

UNIVERSIDADE SANTO AMARO
Curso de Medicina Veterinária

Priscila Rodrigues Serafim

**SÊMEN SEXADO BOVINO: A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO
É INFLUENCIADA PELO TOURO DOADOR DO MATERIAL
GENÉTICO?**

São Paulo
2017

Priscila Rodrigues Serafim

**SÊMEN SEXADO BOVINO: A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO
É INFLUENCIADA PELO TOURO DOADOR DO MATERIAL
GENÉTICO?**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Médico Veterinário.
Orientador: Prof. Dr. André Maciel Crespilho.

São Paulo

2017

Priscila Rodrigues Serafim

**SÊMEN SEXADO BOVINO: A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO
É INFLUENCIADA PELO TOURO DOADOR DO MATERIAL
GENÉTICO?**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título Bacharel em Médico Veterinário.

Orientador: Prof. Dr. André Maciel Crespilho

São Paulo, de 2017.

Banca Examinadora

.....

Prof. Dr.....

.....

Prof. Dr.....

.....

Prof. Dr.....

Conceito Final

A minha querida mãe, que esteve presente em todos os momentos da minha graduação, sempre me motivando e me inspirando a prosseguir. Sem ela eu não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter sido meu alicerce, minha esperança e meu auxílio em todos os momentos da minha vida.

A minha família, em especial a minha irmã Vanessa Farina, que foi essencial para a concretização deste sonho.

Ao Prof. Dr. André Maciel Crespilho, que com muita paciência e dedicação me orientou durante a confecção deste trabalho.

Ao corpo docente da UNISA, pelo apoio técnico e atenção dispensada durante todo o curso.

Ao médico veterinário Roberto Gregório Botelho, pela benevolência em fornecer-me material para a realização deste trabalho.

Aos médicos veterinários Cristiano Gonçalves de Miranda e Marisa da Costa Bitencourt, por todos os ensinamentos, dedicação e solicitude durante meus estágios obrigatórios e durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de classe, pelo companheirismo e experiências compartilhadas durante estes cinco anos, especialmente a minha amiga Amanda, pela amizade e cumplicidade.

A todos que participaram direta ou indiretamente para a minha graduação e realização deste trabalho, meu sincero agradecimento.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a possível influência do touro doador de sêmen sexado na taxa de formação de blastocistos e resultados de concepção de embriões produzidos *in vitro*. Para este experimento foram utilizadas 29 vacas holandesas doadoras de embriões de uma única fazenda situada no município de Rio Vermelho/MG. As doadoras bovinas foram selecionadas de acordo com sua produção leiteira, histórico reprodutivo e mérito genético. As vacas foram submetidas à aspiração folicular e houve uma seleção dos ovócitos viáveis, que foram fertilizados com material genético sexado de fêmea de sete touros da raça Gir. A taxa de formação de embriões no cultivo *in vitro* e a taxa de concepção após a transferência de embriões (TE) foram computadas. Os resultados obtidos foram analisados através de teste Qui-quadrado utilizando software Graph Pad Prism Instat 5.0®, considerando nível de significância de 5% e tendências foram consideradas quando $0,05 < P < 0,10$. Foi observada grande variação na taxa de produção de embriões, que oscilou de 16,09% a 47,83%, com média de $31,97 \pm 8,57$, havendo tendência de influência do touro/sêmen sexado sobre as taxas de formação de blastocistos ($P=0.0659$). Na taxa de concepção dos embriões transferidos observou-se efeito significativo exercido pelo sêmen sexado ($p=0.0230$), com resultados oscilando entre 12,5% a 77,78%, na dependência do touro doador do sêmen. Conclui-se que existe variação nas taxas de produção embrionária e na fertilidade de embriões produzidos *in vitro* de acordo com o touro doador do sêmen sexado.

Palavras-chave: Sêmen sexado. Fertilização *in vitro*. Embriões.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the possible influence of bull donor sexed semen on the rate of blastocyst formation and on in vitro embryo design results. For this experiment, 29 dutch embryo donor cows from a single farm located in the city of Rio Vermelho / MG were used. The bovine donors were selected according to their milk production, reproductive history and genetic merit. The cows were submitted to follicular aspiration and there was a selection of viable oocytes, which were fertilized with sexed genetic material of female of seven Gir bulls. The rate of embryo formation without in vitro culture and the rate of conception after embryo transfer (ET) were computed. The results obtained were analyzed using the Chi-square test using the Graph Pad Prism InStat 5.0® software, releasing 5% significance and tendencies were considered when $0.05 < P < 0.10$. A large variation in the embryo production rate was observed, ranging from 16.09% to 47.83%, with a mean of 31.97 ± 8.57 , tendencies of bull / sexed semen influence on rates of blastocyst formation ($P = 0.0659$). In the conception rate of transferred embryos, a significant effect was observed for females ($p = 0.0230$), with results ranging from 12.5% to 77.78%, depending on the bull donor semen. It is concluded that there is variation in the rates of embryo production and in the fertility of embryos produced in vitro according to the donor bull of the sexed semen

Keywords: Sexed semen. In vitro fertilization. Embryos.

LISTA DE ABREVIATURAS

CL	Corpo lúteo
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IM	Intra muscular
P4	Progesterona
PGF ₂ α	Prostaglandina
PIV	Produção <i>in vitro</i>
TE	Tranferência de embrião

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 DESENVOLVIMENTO	12
2.1 <i>REVISÃO DE LITERATURA</i>	12
2.1.1 Sêmen sexado.....	12
2.1.2 Taxa de concepção do sêmen sexado.....	13
2.1.3 Transferência de embriões.....	17
2.1.4 Efeito do reprodutor sob a taxa de concepção do sêmen sexado.....	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Análise estatística.....	21
3.2 Resultados.....	22
3.3 Discussão	26
4 CONCLUSÃO	28
REFERÊNCIAS	29

1 INTRODUÇÃO

A crescente demanda de alimentos de origem animal vem gerando grande interesse nas indústrias lácteas e cárneas no ganho genético e aumento de produção dos rebanhos, com o intuito de acelerar a produtividade e ainda promover melhoria genética dos animais.

A aquisição de novos animais pode contribuir com isso, mas o nascimento de novos animais no rebanho resulta em maior economia e lucratividade. Segundo Corrêa et. al.¹, é a taxa de natalidade que representa eficiência reprodutiva dos animais e com a capacidade produtiva da propriedade. O aumento da taxa de concepção é fator indispensável para fazer essa cadeia girar, e é desejável para todos os tipos de criações, principalmente as comerciais.

Atualmente, há um crescente interesse em tecnologias que visam aumentar as taxas de prenhez das matrizes, aumentando sua eficiência reprodutiva durante sua vida útil. Além das biotecnologias que visam aumentar a concepção, há também meios de se pré determinar o sexo do produto, possibilitando ao criador escolher o sexo de maior prevalência em sua propriedade, focando assim no objetivo real do negócio, seja lácteo ou cárneo. Segundo Johnson² a pré determinação do sexo da prole possui alta demanda e é de grande importância para fornecer de maneira mais eficiente o abastecimento mundial de alimentos.

