudo verificar se o local de deposição do sêmen sexado influencia na quantidade e qualidade embrionária de vacas Nelore superovuladas. Foram utilizadas 12 fêmeas ciclando, submetidas ao protocolo de SOV, IATF e coleta de embriões. As fêmeas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (1,9g) e 2 mg de benzoato de estradiol em dia aleatório do ciclo estral, D0 (07h). A superestimulação foi induzida com 133 mg de FSH-p em 8 doses decrescentes a cada 12h, a partir do D4. No D6, foram administradas duas doses (07 e 19h) de 25 mg de PGF2 α . Os dispositivos de P4 foram retirados 36h após a primeira dose de PGF2 α e foi administrado 0,25 mg de Gonadorelina, 48h após a primeira dose de PGF2 α . A IATF foi realizada 18 e 30h após a administração da Gonadorelina, com duas palhetas com concentração de $2,1 \times 10^6$ de espermatozoides cada, sendo a coleta dos embriões realizada sete dias após a aplicação da gonadorelina. Foram feitas duas repetições, em delineamento *cross over*, de acordo com o local de deposição do sêmen, corpo ou corno uterino. Foram quantificados $5,2 \pm 2,38$ e $5,5 \pm 1,87$ folículos, com diâmetro médio de $5,37 \pm 1,73$ e $5,08 \pm 1,89$ mm, nos grupos corpo e corno, respectivamente, no início da superestimulação. No final do tratamento superestimulatório foram quantificados $12,00 \pm 2,95$ e $12,25 \pm 4,37$ folículos, de diâmetro médio de $8,64 \pm 2,46$ e $8,73 \pm 2,42$ mm, nos grupos corpo e corno, respectivamente. Observou-se que 66,7% (8/12) dos animais apresentavam CLs no dia da IATF, sendo quatro pertencentes ao grupo corpo e quatro ao grupo corno. O grupo corpo apresentou taxa de recuperação embrionária de 41,07% (23/56) e o grupo corno apresentou taxa de 35,71% (15/42). Foi observada diminuição da taxa de recuperação entre repetições, obtendo-se 44,26% (27/61) na primeira repetição enquanto que na segunda obteve-se 29,72% (11/37). Recuperou-se 52,17% (12/23) de embriões viáveis para o grupo corpo e 60% (9/15) para o grupo corno. Conclui-se que não houve diferença na quantidade ou qualidade dos embriões recuperados quanto ao local de deposição do sêmen sexado no momento da IATF.

Palavras-chave: *Bos indicus*. Embriões. Superovulação.

Evaluation of sexed semen deposition site on the *in vivo* embryo production of Nelore breed

Author: Naia de Britto e Alves

Advisor: Prof. Dr. Fernando Andrade Souza

ABSTRACT

This study's aim was to verify if the site of sexed semen deposition influences the quantity and quality of embryos from superovulated Nelore cows. Twelve females of proved cyclicity were used and went through SOV, FTAI and embryo collection protocols. The females received an intravaginal progesterone-releasing insert and 2 mg of estradiol benzoate at a random day of the estrous cycle, day 0 (07h). Superstimulation was induced with 133 mg of FSH-p in 8 decreasing doses at every 12h, beginning at D4. At D6, two 25 mg shots of PGF2 α were administered (07 and 19h). The progesterone devices were removed 36h after the first PGF2 α shot, and a shot of 0.25 mg of gonadorelin was given 48h after the first PGF2 α shot. FTAI was performed at 18 and 30h after the gonadorelin shot, with two straws each one containing 2,1x10⁶ sperm cells, and the embryo collection was done seven days after the gonadorelin shot. Two repetitions were done, in a cross over design, according to semen deposition site, body or uterine horns. At the beginning of the superstimulatory treatment, 5.2 \pm 2.38 and 5.5 \pm 1.87 follicles were identified, with mean diameter of 5.37 \pm 1.73 and 5.08 \pm 1.89mm, for the groups inseminated in the uterine body and horns, respectively. At the end of the treatment, 12.00 \pm 2.95 and 12.25 \pm 4.37 follicles were identified, with mean diameter of 8.64 \pm 2.46 and 8.73 \pm 2.42mm, for the groups inseminated in the uterine body and horns, respectively. It was noted that 66.7% (8/12) of the animals had CLs at the day of FTAI, presenting four animals in each group. The group inseminated in the uterine body had embryo recovery rate of 41.07% (23/56) and the group inseminated in the uterine horns had 35.71% (15/42). It was seen a decrease in the embryo recovery rate between repetitions, where the first repetition achieved 44.26% (27/61) while the second showed embryo recovery rate of 29.72% (11/37). Yielded 52.17% (12/23) of viable embryos for the group inseminated in the uterine body and 60% (9/15) for the group inseminated in the uterine horns. It was concluded that there wasn't differences at quantity or quality of recovered embryos according to the sexed semen deposition site at the time of FTAI.

Key words: *Bos indicus*. Embryos. Superovulation.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Média e desvio padrão ($X \pm S.D.$) da quantidade (n) e diâmetro folicular (mm) da dinâmica folicular ovariana de vacas Nelore superovuladas, São Luís, 2014. 36
- Tabela 2** – Total e média e desvio padrão de corpos lúteos (CLs) e recuperação embrionária no D15 em vacas Nelore superovuladas, São Luís, 2014. 39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquematização do tratamento superovulatório, IATF e exames ultrassonográficos.	33
--------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
α	Alfa
®	Marca Registrada
β	Beta
°	Graus
'	Minutos
''	Segundos
μ	Micro
\pm	Mais ou Menos
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
TE	Transferência de Embriões
SOV	Superovulação
IA	Inseminação Artificial
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
mm	Milímetro
CO	<i>Cumulus Oophorus</i>
LH	Hormônio Luteinizante
PAPP – A	Proteína Plasmática Associada a Prenhez do Tipo A
IGF – I	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina do Tipo I
P4	Progesterona
CL	Corpo Lúteo
PGFs	Prostaglandinas
PGF2 α /PGF	Prostaglandina F2 Alfa
E2	Estrógeno
eCG	Gonadotropina Coriônica Equina
PMSG	Gonadotropina Sérica de Égua Prenhe
D0	Dia da Ovulação ou Dia da Colocação do Implante de P4
h	Horas
mg	Miligrama
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
IP	Iodeto de Propídio
sptz	Espermatozoide
mL	Mililitro
cm	Centímetro
Mo	Mórula
Mc	Mórula Compacta
Bi	Blastocisto Inicial
BL	Blastocisto
Bx	Blastocisto Expandido
Be	Blastocisto Eclodido
S	Sul
O	Oeste
g	Grama
I.M.	Intra-Muscular

BE	Benzoato de Estradiol
US	Ultrassom / Ultrassonografia
MHz	Mega-Hertz
D4	Dia Quatro do Protocolo
D6	Dia Seis do Protocolo
D7	Dia Sete do Protocolo
D8	Dia Oito do Protocolo
D9	Dia Nove do Protocolo
D10	Dia Dez do Protocolo
D15	Dia Quinze do Protocolo
CLs	Corpos Lúteos
DMPBS	Solução Salina Fosfatada Tamponada de Dubelcco
P24	Protocolo 24
P36	Protocolo 36
X	Média
S.D.	Desvio Padrão
ONF	Oócito Não Fecundado
ZP	Zona Pelúcida
Dg	Degenerado

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Dinâmica folicular ovariana.....	16
2.2	Superovulação.....	20
2.3	Uso do sêmen sexado na IATF.....	23
2.4	Local da deposição do sêmen.....	27
2.5	Coleta e classificação de embriões.....	29
3.	HIPÓTESE.....	30
4.	OBJETIVOS.....	31
4.1	Objetivo geral.....	31
4.2	Objetivos específicos.....	31
5.	MATERIAIS E METODOS.....	31
5.1	Local e Animais.....	31
5.2	Análise estatística e delineamento experimental.....	32
5.3	Protocolos para SOV e IATF.....	32
5.4	Avaliações ultrassonográficas.....	34
5.5	Avaliação das taxas de ovulação e de recuperação das estruturas embrionárias.....	34
5.6	Coleta e avaliação das estruturas embrionárias.....	34
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
7.	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se no cenário mundial da bovinocultura, com o segundo maior rebanho efetivo, com mais de 211.000.000 de cabeças (IBGE, 2013) estando o estado do Maranhão com efetivo atual de cerca de 6.979.844 (AGED-MA, 2010). Além disso, desde 2004, o Brasil assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países (MAPA, 2013). Assim, há permanente busca por técnicas para melhorias na produtividade do rebanho (THOMAZI et al., 2009).

As biotécnicas aplicadas à reprodução têm contribuído significativamente no aumento da produção animal. O controle do ciclo estral, associado à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e à transferência de embriões (TE) influenciam o aumento da produtividade dos rebanhos, algo que cresceu aceleradamente nas últimas décadas (GONÇALVES et al., 2008).

Como complemento à IATF, o uso do sêmen sexado de bovinos tem crescido, juntamente com sua aceitação no mercado. O controle do sexo no nascimento permite um maior avanço genético e melhor produtividade (RATH et al., 2003). Como a disponibilidade deste tipo de sêmen é baixa e de alto custo, tem-se grande interesse no uso associado a ovulações múltiplas – superovulação (SOV), programas de TE e produção *in vitro* (JOHNSON, 2000).

O melhor indicativo do sucesso do uso do sêmen sexado em programas de superovulação é o número de bezerros nascidos do sexo desejado por doadora. Porém, há fatores que podem influenciar o resultado da SOV, tais como: qualidade, quantidade, pureza e potencial da fertilidade espermática; resposta ovulatória das doadoras; taxa de fecundação do oócito, recuperação e viabilidade embrionária; manejo das fêmeas; idade e paridade das doadoras; época do ano; intervalo entre partos; estágio do ciclo estral em que o tratamento superovulatório começa; dose de FSH (hormônio folículo estimulante); número e hora da inseminação artificial (IA); experiência do

inseminador e local de deposição do sêmen (corno ou corpo uterino) (SARTORI et al., 2004; SCHENK et al., 2006).

A imprevisibilidade na resposta superestimulatória, na taxa de ovulação e na alta proporção de embriões não transferíveis resultantes da falha na fecundação e da degeneração dos embriões no trato reprodutivo das doadoras antes da coleta resultam no alto custo de produção de embriões bovinos nos métodos usados atualmente em programas de TE.

Outros fatores como qualidade oocitária, falha no transporte espermático, capacitação, sobrevivência e/ou danos causados durante o processo de sexagem, podem ser responsáveis pela alta taxa de falha na fecundação em animais superovulados. Entretanto, algumas evidências apontam para a falta de sêmen no local da fecundação como a causa mais frequente na falha de fecundação (SCHENK et al., 2006).

Apesar de se obter menores taxas de embriões com o uso do sêmen sexado, a eficácia deste no produto final ainda é melhor. Pois o menor número de embriões do sexo desejado, compensa a perda de aproximadamente 50% dos embriões do sexo não desejado, obtidos com o uso do sêmen congelado convencional (HAYAKAWA et al., 2009).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dinâmica folicular ovariana

A dinâmica folicular ovariana representa um dos aspectos mais importantes da fisiologia ovariana, sendo intensamente estudada em raças taurinas (SAVIO et al., 1988; SIROIS & FORTUNE, 1988; BADINGA et al., 1994). O número de trabalhos com raças zebuínas (*Bos indicus*) e seus mestiços é, contudo, reduzido, particularmente nas raças de maior importância para a pecuária nacional (FIGUEIREDO et al., 1997; GAMBINI et al., 1998).

A partir do conhecimento da dinâmica folicular ovariana, tornou-se possível o desenvolvimento de tratamentos hormonais capazes de regular o crescimento folicular e o momento da ovulação, de forma a viabilizar a IATF em taurinos (PURSLEY et al., 1995) e zebuínos (FERNANDES et al., 2001). De forma similar, o desenvolvimento folicular e o momento da ovulação podem ser controlados farmacologicamente, para melhorar os tratamentos superovulatórios empregados na TE (NOGUEIRA et al., 2002).

