

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA TAXA DE CONCEPÇÃO DE NOVILHAS E
VACAS (*Bos taurus* X *Bos indicus*) COM O USO DE SÊMEN
SEXADO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL OU EMBRIÕES
PRODUZIDOS *in vivo* E *in vitro***

Anelise Ribeiro Peres

Médica Veterinária

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**AVALIAÇÃO DA TAXA DE CONCEPÇÃO DE NOVILHAS E
VACAS (*Bos taurus* X *Bos indicus*) COM O USO DE SÊMEN
SEXADO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL OU EMBRIÕES
PRODUZIDOS *in vivo* E *in vitro***

Anelise Ribeiro Peres

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária, Área de Reprodução Animal.

Peres, Anelise Ribeiro
P437a Avaliação da taxa de concepção de novilhas e vacas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) com o uso de sêmen sexado na inseminação artificial ou embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* / Anelise Ribeiro Peres. – – Jaboticabal, 2014
xiii, 54 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014
Orientador: Joaquim Mansano Garcia
Banca examinadora: Cesar Roberto Esper, Marcos Brandão Dias Ferreira
Bibliografia

1. Embrião. 2. Estro. 3. Inseminação. 4. Sêmen sexado. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:636.082:636.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: AVALIAÇÃO DA TAXA DE CONCEPÇÃO DE NOVILHAS E VACAS (Bos taurus X Bos indicus) COM O USO DE SÊMEN SEXADO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL OU EMBRIÕES PRODUZIDOS in vivo E in vitro

AUTORA: ANELISE RIBEIRO PERES

ORIENTADOR: Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. CESAR ROBERTO ESPER

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. MARCOS BRANDÃO DIAS FERREIRA

Centro Tecnológico do Triângulo e Alto Paranaíba / Fazenda Experimental de Getúlio Vargas / EPAMIG / Uberaba/MG

Data da realização: 04 de julho de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ANELISE RIBEIRO PERES- nascida na cidade de Fernandópolis, SP, aos 16 dias do mês de julho do ano de 1987. Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Camilo Castelo Branco em fevereiro de 2005. Concluiu o curso de graduação em dezembro de 2009 com menção honrosa de melhor aluna do curso. Em janeiro de 2010 ingressou no Programa de Aprimoramento Profissional na Área de Clínica Médica e Cirúrgica de Grandes Animais (com bolsa) pela Universidade de Franca, concluiu o programa de aprimoramento em janeiro de 2012. Em março de 2012 iniciou o curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de mestrado, área de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, com bolsa da CAPES.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado, dando-me saúde e determinação para que eu conseguisse concluir mais uma etapa em minha vida.

Aos meus pais e irmã, que sempre me apoiaram, motivaram, e acreditaram, tanto nas horas difíceis, quanto nas alegrias.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Jaboticabal, pela estrutura física e oportunidade de realização deste trabalho.

Aos professores, pelos ensinamentos ministrados e contribuição fundamental na minha formação profissional. Em especial, ao meu orientador Prof^o Dr^o Joaquim Mansano Garcia, por ter me aceitado como orientada, pela sua paciência, e orientação na condução deste trabalho.

Ao professor Gener Tadeu Pereira, pela orientação nas análises estatísticas.

Aos colegas de pós-graduação Aderson, Marina e Guilherme, pela valiosa ajuda na condução e avaliação dos experimentos.

À CAPES pela bolsa de estudo.

Aos funcionários do laboratório em especial à Roberta pela ajuda, ensinamento e paciência durante os experimentos, ao Edson, Isabel e Ivo pelo auxílio.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Aspectos Reprodutivos de Gado Leiteiro	3
2.2 Influência da Categoria Animal na Reprodução	5
2.3 Cruzamento em Gado Leiteiro	6
2.4 Biotécnicas.....	9
3. HIPÓTESE	16
3.1 Experimento 1	16
3.1 Experimento 2.....	16
4. OBJETIVO.....	17
4.1 Experimento 1	17
4.1 Experimento 2.....	17
5. MATERIAL E MÉTODOS	18
5.1 Experimento 1	18
5.1.1. Locais e animais	18
5.1.2 Manejo Nutricional	18
5.1.3 Período Experimental.....	18
5.1.4 Inseminação Artificial	19
5.1.5 Diagnóstico de Gestação	20
5.2 Experimento 2.....	21
5.2.1 Locais e Animais	21
5.2.2 Período Experimental.....	22
5.2.3 Manejo Nutricional	23
5.2.4 Produção <i>in vitro</i> de Embriões	23

5.2.5 Produção <i>in vivo</i> de Embriões.....	25
5.2.6 Sincronização de Receptoras para Transferência de Embriões	27
5.2.7 Transferência de Embriões	28
5.2.8 Diagnóstico de Gestação	28
5.3 Análise Estatística.....	28
6. RESULTADOS	29
6.1 Experimento 1	29
6.2. Experimento 2	31
7. DISCUSSÃO	34
7.1 Experimento 1	34
7.2. Experimento 2	37
8. CONCLUSÕES	40
8.1. Experimento 1	40
8.2. Experimento 2	40
9. REFERÊNCIAS.....	41
APÊNDICES.....	52
Apêndice 1: PBS Completo.....	52
Apêndice 2: Meio maturação dos oócitos	52
Apêndice 3: Meio FIV gotas	52
Apêndice 4: Solução de Percoll 90%	53
Apêndice 5: Meio TL-Sêmen.....	53
Apêndice 6: Meio SOF	53
Apêndice 7: Meio HSOF	54



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 016926/13 do trabalho de pesquisa intitulado **"Avaliação da taxa de concepção de gado leiteiro submetido à transferência de embrião e inseminação artificial utilizando sêmen sexado e convencional"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 08 de agosto de 2013.

Jaboticabal, 08 de agosto de 2013.


Prof. Dr. Andriago Barboza De Nardi
Coordenador - CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

BE = Benzoato de estradiol
BEN = Balanço energético negativo
BSA = Albumina Sérica Bovina
CIV= Cultivo *in vitro*
CL = Corpo lúteo
CO₂ = Dióxido de carbono
DNA = Ácido desoxirribonucleico
ECC = Escore da condição corporal
eCG = Gonadotrofina coriônica equina
E₂ = Estradiol
FCAV = Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária
FIV = Fecundação *in vitro*
FSH = Hormônio folículo estimulante
g = Grama
GnRH= Hormônio liberador de gonadotrofinas
h = Hora
hCG = Gonadotrofina coriônica humana
HSOF = Meio fluído sintético de oviduto com tampão Hepes
IA = Inseminação Artificial
IATF = Inseminação Artificial em Tempo Fixo
kg = kilograma
L = Litro
LH = Hormônio luteinizante
m = metro
M = mol
mg = Miligrama
MHz = Mega hertz
MIV = Maturação *in vitro*
mL = Mililitro
mm = Milímetro

mM = Milimol

mmHg = Milímetros de mercúrio

MOET= Múltipla ovulação e transferência de embriões

n = Número

ng/mL = Nanograma/Mililitro

OPU =(ovum pick-up) – Aspiração folicular guiada por ultrassom

O₂ = Oxigênio

PBS = Solução salina em tampão fosfato

PGF₂α = Prostaglandina F₂α

pH = Potencial Hidrogeniônico

P4 = Progesterona

PIVE =Produção *in vitro* de embrião

SFB = Soro fetal bovino

SOF = Meio líquido sintético de oviduto

SOV = Superovulação

TCM 199 = Meio de cultivo de tecido 199

TE = Transferência de embrião

TETF= Transferência de embriões em tempo fixo

UI = Unidade internacional

UI/L = Unidade Internacional/Litro

vs = Versus

x = Vezes

µg = Micrograma

µL = Microlitro

µM = Micromol

% = Porcentagem

χ² = Qui-quadrado

= Igual

< = Menor

> = Maior

°C = Grau Celsius

AValiação DA TAXA DE CONCEPÇÃO DE NOVILHAS E VACAS (*Bos taurus* X *Bos indicus*) COM O USO DE SÊMEN SEXADO NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL OU EMBRIÕES PRODUZIDOS *in vivo* E *in vitro*