Existem inúmeros motivos para se querer pré determinar o sexo do feto, de acordo com os interesses econômicos ou emocionais dos indivíduos envolvidos. Dentro do universo da reprodução animal, a preferência pelo sexo varia de acordo com a aptidão desejada dos animais de criação, sejam animais de corte ou produção leiteira. Na pecuária de leite, o produto responsável pela receita da fazenda é o leite, juntamente com a venda de animais excedentes. E para que esse processo produtivo continue gerando lucros é necessário que haja novilhas de reposição que substituirão as vacas matrizes que já não proporcionam uma atividade produtiva e lucrativa para o criador. Esse enfoque na produção de fêmeas é possível somente através do controle zootécnico, sanitário e leiteiro, que possibilita ao produtor conhecer bem suas vacas e assim saber o momento ideal de descartá-las e introduzir novas matrizes em seu lugar. Devido a isso, o interessante nas fazendas leiteiras é aumentar a taxa de fêmeas no rebanho, pois o nascimento de

bezerros machos é visto como um resultado negativo do trabalho de aproximadamente um ano e, portanto, o uso de técnicas que permitam ao criador determinar o gênero do produto a nascer proporciona maior sucesso do negócio. Assim ocorre também na pecuária de corte, porém são os machos que representam os animais de maior valor zootécnico, devido ao seu maior ganho de peso e estrutura corporal.

Antigamente acreditava-se que a produção de herdeiros ou herdeiras era determinada pelo testículo de onde se originou o espermatozoide, e diante dessas crenças surgiram métodos que retiravam o testículo direito ou esquerdo, a fim de impedir a progressão da célula espermática do sexo indesejado^{3,4}. Posteriormente, com a descoberta dos cromossomos X e Y em 1914 por Bridges, tornou-se possível direcionar cientificamente a pré seleção do sexo, e desde então diversos métodos foram pesquisados para viabilizar a separação das duas populações de espermatozoides. Com essas descobertas surgiu também o interesse em escolher o sexo da progênie, que foi possível devido à identificação das pequenas diferenças no peso molecular entre os cromossomos X e Y carregados, respectivamente, por espermatozoides geradores de fêmeas e machos⁵. Atualmente, as únicas técnicas validadas cientificamente para a seleção de gênero são as que se baseiam na diferença do conteúdo do DNA entre ambos os cromossomos⁵, como a citometria de fluxo, que separa os espermatozoides a partir da incidência de luz laser que é dispersa de acordo com o tamanho da partícula (maior dispersão para o cromossomo X e menor para o Y); e a centrifugação em gradiente, que consiste na flutuação e aspiração dos espermatozoides sobrenadantes. Essas descobertas criaram expectativas para a pecuária bovina no Brasil, que enxerga nas tecnologias da reprodução um meio de otimizar seus resultados, focando seus esforços e investimentos somente naquilo que é interessante para seu negócio, o que dentro das pecuárias de leite e de corte é determinado pelo sexo do produto a nascer.

Entretanto, estudos com sêmen sexado de bovinos tem demonstrado que sua taxa de concepção é inferior quando comparada à taxa de concepção do sêmen convencional, provavelmente devido ao estresse que o material genético é submetido para sua classificação, resultando em danos à célula espermática. Além disso, em função das limitações da separação sexual dos espermatozoides sua

utilização só é economicamente rentável para a indústria produtora de material genético com o uso de $2,1 \times 10^6$ espermatozoides/dose inseminante, quantidade que corresponde a cerca de 10% do total de células presentes em uma dose de sêmen. A baixa dose inseminante também responde pelas menores taxas de concepção do sêmen sexado quando comparado a doses de sêmen bovino convencional. Além disso, novos estudos têm especulado que o touro doador do sêmen sexado pode exercer influência sobre a qualidade e fertilidade do material genético, refletindo em variações nas taxas de concepção.

A utilização do sêmen sexado é possível em técnicas como Inseminação Artificial (IA) e Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), porém possui maior interesse econômico quando utilizado em Fertilização *In Vitro* (FIV), pois permite que um menor número de espermatozoides fecunde um maior número de ovócitos. Assim, a fertilização *in vitro* torna-se a alternativa mais racional para o uso comercial do sêmen sexado, devido ao reduzido número de espermatozoides disponíveis por dose após a sexagem⁶. Porém, mesmo na fertilização *in vitro* o sêmen sexado possui menores taxas de sucesso quando comparado ao sêmen convencional. Embriões produzidos *in vitro* apresentam diferenças em sua morfologia, tempo de desenvolvimento e em seu metabolismo quando comparados aos embriões produzidos *in vivo*⁶. Morton⁷ relata que existem alterações no padrão normal de desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* (PIV) produzidos com sêmen sexado, e que podem estar relacionadas com diferenças em nível molecular dos embriões, além do possível efeito do touro doador de sêmen.

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi verificar a influência que o touro doador do sêmen sexado exerce sobre a produção de blastocistos em sistema de produção *in vitro*, avaliando a taxa de concepção proporcionada por esses embriões quando transferidos para receptoras bovinas.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão de literatura

2.1.1 Sêmen sexado

Com a crescente demanda de produtos de origem animal, as indústrias lácteas e cárneas vêm exigindo cada vez mais produtividade de seus rebanhos e fornecedores, que por sua vez procuram aumentar o índice reprodutivo de seus animais, tornando-os alvo de biotecnologias da reprodução e gerando uma nova tendência de mercado com o objetivo de aumentar a lucratividade.

A taxa de natalidade do rebanho indica a eficiência reprodutiva e capacidade de produção de uma fazenda e, portanto, representa um fator crucial que exige atenção e cuidados. O aumento da natalidade é o objetivo central da criação de gado de corte e leite, pois é ela quem trará os lucros para o negócio⁸.

O sexo do bezerro é fator determinante para o sucesso produtivo e econômico de uma atividade⁹, onde nas fazendas leiteiras a fêmea possui maior valor zootécnico, devido à sua aptidão leiteira e de gerar futuras filhas para reposição. Já nas fazendas de corte o bezerro macho é quem possui maior valor zootécnico, devido ao seu maior potencial de produção quando comparado à fêmea. Uma das maneiras de otimizar e tornar o negócio rentável é a possibilidade de aumentar a frequência do sexo desejável no rebanho, o que evita despesas e investimentos em animais que não trarão retorno financeiro significativo. Além disso, a escolha do sexo proporciona rápido progresso genético, maior produtividade, melhora no bem estar dos animais ao evitar castrações e ainda reduz o impacto ambiental por limitar o nascimento de animais do sexo indesejado. Diante deste cenário e da necessidade de aprimorar os resultados, faz-se necessário o uso de tecnologias que permitam ao produtor pré determinar o sexo do produto, e assim garantir maiores índices produtivos em sua propriedade, além de proporcionar um planejamento mais aprimorado e específico.

O sêmen sexado surgiu com a proposta de permitir tal façanha, através de determinadas técnicas como a citometria de fluxo, que atualmente figura como o único método utilizado em escala comercial¹⁰. Na citometria é utilizado um corante

fluorescente que se adere ao DNA do espermatozoide, que passa por um citômetro de luz que identifica e separa as células de acordo com a carga fluorescente emitida. Dessa forma tornou-se possível separar os espermatozoides com cromossomo X (fêmea) dos espermatozoides com cromossomo Y (macho) devido à diferença do volume de DNA presente em cada cromossomo, que é cerca de 4% maior no X^{11,12}. Assim, quando marcados com o corante fluorescente Hoechst 33342 - corante de DNA permeável à membrana plasmática - o gameta com maior volume de DNA é identificado facilmente e separado dos demais¹³.