A foliculogênese bovina é um processo contínuo de crescimento e atresia dos folículos ovarianos que se inicia na vida fetal, passa pela puberdade e continua na vida reprodutiva até a senilidade (NILSSON et al., 2001).

A onda de crescimento folicular é representada pelo crescimento de diversos folículos antrais, seguidos pela seleção de um folículo dominante e regressão de todos os subordinados. Na ausência da regressão luteal, eventualmente o folículo dominante regride para dar início a uma nova onda folicular (MARTÍNEZ et al., 2004).

O desenvolvimento folicular de bovinos ocorre em padrão de ondas. *Bos taurus* apresentam, normalmente, duas (PIERSON & GINTHER, 1988) ou três (SIROIS & FORTUNE, 1988) ondas foliculares por ciclo. Contudo, em zebuínos existem relatos que descrevem maior incidência de três ondas, sendo notificada a presença de até quatro ondas de crescimento folicular por ciclo estral (VIANA et al., 2000). De acordo com Taylor & Rajamahendran (1991) o número de ondas pode ser influenciado pela duração da fase luteínica e dessa forma o tratamento com progestágenos exógenos pode aumentar o número de ondas foliculares e a duração do ciclo estral.

Em várias espécies domésticas, os folículos antrais são recrutados, quando estão em torno de 3 a 4 mm e crescem, simultaneamente, por cerca de três dias, em uma onda folicular sob o controle das gonadotropinas (FORTUNE et al., 2001; GINTHER et al., 2003). Uma elevação nas concentrações plasmáticas de FSH estimulam o recrutamento e a emergência da onda folicular (FORTUNE, 1994). Em bovinos, a concentração máxima de FSH se dá quando o maior folículo da onda possui diâmetro próximo a 5 mm. Posteriormente, essas concentrações caem para níveis basais (ADAMS et al.,

1992), através do aumento nas concentrações plasmáticas de estradiol que, por sua vez, ocasiona uma redução nas concentrações de FSH (GREGORY et al., 2009).

Em espécies monovulatórias, como a bovina, um folículo é selecionado do grupo de recrutados e adquire capacidade ovulatória, enquanto os demais folículos, classificados como subordinados entram em atresia (GONG et al., 1996; GINTHER et al., 2001).

O folículo dominante possui diâmetro equivalente ao dos subordinados no dia da emergência (recrutamento da onda) e, gradualmente, divergem em tamanho por volta do quarto dia pós-recrutamento, quando acontece a seleção folicular (GINTHER, 2000).

A ação do FSH sobre o crescimento folicular ocorre devido ao desencadeamento de uma cadeia de reações provocadas a partir da sua ligação com receptores localizados nas células da granulosa do ovário das fêmeas. Estes receptores de FSH estão presentes em folículos bem jovens com apenas uma camada de células da granulosa e, à medida que os folículos crescem e aumentam às camadas de células *cumulus oophorus* (CO), os receptores de FSH também aumentam em quantidade e na sua capacidade de ligação ao ligante, até o folículo atingir o estágio pré-ovulatório. Alguns estudos *in vitro* mostraram que o tratamento com FSH amplifica a expressão de seus próprios receptores (SIMONI et al., 1997).

A seleção folicular é regulada pela flutuação nos níveis de FSH, que declina em torno de 2 a 3 dias após o recrutamento, esse mecanismo ocorre pela retroalimentação negativa da inibina (FORTUNE et al., 2004). Na supressão final de FSH, apenas um folículo mantém crescimento contínuo, devido aos receptores para LH (hormônio luteinizante) presentes nas células da granulosa (FIGUEIREDO et al., 2000; GINTHER et al., 2001), o qual passa a ser chamado de dominante.

Em bovinos, os folículos podem atingir o diâmetro de 8mm, independentemente do suporte do LH, mas o crescimento além de 9mm requer LH endógeno ou FSH exógeno (GONG et al., 1996). Portanto, os folículos são

considerados dependentes de FSH até a ocorrência da dominância, após o que eles se tornam dependentes de LH (FORTUNE et al., 2001).

O folículo selecionado passa a exercer dominância sobre os demais folículos, suprimindo o crescimento dos mesmos e inibindo o recrutamento de um novo grupo de folículos, fase de dominância (HODGEN, 1982). A inibição do folículo dominante realiza-se de forma passiva pela redução da concentração do FSH e de forma ativa, reduzindo o número de receptores ao hormônio nos folículos subordinados. Dessa forma, os hormônios estradiol e inibina, produzidos pelas células da granulosa do folículo dominante, reduzem a liberação de FSH a concentrações muito baixas, insuficiente para manter o desenvolvimento dos folículos subordinados. Porém, suficientes para manter o crescimento do folículo dominante (ALVES et al., 2002), devido o mesmo possuir aumento da proteína plasmática associada a prenhez do tipo A (PAPP-A) a qual favorece o aumento das concentrações do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-I) livre no fluido folicular (MAZERBOURG et al., 2001; FORTUNE et al., 2004). Pois, este aumento favorece o desenvolvimento dos receptores para LH nas células da granulosa, favorecendo a esteroidogênese folicular (GLISTER et al., 2001; FORTUNE et al., 2004).

Após a fase de divergência da onda folicular e o estabelecimento da dominância, os níveis de FSH são criticamente importantes ao folículo dominante, pois alguns estudos demonstraram interrupção de seu crescimento em situações de supressão do mesmo (BERGFELT et al., 2000).

Quando na presença de altos níveis de progesterona (P4), que promove a redução da frequência na pulsatilidade do LH, o folículo dominante torna-se anovulatório (GINTHER et al., 1989). A maioria desses folículos vai se degenerar no processo conhecido por atresia folicular, enquanto que apenas uma minoria vai completar sua maturação e ovular (GONÇALVES et al., 2008).

Ainda assim, existem outros fatores importantes que resultam na ovulação, como a regressão do CL, a conseqüente queda do nível de P4 e aumento da pulsatilidade de LH. Se os níveis de P4 caírem, enquanto o folículo

estiver na fase de dominância, acontecerá à ovulação. Caso contrário, há a regressão e a ocorrência de uma nova onda folicular (JUNIOR, 2006).

A ovulação é ruptura da parede folicular, induzida pelo pico pré-ovulatório de LH, que ocorre juntamente a uma onda de FSH (KANEKO et al., 1991; CAVALIERI et al., 1997; MIHM, 2002). Esta mudança favorece a liberação do óxido nítrico que promove a dilatação dos vasos ovarianos (HATTORI & TABATA, 2006) favorecendo a liberação de prostaglandinas (PGFs) e metaloproteinases, as quais serão responsáveis pelo rompimento da parede folicular (BASTOS et al., 2013).

Após o pico de LH e a ovulação, as células foliculares se tornam luteínicas e a presença dos receptores de FSH diminui drasticamente. Variações nas concentrações de FSH são observadas durante as fases, folicular e luteínica, do ciclo estral e em intervalos periódicos regulados pelo 17- β estradiol e inibina (MIZUTA, 2003). Após a ovulação, as células que permanecem no folículo rompido proliferam e formam o CL, cuja função nesse caso, domina o ciclo do dia 4 até o dia 17, aproximadamente (BALL & PETERS, 2006).

2.2 Superovulação

Denomina-se SOV o aumento do número fisiológico de ovulações próprias da espécie, provocada mediante a administração de gonadotropinas. No bovino, considera-se que houve resposta ao tratamento quando se tem mais de duas ovulações (CABODEVILA & TORQUATRI, 2001).

A SOV em bovinos tornou-se uma técnica de grande serventia para o aprimoramento do rebanho brasileiro, uma vez que essa técnica aumenta o número de embriões por coleta, obtendo mais prenhez em menor tempo (OLIVEIRA et al., 2007).

O controle farmacológico do ciclo estral e da ovulação de vacas zebuínas depende primeiramente do seu comportamento fisiológico reprodutivo, o qual está ligado diretamente com o seu estado nutricional e

condição reprodutiva. Nesse mesmo sentido, as interações e funções de hormônios utilizados para esse fim requerem compreensão e análise do seu funcionamento fisiológico (FONSECA et al., 2001).

Tratamentos à base de estrógeno (E2) e P4 em estágios variados do ciclo suprimem a liberação de FSH, e, conseqüentemente, o desenvolvimento folicular (BÓ et al., 1994). Uma nova onda folicular acontece quatro dias após o tratamento (BÓ et al., 2002), quando se deve começar o tratamento superovulatório para obter melhores resultados (NASSER et al., 1993).

Inúmeros tratamentos hormonais para induzir ovulações múltiplas foram propostos. Entre os agentes superovulatórios testados destacam-se a gonadotropina coriônica equina (eCG ou PMSG) administrada isoladamente (BOLAND et al., 1978) ou associada a soro anti-PMSG (GONZALEZ et al., 1994) e o FSH proveniente de extrato de pituitárias de suínos, ovinos e equinos (DONALDSON, 1989) ou ainda, FSH recombinante bovino (WILSON et al., 1993).

Para o sucesso da superovulação é necessário a ausência do folículo dominante, podendo este ser retirado de forma mecânica (BERGFELT et al., 1997) ou farmacológica, sendo o uso de dispositivos intravaginais à base de P4 (CIDR-B[®] ou DIB[®]) e a aplicação concomitante de estrógenos (estradiol 17- β ou benzoato de estradiol) uma das aplicações mais práticas (BÓ et al., 1995). Esta prática promove a atresia folicular e início de uma nova onda folicular entre 4 e 5 dias após o início do tratamento, quando se deve iniciar o tratamento superestimulatório com o FSH (BÓ et al., 2003), podendo também ser iniciado no dia 10 ± 1 do ciclo estral, contando o dia da ovulação como D0 (SCHENK et al., 2006).

Tratamentos com FSH no início do desenvolvimento folicular estimulam muitos folículos a obterem diâmetro de dominância (ADAMS et al., 1994), sendo a base dos protocolos de superovulação com FSH para coleta de embriões (RENESTO, 2004).

Um dos protocolos de sincronização para IATF utiliza duas aplicações de PGF2 α (prostaglandina F2 α – PGF; manhã e tarde) no dia seis do protocolo (D6), com a remoção do implante de P4 24 horas após a primeira dose de

PGF2 α , administrando-se o indutor de ovulação 48 horas após a retirada do implante, com a realização da IA após 24 horas, contando como D0 o dia da implantação do progestágeno (CHIARI et al., 2005).

Caso haja a presença de um folículo dominante no início do tratamento superovulatório, ocorre a supressão do crescimento de folículos menores não dominantes, reduzindo as taxas de ovulação e recuperação de embriões, quando comparado a tratamentos com gonadotropinas iniciados na ausência de um folículo dominante (BARROS & NOGUEIRA, 2004).

Uma explicação para a baixa resposta superovulatória é a assincronia existente entre a maturação citoplasmática e nuclear nos oócitos de vacas sob um tratamento de superovulação (assincronia intrafolicular), bem como de perfis esteroidogênicos anômalos nos folículos dessas doadoras, no período pré-ovulatório, o que prejudicaria o transporte espermático e a maturação oocitária (HYTTEL et al., 1991).

Outra explicação para a variabilidade na resposta superovulatória das doadoras, é o fato de que 20 a 30% destas não respondem ao tratamento, conseqüentemente, não produzem embriões e fazem com que a resposta final seja baixa (MARTINS et al., 2005; BARUSELLI et al., 2006).

Em um estudo realizado por Baruselli et al (2003), foi indicado que é possível reduzir a dose de FSH (Folltropin-V[®]) de 400 para 100mg para gado zebu Nelore em programas de superovulação com IATF, sem comprometimento da resposta superovulatória e qualidade embrionária.