RESUMO – As biotecnologias da reprodução são utilizadas como uma alternativa para melhorar a eficiência reprodutiva e acelerar a produção de animais de alto valor zootécnico. Este estudo teve por objetivo avaliar a taxa de concepção de novilhas e vacas mestiças inseminadas com sêmen sexado e convencional (Experimento 1) e a taxa de concepção de novilhas e vacas mestiças submetidas a transferência de embriões produzidos *in vivo* (TE) e *in vitro* (PIVE) com sêmen sexado (Experimento 2). No experimento 1, sêmen sexado e convencional foram utilizados na inseminação de vacas (n=50) e novilhas (n=50) após 18-24 horas de observação de cio; no experimento 2 embriões produzidos *in vitro* (n=50) e *in vivo* (n=40) foram transferidos para vacas (n=45) e novilhas (n=45). Animais inseminados com sêmen sexado apresentaram taxa de concepção de 44% (11/25) para vacas e 52% (13/25) para novilhas e com sêmen convencional, a taxa de concepção foi de 72% (18/25) para vacas e 68% (17/25) para novilhas. A taxa de concepção obtida pela técnica de produção *in vitro* de embriões foi de 24% (6/25) para vacas e 28% (7/25) para novilhas e para os embriões produzidos *in vivo* foi de 45% (9/20) tanto para vacas como para novilhas. A técnica de IA com sêmen sexado apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparada com sêmen convencional, porém a categoria animal não teve diferença estatística ($p > 0,05$) (Experimento 1). Não foi observada diferença estatística ($p > 0,05$) entre as técnicas de produção *in vivo* e *in vitro* de embriões nem entre a categoria animal. Os resultados indicam que o intervalo entre a observação de cio e inseminação de 18-24 horas mostrou-se eficaz na concepção tanto de vacas como de novilhas utilizando sêmen sexado ou convencional, no entanto para se aproximar aos resultados obtidos pelo sêmen convencional há necessidade de mais pesquisas para melhorar a taxa de concepção com sêmen sexado (Experimento 1). As taxas de concepção com embriões PIVE em receptoras novilhas e vacas foram inferiores ao dos produzidos *in vivo*, ficando claro que o processo de produção de embriões *in vitro* para animais da raça Holandesa tem que ser aprimorado (Experimento 2).

Palavras-chave: embrião, estro, inseminação, sêmen sexado

EVALUATION OF THE CONCEPTION RATE OF HEIFERS AND COWS (*Bos taurus X Bos indicus*) WITH THE USE OF SEXED SPERM IN ARTIFICIAL INSEMINATION OR EMBRYOS PRODUCED *in vivo* AND *in vitro*

ABSTRACT – The reproduction biotechnologies are used as an alternative to improve reproductive efficiency and accelerate the production of animals of high performance zootechnical. This study aimed to evaluate the conception rate of heifers and cows crossbred inseminated with sexed semen and conventional (Experiment 1) and conception rate of heifers and cows crossbred receiving the transfer of embryos produced *in vivo* (TE) and *in vitro* (PIVE) with sexed semen (Experiment 2). In experiment 1, sexed and conventional semen were used for the insemination of cows (n = 50) and heifers (n = 50) after 18-24 hours of estrous observation; in experiment 2 embryos produced *in vivo* (n = 40) and *in vitro* (n = 50) were transferred to cows (n = 45) and heifers (n = 45). Animals inseminated with sexed semen showed conception rate from 44% (11/25) for cows and 52% (13/25) for heifers and with conventional semen, the conception rate was 72% (18/25) for cows and 68% (17/25) for heifers. The conception rate obtained by the technique of *in vitro* production of embryos was 24% (6/25) for cows and 28% (7/25) for heifers and for embryos produced *in vivo* was 45% (9/20) both for cows as for heifers. The technique of AI with sexed semen presented statistical difference (p <0.05) when compared with conventional semen, but animal category was not statistically different (p > 0.05) (Experiment 1). No statistical difference (p > 0.05) between the production techniques *in vivo* and *in vitro* embryo or between animal category was observed. The results indicate that the interval between estrous observation and insemination 18-24 hours was effective on conception of both cows and heifers using conventional and sexed semen, however to approximate of the results obtained by the conventional semen is no need to most research to improve conception rates with sexed semen (Experiment 1). Conception rates with embryos PIVE in heifers and cows recipients were lower than those produced *in vivo*, making it evident that the process of *in vitro* embryo production for Holstein animals have to be improved (Experiment 2).

Keywords: embryo, estrus, insemination, sexed semen.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o quarto produtor mundial de leite, superado apenas pelos EUA, Índia e China. Apresenta o segundo maior rebanho do mundo, no entanto a sua produtividade é baixa (FAO, 2012).

Sabe-se que animais puros da raça Holandesa, em razão do estresse nutricional, térmico, e alterações fisiológicas não manifestam todo o potencial genético para produção leiteira. O cruzamento com raças zebuínas pode ser uma ferramenta importante para beneficiar o desempenho produtivo e reprodutivo da atividade leiteira em ambientes tropicais, pois os melhores desempenhos das características produtivas são obtidos com animais mestiços (MCMANUS et al., 2008).

As biotécnicas também podem ser utilizadas como uma alternativa para melhorar a eficiência reprodutiva, sendo a inseminação artificial mais antiga e simples quando comparada com as outras, além de possuir várias vantagens quando comparada à monta natural (REICHENBACH et al., 2008a, SHNEIDER et al., 2009). Com o controle do estro e das ovulações através de tratamentos hormonais, a IA passou a assumir uma maior importância para a pecuária, já que a identificação do estro é um grande problema para o uso e o sucesso da IA (MORAES et al., 2008).

A transferência de embriões é outra biotécnica importante em um programa reprodutivo, é utilizada quando se deseja um aumento das taxas de reprodução de fêmeas com alto valor genético. Esta técnica possibilita que uma fêmea produza um número de descendentes muito superiores ao que seria possível obter durante toda sua vida reprodutiva (REICHENBACH et al., 2008b). Esta técnica pode também ser utilizada para minimizar os possíveis efeitos do ambiente uterino e lactação sobre o desenvolvimento embrionário, evitando a morte embrionária precoce (RODRIGUES et al., 2010).

A técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) é considerada a terceira geração de biotecnologia da reprodução, após a IA e MOET. Com essa técnica é possível acelerar a produção de animais geneticamente superiores, triplicando a produção de embriões em comparação com a múltipla ovulação e transferência de

embriões (WATANABE et al., 2008). A PIVE apresenta como vantagem a sua utilização em novilhas pré-púberes, vacas gestantes até o terceiro mês e pode ser realizada com intervalo de três a quatro dias, em animais com infertilidade adquirida inviáveis para as técnicas de IA e MOET como obstrução ou aderência tubárica, e em animais que não respondem mais a superovulação (WATANABE et al., 2008).

A utilização das biotécnicas associadas à utilização de sêmen sexado pode trazer vários benefícios para a produção animal (DE VRIES et al., 2008). O uso do sêmen sexado é utilizado pelo desejo de expansão do rebanho, crescimento do rebanho interno e progresso genético (WEIGEL, 2004). No entanto, a dose baixa de espermatozoides por inseminação e as reduções na qualidade do espermatozóide devido a danos durante a passagem pelo citômetro de fluxo tem resultado em menor fertilidade em comparação com o sêmen convencional (NORMAN; HUTCHISON; MILLER, 2010).