Entretanto, o processo de classificação causa danos funcionais no espermatozoide, além da criopreservação, resultando em um potencial de fertilização reduzido⁵. Dessa forma, em função dos insultos sofridos ocorre maior variação nos resultados de concepção obtidos com o sêmen sexado, tornando-o menos eficiente do que o sêmen convencional, o que demanda estudos sobre sua taxa de concepção para permitir ao produtor decidir se o risco compensa os benefícios.

Vale ressaltar que a progênie de bezerros oriundos do sêmen sexado não difere daqueles nascidos a partir do sêmen convencional, incluindo o tempo de gestação, peso ao nascer, taxa de mortalidade e ganho de peso¹⁴. Além disso, não foram encontrados até o momento efeitos tóxicos no sêmen sexado com o uso do corante Hoechst 33342^{5,15}.

2.1.2 Taxa de concepção do sêmen sexado

Com sua introdução comercial, o sêmen sexado tem sido recomendado em novilhas devido ao maior potencial de fertilidade em relação às vacas e à maior capacidade de ganho genético⁸. De acordo com as empresas distribuidoras de sêmen sexado, a orientação do seu uso em novilhas baseia-se em, além da redução de partos distócicos, na possibilidade de produzir novilhas geneticamente superiores oriundas das melhores novilhas e crescimento fechado do rebanho, excluindo-se os riscos de biossegurança que existem com a aquisição de novos animais. Segundo Weigel et al.¹⁶ seu uso pode aumentar o número de fêmeas nascidas de primíparas para cerca de 65%, concedendo maiores chances de partos eutócicos. Outro fator relevante levado em consideração na escolha da novilha e não da vaca, é a inerente

redução na fertilidade de vacas multíparas, que tornam o uso do sêmen sexado economicamente inviável. Segundo Fetrow et al.¹⁷ 5% de redução na taxa de concepção em vacas pode ser muito mais assolador do que a mesma redução em novilhas, pois dessa forma aumenta o risco de a vaca ficar vazia e a possibilidade de ser descartada.

Apesar de tais benefícios, é sabido que as taxas de prenhez do sêmen sexado são inferiores ao sêmen convencional, tornando necessária uma avaliação individual de cada propriedade, levando em consideração seus objetivos e os prós e contras da utilização da técnica. A literatura relata que sua taxa de prenhez varia de 70 a 80% em relação ao sêmen convencional^{18, 5, 19, 20, 15}.

Quando comparado com a taxa de concepção do sêmen convencional, Seidel et al.¹⁸ descreveram que em um experimento com novilhas de corte inseminadas com sêmen sexado, obtiveram 40% de taxa de prenhez, contra 75% do sêmen convencional. Seidel e colaboradores¹⁸ também relataram que para quantidades $\leq 1.5 \times 10^6$ espermatozoides/dose, há melhores resultados quando depositados profundamente no corno uterino. E ainda que, para inseminações com sêmen depositado no corpo uterino, as taxas de concepção foram parecidas para os grupos: 1) Sêmen sexado – IA corpo uterino (1.0×10^6 espermatozoides/dose), 2) Sêmen sexado – IA corpo uterino (3.0×10^6 espermatozoides/dose) e 3) Sêmen convencional – IA corpo uterino (20×10^6 espermatozoides/dose), onde obtiveram 59%, 53% e 57% respectivamente.

Já Doyle et al.²¹ separaram vacas de corte lactantes nos seguintes grupos: 1) Sêmen convencional congelado (40×10^6 espermatozoides/dose), 2) Sêmen convencional congelado (1×10^6 espermatozoides/dose), 3) Sêmen sexado congelado (1×10^6 espermatozoides/dose) e 4) Sêmen sexado refrigerado (5×10^6 espermatozoides/dose), onde o grupo 1 teve o sêmen depositado no corpo uterino e os outros tiveram o sêmen dividido em duas partes e depositado em cada lado dos cornos uterinos. Os resultados de vacas prenhes foram 67%, 49%, 23% e 25% respectivamente.

Em novilhas de leite, Kurykin et al.²² estudaram a taxa de prenhez com diferentes lugares para a deposição do sêmen sexado. As novilhas foram divididas

em três grupos: 1) IA com sêmen convencional no corpo do útero, 2) IA com sêmen sexado no meio do corno uterino com ovulação pré determinada por US e 3) IA com sêmen sexado no final do corno uterino com ovulação pré determinada por US. Para os grupos sexados a dose de espermatozoides foi de 2.2×10^6 , após 80-82hrs da aplicação de prostaglandina 2α . Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa nas taxas de prenhez dos grupos do sêmen sexado, e que o local de deposição do sêmen não é tão relevante quando se usam doses inseminantes de no mínimo $2,2 \times 10^6$ espermatozoides em novilhas. E mesmo quando a quantidade do sêmen sexado é aumentada para 3.5, 5 ou 10×10^6 não há melhora significativa nas taxas de concepção quando comparadas a dose de 2.1×10^6 ⁽²³⁾. As taxas de prenhez obtidas foram de 41,8%, 49,1% e 39,3% para os grupos 1, 2 e 3 respectivamente.

Em um experimento com sêmen convencional e sexado para determinação do melhor momento para realização da IA (inseminação artificial), Basurelli et al. (2007) dividiram cerca de 400 vacas Nelore em dois grupos: 1) IATF (inseminação artificial em tempo fixo) 54hrs e 2) IATF 60hrs após a retirada do implante de progestágeno, baseados nos estudos anteriores de Baruselli et al.^(24b) que observaram que a ovulação ocorre de 70-72hrs após a retirada do implante. A ideia do grupo era de que a inseminação realizada mais próxima ao horário de ovulação aumentaria a taxa de concepção do sêmen sexado. O estudo concluiu que a inseminação mais próxima ao momento previsto da ovulação gerou maiores taxas de concepção para ambos os tipos de sêmen, onde para o sêmen convencional com 54hrs após a retirada do implante a taxa de concepção foi de 48,4% e com 60hrs a taxa foi de 55,1%; e para o sêmen sexado com 54hrs após a retirada do implante a taxa de concepção foi de 37,4% e com 60hrs a taxa foi de 46,4%. Bodmer et. al.²⁵ verificaram que as taxas de prenhez em vacas lactantes inseminadas 12hrs após a detecção do cio foram semelhantes nos grupos de sêmen sexado e convencional, sendo 27,6% para o sêmen sexado e 28,1% para o convencional, reforçando a importância da correta e mais precisa determinação do cio para o momento da inseminação.