A utilização do FSH como agente indutor de superovulação tem sido extensivamente estudada, conseqüentemente, já foi testado o uso de diferentes concentrações (GONZALEZ et al., 1990; SAUNDERS et al., 1990) e vias de administração (TRIBULO et al., 1993), a eficiência de produtos comerciais das mais variadas marcas e procedências (DONALDSON, 1995) e as variações na relação FSH:LH entre preparados comerciais (DONALDSON, 1990). Nestes trabalhos ficaram caracterizadas as variações de potência do FSH (BRAILEANU et al., 1998) e da relação FSH:LH existente entre diferentes produtos comerciais e dentro de um mesmo produto.

O Folltropin[®] é um produto amplamente utilizado no Brasil para o tratamento superovulatório. Este produto é composto de FSH purificado (84% FSH:16%LH), extraído de pituitárias (hipófises) de suínos abatidos para alimentação humana (BOLETIM TÉCNICO TECNOPEC). Sua principal atividade é estimular o crescimento folicular nos ovários agindo em receptores específicos.

No entanto, há fatores que influenciam a superovulação, dentre eles, a administração do hormônio, a dose, o estado nutricional do animal, o histórico reprodutivo, a idade, a estação do ano, o efeito de repetidas superovulações e a raça. Pesquisas mais recentes na área da fisiologia e endocrinologia da reprodução, envolvendo vários aspectos da dinâmica folicular em bovinos, mostraram que o estágio de desenvolvimento folicular no início do tratamento hormonal é um dos principais fatores responsáveis pela variação na resposta superovulatória (REICHENBACH et al, 2008).

2.3 Uso do sêmen sexado na IATF

A indução do estro e a sincronização da ovulação para o uso da IATF são alternativas descritas para a busca de aumento da produtividade em sistemas de produção de bovinos de corte (MADUREIRA & PIMENTEL, 2005).

Como vantagens da IATF têm-se a utilização de sêmen de touros com superioridade genética comprovada (PEGORER et al., 2011); a concentração de animais em estro em curto espaço de tempo; a redução do período de parição; a padronização do nascimento de bezerros; o aumento do peso à desmama e o aumento da probabilidade de reconcepção na estação subsequente (SÁ FILHO et al., 2009).

A determinação do sexo na pré-concepção é o método de melhor custo-benefício para alcançar o resultado desejado. Para tanto, é utilizada a separação dos cromossomos X e Y presentes nas células espermáticas para melhores resultados nas técnicas de IATF, fertilização *in vitro* (FIV) e TE (JOHNSON, 2000).

Para otimizar o uso do sêmen sexado, um produto vulnerável e de alto custo, têm-se interesse na combinação deste com programas de ovulações múltiplas e TE (SCHENK et al., 2006).

A sexagem espermática é possível devido às diferenças no conteúdo do DNA das células espermáticas, o espermatozoide X tem cerca de 4% mais material genético que o espermatozoide Y. A separação é feita com o uso do citômetro de fluxo, sendo que a forma e a área da cabeça dos espermatozoides bovinos facilitam a sua separação. Nos últimos 10 anos ocorreram mudanças que proporcionaram melhorias no processo de separação dos gametas X e Y (GARNER, 2006).

Espermatozoides danificados ou mortos são primeiramente identificados pela entrada do corante impermeável à membrana, iodeto de propídio (IP) (JOHNSON et al., 1994). Assim, gametas danificados são identificados e descartados juntamente com as células que não apresentam resposta apropriada (GARNER, 2006).

Deve-se levar em consideração a susceptibilidade dos gametas aos riscos existentes no processo de sexagem, tais como: coloração, exposição a lasers, alta diluição, pressão elevada e às diversas mudanças de composição dos meios utilizados (MAXWELL et al., 1998). Por ser um procedimento altamente invasivo, sabe-se que tem efeitos deletérios na viabilidade e qualidade espermática (JOHNSON et al., 1989), podendo comprometer as taxas de concepção (SCHENK et al., 1999; SEIDEL Jr. et al., 1999).

A sobrevivência dos gametas sexados é de extrema importância, devido ao seu alto custo de produção. Portanto, quando grandes quantidades desse gameta mantêm seu potencial fértil após a sexagem e armazenamento, menos espermatozoides precisam ser sexados para cada dose, sendo então a criopreservação e o armazenamento pontos cruciais para o sucesso do sêmen sexado (GARNER, 2006).

Apesar do processo de sexagem eliminar células espermáticas mortas ou danificadas de bovinos, as células sobreviventes tendem a degenerar mais rápido do que células que não passaram por esse processo (RATH et al., 2003).

A inseminação com sêmen sexado, quando comparada à de sêmen convencional, pode não ser compatível com o mesmo intervalo entre inseminação e estro (SALES et al., 2011) por diversos fatores, tais como: tempo de vida potencialmente reduzido no trato genital da fêmea (DeJARNETTE et al., 2008), menor número de espermatozoides por palheta (MAXWELL et al., 2004) e a possível pré-capacitação induzida pelo processo de sexagem (LU & SEIDEL Jr, 2004).

Diversos estudos encontraram taxas de fertilidade razoáveis, utilizando sêmen bovino sexado com o corante Hoechst 33342 (MORRELL & DRESSER, 1989; SEIDEL Jr. et al., 1999; SEIDEL Jr. & GARNER, 2002), não demonstrando variação para duração da gestação, peso ao nascimento, distocias, peso à desmama, taxa de aborto e taxa de mortalidade – neonatal e até o desmame (TUBMAN et al., 2004). Indicadores de danos aos espermatozoides sexados podem ser vistos em menores taxas de concepção (SEIDEL Jr. et al., 1999; SEIDEL Jr. & SCHENK, 2002).

Acredita-se que a inseminação com a maior concentração de sêmen sexado em novilhas superovuladas, na forma de múltiplas inseminações, poderia prevenir, provavelmente, a perda retrógrada e permitir maior reserva espermática no local da fecundação. Resultando em uma maior taxa de fecundação e recuperação de embriões transferíveis, taxas comparáveis às de inseminações controle com sêmen congelado tradicional (SCHENK et al., 2006).

Neste mesmo estudo foi relatado que a dose de sêmen sexado utilizado não afetou o número de embriões transferíveis recuperados, tanto com múltiplas inseminações ou com inseminação única; embora a taxa de recuperação tenha sido diferente entre experimentos, sendo a menor taxa nos grupos de sêmen sexado. Uma possível explicação da adequada reserva espermática, em inseminações de baixa dose, foram as múltiplas inseminações, acarretando taxas de fecundação próxima ao grupo de dose convencional.

No estudo de Sartori et al (2004) não foi encontrado diferença estatística, entre os grupos de inseminação única (20×10^6 spz/mL) ou

inseminações múltiplas (duas doses de 10×10^6 spz/mL) de sêmen sexado, para as seguintes variáveis: estruturas fecundadas/lavado, embriões viáveis/lavado e percentual de embriões degenerados/lavado. Entretanto, todas essas variáveis estudadas apresentaram diferença significativa ao serem comparadas ao grupo de inseminação dupla (12 e 24h) de sêmen convencional, sendo este com os melhores resultados.

Larson et al (2010) relataram maior taxa de embriões transferíveis utilizando-se sêmen congelado convencional, também observado por Schenck et al (2006). Estes também relataram maior taxa de fecundação dos oócitos, sem diferença entre as duas doses de sêmen sexado ou sexado X e Y.

Segundo Hayakawa et al (2009) não houve diferença no número de oócitos e embriões recuperados, número e taxa de embriões transferíveis, embriões degenerados, oócitos não fecundados e embriões grau 1 entre os grupos de sêmen congelado tradicional e sexado. Contudo, o número de embriões transferíveis foi menor e o percentual de oócitos não fecundados foi maior no grupo de sêmen sexado, também observado no estudo de Larson et al (2010), em que não houve diferença na porcentagem de embriões degenerados entre grupos de sêmen sexado e congelado convencional. Estes pesquisadores também encontraram uma maior quantidade de oócitos não fecundados no grupo de sêmen sexado.

Em um estudo que comparou a quantidade e a qualidade dos embriões de vacas da raça Angus (*Bos taurus*) recuperados entre repetições, com intervalo de 30 dias, foi visto que não houve diferença entre períodos, embora ambos tenham mostrado maior tendência na quantidade e melhor qualidade na primeira repetição (LARSON et al., 2010).

Baseados no exame ultrassonográfico realizado no dia da coleta embrionária, relatou-se que a taxa de recuperação foi de 74%, sendo similar entre os grupos. Contudo, o grupo de sêmen congelado convencional obteve maior número de embriões grau 1 e não houve diferença no número de embriões degenerados, grau 2 ou 3 entre os grupos (LARSON et al., 2010).

2.4 Local da deposição do sêmen

Atualmente a IA em bovinos é realizada no corpo uterino, com o auxílio de um equipamento de aço inoxidável, feito por Cassou (NOAKES et al., 2001). É um tubo rígido, o que facilita a passagem pela cérvix, e usualmente é coberto por uma bainha plástica para minimizar a transmissão de agentes infecciosos. Com este dispositivo, a deposição do sêmen é feita no corpo uterino da vaca, e torna possível o alcance de uma taxa de concepção aceitável, utilizando uma dose de sêmen congelado de concentração relativamente baixa, 10-15 milhões (DEN DAAS et al., 1998).

Estudos indicam que a reduzida taxa de concepção de inseminações com baixa concentração pode ser evitada pela deposição do sêmen mais próximo ao local de fecundação (DALTON et al., 1999; HUNTER, 2001), ou seja, com a deposição do sêmen mais próxima ao oviduto, como acontece com sêmen sexado ou espermatozoides cujo DNA tenham sido modificados por tratamentos específicos (GANDOLFI, 2000).

A deposição do sêmen próximo à junção útero-tubárica resulta em uma menor perda de espermatozoides, devido a diversos fatores, tais como: fluxo retrógrado no muco cervical (LARSSON & LARSSON, 1985; MITCHELL et al., 1985; NELSON et al., 1987), fagocitose ocorrida no útero durante a migração espermática (HAWK, 1983) e maior tempo de sobrevivência do espermatozoide no ambiente favorável ao espermatozoide, como o istmo (SUAREZ, 2001).

Várias pesquisas, com grau de sucesso variado, têm sido realizadas na tentativa de melhorar as taxas de concepção em vacas, por meio da inseminação mais próxima ao local da fecundação (VERBERCKMOES et al., 2004). Na maioria dos casos, não houve diferença entre a inseminação profunda (nos cornos uterinos) e no corpo uterino (McKENNA et al., 1990). Um estudo realizado por Marshall et al (1989) resultou em piores taxas de concepção após a inseminação profunda, contrariando outras pesquisas (SENGER et al., 1988; DALTON et al., 1999).

Explicações para os resultados variados podem ser encontrados nas diferentes doses inseminantes usadas, o uso de inseminação uni ou bilateral,

habilidade e experiência dos inseminadores, diferenças entre nulíparas e pluríparas e cio natural ou após a indução do estro. A grande variação nos experimentos define que a inseminação profunda não tem resultados constantes e é de difícil comparação (VERBERCKMOES et al., 2004).

Segundo Dobrowolski et al (1970), menos de 1% dos espermatozoides inseminados estão disponíveis no local de fecundação 24 horas após a inseminação. Estes mesmos autores dizem que 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 fecundados. Por outro lado, se a inseminação for realizada tardiamente, os oócitos poderão retomar a meiose e estarem envelhecidos ao contato com os espermatozoides, resultando em alto índice de embriões degenerados. Em ambos os casos, deve ser dada a devida importância ao momento da inseminação e ao local de deposição do sêmen.

Em inseminações realizadas na cérvix, houve grande perda de espermatozoides, em decorrência do fluxo retrógrado, em comparação às inseminações realizadas no meio do corno uterino (GALLAHGER & SENGER, 1989). Porém, quando estes mesmos autores compararam a quantidade de esperma encontrado na vagina (devido ao fluxo retrógrado) de inseminações realizadas no corpo e nos cornos uterinos, não houve diferença significativa.