Os resultados de literatura avaliando as taxas de concepção de vacas e novilhas leiteiras utilizando da inseminação artificial com sêmen sexado ou embriões *produzidos in vitro* são poucos consistentes. Por este motivo avaliamos neste estudo se a taxa de concepção de vacas e novilhas mestiças submetidas à inseminação artificial com sêmen sexado é semelhante à do sêmen convencional, quando realizada 18 a 24 horas após observação de estro; e se a taxa de concepção de vacas e novilhas mestiças submetidas à transferência de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* utilizando sêmen sexado apresentam resultados satisfatórios para serem utilizadas na cadeia produtiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Reprodutivos de Gado Leiteiro

Algumas das reduções na eficiência reprodutiva de rebanhos leiteiros são devido à alta produção de leite estar associada com alterações na fisiologia reprodutiva (WILTBANK et al., 2006).

Vacas em lactação têm necessidades energéticas maiores do que as vacas não lactantes. O alto consumo de alimentos é exigido para atender a essas necessidades, o que leva a um aumento dramático no fluxo sanguíneo hepático e consequentemente eleva o metabolismo de estradiol e progesterona (SAGSRITAVONG et al., 2002).

O aumento do metabolismo causa uma redução nas concentrações de estradiol e progesterona circulante, mesmo em meio à alta produção de hormônios esteróides pelo folículo ou CL. Isso explica o fato de que vacas com elevada produção leiteira ovula folículos com diâmetros maiores, mas têm menores concentrações circulantes de estradiol (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004) e possui maior volume de tecido lúteo, mas progesterona circulante reduzida (LOPEZ et al., 2005).

O envolvimento crítico de estrógeno e progesterona em quase todos os aspectos da fisiologia reprodutiva faz com que alterações em seu metabolismo causem numerosas mudanças na reprodução, dentre elas relata-se a redução na duração da manifestação do estro, o aumento da taxa de dupla ovulação, a maior ocorrência de cistos foliculares, diminuição na taxa de concepção e a mortalidade embrionária precoce (WILTBANK et al., 2006, WALSH; WILLIANS; EVANS, 2011).

O balanço energético negativo (BEN) é outro fator que afeta animais de alta produção leiteira e que compromete a reprodução destes animais (SANTOS, 2009). Vacas de alta produção leiteira tem suas necessidades energéticas aumentadas no período pós-parto devido ao pico de lactação que ocorre entre 4 a 8 semanas pós-parto (WALSH; WILLIANS; EVANS, 2011). Esta necessidade é parcialmente

atendida pelo aumento do consumo alimentar, o restante é pela mobilização de reservas corporais, resultando em animais com BEN (GRUMMER, 2007).

O escore de condição corporal (ECC) é uma medida subjetiva, visual e tátil da condição corporal internacionalmente aceita e é usada para monitorar o estado nutricional e de saúde do animal (ROCHE et al., 2009). Baixo ECC juntamente com grave BEN suprime a secreção pulsátil de LH, reduz a capacidade de resposta do ovário e também reduz a competência funcional do folículo, e conseqüentemente a maturação oocitária e a capacidade de ovulação (DISKIN et al., 2003). Além disso, o estresse térmico pode agravar os efeitos do BEN de animais de alta produção, pois reduz o apetite desses animais que perde ECC pós-parto (DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003, SHEHAB -EL - DEEN et al., 2010, CHEBEL et al., 2004).

Vacas com BEN durante a lactação esta associada a baixas concentrações plasmáticas de insulina e IGF-I. A insulina e IGF-I atuam na reprodução através de efeitos diretos nas células do ovário, no desenvolvimento folicular e também sobre a secreção e a função dos receptores de gonadotrofinas (LUCY, 2008). Além disso, vacas leiteiras de alta produção com baixo ECC e BEN têm uma competência imune reduzida que pode levar a um aumento da incidência de claudicação, mastite e endometrite (WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011) e desenvolver doenças metabólicas, que incluem acidose, retenção de placenta e deslocamento de abomaso (MULLIGAN; DOHERTY, 2008).

A alta produção de leite, o aumento da ingestão alimentar e o aumento da taxa metabólica compromete os mecanismos de termorregulação levando o animal ao estresse térmico (SANTOS, 2009). O estresse térmico aumenta a liberação de cortisol e desta forma reduz a liberação de GnRH e, portanto, a frequência dos pulsos de LH causando vários transtornos reprodutivos como, o aumento do intervalo entre parto e primeira ovulação, o aumento da incidência de anestro e cio silencioso, a redução na qualidade do oócito e desenvolvimento embrionário inicial, diminuição na concentração plasmática e folicular de glicose, IGF-I e colesterol, aumento na concentração plasmática e folicular de uréia e ácidos graxos não esterificados e diminuição da taxa de concepção (FERNANDES et al., 2005, DOBSON et al., 2007, DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003).

2.2 Influência da Categoria Animal na Reprodução

A redução do desempenho reprodutivo e as taxas de concepção mais baixas de vacas em lactação estão intimamente associadas com o progresso genético para alta produção de leite. Em contrapartida, a fertilidade de novilhas Holandesas manteve-se relativamente estável ao longo dos anos e marcadamente mais elevada do que a de vacas em lactação. Possíveis diferenças na qualidade dos oócitos e os níveis de esteróides foliculares podem ser associados com a baixa fertilidade das vacas em lactação de alta produção (ROTH; INDAR; ARAV, 2008).

O desempenho reprodutivo de vacas em lactação é multifatorial com associação de alterações fisiológicas e endócrinas durante o período de lactação. A duração da lactação é altamente desfavorável e relacionada com a fertilidade, o alto pico de lactação provoca uma deficiência moderada de fertilidade como atraso no primeiro serviço, menor taxa de concepção e serviços repetidos (TIEZZI et al., 2012). Além disso, vacas em lactação têm uma maior incidência de falha na ovulação após a luteólise e de ovulações múltiplas do que novilhas (SARTORI et al., 2004).

A duração da dominância do folículo ovulatório tende a ser mais longa em vacas lactantes do que em novilhas. Concentrações de estradiol durante o estro, o pico de LH pré-ovulatório e a concentração de progesterona do dia 3 aos 16 do ciclo também foram maiores nas novilhas do que em vacas lactantes. Os baixos níveis de progesterona antes ou depois da IA podem estar envolvidos na baixa fertilidade das vacas lactantes (WOLFENSON et al., 2004).

O estresse térmico também está associado com a baixa fertilidade de vacas lactantes (ROTH; INDAR; ARAV, 2008), a este respeito, foi registrada uma baixa taxa de fertilização e baixa proporção na qualidade embrionária de vacas lactantes em relação às novilhas durante temperaturas altas do verão, porém, a qualidade embrionária durante o inverno também se manteve inferior em vacas lactantes em comparação com vacas secas. Isto se deve a alterações metabólicas referentes ao balanço energético negativo pós-parto que prejudicam os componentes do fluido folicular que por sua vez afeta a competência e o desenvolvimento do oócito (SARTORI et al., 2002).

A composição do fluido folicular é um fator importante que afeta a maturação do oócito e subsequente desenvolvimento embrionário inicial. Maiores concentrações de ácidos graxos saturados foram encontrados no fluido folicular de vacas lactantes do que em novilhas, e isto leva a um impacto negativo sobre a maturação do oócito e desenvolvimento embrionário (BENDER et al., 2010).