Já em outro estudo com vacas leiteiras de alta produção, Andersson et al.²⁶ observaram taxa de prenhez de 21% para o grupo inseminado com sêmen sexado e

de 46% para o grupo inseminado com sêmen convencional, ambos após a detecção do cio. Apesar do índice inferior na taxa de prenhez, o sêmen sexado obteve melhores números no que se refere ao nascimento de bezerras, sendo 82% de fêmeas nascidas de sêmen sexado contra 49% de fêmeas nascidas de sêmen convencional. Healy et al.²⁷ também obtiveram um maior número de fêmeas nascidas oriundas do sêmen sexado em comparação com o sêmen convencional, sendo de 86% e 48%, respectivamente.

Em um estudo comparando a taxa de concepção do sêmen convencional e sexado do mesmo touro, Karakaya et al.²⁸ selecionaram 302 vacas em lactação e as sincronizaram com GnRH (hormônio liberador de gonadotrofina) e PGF₂α (prostaglandina) (Protocolo Ovsynch). Foram selecionadas apenas vacas que apresentaram sinais de cio, como folículos dominantes nos ovários e secreção vaginal translúcida. O grupo 1 recebeu sêmen sexado e o grupo 2 sêmen convencional. Aos 31 dias, a taxa de concepção do grupo 1 foi de 31,8% e para o grupo 2 de 40,9%. Aos 62 dias as taxas de concepção do grupo 1 foi de 25,7% e para o grupo 2 de 39%.

No estudo de Kurykin et al.⁸ as vacas primíparas apresentaram maiores taxas de concepção em relação a vacas múltiparas, sendo aos 31 dias pós IA de 41,7% para o sêmen sexado e 53% para o convencional, contra 25% do sêmen sexado e 31,8% com sêmen convencional, respectivamente. Aos 62 dias as taxas foram de 33,3% do sêmen sexado e 48,5% do sêmen convencional para as vacas primíparas e 20,5% do sêmen sexado e 31,8% do sêmen convencional para as vacas múltiparas.

De fato, a literatura concluiu que os índices de sucesso nas inseminações com sêmen sexado são sempre inferiores ao sêmen convencional. Analisando tais resultados apresentados pela literatura podemos supor que a dose reduzida de sêmen sexado e o local de deposição do material genético no trato reprodutor feminino exercem influência sobre as taxas de concepção, porém aparentemente os danos sofridos pela célula espermática durante o processamento respondem de maneira mais significativa pelas baixas taxas de prenhez do sêmen submetido à sexagem. Levando-se em consideração que a resistência do espermatozoide ao processamento sofre influência direta da qualidade do touro que o produz, torna-se

plausível especular que naturalmente devem existir reprodutores com maior aptidão para produção de sêmen voltado à sexagem.

2.1.3 Transferência de embriões

O uso do sêmen sexado em conjunto com a produção de embriões *in vitro* (PIV) resulta em um meio potencialmente eficiente para obtenção de progênie de determinado sexo²⁰. A produção de embriões *in vitro* contribui cada vez mais para o aumento da produção de animais em um menor espaço de tempo, e ainda agrega valor ao gado, promovendo melhorias zootécnicas expressivas⁶. A aplicabilidade do sêmen sexado ganhou espaço neste meio devido à possibilidade de se usar um menor número de espermatozoides para fecundar um maior número de ovócitos de uma só vez, otimizando a tecnologia da sexagem¹⁰.

O sêmen sexado também apresenta resultados inferiores ao sêmen convencional na TE (transferência de embriões), principalmente devido ao fato de a própria técnica de aspiração e transferência já resultar em taxas mais baixas de fertilidade quando comparada a animais não submetidos a tais procedimentos³⁰. Palma et al.³¹ relataram que o sucesso da fertilização *in vitro* pode ser afetado pelo uso do sêmen sexado. Por isso, a viabilidade do sêmen é de extrema importância para determinar o sucesso dessa biotécnica³².

Seidel¹⁴ relatou que para que o sêmen sexado torne-se rentável para a produção de carne e leite, é preciso aliar seu uso com a transferência de embriões e à programas de melhoramento genético. Entretanto, tais tecnologias afetam a qualidade do sêmen, além de as taxas da fertilização com sêmen sexado serem de 10 a 20% menores quando comparadas com a PIV com sêmen convencional e à IA^{18,6}. Além disso, o sêmen sexado exige uma menor janela de erro quanto ao momento da ovulação, pois para ele o tempo é fator crítico, tornando a FIV (fertilização *in vitro*) uma técnica mais assertiva quanto ao seu uso.

Segundo Moce et al.¹⁹ a vida útil do sêmen sexado é inferior ao sêmen convencional, devido a aceleração da capacitação e reação acrossomal dos espermatozoides durante o processo de classificação, congelamento e

descongelamento espermático. Tais processos diminuem a longevidade do material genético¹³. Basurelli et al.¹² também verificaram, em um estudo com 400 vacas para efeito do momento da IA, que o sêmen sexado permite uma janela de erro muito pequena quando comparado ao sêmen convencional. Quando utilizadas as técnicas de IA e IATF, é necessária uma sincronia ainda maior no momento da deposição do sêmen sexado após a observação ou sincronização do cio, dificultando ainda mais o processo e as taxas de sucesso da concepção^{18,8}.

Cebrian-Serrano et al.³³ realizaram um estudo sobre os efeitos do sêmen sexado no desenvolvimento e qualidade de embriões PIV. Observaram uma maior taxa de clivagem em oócitos fertilizados com sêmen convencional em comparação com sêmen sexado (69.09 e 52.43 % respectivamente, $P < 0,05$).

Quanto ao momento da formação de blastocisto, os autores³³ não encontraram diferenças significativas entre os grupos tratados com os dois tipos de sêmen, sendo de 10,53% para o sêmen convencional e 5,56% para o sêmen sexado no dia 7, e dia 30,26% para o sêmen convencional e 24,07% para o sêmen sexado no dia 8. Além disso, não houve diferenças para as taxas de formação de blastocistos classificados como bons ou excelentes em função do tipo de sêmen, sendo 87.50% para o sêmen convencional e de 85.71% para o sexado.

Larson et al.³⁴ verificaram que a capacidade do sêmen sexado em promover a formação de embriões é inferior (metade da eficiência) quando comparado ao uso do sêmen convencional em programas de TE.

Bermejo-Álvarez et al.³⁵ também obtiveram resultados inferiores em seu estudo com sêmen sexado na FIV, sendo de baixa fertilidade e redução no desenvolvimento embrionário, e foram atribuídos ao efeito deletério da classificação seminal sobre a meia vida e capacitação das células espermáticas.

Em outro experimento utilizando sêmen de touros holandeses, Palma et al.³¹ estudaram a eficiência do sêmen sexado FIV em comparação com o sêmen convencional. Verificaram que o sêmen sexado apresentou resultados inferiores ao sêmen convencional para a taxa de clivagem e desenvolvimento de blastocistos. Além disso, mesmo quando utilizado a mesma quantidade de espermatozoides em relação ao sêmen convencional (10×10^6), o sêmen sexado resultou em menor

número de oócitos fertilizados. O estudo demonstrou também que a estrutura dos blastocistos produzidos a partir de sêmen sexado possuía alterações no número e na estrutura das mitocôndrias, invólucro nuclear e retículo endoplasmático rugoso. Tais alterações morfológicas podem justificar o desenvolvimento limitado dos embriões oriundos de sêmen sexado em sistema FIV.