Em vacas, quando o sêmen é depositado em um dos cornos uterinos, ocorre o transporte intercornual. Isto é, há distribuição para que ambos os cornos tenham quantidade significativa de espermatozoides. Isto não compromete a fertilidade, entretanto há um melhor resultado quando a deposição do sêmen é feita nos dois cornos uterinos (SENGER, 2005).

Seidel et al (1998), usando baixas doses de sêmen sexado resfriado e inseminação no corno uterino, acharam uma taxa de concepção similar à alta concentração espermática de sêmen sexado resfriado ou congelado convencional, ambos depositados no corpo uterino. Em estudos posteriores, a taxa de concepção em novilhas inseminadas no corno uterino, com baixa concentração de sêmen sexado congelado, foi similar às obtidas com sêmen congelado e local de deposição convencional (SEIDEL et al., 1999).

No estudo realizado por Kurykin et al (2007) foi relatado que não houve diferença estatística na taxa de concepção entre inseminações realizadas no corpo uterino, meio do corno uterino e na junção útero-tubárica; embora tenha mostrado um maior percentual na taxa de concepção quando a inseminação foi realizada no meio do corno uterino. Inseminações de baixa dose (2×10^6) de sêmen congelado convencional, realizadas no corno uterino e na junção útero-tubárica não demonstraram diferença significativa, comparadas com inseminações convencionais com a mesma dose (VERBERCKMOES et al., 2004).

Sugere-se que não houve diferença, pois o problema não se encontrava na quantidade de espermatozoides no local de fecundação, e que, talvez, com uma redução ainda maior da concentração de espermatozoides, o local de deposição espermática pode vir a ser um fator importante, com tendência a melhores taxas de concepção se a inseminação for feita na junção útero-tubárica, quando comparada às inseminações no meio do corno uterino. Possivelmente pelo menor tempo de exposição do espermatozoide a ambientes hostis (KURYKIN et al., 2007).

2.5 Coleta e classificação de embriões

Historicamente, os embriões eram coletados de ovidutos ou úteros de doadoras após o abate ou cirurgia. Contudo, desde 1976 a recuperação transcervical de embriões de vacas, búfalas e éguas tornou-se rotina. A coleta é, preferencialmente, realizada entre o sexto e o oitavo dia pós-ovulação. Para muitas aplicações, as técnicas não cirúrgicas de coleta de embriões são desejáveis, pois apresentam menor risco de vida e de problemas de saúde. Técnicas cirúrgicas, invariavelmente, levam à formação de aderências (JAINUDEEN et al., 2004).

O método de coleta mais utilizado para bovinos é o transcervical. O catéter de Foley, com o mandril no seu interior, é guiado através da cérvix por manipulação retal, sendo o mesmo posicionado no corpo uterino ou em um dos

cornos. Após o posicionamento da sonda, o balão é inflado, injetando-se 10 a 20mL de ar, quantidade suficiente para fechar a abertura cervical e fixar a sonda. Por conseguinte, o mandril é retirado e inicia-se a coleta dos embriões através da lavagem uterina (GAMBARINI, 2004).

Após o lavado, o líquido retirado do útero é armazenado no filtro coletor e transferido para uma placa de Petri. Realiza-se então o rastreamento dos embriões sob estereomicroscópio, com aumento máximo de 50x. Os embriões encontrados são transferidos para uma placa de Petri com diâmetro de 3,5 cm contendo meio de manutenção de embriões e, posteriormente, separados em viáveis e não viáveis (GAMBARINI, 2004).

De acordo com BEM et al (1995), as estruturas viáveis são: mórula (Mo), mórula compacta (Mc), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (BL), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto eclodido (Be). Essa classificação depende do grau de desenvolvimento que o embrião apresentar no dia da coleta.

Na avaliação individual dos embriões várias características são observadas, tais como: tamanho, forma, cor, homogeneidade do citoplasma, forma e integridade da membrana pelúcida, tamanho e presença de células no espaço perivitelíneo e presença de vesículas (ROBERTSON & NELSON, 1999).

Há relatos que novilhas produzem menor quantidade de embriões transferíveis do que vacas, embora não tenha sido comprovado estatisticamente (SCHENCK et al., 2006). Este mesmo estudo relatou que vacas possuem maior percentual de estruturas recuperadas; embora novilhas possuam maior taxa de estruturas fecundadas.

3 HIPÓTESE

O local de deposição do sêmen sexado, mais próximo ao local da fecundação, influencia na quantidade e qualidade dos embriões recuperados após o lavado uterino de vacas Nelore superovuladas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

- Avaliar a influência do local de deposição do sêmen sexado na produção *in vivo* dos embriões produzidos em vacas da raça Nelore superovuladas.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o protocolo de superovulação de vacas da raça Nelore por meio do acompanhamento da dinâmica folicular ovariana;
- Avaliar as taxas de ovulação e de recuperação das estruturas embrionárias;
- Quantificar e classificar as estruturas recuperadas após os lavados uterinos;
- Determinar o local mais adequado para a deposição do sêmen sexado no protocolo de IATF e SOV de vacas da raça Nelore

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Local e Animais

Os animais pertenciam à Fazenda Asa Branca – Agropecuária A Renovar, localizada no município de Miranda do Norte, na microrregião de Itapecuru-Mirim/Maranhão, latitude 03° 34' 08" S e longitude 44° 35' 02" O, sendo gerenciada em sistema extensivo; onde os animais têm livre acesso à água e suplementação mineral *ad libitum* em cocho coberto.

Foram utilizadas doze (n = 12) fêmeas bovinas multíparas da raça Nelore (*Bos indicus*) com idade entre 3 e 5 anos. Os animais apresentavam escore corporal $\pm 3,5$, variando entre 2,5 e 4,0; na escala proposta por FERREIRA & TORRES (1993). O lote de animais foi avaliado sete dias antes do início do tratamento, para detecção de CL e seleção de animais cíclicos.

Os procedimentos com os animais foram aprovados pela comissão de ética e experimentação animal da Universidade Estadual do Maranhão (Processo 28/2010).

5.2 Análise estatística e delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais, de acordo com o local da inseminação (corpo – CG vs terço médio do corno uterino – GCC). Para tanto, os animais foram divididos em blocos, de acordo com o número de folículos presentes no D7, para evitar que as fêmeas com folículos maiores ou em maior quantidade ficassem agrupadas.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, em esquema de blocos 2x12, para que todos os animais passassem por todos os tratamentos (*cross over*), totalizando duas repetições com intervalo de 60 dias.

O trabalho foi desenvolvido de forma descritiva, calculando-se a média e o desvio padrão ($X \pm S.D.$) de cada resposta.

5.3 Protocolos para SOV e IATF

As fêmeas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (1,9 g P4; CIDR[®], Pfizer, USA) + 2 mg de benzoato de estradiol por via intramuscular (I.M.) (BE, Estrogin[®], Farmavet, Brasil) no dia 0 (07:00h). A superestimulação foi induzida com FSH-p (133mg de Folltropin-V[®] I.M., Bioniche, Canadá) em 8 doses decrescentes a cada 12 horas, a partir do D4. No D6, foram administradas duas doses (07:00 e 19:00h, I.M.) de 25 mg de PGF2 α (I.M.,

dinoprost trometamina, Lutalyse[®], Pfizer, USA). Os dispositivos de P4 foram retirados 36 horas após a primeira dose de PGF2 α e foram administrados 0,25 mg de Gonadorelina (Fertagyl[®] I.M., Intervet Shcering-Plough, USA) 48 horas após a primeira dose de PGF2 α (Figura 1).

As fêmeas foram inseminadas em tempo fixo 18 e 30 horas após a indução da ovulação. As inseminações foram realizadas sempre pelo mesmo inseminador.

Os animais foram inseminados duas vezes, ambas com duas palhetas de $2,1 \times 10^6$ spz/mL, sendo o sêmen depositado de acordo com seu respectivo grupo. Entretanto, no grupo corno depositou-se uma palheta no corno direito enquanto a outra foi depositada no corno esquerdo.

Todas as partidas de sêmen foram obtidas de uma central de IA idônea, de um mesmo touro Nelore e provenientes do mesmo ejaculado, para minimizar o efeito touro nos resultados. As palhetas foram avaliadas previamente às inseminações, após a montagem do dispositivo de inseminação, para verificação da motilidade, objetivando-se ter no mínimo 30%.

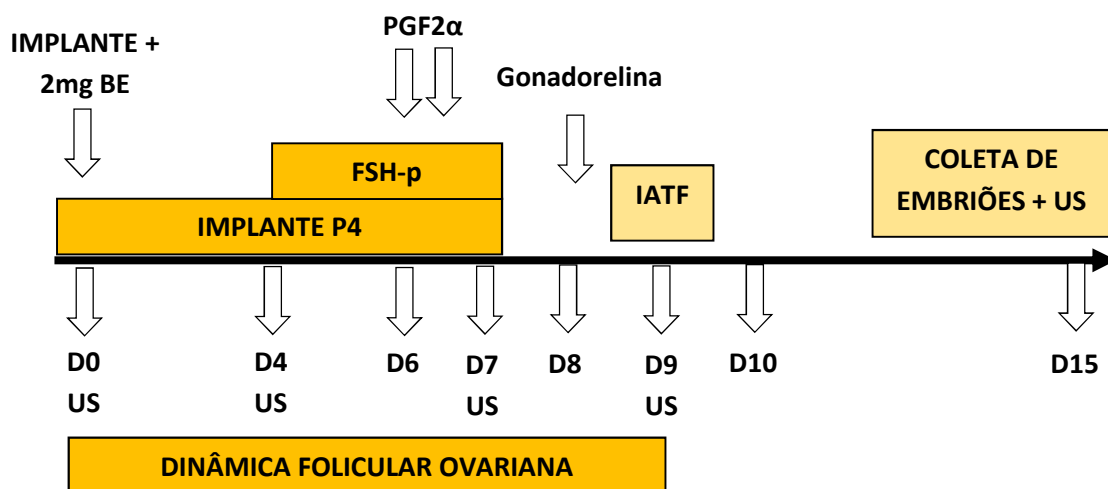


Figura 1 – Esquematização do tratamento superovulatório, IATF e exames ultrassonográficos.

5.4 Avaliações ultrassonográficas

Foram realizados exames ultrassonográficos (CHISON D600VET, USProducts Eletromedicina, Brasil) utilizando transdutor linear transretal de 7,0 MHz; no D0, início do tratamento superovulatório, para quantificar os folículos, e do D4 ao D9, a cada 48 horas para acompanhamento do crescimento folicular e determinação de folículos pré ovulatórios no D9. Para determinar a taxa de ovulação foi realizado exame ultrassonográfico no momento da coleta embrionária, D15, quando foram quantificados os corpos lúteos (CLs). As imagens foram armazenadas e posteriormente transferidas para o computador para análise e mensuração, utilizando o software IMAGEJ[®] (National Institute of Mental Health, USA).

5.5 Avaliação das taxas de ovulação e de recuperação das estruturas embrionárias

A taxa de ovulação foi obtida pelo número de CLs verificados, ultrassonograficamente, no D15 dividido pelo número de folículos potencialmente ovulatórios ($\geq 8\text{mm}$) detectados ultrassonograficamente no D9, e o valor obtido foi multiplicado por 100.

A taxa de recuperação de estruturas embrionárias foi obtida pelo número de estruturas recuperadas no D15, dividido pelo número de CLs visualizados no exame ultrassonográfico no mesmo dia, e o valor obtido foi multiplicado por 100.

5.6 Coleta e avaliação das estruturas embrionárias

A recuperação das estruturas embrionárias foi realizada sete dias após a aplicação de Gonadorelina, pelo método não cirúrgico de lavagem uterina. Para a coleta das estruturas, utilizou-se uma sonda Foley (Rusch[®] 18, Carolina do

Norte, USA) por meio de “flushing” uterino utilizando como veículo o meio DPBS-Flush[®] (Nutricell, Campinas, Brasil).