O oviduto fornece o ambiente favorável para a fecundação e desenvolvimento embrionário inicial, a diferença no ambiente do oviduto entre vacas e novilhas pode influenciar o desenvolvimento embrionário precoce. O fator de crescimento semelhante à insulina é um importante contribuinte para este ambiente (SWANGCHAN-UTHAI et al., 2011). Swangchan-Uthai et al. (2011), observaram que o oviduto de uma novilha no momento do estro e no início da fase lútea é exposto a alta concentração de IGF-I, em contraste, uma vaca em lactação tem menor circulação IGF-I e reduzida expressão de proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina no oviduto (IGFBP).

2.3 Cruzamento em Gado Leiteiro

O objetivo da criação de gado leiteiro é aumentar a eficiência na produção de leite, e os produtores consideram o cruzamento como uma alternativa para atingir este objetivo. Fácil acesso ao material genético a partir de vários lugares do mundo, juntamente com a padronização das avaliações genéticas e forte concorrência entre as várias raças, são alguns dos fatores que estão fazendo o cruzamento cada vez mais viável (CARAVIELLO, 2004).

Vacas de alta produção têm intervalos mais longos entre as primeiras ovulações, maior incidência de anestro, fase lútea anormal, baixa concentração plasmática de progesterona, estradiol e IGF-I, maior taxa de dupla ovulação e maior perda embrionária, ou seja, têm menor eficiência reprodutiva. O declínio na fertilidade de vacas holandesas é uma grande preocupação e pode ser causada por uma combinação de fatores fisiológicos. A alta produção de leite, o aumento do rebanho, confinamento, estresse térmico, saúde do animal, e o aumento da endogamia também contribuem para diminuir a fertilidade (LUCY, 2001).

Na tentativa de melhorar a produtividade dos sistemas de produção de leite sob condições tropicais, tem-se utilizado em larga escala o cruzamento de raças zebuínas, que apresentam excelente adaptação às condições tropicais, com raças de origem européia, especializadas em produção de leite. Isso ocorre, geralmente, em razão de sérios problemas de adaptação de raças taurinas especializadas sob condições tropicais (FACÓ et al., 2005).

O estresse térmico provoca grandes reduções na fertilidade em vacas leiteiras em lactação. A magnitude do problema é aumentada porque melhorias na produção de leite têm tornado mais difícil para as vacas regular a sua temperatura corporal durante o clima quente (HANSEN, 2007). Os efeitos nocivos do estresse térmico sobre a fertilidade em bovinos são menos pronunciados em raças tolerantes ao calor. A exposição de embriões no quinto dia após a inseminação ao choque térmico causa diminuição do desenvolvimento para a fase de blastocisto e redução do número de células por embrião. No entanto, os embriões de vacas zebuínas são mais resistentes ao choque térmico do que embriões de vacas taurinas, isso indica que o choque térmico é menos pronunciado por raças resistentes ao calor (PAULA-LOPEZ et al., 2003).

A alta temperatura ambiental resulta em uma queda acentuada na qualidade de oócitos recuperados de vacas *Bos taurus* e diminui a sua capacidade de desenvolvimento *in vitro*. Por outro lado, uma elevada percentagem de oócitos recuperados de vacas *Bos indicus* exibe morfologia normal e produz uma elevada percentagem de blastócitos, independentemente da estação. A qualidade comprometida do oócito devido aos efeitos do estresse térmico desempenha um importante papel na diminuição da fertilidade exibida por raças sensíveis ao calor durante períodos de elevadas temperaturas ambientais (ROCHA et al., 1998).

Dessa forma, o cruzamento é favorável tratando-se de climas tropicais (MCDOWELL, 1985), onde as raças leiteiras de alta produção estão menos adaptadas ao ambiente do que raças mestiças, considerando-se a sua adaptabilidade para produzir leite sob condições estressantes, como por exemplo, o estresse térmico (PONTES et al., 2010).

A eficiência reprodutiva é importante para se alcançar maior produtividade e rentabilidade do sistema de produção de leite. A lucratividade está diretamente

relacionada com o período de serviço e com o intervalo de partos, já que seu aumento diminui o número de crias por vida útil da vaca e a produção de leite. Vacas mestiças apresentam alta eficiência reprodutiva, com rápido retorno à atividade ovariana no pós-parto e intervalos de parto ideais, de 12 meses. Assim, pode-se obter maior produção de leite e de crias durante a vida produtiva do animal (BORGES; CARVALHO; RUAS, 2009). Animais mestiços têm maior taxa de concepção ao primeiro serviço (HEINS; HANSEN; SEYKORA, 2006, HEINS; HANSEN, 2012), maior taxa de prenhez (HEINS; HANSEN, 2012), menor período de serviço (HEINS; HANSEN; SEYKORA, 2006, HEINS; HANSEN, 2012, SCHAEFFER et al., 2011), maior taxa de não retorno ao cio, menos serviços, comprimento de gestação mais curto (SCHAEFFER et al., 2011), maior sobrevivência aos 30, 150 e 305 dias pós-parto comparados com animais puros da raça Holandesa (HEINS; HANSEN; SEYKORA, 2006). A superioridade de vacas mestiças para a fertilidade e sobrevivência em comparação com vacas puras da raça Holandesa resultou em um maior número de partos durante um período maior de vida (HEINS et al., 2012).

A dificuldade de parto é também um problema importante da raça Holandesa, cerca de 23% de novilhas dessa raça têm problemas de parto e 28% desses partos os bezerros morrem ao nascer (CARAVIELLO, 2004). Novilhas e vacas mestiças têm natimortalidade mais baixos devido a ter bezerros menores e facilidade de parto (SCHAEFFER et al., 2011). Já animais puros da raça Holandesa têm maior peso ao nascer do que animais mestiços (OLSON et al., 2009). Assim, entre as raças leiteiras, a criação da raça Holandesa pura é associada com um risco aumentado de distocia em comparação com cruzamentos com outras raças leiteiras (MEE, 2008). A reduzida mortalidade neonatal de bezerros nascidos de fêmeas mestiças no primeiro parto é uma vantagem potencial para os produtores. O uso do cruzamento entre raças pode ser realizado para diminuir a mortalidade de bezerros e aumentar a facilidade do parto em comparação com o uso de raças puras (HEINS et al., 2008, DHAKAL et al., 2013). As diferenças de raça e heterose são fatores importantes na sobrevivência do bezerro, porque os animais de raça pura têm pior desempenho do que os animais mestiços (CARAVIELLO, 2004).

Um importante resultado dos cruzamentos é a heterose, que é o produto de uma maior diversidade de genótipos que aumentaria a probabilidade de adaptação

às condições ambientais (VASCONCELLOS et al., 2003). A endogamia na maioria das raças leiteiras está a aumentar a um ritmo de 2% a 3% por década, e essa preocupação também faz o cruzamento entre raças cada vez mais atraente. Perdas devido à depressão por endogamia pode ser recuperado quando duas raças diferentes puras são cruzadas. No gado leiteiro, a consangüinidade pode comprometer a fertilidade, saúde e efeitos maternos (CARAVIELLO, 2004).

Outro benefício que o cruzamento proporciona para o produtor é o aumento dos componentes do leite como proteína e gordura e que conseqüentemente aumenta o valor do seu produto. Há uma grande diferença entre as raças na composição do leite, o que é muito importante para a indústria do queijo e determina o preço do leite em diversos mercados. Isso faz com que o cruzamento seja mais rentável onde um prêmio substancial é colocado em porcentagem de gordura e proteína (CASSEL; MCALLISTER, 2009, LUNDGREN, 2011, CARAVIELLO, 2004).