Dessa forma, a revisão da literatura disponível sinaliza claramente para uma menor eficiência do sêmen sexado em programa de produção de embriões *in vivo* e *in vitro*, o que abre margem para especulação de um possível efeito do touro doador de sêmen nos resultados de produção embrionária.

2.1.4 Efeito dos reprodutores sob a taxa de concepção

A grande variância entre os índices reprodutivos do sêmen sexado dos touros doadores nos leva a crer que os fatores deletérios sofrido pelos espermatozoides são diferentes entre cada indivíduo. A qualidade do ejaculado influencia diretamente a velocidade da sexagem, que por sua vez interfere diretamente na pureza do sêmen⁶. A escolha de determinado doador pode definir o sucesso ou fracasso da utilização do sêmen sexado³³. A capacidade fertilizante do sêmen é um dos principais contribuintes para a concepção^{36,8}. Gosálvez et al.³⁷ relataram que os touros exibem resultados de fragmentação de seu DNA diferentes de outros indivíduos após terem seu sêmen submetido à citometria de fluxo, resultando em diferentes taxas de reprodução entre os doadores. Diante disso, a avaliação individual do ejaculado dos doadores e o conhecimento de seu potencial fecundante pode ajudar a definir a escolha do reprodutor ideal e ainda pode significar uma melhoria nos resultados.

Garner et al.⁵ relataram que existem diferenças entre as raças bovinas quanto às características do cromossomo Y, e também diferenças entre a quantidade de material genético entre os cromossomos X e Y entre as raças de bovinos, indicando a possibilidade de haver resultados variáveis devido a influência do touro. Tanno¹⁵ observou em seu estudo que o material proveniente do genótipo taurino apresentou pior desempenho na sexagem quando comparado ao genótipo zebuino. Em experimento analisando a qualidade espermática em um programa de FIV, Palma et

al.³¹ verificaram que apesar da técnica de sexagem reduzir a capacidade fertilizante do espermatozoide, um dos touros apresentou alta taxa de formação de blastocistos, indicando uma menor ação deletéria da técnica sobre o material genético especificamente daquele indivíduo.

Além da análise andrológica e processo de criopreservação, o sêmen sexado também precisa passar pelo processo de separação cromossômica, o que significa mais desafios em sua capacidade de manter sua qualidade fertilizante. Em um experimento com touros girolando para análise da influência da sexagem sob a estrutura espermática, Marques et al.³⁸ verificaram que o processo de seleção celular resultou em alterações na membrana plasmática e acrossomal de um dos três animais utilizados, evidenciando que a influência exercida pela técnica é variável entre os indivíduos. No mesmo trabalho não foram encontradas alterações nas membranas mitocondriais das células dos indivíduos, e as características estruturais da célula de um dos três touros pode ter sido afetada pela técnica. Suh et al.³⁹ relataram que a fertilidade do sêmen sexado depende de sua susceptibilidade ao processo de separação dos cromossomos, e Carvalho¹⁰ descreveu que os espermatozoides não tem seu DNA prejudicado após passarem pela citometria, sugerindo que os danos celulares encontram-se restritos às características funcionais e morfológicas do espermatozoide.

A variação na resposta e na resistência à sexagem de acordo com as características individuais dos espermatozoides de diferentes touros motiva a realização desse estudo que avalia o efeito do reprodutor doador de sêmen nas taxas de formação de blastocistos e de concepção após a transferência de embriões produzidos *in vitro*.

3 Materiais e métodos

Os procedimentos de TE foram realizados durante os anos de 2013, 2014 e 2016 na propriedade leiteira privada Ribeirão dos Lopes, localizada no município de Rio Vermelho/MG, região sudeste, latitude 18°17'37"W, altitude 730m, área 973,1 Km². Foram analisados os dados retrospectivos da taxa de concepção de 7 touros da raça Gir, cujas amostras de sêmen sexado para fêmea obtidas das centrais de distribuição Semex e Alta Genetics foram utilizadas para a produção *in vitro* de embriões bovinos obtidos de 29 doadoras da raça Holandesa. As mesmas foram selecionadas de acordo com seu pedigree, produção leiteira e características zootécnicas de suas filhas. O material genético sexado criopreservado de cada reprodutor foi descongelado em banho maria a 37°C durante 30 segundos, e submetido à centrifugação em gradiente de Percoll. Foi utilizada uma concentração de 1×10^6 espermatozoides/dose para fecundação dos ovócitos. As receptoras foram selecionadas a partir dos seguintes critérios: escore de condição corporal de 2,5 a 5, tonicidade uterina de medianamente relaxado a tônico, ovários funcionais com presença de um folículo dominante ou corpo lúteo (CL) cíclico e sem indicativos de problemas reprodutivos. As receptoras foram submetidas ao seguinte protocolo de sincronização: em um dia aleatório denominado dia 0 (D0), no início da manhã, os animais receberam um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (P4) (Sincrogest®, Ouro Fino, São Paulo, Brasil; 1,0g de progesterona) associado a 2,0 mL de Benzoato de Estradiol (Estrogin®, Biofarm, Jaboticabal, Brasil; 0,005 g) intramuscular (IM). No dia 8 (D8), no início da manhã, o dispositivo de P4 (progesterona) foi retirado e foi administrado 2 mL de Cloprostenol Sódico (Sincrocio®, Ouro Fino, São Paulo, Brasil; 0,25 mg/mL) IM (intramuscular); 0,3 mL de Cipionato de Estradiol (ECP®, Pfizer, São Paulo, Brasil; 2 mg/mL) IM e 1,5 mL de Gonadotrofina Coriônica Equina (Folligon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil, 200 UI/mL) IM. No dia 18 (D18) as receptoras foram submetidas ao exame ginecológico de palpação retal e aquelas que apresentaram CL (corpo lúteo) funcional receberam os embriões fecundados e que atingiram o estágio de blastocisto através de um inovulador, ipsilateralmente ao CL funcional.

3.1 Análise estatística

Foi realizada análise estatística descritiva incluindo o cálculo das médias e desvio padrão para os parâmetros taxa de produção de blastocistos e taxa de concepção após a transferência dos embriões. Adicionalmente os touros foram identificados com números de 1 a 7. As variáveis dependentes (taxa de produção e taxa de concepção dos embriões) foram analisadas utilizando-se teste Qui-quadrado através do software Graph Pad Prism Instat 5.0®, considerando diferenças estatísticas quando $P < 0,05$ e tendências quando $0,05 < P < 0,10$.

3.2 Resultados

Os resultados obtidos demonstraram grande variação nas taxas de produção de embriões, que oscilaram entre 16,09% a 47,83%, com média de $31,97 \pm 8,57$, havendo uma tendência de influência do touro/sêmen sexado na taxa de produção de embriões ($P=0.0659$), de acordo com a Tabela1 abaixo.

Tabela 1 – Resultados da produção de embriões, de acordo com o touro doador de sêmen sexado.

Nº do touro	Nº de ovócitos viáveis	Nº de embriões produzidos	Taxa de produção embrionária
1	79	26	32,91
2	23	11	47,83
3	78	19	24,36
4	24	8	33,33
5	87	14	16,09
1	30	9	30,00
6	68	24	35,29
7	26	9	34,62
5	54	18	33,33
Total	469	138	29,42
Média geral			31,97
Desvio			8,57

No entanto, efeito significativo do touro/sêmen sexado foi observado para a taxa de concepção dos embriões transferidos ($P=0.0230$), de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2 – Efeito do touro sobre a taxa de concepção dos embriões produzidos.