O líquido recuperado passou por um filtro de coleta de embriões com malha de 80 μ (Millipore[®], Bedford, MA, USA), sendo transferido para placas de cultivo celular 100 x 20 mm contendo meio de manutenção de embriões Holding[®] (Nutricell, Campinas, Brasil).

As estruturas recuperadas foram quantificadas e avaliadas com auxílio de um estereomicroscópio de aumento final de 50x e, posteriormente, classificadas em viáveis e não viáveis de acordo com os padrões de morfologia estrutural da sociedade Internacional de Transferência de Embriões – IETS (STRINGFELLOW & SEIDEL, 1998).

Os embriões recuperados foram descartados após as análises por falta de interesse da parte do proprietário da fazenda em inovular os mesmos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a separação dos grupos foram quantificados 149 folículos totais, apresentando média e desvio padrão de $12,41 \pm 2,06$, em ambos os ovários, ficando $12,00 \pm 2,09$ folículos para o grupo corpo e $12,83 \pm 2,13$ folículos para o grupo corno. Estes folículos apresentaram diâmetro médio e desvio padrão de $8,66 \pm 2,84$ e $8,16 \pm 2,56$ para os grupos corpo e corno, respectivamente. Estes dados referem-se ao último dia do tratamento superovulatório (D7) da primeira repetição.

Resultados similares foram obtidos por Teixeira et al (2013), em estudo com vacas Curraleiro pé-duro, com dose e método de administração equivalentes, onde encontraram médias de total de folículos parecidas entre os grupos estudados; $12,6 \pm 6,2$; $14,2 \pm 7,4$ e $15,8 \pm 7,6$ para os grupos controle, P24 (dispositivo de progesterona retirado 24h após a primeira aplicação de PFG2 α) e P36 (dispositivo de progesterona retirado 36h após a primeira aplicação de PFG2 α), respectivamente. Porém, os dados do presente estudo

foram inferiores quando comparados ao estudo de Nasser (2006), com média de $23,0 \pm 3,7$, realizados em animais Nelore (*Bos indicus*).

Obteve-se média e desvio padrão de $5,2 \pm 2,38$ folículos, no início do tratamento superovulatório (D4), para os animais pertencentes ao grupo corpo. Após o final do tratamento superovulatório, no dia da IATF (D9), a média e desvio padrão foi de $12,00 \pm 2,95$ folículos, de diâmetro médio de $8,64 \pm 2,46$ mm, variando entre 3,27 e 14,54mm.

Para os animais pertencentes ao grupo corno, obteve-se média e desvio padrão de $5,5 \pm 1,87$ folículos no início do tratamento superovulatório (D4). Após o final do tratamento superovulatório, no dia da IATF (D9), a média e desvio padrão foi de $12,25 \pm 4,37$ folículos, de diâmetro médio de $8,73 \pm 2,42$ mm, variando entre 3,60 e 14,00mm (tabela 1).

TABELA 1 – Média e desvio padrão ($X \pm S.D.$) da quantidade (n) e diâmetro folicular (mm) da dinâmica folicular ovariana de vacas Nelore superovuladas, São Luís, 2014.

Dia	Variável	Tratamento	
		Corpo ($X \pm S.D.$)	Corno ($X \pm S.D.$)
D7	n	$11,41 \pm 2,35$	$10,41 \pm 3,14$
	Diâmetro	$7,69 \pm 2,74$	$7,95 \pm 2,45$
D9	n	$12,00 \pm 2,95$	$12,25 \pm 4,37$
	Diâmetro	$8,69 \pm 2,46$	$8,73 \pm 2,42$
	Pré – ovulatórios (n)	$10,21 \pm 1,69$	$10,22 \pm 1,55$
	Diâmetro	$10,21 \pm 1,69$	$10,22 \pm 1,55$

Estes resultados são inferiores quando comparados com a literatura. Carvalho (2004) encontrou média de pequenos folículos na emergência folicular de $39,7 \pm 4,9$ e $26,5 \pm 3,1$ quando trabalhou com novilhas Nelore e Gir, respectivamente. Estes também foram menores dos encontrados em vacas mestiças, Hereford e Angus, onde encontraram $14,6 \pm 2,2$ pequenos folículos no dia da emergência (BÓ et al., 1996) ou vacas Holandesas, que apresentaram $13,8 \pm 0,8$ e $12,4 \pm 1,5$, respectivamente, para os grupos

P36LH48 e P36LH60; onde P36 refere-se à permanência do dispositivo de progesterona e LH48 ou LH60 referem-se ao momento da aplicação do LH em relação à aplicação de PGF (MARTINS, 2007), possivelmente pela diferença genética e/ou categoria dos animais estudados.

A baixa resposta superovulatória pode ser explicada pela assincronia existente entre a maturação citoplasmática e nuclear nos oócitos de vacas sob tratamento de superovulação (assincronia intrafolicular), bem como pelos perfis esteroideogênicos anômalos nos folículos de doadoras, o que prejudica a maturação oocitária (HYTTEL et al., 1991). No entanto, deve-se ressaltar que no presente estudo essas variáveis não foram estudadas.

Demonstrou-se que os folículos continuaram com seu crescimento após o tratamento superestimulatório, como é visto nos dados referentes ao diâmetro folicular médio dos grupos, nos dias D7 e D9, apresentados na tabela 1, valores de diâmetro próximos aos encontrados por Thomazi et al (2009) quando estudaram vacas Nelore. Porém, estes mesmos autores observaram menos folículos no dia da IATF, sugerindo que os animais estudados estariam aptos a ovularem após a última aplicação hormonal. Estas diferenças indicam que as ovulações teriam começado anteriormente no estudo de Thomazi et al (2009), possivelmente por não ser um estudo sobre superovulação, o contrário do presente estudo.

As vacas foram inseminadas com 18 e 30h após a aplicação do indutor, pois somente quatro animais apresentaram cio 12 horas após a indução da ovulação. De acordo com Soares et al (2011), inseminações realizadas com 18 e 30h tiveram melhores resultados numéricos e percentuais de estruturas recuperadas do que o grupo inseminado com 12 e 24h após a aplicação de LH. Estes podem ser explicados pela inseminação mais próxima ao período da ovulação.

No dia da IATF (D9) 66,7% (8/12) dos animais apresentaram CLs, sendo 33,3% (4/12) em cada grupo, observando um total de 7 CLs para o grupo corpo e 6 no grupo corno. Estima-se que essas observações influenciaram o processo superovulatório, conseqüentemente, influenciando nas taxas de ovulação e recuperação embrionária. Nota-se que esses dados apareceram

durante a segunda repetição, o que pode ter influenciado na menor taxa de recuperação observada.

No dia do lavado uterino (D15), o grupo corpo apresentou 19 ($2,11 \pm 1,61$) folículos anovulatórios, enquanto que no grupo corno foram 46 ($4,6 \pm 3,13$). O estudo de Teixeira et al (2013) demonstraram médias parecidas, obtendo $3,7 \pm 2,8$; $2,8 \pm 2,1$ e $3,9 \pm 3,1$ para os grupos controle, P24 (dispositivo de progesterona retirado 24h após a primeira aplicação de PFG2 α) e P36 (dispositivo de progesterona retirado 36h após a primeira aplicação de PFG2 α), respectivamente. Estes resultados podem ser explicados pelo alto nível de P4 circulante, proveniente dos CLs encontrados no dia da IATF. Ginther et al (1989) relataram que folículos dominantes tornam-se anovulatórios quando em presença de altos níveis de P4, por reduzir a frequência na pulsatilidade do LH.

No grupo corpo, um animal (8,33%) não apresentou resposta ao indutor de ovulação, enquanto no grupo corno isso aconteceu em três animais (25%). Estes animais não apresentaram CLs em seus ovários e, conseqüentemente, não tiveram estruturas recuperadas. Estes dados são corroborados por estudos anteriores, que estimam que 30% dos animais tratados não demonstram resposta superovulatória (BOLAND et al., 1991; BARUSELLI et al., 2006; MONTEIRO JR et al., 2011).

Observou-se 65,11% (56/86) de ovulações para o grupo corpo, com média e desvio padrão de $4,66 \pm 4,71$ para o grupo e 5,09 CLs/doadora; enquanto o grupo corno apresentou 44,68% (42/94), com média e desvio padrão de $3,5 \pm 2,71$ para o grupo e 4,66 CLs/doadora. Em comparação com o estudo de Teixeira et al (2013) que encontraram $11,3 \pm 5,8$; $12,3 \pm 5,6$ e $11,9 \pm 5,4$ CLs para os grupos controle, P24 (dispositivo de progesterona retirado 24h após a primeira aplicação de PFG2 α) e P36 (dispositivo de progesterona retirado 36h após a primeira aplicação de PFG2 α), respectivamente, o presente estudo apresentou menores quantidades de CLs no D15. Estes achados podem ser explicados pelas diferenças do protocolo, onde os autores citados realizaram uma pré sincronização do ciclo estral, diferentemente do presente estudo. Os resultados também foram menores dos que os obtidos nos estudos

de Carvalho (2004) e Bó et al (1996) que encontraram $22,4 \pm 0,5$ e $16,6 \pm 3,4$ em animais Nelore e mestiços de Angus e Hereford, respectivamente. Resultados também menores dos que foram encontrados em vacas Pardo Suíço (*Bos taurus*) onde Monteiro Jr et al (2011) encontraram médias de CLs de $9,88 \pm 3,31$, $9,22 \pm 3,31$ e $10,00 \pm 4,53$ para os grupos de inseminação com: sêmen convencional 12 e 24h, sêmen sexado 12 e 24h e sêmen sexado 24 e 36h, quando utilizaram o protocolo onde o dispositivo de progesterona é retirado 36h após a primeira aplicação de cloprostenol, e 25mg de LH (Lutropin[®]), 24h após a remoção do dispositivo de P4, para indução da ovulação.

Os resultados referentes à recuperação embrionária estão apresentados na tabela 2.

TABELA 2 – Total e média e desvio padrão de corpos lúteos (CLs) e recuperação embrionária no D15 em vacas Nelore superovuladas, São Luís, 2014.

Variável	Tratamento	
	Corpo	Corno
CLs	56	42
CLs/doadora	$4,66 \pm 4,71$	$3,5 \pm 2,71$
Folículos anovulatórios	$2,11 \pm 1,61$	$4,6 \pm 3,13$
Recuperação embrionária	23	15
Estruturas recuperadas/doadora	$2,09 \pm 2,73$	$1,87 \pm 1,55$
Zona Pelúcida (%)	2 (8,69)	–
Mórula (%)	9 (39,13)	8 (53,33)
Blastocisto inicial (%)	4 (17,39)	1 (6,66)
Oócito não fecundado (%)	2 (8,69)	–
Degenerado (%)	6 (26,08)	6 (40,00)

O grupo corpo apresentou taxa de recuperação de 41,07% (23/56) e o grupo corno apresentou taxa de 35,71% (15/42). Estes dados são inferiores

aos encontrados no estudo de Teixeira et al (2013), que relataram $48,8 \pm 26,6\%$; $60,9 \pm 30,5\%$ e $58,2 \pm 26,7\%$ de taxa de recuperação embrionária para os grupos controle, P24 (dispositivo de progesterona retirado 24h após a primeira aplicação de PFG2 α) e P36 (dispositivo de progesterona retirado 36h após a primeira aplicação de PFG2 α), respectivamente. Estas diferenças podem ser explicadas pelo uso do sêmen congelado convencional e pelo uso da pré sincronização do ciclo estral por estes autores. Entretanto, Larson et al (2010) encontraram taxa média de 74% e similares entre os grupos, não havendo diferença no uso de sêmen sexado ou convencional. Em um estudo que comparou doses inseminantes e local de deposição do sêmen, Andersson et al (2004) não encontraram diferença na taxa de concepção entre os locais de deposição quando utilizaram a concentração de 2×10^6 /palheta de sêmen convencional, alcançando 31,1% e 31,7% com inseminações no corpo e corno, respectivamente.