Apesar de animais holandeses produzirem um volume maior de leite do que animais mestiços, o mercado agrega um maior valor pelos componentes do leite o que compensaria as perdas na produção com o cruzamento, além de um maior ganho econômicas devido à melhoria da saúde e fertilidade desses animais (HEINS; HANSEN; SEYKORA, 2006, WEIGEL e BARLASS, 2003, SCHAEFFER et al., 2011).

O cruzamento do gado leiteiro está sendo explorada principalmente pelo seu potencial para melhorar a facilidade de parto, fertilidade, saúde, e a sobrevivência das vacas. Vantagens para essas características funcionais irão compensar a perda do potencial de produção de vacas mestiças (HEINS; HANSEN, 2012).

2.4 Biotécnicas

A Inseminação artificial é indispensável quando se quer o melhoramento genético do rebanho e aumento da eficiência reprodutiva. Trata-se da biotécnica mais antiga e simples quando comparada com as outras (REICHENBACH et al., 2008a). Em relação à monta natural, a inseminação artificial possui várias vantagens como controle de doenças transmitidas sexualmente, aumento do ganho genético para características desejáveis, concentração dos partos em épocas mais propícias

do ano, redução de despesas referentes à manutenção de reprodutores (SHNEIDER et al., 2009), maior número de descendentes por reprodutor, redução de partos distócicos, facilidade de implementação de programas de cruzamento, utilizando touros da raça européia, redução de risco de acidentes tanto com as fêmeas durante a cobertura quanto para funcionários da propriedade (REICHENBACH et al., 2008a).

Vários trabalhos são desenvolvidos com o objetivo de aumentar o sucesso da inseminação artificial (BISINOTTO et al., 2010, FORRO et al., 2012, PEREIRA et al., 2014).

Com o controle do estro e das ovulações através de tratamentos hormonais, a IA passou a assumir uma maior importância para a pecuária, já que na intensificação da produção a identificação do estro é um problema para o uso e o sucesso da IA. Adicionalmente uma maior concentração de inseminações pode ser realizada, facilitando o emprego da técnica pela redução do período do controle do estro e permitindo a concentração dos partos em épocas desejáveis (MORAES et al., 2008).

Portanto, a eficiência da IA não depende apenas da qualidade do sêmen, mas do manejo reprodutivo, sanitário e nutricional da propriedade, das condições sanitárias do rebanho, da observação do estro, da inseminação no momento mais propício, da correta manipulação do sêmen, da técnica de inseminação, da experiência do inseminador (REICHENBACH et al., 2008a), de fatores climáticos antes e após a IA (LÓPEZ-GATIUS, 2012), da dose do sêmen utilizada (ANDERSON et al., 2004), do programa de sincronização (BISINOTTO et al., 2010, PEREIRA et al., 2014) e da utilização da suplementação com progesterona após a IA (FORRO et al., 2012).

A transferência de embriões (TE) é outra biotécnica importante em um programa reprodutivo, no entanto é utilizada quando se deseja um aumento das taxas de reprodução de fêmeas com alto valor genético. Esta técnica possibilita que uma fêmea produza um número de descendentes muito superiores ao que seria possível obter durante toda sua vida reprodutiva, seja pela monta natural ou pela inseminação artificial. Além do melhoramento zootécnico, pode ser empregada para obter descendentes de fêmeas geneticamente superiores que devido a distúrbios reprodutivos adquiridos são impossibilitadas de levar uma gestação a termo (REICHENBACH et al., 2008b). O uso da tecnologia de transferência de embriões

(TE) pode melhorar a produção do rebanho. Os sistemas de criação empregando a técnica de múltipla ovulação e transferência de embriões múltipla (MOET) obtiveram uma maior taxa de resposta genética que os atuais programas de testes de progênie de IA (HOSSEIN-ZADEH, 2010).

Um grande esforço tem sido realizado ao longo dos anos para melhorar os protocolos de superovulação. Esses avanços ajudam na aplicação generalizada da tecnologia de transferência de embriões em todo o mundo. A superovulação sincronizada de folículos pode ser conseguida por iniciar os tratamentos com FSH quatro dias após a administração de estradiol e progesterona, dois dias após a ablação do folículo dominante, ou de 1,5 a 2 dias após a ovulação induzida por GnRH (BÓ; MAPLETOFT, 2014). Resultados de superovulação são influenciados por diferenças individuais e ambientais. A dose hormonal e idade do animal para a superovulação deve ser considerada no momento da definição dos procedimentos a fim de obter os resultados desejados (PEIXOTO et al., 2006). As doses de FSH recomendadas variam entre as raças zebuínas e a raças taurinas. Além disso, a IATF de doadoras pode ser realizada com sucesso, mas o intervalo ideal de remoção do dispositivo de progesterona ao tratamento GnRH diferem entre raças. Há uma enorme variação individual em resposta à superovulação, e a população folicular nos ovários de doadoras é uma ferramenta que auxilia a selecionar os animais que tem uma maior chance de responder aos tratamentos superestimulatórios (BÓ; MAPLETOFT, 2014).

Os avanços da biologia molecular poderá também mostrar outros fatores que influenciam a dinâmica folicular, bem como a identificação de genes que desempenham papéis importantes na função folicular e levar a caminhos que influenciam a expressão do gene ou os seus produtos para aumentar o recrutamento do folículo e diminuir ou adiar atresia folicular (BÓ; MAPLETOFT, 2014).

Outro fator que influencia a taxa de prenhez é a transferência de embriões frescos ou congelados, pois, receptoras que recebem embriões frescos apresentam melhores resultados do que animais que receberam embriões congelados (WALLACE et al., 2011).

Em razão de taxas adequadas de ovulação, o uso de protocolos permitiu a transferência de embriões em tempo fixo (TETF) sem prévia observação de cio,

empregando apenas a avaliação do corpo lúteo no momento da inovulação dos embriões (BARREIROS et al., 2006)

A transferência de embriões pode também ser utilizada para minimizar os possíveis efeitos do ambiente uterino e lactação sobre o desenvolvimento embrionário, promovendo maiores taxas de prenhez e, conseqüentemente, evitando a morte embrionária precoce (RODRIGUES et al., 2010).

A técnica de produção *in vitro* de embriões (PIVE) é considerada a terceira geração de biotecnologia da reprodução, após a IA e MOET. Com a técnica de aspiração folicular (OPU) acompanhada da PIVE, é possível acelerar a produção de animais geneticamente superiores e apresenta como vantagem a sua utilização em novilhas pré-púberes, vacas gestantes até o terceiro mês, pode ser realizada com intervalo de três a quatro dias, em animais com infertilidade adquirida inviáveis para as técnicas de IA e MOET como obstrução ou aderência tubárica e em animais que não respondem mais a superovulação (WATANABE et al., 2008). Com a PIVE, é possível triplicar a produção de embriões quando se compara com a técnica de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET) (WATANABE et al., 2008). A produção *in vitro* de embriões (PIVE) envolve três etapas, maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo (CIV) *in vitro*, (GONÇALVES et al., 2008). O principal problema da PIVE é a variabilidade dos resultados que ocorre tanto no número de folículos aspirados como no desenvolvimento embrionário e taxa de prenhez. Desta forma, a PIVE é alvo de muitas pesquisas que tem por objetivo melhorar a sua utilização (WATANABE et al., 2008). A PIVE proporciona o acesso a uma quantidade extra de embriões em diferentes fases. Mas a qualidade desses embriões não reflete a qualidade dos embriões produzidos *in vivo* (BESENFELDER et al., 2010).