Nº do touro	Nº de embriões produzidos	Diagnóstico de gestação	Taxa de concepção
1	26	11	42,31
2	11	3	27,27
3	19	4	21,05
4	8	1	12,50
5	14	2	14,29
1	9	7	77,78
6	24	11	45,83
7	9	3	33,33
5	18	10	55,56
Total	138	52	37,68
Média geral			36,66
Desvio			21,19

Os resultados individuais evidenciando a grande amplitude entre touros no que diz respeito aos parâmetros analisados são demonstrados nos gráficos abaixo.

Gráfico 1 – Demonstrativo da proporção de embriões produzidos por touro.

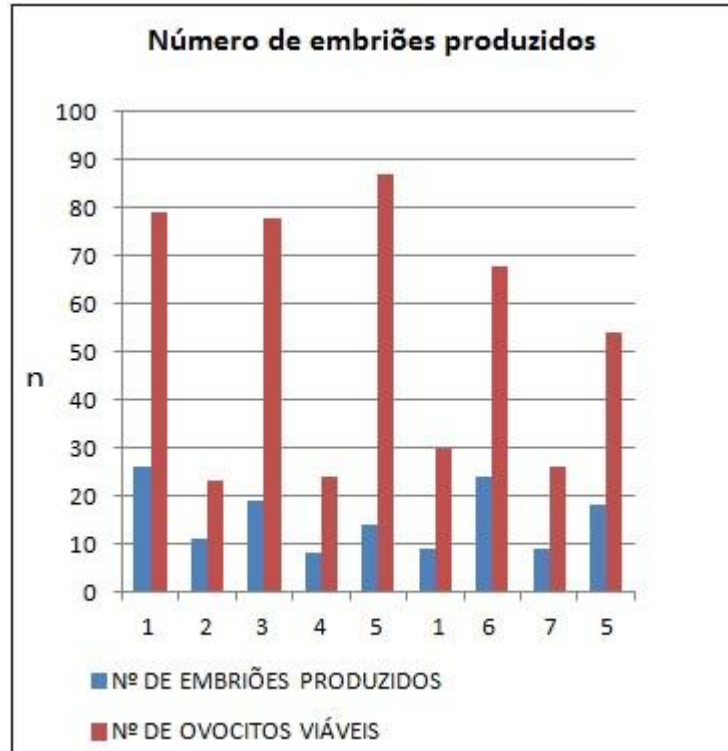


Gráfico 2 – Demonstrativo da taxa de concepção total por touro.

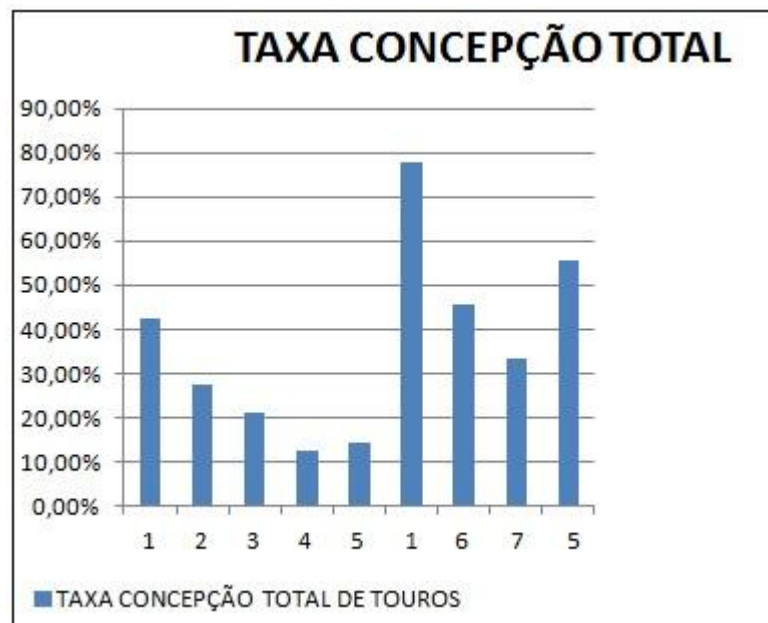


Gráfico 3 – Demonstrativo do diagnóstico de gestação resultante de cada touro.

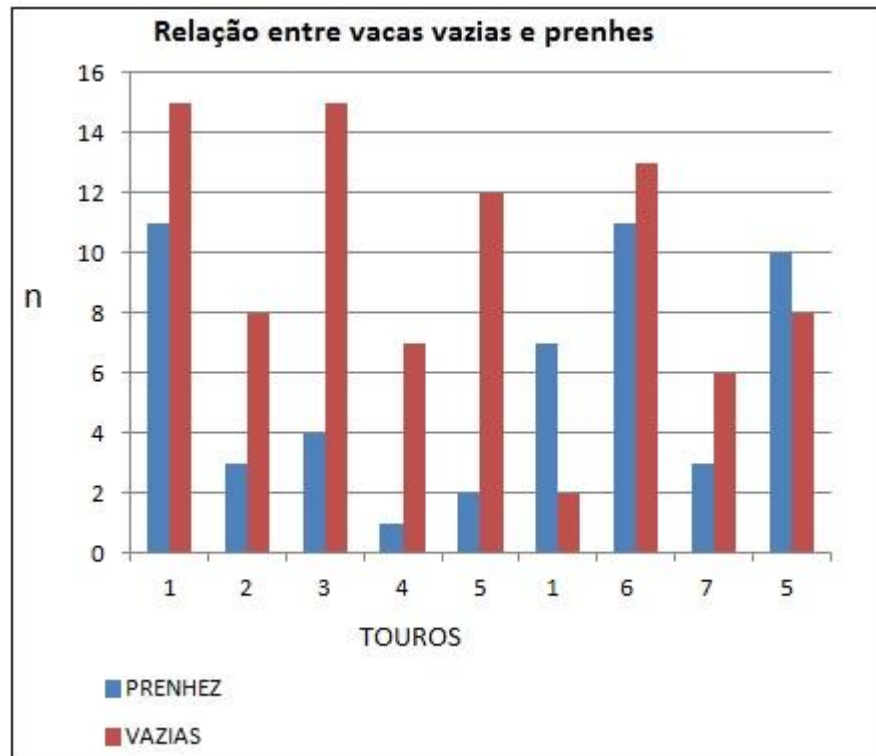
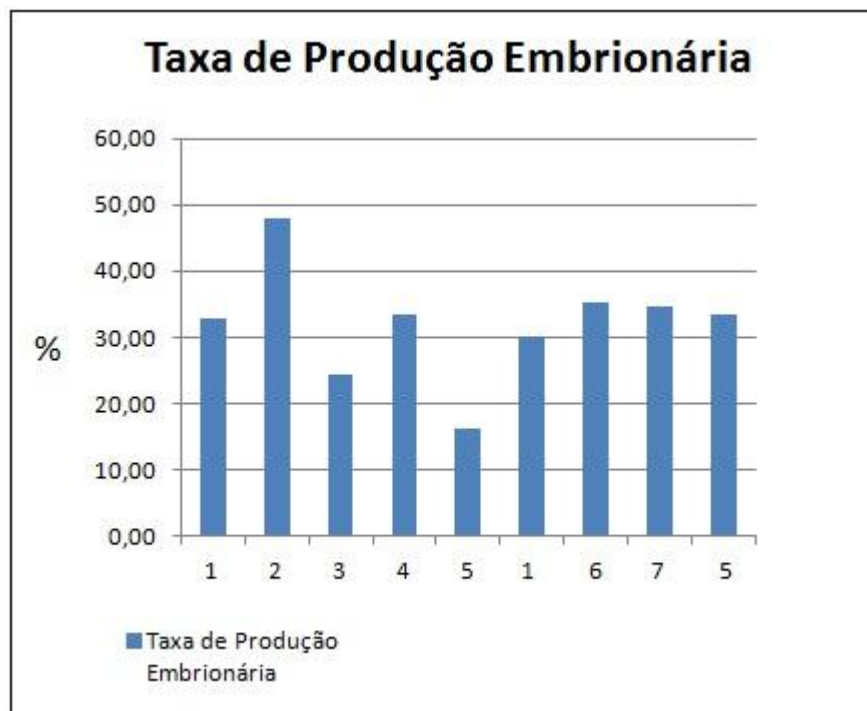