Entretanto, 33,33% (4/12) dos animais do grupo corpo não tiveram estruturas recuperadas em seus respectivos lavados, sendo que um dos animais apresentava secreção uterina mucopurulenta no D15. Já no grupo corno 16,67% (2/12) não tiveram estruturas recuperadas, sendo que um desses animais não foi coletado, por não ter conseguido transpassar a cérvix para colocação da sonda uterina.

A inseminação realizada no corpo uterino produziu um total de 23 estruturas recuperadas ($2,09 \pm 2,73$ /doadora), enquanto a IA no corno uterino gerou 15 recuperações ($1,87 \pm 1,55$ /doadora). Este resultado obtém suporte de estudo anterior, o qual não encontrou diferença entre inseminações próximas à junção útero-tubárica, no meio do corno uterino ou no corpo uterino, no percentual de prenhez (KURYKIN et al., 2007). Porém, são resultados inferiores aos encontrados por Monteiro Jr et al (2011) em estudo feito em vacas Pardo Suíço superovuladas e inseminadas com sêmen convencional e sexado, que encontraram média total de $9,59 \pm 6,89$ estruturas por doadora. Essa diferença pode ser explicada pelos diferentes grupos experimentais (G1 – sêmen convencional, G2 – sêmen sexado 12 e 24h após administração de LH e G3 – sêmen sexado 24 e 36h após administração de LH) os quais não

apresentaram diferença estatística nas estruturas recuperadas, mas sim na maior porcentagem de estruturas fecundadas do G1; e pelas diferenças genéticas entre animais *Bos indicus* e *Bos taurus*, mesmo com estudos que apontam maiores quantidades de pequenos folículos, no dia da emergência folicular, em diversas raças de animais *Bos indicus* (30 a 60), quando comparados à *Bos taurus* (15 a 33) (SARTORI et al., 2010), os quais teriam mais chance de se tornarem embriões em programas de SOV. Em um estudo com vacas Nelores e Holandesas, sob condições tropicais, foi relatado melhores resultados no número total de estruturas recuperadas com animais *Bos taurus*, $9,0 \pm 3,8$ e $12,4 \pm 3,8$, respectivamente (SOARES et al., 2011).

Foi observada uma diminuição da taxa de recuperação entre repetições, obtendo-se 44,26% (27/61) na primeira repetição enquanto que a segunda repetição obteve 29,72% (11/37). Estes resultados corroboram com o estudo de Larson et al (2010), que encontraram tendência para mais e melhores embriões na primeira repetição. Isso é explicado por Galli et al (2003) que relataram que repetidos tratamentos superovulatórios afetam a fertilidade em vacas e novilhas, podendo causar síndromes císticas e dificuldades em prenhez futuras.

No presente estudo foram relatados resultados parecidos com pesquisas anteriores, que demonstram que 20 a 30% das doadoras não respondem ao tratamento, portanto não produzem embriões (BARUSELLI et al., 2006; MONTEIRO JR et al., 2011), havendo grande variação na produção embrionária por doadora (BARUSELLI et al., 2003; LARSON et al., 2010), onde um terço dos animais não respondem ao tratamento superestimulatório, outro terço produzem em média de um a três embriões e somente um terço tem boa resposta superovulatória, produzindo alto número de embriões (BOLAND et al., 1991).

As melhores candidatas para o processo de superovulação e uso de sêmen sexado são as fêmeas que tem em seu histórico produção de grandes quantidades de embriões (LARSON et al., 2010). Assim, no presente estudo, na tentativa de excluir animais que não respondem ao tratamento, 15 animais foram superovulados, utilizando-se para o experimento os 12 que obtiveram

melhores resultados. Porém, essa escolha não foi possível na segunda repetição, pois, necessariamente, utilizaram-se os mesmos animais da primeira repetição para que os mesmos pudessem passar pelo tratamento subsequente, fechando o delineamento *cross over*.

A baixa quantidade de estruturas recuperadas não pode ser explicada pela baixa concentração do sêmen sexado ($2,1 \times 10^6$), pois foram feitas duas inseminações (18 e 30h após o indutor de ovulação), com duas doses inseminantes.

Inseminações múltiplas podem manter o número mínimo de espermatozoides para concepção, como comprovou o estudo de Sartori et al (2004), que observou que as novilhas inseminadas uma única vez tinham menos espermatozoides acessórios ligados à zona pelúcida. Duas inseminações mantêm a quantidade adequada para fecundar o oócito dentro do trato reprodutivo feminino, na mesma proporção que uma inseminação única de 20×10^6 de sêmen sexado (SCHENK et al., 2006).

Sartori et al (2004), em estudo com novilhas Holandesas superovuladas e inseminadas profundamente nos cornos uterinos, com sêmen convencional e sexado, demonstraram diferença significativa na recuperação embrionária quando compararam os grupos de sêmen sexado e convencional. Embora os grupos de sêmen sexado (inseminação única de 20×10^6 vs duas inseminações de 10×10^6) não demonstraram diferença, sendo o grupo de dupla inseminação o de maior quantidade de estruturas recuperadas. Entretanto, Verberckmoes et al (2004) obtiveram diferença estatística na taxa de concepção dos grupos que utilizaram o dispositivo de Ghent para inseminações no corpo ou cornos uterinos, alcançando melhores resultados nas inseminações realizadas nos cornos. Embora tenham sido melhores, não houve diferença quando este grupo foi comparado ao grupo de inseminação com o dispositivo de Cassou no corpo uterino. Quando comparados os resultados entre vacas e novilhas, observou-se que houve tendência para maiores taxas de concepção para inseminações nos cornos em vacas, enquanto as taxas de concepção de novilhas foram iguais. Este estudo utilizou sêmen convencional com concentração de $20-30 \times 10^6$ spz/mL.

Estudos de Kurykin et al (2007) sugeriram que o local de deposição possa vir a ser importante, deveria existir uma redução ainda maior na concentração de espermatozoides, e tendendo a inseminações próximas à junção útero-tubárica.

Outra explicação para as baixas taxas de fecundação e, conseqüentemente, recuperação pode ser referente à distúrbios no transporte oocitário e do espermatozoide e a menor qualidade oocitária (KAFI & McGOWAN, 1997). As diferenças referentes ao transporte dos espermatozoides, entre fêmeas superovuladas ou não, não podem ser compensadas pelo simples aumento na quantidade espermática (LARSON et al., 2010).

O menor potencial espermático do sêmen sexado juntamente a essas condições adversas encontradas no trato genital de fêmeas superovuladas resultam em menores taxas de fecundação, quando comparadas com sêmen convencional (SARTORI et al., 2004). Estes mesmo autores encontraram maior percentual de estruturas fecundadas degeneradas nos grupos de sêmen sexado, que indicam que o processo de sexagem pode acarretar em danos após a fecundação, também como à diminuição do potencial espermático já conhecido (SEIDEL & GARNER, 2002), sendo este causado por perda de parte das funções espermáticas, redução da motilidade total e progressiva quando comparado a células não sexadas (RATH et al., 2003), no número de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras (CARVALHO et al., 2010), pré capacitação espermática e no número reduzido de células para a inseminação (SCHENK et al., 2009).

Diversos estudos afirmam que o ponto chave na produção embrionária com o uso de sêmen sexado não é o número de espermatozoides por dose inseminante nem o local de deposição do sêmen (SARTORI et al., 2004; SCHENK et al., 2006; PEIPPO et al., 2009; LARSON et al., 2010). O melhor percentual para estruturas fecundadas seria obtido com a adequação do tempo para a IATF nos protocolos de SOV (PANARACE et al., 2003; SARTORI et al., 2004; SCHENK et al., 2006). Contudo, isso não foi observado no presente estudo.

Dentre as estruturas recuperadas, as seguintes classificações foram encontradas: oócitos não fecundados (ONF), zonas pelúcidas (ZP), embriões degenerados (Dg), mórulas (Mo) e blastocistos iniciais (Bi).

Destes, somente mórulas graus 1 e 2 e blastocistos iniciais foram classificados como embriões viáveis, resultando em 52,17% (12/23) de embriões viáveis para o grupo corpo e 60% (9/15) para o grupo corno. Tendo então média de $4,0 \pm 3,0$ de embriões viáveis para o grupo corpo e $4,5 \pm 4,94$ para o grupo corno. Médias próximas às encontradas por Larson et al (2010), que relataram $5,9 \pm 1,0$ e $3,8 \pm 0,9$ de embriões totais para os grupos de sêmen convencional e sexado, respectivamente. E números mais baixos do que relatado por Galli et al (2003), que relataram média de quatro a seis embriões viáveis por doadora. Podendo este ser explicado pelo uso do sêmen sexado no presente estudo.

Sartori et al (2004) não obtiveram diferença significativa no número de embriões viáveis com o uso do sêmen sexado. Contudo, o sêmen convencional resultou em maior quantidade de embriões viáveis e diferença significativa na taxa de estrutura fecundadas recuperadas, resultados similares aos de Soares et al (2011), que não obtiveram diferença estatística significativa entre os grupos de sêmen sexado ou convencional para embriões totais. No entanto, obtiveram diferença estatística entre os grupos de sexado e convencional nos resultados de embriões viáveis e embriões congeláveis. Estes também corroboram com o estudo de Larson et al (2010), que não obtiveram diferenças quanto à quantidade total de estruturas recuperadas ($10,9 \pm 1,8$ e $10,5 \pm 1,6$ para os grupos convencional e sexado respectivamente). Todavia, houve diferença em relação a embriões grau 1 e estruturas não fecundadas; obtendo melhores resultados no grupo de sêmen convencional. Estes resultados podem estar relacionados ao diferente protocolo de sincronização utilizado, e também pela diferente raça estudada, Angus.

Soares et al (2011) em estudo com sêmen convencional e sexado, protocolo de IATF semelhante e vacas Nelore, encontraram valores próximos aos do presente estudo, com total de $9,0 \pm 3,8$ estruturas recuperadas e $4,5 \pm 3,0$ de embriões viáveis para o grupo de sêmen sexado e inseminação com 18

e 30h pós indução; $7,1 \pm 3,3$ e $2,4 \pm 1,8$ de estruturas recuperadas e embriões viáveis, respectivamente, para o grupo de sêmen sexado e inseminação 12 e 24h pós indução, e $8,0 \pm 3,2$ e $6,8 \pm 2,6$ de estruturas recuperadas e embriões viáveis, respectivamente, para o grupo de sêmen convencional e inseminação 12 e 24h pós indução.

Estes resultados não tiveram diferença no número total de estruturas recuperadas, enquanto houve diferença nos números de embriões viáveis e também dos congeláveis, observando melhor resultado no grupo de sêmen convencional, seguido pelo grupo de sêmen sexado e inseminação com 18 e 30h pós-indução e, posteriormente, pelo grupo de sêmen sexado e inseminação com 12 e 24h pós-indução. Valores também inferiores aos encontrados em vacas Pardo Suíço (*Bos taurus*, MONTEIRO JR et al., 2011) que encontraram $10,00 \pm 7,23$ e $10,40 \pm 11,25$ estruturas recuperadas nos grupos de sêmen sexado, inseminadas com 12 e 24h após a indução com LH e 24 e 48h após a indução com LH, respectivamente; e $8,63 \pm 5,37$ no grupo de sêmen convencional inseminado com 12 e 24h após a indução com LH.

Estes mesmos pesquisadores encontraram médias de embriões degenerados de $5,38 \pm 6,41$; $0,67 \pm 1,00$ e $1,40 \pm 3,13$, respectivamente para os grupos: sêmen convencional, sexado 12/24h e sexado 24/48h. Enquanto que no presente estudo obteve-se taxas de 17,39% (4/23) e 40% (6/15) de embriões degenerados para os grupos corpo e corno, respectivamente. Sartori et al (2004) não encontraram diferença significativa entre os grupos de sêmen sexado ou convencional, apesar de haver uma tendência para mais embriões degenerados em ambos os grupos que utilizaram sêmen sexado, resultados contrários ao estudo de Larson et al (2010), que obtiveram maiores tendências para embriões degenerados no grupo de sêmen congelado convencional.