A utilização das biotécnicas associadas à utilização de sêmen sexado pode trazer vários benefícios para a produção animal. A aplicação de sêmen sexado permite que os produtores de leite selecionem seus rebanhos a produzir novilhas de reposição de animais geneticamente superiores (DE VRIES et al., 2008). O uso do sêmen sexado é utilizado pelo desejo de expansão do rebanho, crescimento do rebanho interno, progresso genético e aumento de biossegurança (WEIGEL, 2004).

A utilização do sêmen sexado pode aumentar a eficácia dos programas de testes de progênie de IA, bem como a eficiência de ovulação múltipla e transferência de embriões (MOET) e programas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) resultando em maior proporção de nascimentos com o sexo desejado (WEIGEL, 2004).

Utilizando sêmen sexado X para acasalar novilhas diminui substancialmente a incidência de problemas de parto como a distocia, pois fêmeas são menores que os machos (WEIGEL, 2004).

Um adicional do benefício do sêmen sexado, é a biossegurança. Na busca de expandir o rebanho os produtores adquirem animais de leilões, negociantes de gado ou outros agropecuaristas. Quando estes animais chegam à fazenda podem expor os outros animais a novos patógenos, aumentando a taxa de descarte devido a doenças. Como resultado, o produtor precisa de mais substituições, e o ciclo continua. A disponibilidade de sêmen sexado permite aos produtores expandir a partir de um rebanho fechado e evitar tais problemas. No entanto, sem a utilização do sêmen sexado tal expansão torna-se impossível (WEIGEL, 2004).

A citometria de fluxo é um método confiável de separação de espermatozoides, no entanto, ainda é lento em relação à exigência de sêmen de rebanhos leiteiros comerciais. Espermatozoides são diferenciados com base na quantidade de DNA, pois o espermatozoide que carrega o cromossomo X contém aproximadamente 3,8% mais DNA do que o que carrega o cromossomo Y (WEIGEL, 2004, GARNER; SEIDEL, 2008). No entanto, a diferenciação sexual causa danos aos espermatozoides, comprometendo a motilidade e conseqüentemente sua função e capacidade de fertilização (VAZQUEZ et al. , 2008, CARVALHO et al., 2009).

Dados os desafios associados com a velocidade de separação dos espermatozoides, o número de espermatozoides sexado é geralmente baixo, cerca de dois milhões de espermatozoides por palheta, que é consideravelmente menor do que os vinte milhões de espermatozoides por palheta de sêmen convencional. Devido à melhor taxa de concepção observada em novilhas do que animais lactantes, o sêmen sexado é recomendado para uso em novilhas (OLYNK; WOLF, 2007).

Os efeitos combinados da dose baixa de espermatozoides por inseminação e reduções na qualidade do esperma e viabilidade devido a danos durante o processo de separação tem resultado em menor taxa de concepção da AI em comparação com o sêmen convencional (NORMAN; HUTCHISON; MILLER, 2010).

Em geral, a taxa de concepção com uso de sêmen sexado é em torno de 60% a 90% da observada na utilização do sêmen convencional (SCHENK et al., 2009, HEALY.; HOUSE; THOMSOM, 2013, DEJARNETTE; NEBEL; MARSHALL, 2009, DEJARNETTE et al., 2010).

Norman, Hutchison e Miller (2010) observaram uma menor taxa de concepção tanto em novilhas como em vacas da raça Holandesa inseminadas com sêmen sexado em comparação com sêmen convencional. Porém, ambos relataram que com a utilização de sêmen sexado houve uma redução de partos distócicos em novilhas e vacas com utilização de sêmen sexado para fêmea.

Outros autores também observaram que a inseminação artificial com sêmen convencional apresentou resultados melhores do que com sêmen sexado (BODMER et al., 2005, ANDERSON et al., 2006, SÁ FILHO et al., 2013, MALLORY et al., 2013, SALES et al., 2011, SEIDEL JÚNIOR; SCHENK, 2008).

Vários estudos são realizados com o intuito de melhorar os resultados do sêmen sexado para que se possa expandir a técnica, no entanto é necessário que se desenvolva protocolos que facilitem seu uso em conjunto com a IATF (SEIDEL JÚNIOR et al., 1999, DEJARNETTE et al., 2010, DEJARNETTE et al., 2011, SALES et al., 2011, SEIDEL JÚNIOR; SCHENK, 2008, SÁ FILHO et al., 2010, MALLORY et al., 2013).

O fornecimento de sêmen sexado é limitado e dispendioso. Assim, utilizá-lo em programas de MOET e PIVE tem tornado esta técnica economicamente viável, pois, produz um grande número de fêmeas com a utilização de uma menor quantidade de sêmen em comparação com a técnica de inseminação artificial (MC CULLOCK et al., 2013, HAYAKAWA et al., 2009, PONTES et al., 2010).

Comparando sêmen sexado e não sexado em programas de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET) de novilhas holandesas não se observou diferença nas taxas de embriões transferíveis, degenerados, óvulos não fertilizados e na taxa de concepção (HAYAKAWA et al., 2009).

Schenk, Suh e Seidel Júnior (2006) não observaram diferença na taxa de concepção de embriões produzidos *in vivo* entre sêmen sexado e convencional. Já Peippo et al. (2009) obtiveram um menor número de embriões transferíveis e maior número de oócitos não fertilizados no grupo inseminados com sêmen sexado do que com o convencional tanto para novilhas quanto para vacas. Soares et al. (2011) também tiveram uma menor produção de embriões com a utilização do sêmen sexado em comparação com o convencional.

Mesmo com essa diferença encontrada em diversos trabalhos utilizando sêmen sexado na MOET, a vantagem de se utilizar o sêmen sexado é a porcentagem maior de embriões do sexo desejado o que compensaria essas perdas (SCHENK; SUH; SEIDEL JÚNIOR, 2006, PEIPPO et al., 2009, HAYAKAWA et al., 2009).

Existem várias preocupações sobre a implementação da tecnologia do sêmen sexado que incluem a fertilidade aparente menor de espermatozoides, a menor sobrevivência dos espermatozoides após a criopreservação e do reduzido número de espermatozoides que poderiam ser separados em um período de tempo especificado. Um atributo muito atraente de usar espermatozoides sexados para a PIVE é que consideravelmente menos espermatozoides são necessários para a fertilização *in vitro* (WHEELER et al., 2006). Além de que a fertilização *in vitro* pode ser eficientemente implementada para produzir animais de um sexo desejado para fins de expansão do rebanho, substituição genética rápida, manejo do rebanho e ganho econômico (XU; CHAUBAL; DU, 2009) e se mostra eficiente para a PIVE (PONTES et al., 2010).

As taxas de concepção para embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado foram inferiores aos produzidos com sêmen convencional (WILSON et al., 2005). Ao contrario do observado por Rasmussen et al. (2013) que não teve diferença na taxa de concepção de embriões produzidos *in vitro* entre sêmen sexado e convencional.

Trigal et al. (2012) tiveram na PIVE uma maior taxa de blastocisto eclodido com utilização de sêmen convencional do que com sexado. Blondin et al. (2009), também tiveram melhores resultados na produção de blastocisto produzidos *in vitro* com utilização de sêmen convencional do que sexado.

3. HIPÓTESE

3.1 Experimento 1

- Fêmeas mestiças leiteiras inseminadas com sêmen convencional apresentam maior taxa de concepção que as inseminadas com sêmen sexado.
- Nulíparas apresentam maior taxa de concepção do que múltiparas com a utilização de sêmen sexado

3.1 Experimento 2

- A taxa de concepção é maior em animais transferidos com embriões produzidos *in vivo* do que *in vitro* e em nulíparas comparadas com múltiparas.