Gráfico 4 – Demonstrativo da taxa de produção embrionária por cada touro.



3.3 Discussão

No presente trabalho foi encontrada grande variação na taxa de produção de embriões até o estágio de blastocisto em função do touro produtor da dose de sêmen sexado.

Quanto à taxa de concepção dos embriões produzidos *in vitro*, foi observado efeito significativo do touro doador sobre os índices de fertilidade.

Tais resultados se assemelham aos reportados por Cebrian-Serrano et al.³³ que descreveram que as diferenças de fertilidade encontradas em seu experimento podem ser devidas a seleção do touro doador, qualidade do sêmen sexado e variedades de oócitos. De acordo com Saacke⁴⁰ há animais que possuem menor capacidade fertilizadora do que outros.

Palma et. al.³¹ observaram que embriões fertilizados *in vitro* com sêmen sexado apresentaram taxa de clivagem, desenvolvimento de blastocistos e motilidade progressiva inferiores aos mesmos parâmetros dos embriões fertilizados com sêmen convencional.

A influência individual do reprodutor sobre a taxa de concepção do sêmen sexado também foi relatada por Gosálvez et al.³⁷ que observaram que indivíduos diferentes podem apresentar sensibilidade diferenciada quando submetidos ao processo de citometria de fluxo, pois alguns touros exibiram resultados de fragmentação de seu DNA diferentes de outros indivíduos após o processo de sexagem, resultando em diferentes taxas de concepção entre os doadores.

Marques et al.³⁸ verificaram em seu experimento que o processo de seleção espermática resultou em alterações na membrana plasmática e acrossomal de um dos três animais utilizados em seu estudo, comprovando que a sensibilidade e vulnerabilidade da célula espermática à sexagem é variável entre os diferentes indivíduos.

Semelhantemente, Palma et al.³¹ verificaram em um programa de FIV que um dos touros apresentou alta taxa de formação de blastocistos mesmo após a sexagem, indicando uma menor ação deletéria da técnica sobre o material genético deste indivíduo.

Para Araújo et al.⁶ a grande variância entre os índices reprodutivos do sêmen sexado dos touros doadores leva a crer que os fatores deletérios sofrido pelos espermatozoides são diferentes entre cada indivíduo.

A capacidade fertilizante do sêmen é um dos principais contribuintes para a concepção^{36,8}. Suh et al.³⁹ relatam que a fertilidade do sêmen sexado depende de sua susceptibilidade ao processo de separação dos cromossomos, que pode sofrer grande variação de acordo com o touro doador do sêmen submetido à seleção sexual.

Os resultados variados entre as taxas de concepção do sêmen sexado podem estar relacionados a fatores como diferenças nas variedades de oócitos, seleção do touro doador e qualidade do sêmen sexado³³; menor tempo de viabilidade do material sexado, associado com diferentes padrões de motilidade espermática⁴¹; maior peroxidação lipídica nos espermatozoides com membrana íntegra e presença de proteínas fosforiladas na superfície da membrana plasmática¹⁹, que apesar de promoverem a capacitação do material sexado, não resultaram em maior quantidade de células classificadas como capacitadas¹⁵; alterações no acrossoma³⁸; sobrevivência menor após a criopreservação⁴¹; aumento de danos nas membranas⁴² e susceptibilidade individual do sêmen sexado ao processo de separação dos cromossomos³⁹.

Fatores como a concentração utilizada (2.1×10^6) também foram associados ao menor índice de fertilidade do sêmen sexado²⁶, apesar de alguns trabalhos mostrarem que o uso similar das doses de sexado e convencional resultaram em taxas de concepção similares²⁵ e, mesmo utilizando a mesma dose do sêmen convencional obtiveram menor número de ovócitos fertilizados³¹.

A real causa da diminuição da fertilidade do sêmen sexado ainda não está totalmente esclarecida, porém, Rath e Johnson⁴³ relatam que a qualidade do sêmen sexado é afetada devido ao estresse inerente ao processo de triagem, porém, os resultados a este respeito ainda não são conclusivos³³.

Para Arruda et al.⁴⁴ o grande desafio é identificar entre as diversas variáveis obtidas através das análises aquelas que tem uma maior influencia sobre o potencial de fertilidade do material espermático.

4 CONCLUSÃO

A seleção de reprodutores com base não apenas no potencial de produção de espermatozoides, como também pela susceptibilidade das células espermáticas à citometria de fluxo, se torna imperativo para a plena implementação do sêmen sexado junto as demais biotécnicas empregadas para a multiplicação de gado de corte e leite, já que a taxa de formação de blastocistos e fertilidade dos embriões produzidos *in vitro* sofre influencia individual dos touros cujas células espermáticas são submetidas ao processo de sexagem.

REFERÊNCIAS

- 1 Corrêa C. Gerenciamento da pecuária de corte no Brasil: Cria, Recria e Engorda de bovinos a pasto. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Porto Alegre, 2009. Disponível em: <http://www.sober.org.br/palestra/13/762.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2015.
- 2 Johnson L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Animal Reproduction Science*. 60–61.2000. 93–107
- 3 Windsor D. P., Evans, G.; White, I. G. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: a review. *Reprod. Fertil. 1993. Dev.*, 5, 155–171.
- 4 Reubinoff, B. E., Schenker, J. G. New advances in sex preselection. *Fertil. Steril.* 1996. v. 66, n. 3, p. 343-350.
- 5 Garner D.L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*. 2006. 65, p. 943–957.
- 6 Araujo M. S., Volpato R., Lopes M. D. Produção de embriões bovinos *in vitro* com sêmen sexado / Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP / Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária. 2013. v. 11, n. 3 (2013), p. 08–15.
- 7 Morton, K. M., Herrmann, D., Sieg, B., Struckmann, C., Maxwell, W. M. C., Rath, D., Evans, G., Lucas-Hahn, A., Niemann, H., Wrenzycki, C. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilization *in vitro* using flow-cytometrically sex-sorted sperm. *Molecular Reproduction and Development*. 2007. v. 74, p. 931-940.
- 8 Kurykin J. Sex-sorted semen: Efficiency of insemination and opportunities to increase outcome of pregnancies in dairy and beef cattle. A review. *issn 1392-2130. Veterinarija ir Zootechnika (Vet Med Zoot)*. 2017 T. 75 (97).