Enquanto o grupo corpo resultou em 8,69% (2/23) de estruturas não fecundadas, no grupo corno não foi recuperado essas estruturas. Dados da literatura mostram que estudos anteriores encontraram médias de $0,5 \pm 0,7$; $3,7 \pm 3,6$ e $2,9 \pm 2,6$ para oócitos não fecundados nos grupos: sêmen convencional, sexado 12/24h e sexado 18/30h, respectivamente, (SOARES et al., 2011) e $2,38 \pm 2,56$; $9,00 \pm 7,45$ e $6,60 \pm 3,44$ para os grupos sêmen

convencional e inseminação 12/24h, sêmen sexado e inseminação 12/24h e sêmen sexado e inseminação 24/48h, respectivamente (MONTEIRO JR et al., 2011). Um estudo que também utilizou inseminação cornual, juntamente com sêmen sexado e superovulação (SARTORI et al., 2004) encontrou percentual parecido quanto as estruturas fecundadas/lavado, obtendo $63,5 \pm 9,2$ e $61,9 \pm 6,3$ nos grupos de sêmen sexado e $90,9 \pm 4,0\%$ para sêmen convencional.

O uso do sêmen sexado, quando comparado ao sêmen congelado convencional, produz em média, 20 pontos percentuais a menos de embriões viáveis e de taxa de concepção (LARSON et al., 2010).

Obteve-se diversos graus de sucesso, na taxa de concepção em vacas, quando utilizado a inseminação mais próxima ao local da fecundação (VERBERCKMOES et al., 2004). Na maioria dos casos, não houve diferença entre a inseminação profunda (nos cornos uterinos) e no corpo uterino (McKENNA et al., 1990), como ocorrido no presente estudo.

7 CONCLUSÃO

Não houve diferença na quantidade e/ou qualidade dos embriões recuperados quanto ao local de deposição do sêmen sexado no momento da IATF.

PERSPECTIVAS

O protocolo utilizado para a IATF está de acordo com os protocolos encontrados na literatura o qual possui uma boa resposta na quantidade de embriões recuperados. Contudo, quando este protocolo é usado para a superovulação e, conseqüente, inseminação com sêmen sexado, sua resposta cai, devido a fatores conseqüentes à superovulação e à sexagem espermática.

Porém, se pôde observar uma tendência à maior resposta quando se utilizou o local convencional para inseminação, o corpo uterino. É possível que em futuros estudos, com o número de repetições maior se encontre diferença estatística significativa.

REFERÊNCIAS

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

ADAMS, G. P.; EVANS, A. C. O.; RAWLINGS, N. C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 27 – 33, 1994.

AGED-MA – Agência de Defesa Agropecuária do Maranhão. Disponível em <http://www.sedinc.ma.gov.br/paginas/view/paginas.aspx?id=44#.UwLSCYUz12Z>. 2010. Acesso em fevereiro de 2014.

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

ALVES, N. G.; COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D.; SILVA, M. R.; ZAMPERLINI, B.; COSTA, F. M. J.; SANTOS, A. D. F.; NETO, T. M. Atividade ovariana em fêmeas bovinas da raça holandesa e mestiças Holandês x Zebu, durante dois ciclos estrais normais consecutivos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 627 – 634, 2002.

BADINGA, L.; THATCHER, W. W.; WILCOX, C. J.; MORRIS, G.; ENTWISTLE, K.; WOLFENSON, D. Effect of season on follicular dynamics and plasma concentrations of estradiol-17 β , progesterone and luteinizing hormone in lactating holstein cows. **Theriogenology**, v. 42, p. 1263 – 1274, 1994.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. **Reprodução em bovinos**. 3.ed. São Paulo: Roca, 2006. 232 p.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Superovulação em zebuínos de corte. Biotecnologia Da Reprodução Em Bovinos, **1º Simpósio Internacional De Reprodução Animal Aplicada**, 2004.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; NASSER, L. F. T.; SILVA, R. C. P.; MENEGATTI, J. A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I. C. C. Adequação da dose de FSH (Follitropin-V) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientia Veterinae**, v. 31, suplemento 1, p. 244 – 245, 2003.

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

BASTOS, H. B. A.; KRETZMANN, N. A.; ESMERALDINO, A. T.; MATTOS, R. C.; RECHSTEINER, S. F.; NEVES, A. P. Expressão gênica das metaloproteínas de matriz e de receptores de LH no desenvolvimento folicular da égua. In... BASTOS, H. B. A. **Expressão gênica das metaloproteínas de matriz e de receptores de LH no desenvolvimento folicular da égua**. 2013. 47p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação em Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS, Porto Alegre, 2013.

BEM, A. R.; RUMPF, R.; SOUSA, R. V.; PEIXER, M. A. S. **Manual sobre transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e eqüina**. Brasília – DF, EMBRAPA-CENARGEN, 1995. 123p.

BERGFELT, D. R.; BÓ, G. P.; MAPLETOFT, R. J.; ADAMS, G. P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 49, p. 1 – 12, 1997.

BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K.; GINTHER, O. J. Follicular and hormonal response to experimental suppression of FSH during follicle deviation in cattle. **Theriogenology**, v. 54, n. 8, p. 1191 – 1206, 2000.

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

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

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

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

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

BOLAND, M. P.; CROSBY, T. F.; GORDON, I. Morphological normality of cattle embryos following superovulation using PMSG. **Theriogenology**, v. 10, p. 175, 1978.

BOLAND, M. P.; GOULDING, D.; ROCHE, J. F. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. **Theriogenology**, v. 35, p. 5 – 17, 1991.

BOLETIM TÉCNICO TECNOPEC. Uso de gonadotrofina folículo estimulante para o auxílio do crescimento folicular final em vacas em anestro na IATF: FOLLTROPIN®.

BRAILEANU, G. T.; ALBANESE, C.; CARD, C.; CHEDRESE, P. J. FSH bioactivity in commercial preparations of gonadotropins. **Theriogenology**, v. 49, p. 1031 – 1037, 1998.

CABODEVILA, J.; TORQUATRI, S. Superovulação de Fêmeas Bovinas. In: PALMA, G. A. **Biotechnologia de la Reproducción**, 1ª ed. INTA, Argentina, p. 79 – 108, 2001.

CARVALHO, J. B. P. **Sincronização da ovulação com dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR®) em novilhas *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus* e *Bos taurus***. 2004. 124p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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

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

CHIARI, J. R.; DEMÉTRIO, D.; SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; BARUSELLI, P. S. Superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em doadoras *Bos indicus* tratadas com FSHp ou com eCG. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, suplemento 1, p. 230, 2005.

DALTON, J. C.; NADIR, S.; BAME, J. H.; SAACKE, R. G. Effect of a deep uterine insemination on spermatozoal accessibility to the ovum in cattle: a competitive insemination study. **Theriogenology**, v. 5, p. 883 – 890, 1999.

DeJARNETTE, J. M.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E.; MORENO, J. F.; McCLEARY, C. R.; LENZ, R. W. Effect of sex-sorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 91, p. 1778 – 1785, 2008.

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

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 – 943, 1970.

DONALDSON, L. E. Porcine, equine, and ovine FSH in the superovulation of cattle. **Theriogenology**, v. 31, p. 183, 1989.

DONALDSON, L. E. FSH-P bath variation. **Theriogenology**, v. 33, p. 215, 1990.

DONALDSON, L. E. A comparison of FSH products. In: INTERNATIONAL WORKSHOPS OF EMBRYO TRANSFER, BIOTECHNOLOGY AND ADVANCED TECHNOLOGIES, 1, 1995, Montevideo. **Anais...** Montevideo: Universidad de la Republica, v. 1, p. 1 – 8, 1995.

FERNANDES, P.; TEIXEIRA, A. B.; CROCCI, A. J.; BARROS, C. M. Timed artificial insemination in beef cattle using GnRH agonist, PGF2alpha and estradiol benzoate (EB). **Theriogenology**, v. 55, p. 1521 – 1532, 2001.

FERREIRA, A. M.; TORRES, C. A. A. Perda de peso corporal e cessação da atividade ovariana luteínica cíclica em vacas mestiças leiteiras. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, p. 411 – 418, 1993.

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

FIGUEIREDO, M. M. N.; FONSECA, F. A.; TORRES, C. A. A.; GALIMBERT, A. M.; ALMEIDA, C. A. Dinâmica folicular ovariana de vacas leiteiras no pós parto após tratamentos com buserelina (GnRH) e cloprostenol (PGF 2 α). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 3, p. 725 – 731, 2000.

FONSECA, J. F.; SILVA FILHO, J. M.; PINTO NETO, A.; PALHARES, M. S. Superovulated zebu cows embryonic developmental stages. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 6, p. 671 – 676, 2001.

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

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648 – 654, 2001.

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

GALLAHGER, G. R.; SENGER, P. L. Concentrations of spermatozoa in the vagina of heifers after deposition of semen in the uterine horns, uterine body or cervix. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 86, n. 1, p. 19 – 25, 1989.

GALLI, C.; DUCHI, R.; GROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599 – 616, 2003.

GAMBARINI, M. L. M. **Curso de transferência de embriões em bovinos**. Goiânia, UFG, 2004.

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

GANDOLFI, F. Sperm-mediated transgenesis. **Theriogenology**, v. 53, p. 127 – 137, 2000.

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

GLISTER, C.; TANNETTA, D. S.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Interaction between follicle-stimulating hormone and growth factors in modulating secretion of steroids and inhibin-related peptides by nonluteinized bovine granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1020 – 1028, 2001.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª ed. São Paulo, Ed. Roca, 2008. 398p.

GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; GUTIERREZ, C. G.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 68 – 74, 1996.

GONZALEZ, A.; LUSSIER, J. G.; CARRUTHERS, T. D.; MURPHY, B. D.; MAPLETOFT, R. J. Superovulation of beef heifers with Folltropin-V: A new FSH preparation containing reduced LH activity. **Theriogenology**, v. 33, p. 519, 1990.

GONZALEZ, A.; WANG, H.; CARRUTHERS, T. D.; MURPHY, B. D.; MAPLETOFT, R. J. Superovulation in the cow with pregnant mare serum gonadotrophin: effect of dose and antipregnant mare serum gonadotrophin. **Canadian Veterinary Journal**, v. 35, p. 158 – 162, 1994.

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

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 61 – 79, 2000.

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

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

GREGORY, R. M.; MELO, L. C.; BESKOW, A.; MATTOS, R. C.; JOBIM, M. I. M.; GREGORY, J. W. Dinâmica folicular e uso de hormonioterapias na regulação do ciclo estral na vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 6, p. 148 – 152, 2009.

HATTORI, M.; TABATA, S. Nitric oxide and ovarian function. **Animal Science Journal**, v. 77, n. 3, p. 275 – 284, 2006.

HAWK, H. W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **Journal of Dairy Science**, v. 66, p. 2645 – 2660, 1983.

HAYAKAWA, H.; HIRAI, T.; TAKIMOTO, A.; IDETA, A.; AOYAGI, Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 71, p. 68 – 73, 2009.

HODGEN, G. D. The dominant ovarian follicle. **Fertil. Steril.**, v. 38, p. 281 – 300, 1982.

HUNTER, R. H. F. New breeding opportunities with deep corneal insemination: exploiting modern sperm technologies in cattle. **Reproduction of Domestic Animals**, v. 36, p. 217 – 222, 2001.