4. OBJETIVO

4.1 Experimento 1

Avaliar a taxa de concepção para sêmen convencional e sexado entre nulíparas e múltiparas leiteiras mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*)

4.1 Experimento 2

Avaliar a taxa de concepção para embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* e entre nulíparas e múltiparas leiteiras mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Experimento 1

5.1.1. Locais e animais

As inseminações artificiais foram realizadas em propriedades localizadas no município de Guarani D'Oeste, estado de São Paulo, com latitude 20° 04' 29" sul e longitude 50° 20' 22" oeste, com precipitação média anual de 1196 mm e temperatura média anual de 22,7 °C.

Foram utilizadas 50 vacas mestiças (1/2 e 3/4, *Bos taurus* x *Bos indicus*) lactantes (média de 16 litros/ dia /sistema a pasto) com até três partos e todas com mais de 60 dias pós-parto e 50 novilhas mestiças púberes (1/2, 3/4, *Bos taurus* x *Bos indicus*), totalizando 100 animais, os animais apresentaram ECC 3 a 3,5. Os animais tiveram o ciclo estral sincronizado, mas não a ovulação, pois, a inseminação era realizada 18-24 horas após a observação de cio.

5.1.2 Manejo Nutricional

Os animais de ambas as categorias eram mantidos em pastagem de Tifton 85 (*Cynodon spp.*) e capim-mombaça (*Panicum maximum*), sal e água *ad libitum*. Para as vacas lactantes além da pastagem era fornecido concentrado com 23% de proteína bruta (PB) na proporção de 1 Kg de ração para 3 Kg de leite.

5.1.3 Período Experimental

Com a técnica de inseminação artificial comparou-se a taxa de concepção entre as categorias e o sêmen utilizado, 25 vacas e 25 novilhas foram inseminadas

com sêmen convencional e 25 vacas e 25 novilhas foram inseminadas com sêmen sexado. As inseminações foram realizadas no período de novembro de 2013 a janeiro de 2014. Os dados de temperatura e precipitação durante o período experimental foram obtidos na Estação Agrometeorológica de Populina, situada a aproximadamente 25 km da propriedade (UNESP, 2014) e encontram-se na Figura 1.

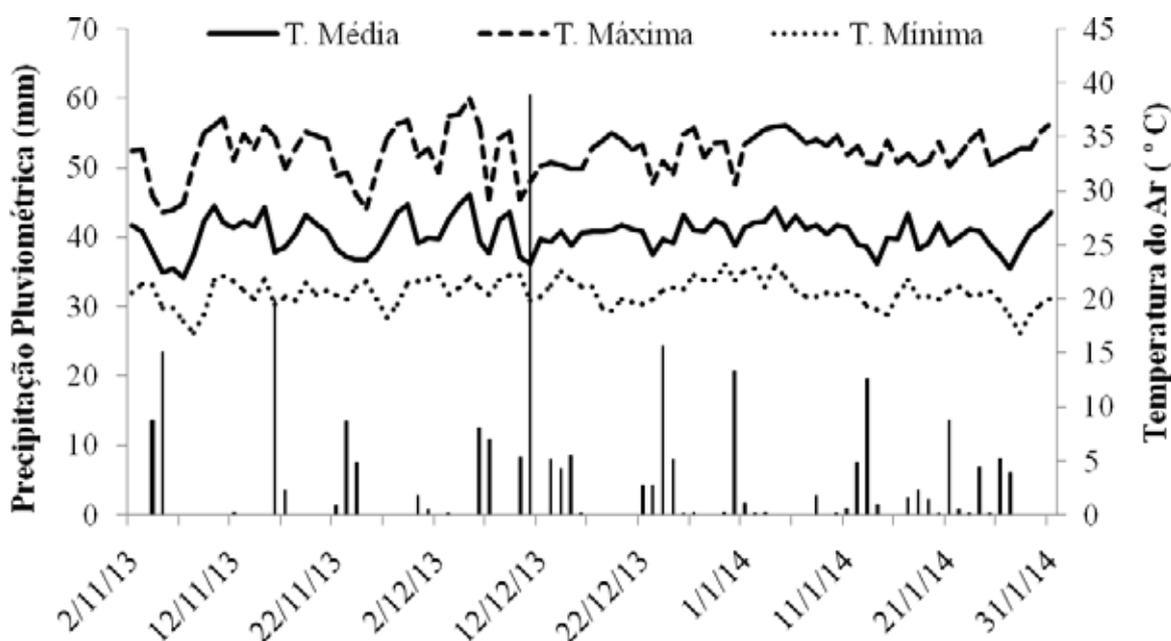


Figura 1. Temperatura e precipitação durante os meses de novembro de 2013 a janeiro de 2014

5.1.4 Inseminação Artificial

O protocolo de sincronização do ciclo estral foi realizado em dia aleatório do ciclo estral D0, com a inserção de dispositivo intravaginal com 1g de progesterona (P4) (Sincrogest® Ourofino, Brasil) e aplicação intramuscular de 2mg de benzoato de estradiol (BE) (Sincrodiol® Ourofino, Brasil). No quinto dia (D5), foi realizada uma aplicação intramuscular de 200UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG), (Folligon®, Intervet, Brasil). No oitavo dia (D8), o dispositivo de progesterona foi

retirado, e aplicado por via intramuscular 500 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ourofino, Brasil), o cio foi observado 3 vezes ao dia (06:00h/ 12:00h/ 18:00h) por um período de 1 hora (cada observação) e após a detecção do cio os animais foram inseminados 18 a 24 após, conforme está ilustrado na Figura 2.

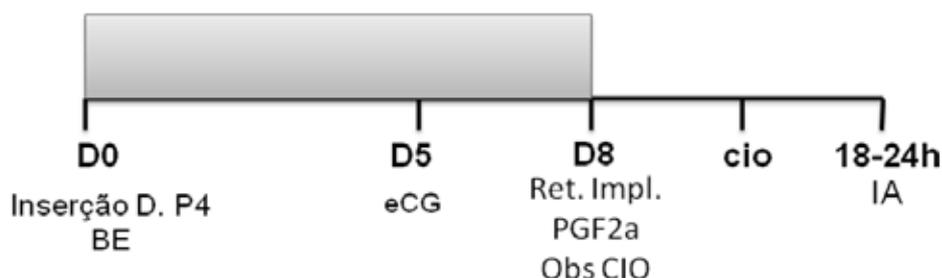


Figura 2. Protocolo de sincronização do ciclo estral de novilhas e vacas para inseminação artificial com sêmen convencional e sexado 18 a 24 horas após a observação do cio.

Vacas (n= 25) e novilhas (n =25) foram inseminadas com sêmen convencional e da mesma forma com sexado, totalizando 100 animais.

As palhetas foram descongeladas a 36°C por 30 segundos, colocadas na bainha e aplicador, o depósito do sêmen no sistema reprodutor da fêmea foi procedido no corpo do útero, após a inseminação foi realizada massagem do clitóris por 10 segundos.

As inseminações foram realizadas por um mesmo inseminador. Foi utilizado o sêmen do mesmo touro da raça Gir na inseminação artificial com sêmen convencional e sexado adquirido de uma central de inseminação.

Os animais inseminados foram provenientes de três propriedades do município de Guarani D'Oeste, SP.

5.1.5 Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado 30 a 40 dias após a data da inseminação utilizando o aparelho de ultra-som Aloka SSD-900 V (Corometrics

Medical Systems Inc., Wallingford, CT, USA) e transdutor linear trans-retal UST- 7,5 MHz.

5.2 Experimento 2

5.2.1 Locais e Animais

A aspiração folicular guiada por ultrassom para a produção *in vitro* de embriões, foi realizada na fazenda experimental Marcelo Mesquita Serva da Universidade de Marília-Unimar e levados para o laboratório de reprodução animal da Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP, onde os embriões foram produzidos. A produção de embriões *in vivo* através da múltipla ovulação foi realizada no Setor de Granja Laitaria da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP. As transferências dos embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* foram realizadas em propriedades localizadas na cidade de Guarani D'Oeste, Estado de São Paulo.