9 Sá Filho, M.F., Souza A.H., Martins C.M., et al. Avanços nos Protocolos Reprodutivos em Fêmeas Bovinas Utilizando Sêmen Sexado. São Paulo, Brasil. 2010.

10 Carvalho, J.O. Aspectos moleculares, estruturais e funcionais de espermatozoides bovinos sexados por citometria de fluxo. Tese de Doutorado Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz . 2013.

11 Garner D.L., Gledhill B.L., Pinkel D., Lake S., Stephenson D., Van Dilla MA., et al. Quantification of the X and Y chromosomebearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. Biol Reprod 1983. 28:312–21.

12 Baruselli P.S., Souza A. H., Martins C.M., Gimenes L. U., Sales J. N., Ayres H., Andrade A.F.C., Raphael C.F., Arruda R.P. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões/Sexed semen: artificial insemination and embryo transfer. Rev Bras Reprod Anim. Belo Horizonte. 2007. v.31, n.3 p.374-381.

13 Freitas, C. P. Variações metodológicas na congelação de sêmen bovino sexado (Methodological variations on freezing bovine sexed semen). Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Botucatu. 2007. 85 f.

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

15 Tanno, P. H. Estudo das alterações morfo-funcionais de espermatozoides bovinos submetidos à sexagem por meio da técnica de citometria de fluxo. [Study of morpho-functions alterations in bovine spermatozoa submitted on sorting through flow cytometry technology]. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009. 100 f.

16 Weigel, K.A. Exploring the role of sexed semen in dairy production systems. J Dairy Sci 2004. 87. Supplement 1: E120–130.

17 Fetrow, J., Overton, M., Eicker, S. Sexed Semen: economics of a new technology. Western Dairy Management Conference. 2007. Reno, NV March 7-9.

18 Seidel JR., Cran, G. E., Herickhoff, D. G., Schenk L. A., Doyle J. L., Green S. P. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology*, 1999. v. 52, p. 1407-1420.

19 Moće E., Graham J.K., Schenk J.L. Effect of sexsorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. *Theriogenology* 2006. 66. 929–936.

20 Wheeler M.B., Rutledge J.J., Fischer-Brown A., Van Etten T., Malusky S., Beebe D.J. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology*. 2006 Jan. 7;65(1):219-27.

21 Doyle S.P., Seidel G.E., Schenk J.L., Herickoff L.A., Cran D.G., Green R.D. Artificial insemination of lactating Angus cows with sexed semen. *J Anim Sci* 1999, 50, 203–205.

22 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* 2007, 67, 754–759.

23 DeJarnette J.M., McCleary C.R., Leach M.A., Moreno J.F., Nebel R.L., Marshall C.E. Effects of 2.1 and 3.5 x 10⁶ sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. *J Dairy Sci*. 2010b. 93, 4079–4085.

24 Baruselli P.S., Sá Filho M.F., Martins C.M., Nasser L.F.T., Nogueira M.F.G., Barros C.M., Bo G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle *Theriogenology*. 2006b v.65, p.77-88.

25 Bodmer M., Jannet F., Hässig M., Den Daas N., Reichert P., Thun R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology* 2005, 64, 1647–1655.

26 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*. 2004. v.61, p.1583-1588.

27 Healy, A. A.; House, J. K.; Thomsom P. C. Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers *Journal of Dairy Science*, New York. 2013. v. 96, n. 1, p. 1905-1914.

28 Karakaya E., Yilmazbas-Mecitoglu G., Keskin A., Alkan A., Tasdemir U., Santos J.E.P., Gumen A. Fertility in dairy cows after artificial insemination using sex-sorted sperm or conventional semen. *Reprod Domest Anim*. 2014. 49:333-337.

29 Marques, C.C.; Baptista, M.C. – Pereira. R.M.,et al. Influência do sêmen de diferentes touros sobre as taxas de fertilização in vitro e desenvolvimento de embriões em co-cultura. *Revista Portuguesa de Zootecnia*. Lisboa. 1995. n. 2, p. 103-110.

30 Page R.D., Jordan J.E., Johnson S.K. Superovulation of Holstein heifers under heat stress with FSH-P or Folltropin. *Theriogenology*. 1985. v.31, p.236.

31 Palma, G. A., Olivier, N. S., Neumüller, Ch., Sinowatz, F. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts. *Anatomy, Histology and Embryology*, 2008 v. 37, p. 67-73.

32 Newcomb R. Investigation of factors affecting superovulation and non-surgical embryo recovery from lactating British Friesian cows. *Vet Rec*. 1980. v.106, p.48-52.

33 Cebrian-Serrano A., M. A. Silvestre, S. Ruiz, D. Rath. Effect of sex-sorted sperm on development and quality of in vitro-produced bovine embryos derived from ovum pick up oocytes. *Institute of Genetics and Animal Breeding, Jastrzębiec, Poland Animal Science Papers and Reports* vol. 31. 2013. no. 2, 111-122.

34 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 sex-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology* 2010, 73, 698–703.

35 Bermejo-Álvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P., Gutierrez-Adan, A. Epigenetic differences between male and female bovine blastocysts produced in vitro. *Physiological Genomics*. 2008. v. 32, p. 264-272.

36 Saake R.G. Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology*. 2008. 70, 473-478.

37 Gosálvez, J., Ramirez, M. A., López-Fernández, C., Crespo, F., Evans, K. M., Kjelland, M. E., Moreno, J. F. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology*, Philadelphia. 2011a. v. 75, n. 1, p. 197-205.

38 Marques S. R.; Ana Carolina Messias de Souza; Jussara Valença de Alencar Ramos; Ivanise Maria de Santana; Verônica Maria Silva da Costa; Maria Aparecida da Gloria Faustino. Uso de fluorocromos para avaliação do semên sexado de bovinos girolando. *Ciência vet. tróp.*, Recife-PE. 2015. v.18.

39 Suh T.K., Schenk J.L., Seidel G.E. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. *Theriogenology*. 2005. 52, 1035–1048.

40 Saacke R.G., Insemination related factors affecting fertilization in estroussynchronized Cattle. Staunton, VA. October 15-16, 2013. Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle.

41 Schenk J.L., Suh T.K., Seidel Jr. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology*. 2006. v.65, p.299-307.

42 Parrilla, I., Vasquez, J.M., Gil, M.A., Caballero, I., Almiñana, C., Roca, J., Martinez, E.A. Influence of storage time on functional capacity of flow cytometrically sex-sorted boar spermatozoa. *Theriogenology*. 2005. v. 64, p. 86-98.

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

44 Arruda, R.L., Orros, I.R., Passos, T.S., et al. Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros. Belo Horizonte. Rev. Bras. Reprod. Anim. 2010. v.34, n.1, p.168-184.