HYTTEL, P.; CALLESEN, H.; GREVE, T.; SCHMIDT, M. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 91 – 108, 1991.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em <<http://economia.estadao.com.br/noticias/economia-brasil,rebanho-bovino-brasileiro-e-o-segundo-maiordomundo,167062,0.htm>>. 2013. Acesso em fevereiro de 2014.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Indução, ovulação, produção e transferência de embriões. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004, p. 409 – 434.

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

JOHNSON, L. A.; WELCH, G. R.; GARNER, D. L. Improved flow sorting resolution of X- and Y-bearing viable sperm using dual staining and dead cell gating. **Cytometry**, v. 17, suppl. 7, p. 83, 1994.

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.

JUNIOR, J. B. Foliculogênese em bovinos. In: BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO EM BOVINOS, 2º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2006. **Anais...**, p. 55 – 62, 2006.

KAFI, M.; MCGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 137 – 157, 1997.

KANEKO, H.; TERADA, T.; TAYA, K.; WATWUNABE, G.; SASAMOTO, S.; HASEGAWAY, Y.; IGARASASHI, M. Ovarian follicular dynamics and concentration of estradiol-17 β progesterone, luteinizing hormone and follicle

stimulating hormone during the periovulatory phase of the oestrus cycle in the cow. **Reproduction Fertility Development**, v. 3, n. 5, p. 529 – 535, 1991.

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

LARSSON, B.; LARSSON, K. Distribution of spermatozoa in the genital tract of artificially inseminated heifers. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 26, p. 385 – 395, 1985.

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

LU, K. H.; 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.

MADUREIRA, E. H.; PIMENTEL, J. R. V. IATF como ferramenta para melhorar a eficiência reprodutiva. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005. Goiânia. **Anais...**, Goiânia, GO. p. 1 – 8, 2005.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/animal/especie/bovinosebubalinos>. 2013. Acesso em novembro de 2013.

MARSHALL, C. E.; GRAVES, W. M.; MEADOR, J. L.; SWAIN, J. B.; ANDERSON, J. I. A fertility comparison of uterine body and bicornual semen deposition procedures in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 455, 1989.

MARTÍNEZ, M. F.; BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Synchronization of follicular wave emergence and ovulation for reproductive biotechnologies. In: **Biotechnologia da Reprodução em Bovinos, 1º Simpósio Internacional De Reprodução Animal Aplicada**, p. 26 – 55, 2004.

MARTINS, C. M.; CASTRICINI, E. S. C.; REIS, E. L.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F. Produção embrionária de vacas holandesas a diferentes protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientia Veterinarie**, v. 33, suplemento 1, p. 286 (abstract), 2005.

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

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.

MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F. K.; BATHGATE, R.; DE GRAAF, S. P.; ERIKSSON, B. M.; GILLAN, L.; MORTON, K. M.; O'BRIEN, J. K. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**, v. 82, p. 79 – 95, 2004.

MAZERBOURG, S.; OVERGAARD, M. T.; OXVIG, C.; CHRISTIANSEN, M.; CONOVER, C. A.; LAURENDEAU, I.; VIDAUD, M.; TOSSER-KLOPP, G.; ZAPF, J.; MONGET, P. Pregnancy-Associated Plasma Protein-A (PAPP-A) in Ovine, Bovine, Porcine, and Equine Ovarian Follicles: Involvement in IGF Binding Protein-4 Proteolytic Degradation and mRNA Expression During Follicular Development. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5243 – 5253, 2001.

McKENNA, T.; LENZ, R. W.; FENTON, S. E.; AX, R. L. Non return rates of dairy cattle following uterine body or cornual insemination. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 1779 – 1783, 1990.

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

MITCHELL, J. R.; SENGER, P. L.; ROSENBERGER, J. L. Distribution and retention of spermatozoa with acrosomal and nuclear abnormalities in the cow genital tract. **Animal Science**, v. 61, p. 956 – 967, 1985.

MIZUTA, K. **Estudo comparativo dos aspectos comportamentais do estro e dos teores plasmáticos de LH, FSH, progesterona e estradiol que precedem a ovulação em fêmeas bovinas Nelore (*Bos taurus indicus*), Angus (*Bos taurus taurus*) e Nelore x Angus (*Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*).** 2003. 98p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MONTEIRO JR, P. L. J.; BATISTA, A. M.; ALMEIDA, F. C.; CARNEIRO, G. F.; SOARES, P. C.; SANTOS, I. C. C.; GUERRA, M. M. P. Avaliação do sêmen (convencional ou sexado) e do momento da inseminação artificial sobre a taxa de fertilização de vacas *Bos taurus* superovuladas. In... MONTEIRO JR, P. L. J. **Momento ideal da inseminação artificial em tempo fixo com sêmen sexado na produção *in vivo* de embriões bovinos.** 2011. 51p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2011.

MORRELL, J. M.; DRESSER, D. W. Offspring from inseminations with mammalian sperm stained with Hoechst 33342, either with or without flow cytometry. **Mutation Research**, v. 224, p. 177 – 218, 1989.

NASSER, L. F. T.; ADAMS, G. P.; BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian superestimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, v. 40, p. 713 – 724, 1993.

NASSER, L. F. T. **Resposta superovulatória na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore (*Bos indicus*).** 2006. 79p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

NELSON, V. E.; AALSETH, E. P.; HAWMAN, C. H.; ADAMS, G. D.; DAWON, L. J.; McNEW, R. W. Sperm discharge and distribution within the cows reproductive tract and after A.I. **Animal Science**, v. 65, p. 401, 1987.

NILSSON, E.; PARROT, J. A.; SKINNER, M. K. Basic fibroblast factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 175, p. 123 – 130, 2001.

NOAKES, D. E.; PARKINSON, T. J.; ENGLAND, G. C. W. **Veterinary reproduction and obstetrics.** 8th ed. In: Artificial insemination. W. B. Saunders. p. 751 – 778, 2001.

NOGUEIRA, M. F. G.; BARROS, B. J. P.; TEIXEIRA, A. B.; TRINCA, L. A.; D'OCCHIO, M. J.; BARROS, C. M. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. **Theriogenology**, v. 57, p. 1625 – 1634, 2002.

OLIVEIRA, J. L. S. O.; SOARES, R. D.; ROCHA, F. A.; ROMERO, V. L.; PRADO, F. R. A. Superovulação em bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano IV, n. 8, 2007. Disponível em <http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/EhldbsfwrovARYX_2013-5-21-16-57-24.pdf>. Acesso em novembro de 2013.

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

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

PEGORER, M. F.; ERENO, R. L.; SATRAPA, R. A.; PINHEIRO, V. G.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Neither plasma progesterone concentrations nor exogenous eCG affects rates of ovulation or pregnancy in fixed-time artificial insemination (FTAI) protocols for puberal Nellore heifers. **Theriogenology**, v. 75, p. 17 – 23, 2011.

PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic imaging of the ovaries and uterus in cattle. **Theriogenology**, v. 29, p. 21 – 37, 1988.

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

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

REICHENBACH, H. D.; MORAES, J. C. F.; NEVES, J. P. 2008. Tecnologia do sêmen e inseminação artificial em bovinos. In: GONÇALVES P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ª ed. São Paulo: Ed. Roca. 395 p.

RENESTO, A. **Associação das biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultra-sonografia e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos**. 2004. 59p. Dissertação de Mestrado, UNESP Jaboticabal, 2004.

ROBERTSON, I.; NELSON, R. E. Certificação e identificação de embriões. In: International Embryo Transfer Society. USA, Abril, 1998. Trad. OLIVEIRA FILHO, E. B. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. Uberlândia, SBTE, p.109 – 122, 1999.

SÁ FILHO, O. G.; MENEGHETTI, M.; PERES, R. F. G.; LAMB, G. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II: Strategies and factors affecting fertility. **Theriogenology**, v. 72, n. 2, p. 210 – 218, 2009.

SALES J. N. S.; NEVES, K. A. L.; SOUZA, A. H.; CREPALDI, G. A.; SALA, R. V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; FARIA, M.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 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 sperm or unsorted sperm. **Animal Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 86 – 90, 2004.

SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; ERENO, R. L.; BARROS, C. M. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. Disponível em <<http://www.sheepembryo.com.br/artigos.php>>. Acesso em outubro de 2013.

SAUNDERS, J.; WILMOTT, N.; PALASZ, A.; MAPLETOFT, R. J. Dose titration of Folltropin in the cow. **Theriogenology**, v. 33, p. 319, 1990.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 663 – 671, 1988.

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

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

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

SEIDEL Jr., G. E.; HERICKHOFF, L. A.; SCHENK, J. K.; DOYLE, S. P.; GREEN, R. D. Artificial insemination of heifers with cooled, unfrozen sexed semen. **Theriogenology**, v. 49, p. 365, 1998.

SEIDEL Jr., G. E.; SCHENK, J. K.; 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.

SEIDEL Jr., G. E.; SCHENK, J. L. Field trials with sexed bovine semen. In: Proceedings of the 19th Technical Conference on Artificial Insemination & Reproduction. **Proceedings...**, p. 64 – 69, 2002.

SEIDEL Jr., G. E.; GARNER, D. L. Sexing mammalian sperm by flow cytometry. **Reproduction**, v. 124, p. 733 – 743, 2002.

SENGER, P. L.; BECKER, W. C.; DAVIDGE, S. T.; HILLERS, J. K.; REEVES, J. J. Influence of cornual insemination on conception in dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 3010 – 3016, 1988.

SENGER, P. L. **Pathways to Pregnancy and Parturition**. 2nd Revised ed. Current Conceptions, Washington, p. 266 – 283, 2005.

SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology and pathophysiology. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 6, p. 739 – 773, 1997.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the oestrous cycle in heifers monitored by real time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 308 – 317, 1988.

SOARES, J. G.; MARTINS, C. M.; CARVALHO, N. A. T.; NICACIO, A. C.; ABREU-SILVA, A. L.; CAMPOS FILHO, E. P.; TORRES JÚNIOR, J. R. S.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with *Bos indicus* and *Bos taurus* superovulated donos. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 148 – 153, 2011.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. **IETS**, p. 112 – 113, Illinois, 1998.

SUAREZ, S. S. Carbohydrate-mediated formation of the oviductal sperm reservoir in mammals. **Cells Tissues Organs**, v. 168, p. 105 – 112, 2001.

TAYLOR, C.; RAJAMAHENDRAN, R. Follicular dynamics, corpus luteum growth and regression in lactating dairy cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 71, p. 61 – 68, 1991.

TEIXEIRA, H. C. A.; MARIANTE, A. S.; NASCIMENTO, N. V.; DRIESSEN, K.; RAMOS, A. F. Protocols with Different Time of Progesterone Exposure on Superestimulatory Response and Embryo Production of Locally Adapted Curraleiro Pé-Duro Cows. **Journal of Animal Science Advances**, v. 3, n. 5, p. 261 – 269, 2013.

THOMAZI, S.; PINTO-NETO, A.; SILVA, R. Z.; MOTA, M. F.; MELLO, N. M.; FONSECA, J. F. Dinâmica ovariana e concentração de progesterona de vacas Nelore submetidas à IATF. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, v. 12, n. 2, p. 135 – 140, 2009.

TRIBULO, H.; JOFRE, F.; CARCEDO, J.; ALONSO, A.; TRIBULO, R.; BÓ, G. A. Superovulation in *Bos indicus* cattle with a single subcutaneous injection of commercial pituitary extracts. **Theriogenology**, v. 39, p. 331, 1993.

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

VERBERCKMOES, S.; VAN SOOM, A.; DE PAUW, I.; DEWULF, J.; VERVAET, C.; DE KRUIF, A. Assessment of a new utero-tubal junction device in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 61, p. 103 – 115, 2004.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 2501 – 2509, 2000.

WILSON, J. M.; JONES, A. L.; MOORE, K.; LOONEY, C. R.; BONDIOLI, K. R. Superovulation of cattle with a recombinant-DNA bovine follicle stimulating hormone. **Animal Reproduction Science**, v. 33, p. 71 – 82, 1993.