Foram utilizadas como doadoras para a produção *in vitro* de embriões 7 vacas secas e 7 novilhas da raça Holandesa que tiveram seus folículos ovarianos aspirados com intervalo de 21 dias, totalizando 4 aspirações. Para doadoras de embriões produzidos *in vivo* foram utilizadas 2 vacas secas e 5 novilhas da raça Holandesa, os animais foram superovulados com intervalo de 45 dias, totalizando 3 superovulações.

Para as receptoras foram utilizadas 45 vacas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) lactantes (média de 16 litros/ dia /sistema a pasto) com até três partos e todas com mais de 60 dias pós-parto e 45 novilhas mestiças púberes (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*), os animais apresentaram ECC 3 a 3,5. Vacas e novilhas usadas como receptoras tiveram seu ciclo estral e ovulação sincronizados através da administração hormonal exógena.

5.2.2 Período Experimental

Com o objetivo de comparar a taxa de concepção entre as categorias de animais e as técnicas utilizadas, transferiram-se embriões produzidos *in vivo* para 20 vacas e 20 novilhas, do mesmo modo foram transferidos embriões produzidos *in vitro* para 25 vacas e 25 novilhas no período de agosto a dezembro de 2013.

Tanto para os embriões produzidos *in vivo* quanto os *in vitro* foi utilizado o sêmen sexado do mesmo touro adquirido de uma central de inseminação.

Os dados de temperatura e precipitação durante o período experimental foram obtidos na Estação Agrometeorológica de Populina, situada a aproximadamente 25 km da propriedade (UNESP, 2014) e encontram-se na Figura 3.

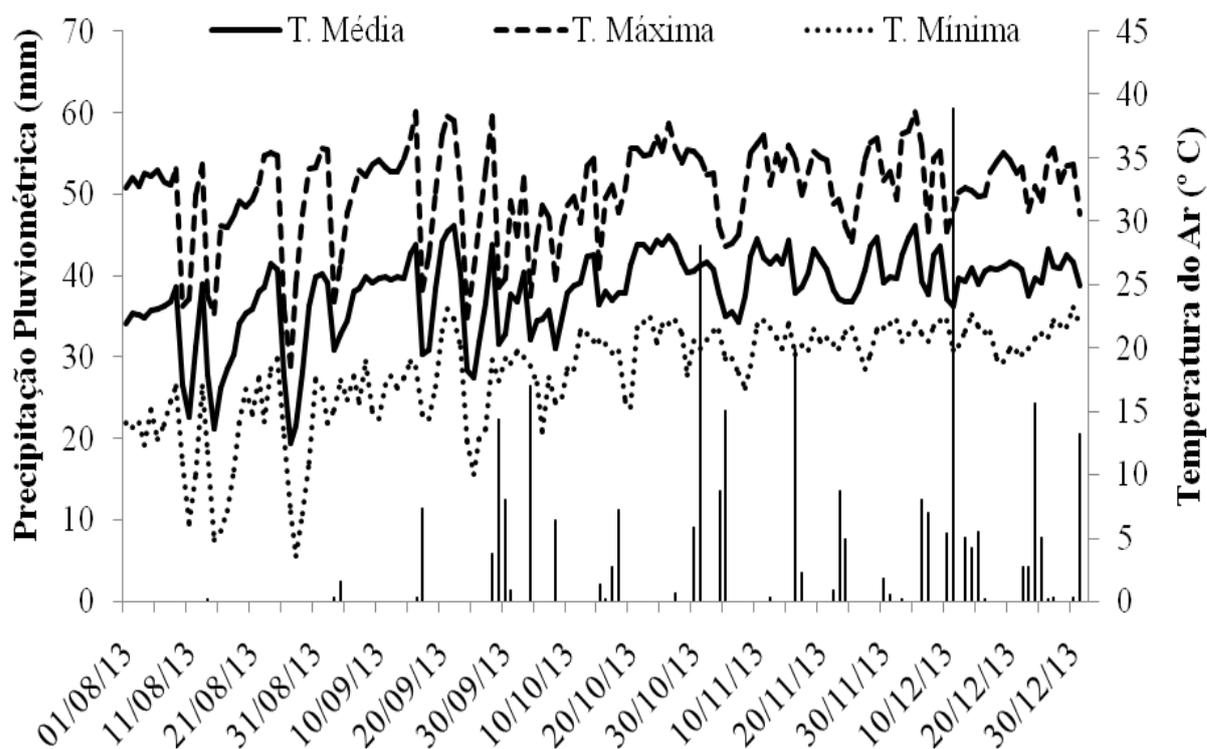


Figura 3. Temperatura e precipitação durante os meses de agosto a dezembro de 2013

5.2.3 Manejo Nutricional

Os animais de ambas as categorias no período chuvoso eram mantidos em pastagem de Tifton 85 (*Cynodon spp.*) e capim-mombaça (*Panicum maximum*), sal mineral e água *ad libitum*. Para as vacas lactantes além da pastagem era fornecido concentrado com 23% de proteína bruta (PB) na proporção de 1 Kg de ração para 3 Kg de leite.

No período seco os animais eram mantidos com silagem de milho, sal mineral e água *ad libitum*; para as vacas lactantes além da silagem de milho era fornecido concentrado com 23% de proteína bruta (PB) na proporção de 1 Kg de ração para 3 Kg de leite.

5.2.4 Produção *in vitro* de Embriões

A OPU foi realizada em dia aleatório do ciclo estral; previamente às aspirações, realizou-se anestesia epidural baixa com deposição 5 mL de lidocaína 2% (Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro, Brasil) na região entre a primeira e segunda vértebra coccígea e higienização da região perineal.

Os oócitos foram coletados por meio da aspiração folicular (OPU). O procedimento foi realizado utilizando-se um equipamento de ultrassom Aloka SSD 500 com transdutor microconvexo de 5 MHz, conectado na guia de aspiração transvaginal. Foram utilizadas agulhas hipodérmicas descartáveis 20G (0,9 x 50 mm; Terumo, São Paulo, Brasil), e sistema de aspiração Cook (Cook, Queensland, Austrália) acoplado em tubos de polipropileno tipo Falcon de 50 mL. A pressão de vácuo foi obtida com uma bomba de vácuo (WTA, Cravinhos, Brasil), e a pressão ajustada entre 70 e 90 mm Hg.

A guia de aspiração acoplada ao transdutor do ultrassom foi inserida até o fornix vaginal de cada lado correspondente ao ovário, os folículos foram aspirados e acondicionados em tubo tipo Falcon de 50 mL contendo PBS (Apêndice 1) acrescido de 10.000 UI/L de Heparina (Liquemine, Roche Químicos e Farmacêuticos, Rio de

Janeiro, Brasil). Logo após as aspirações o sistema foi lavado com o meio de punção (PBS) e o material coletado encaminhado para o laboratório da fazenda.

No laboratório da fazenda, realizou-se a lavagem com PBS em filtro de colheita de embriões até que o conteúdo do filtro se tornasse translúcido. O sedimento restante no filtro foi depositado em placas de Petri de 90 mm. Em seguida, com uso de estereomicroscópio, foi efetuada a contagem e avaliação da qualidade dos oócitos recuperados que foram classificados quanto ao aspecto morfológico em GI, GII, GIII, desnudos e atrésicos (DE LOOS et al., 1991).

Após a avaliação, os oócitos classificados como grau I, II e III foram transportados em criotubos contendo meio de maturação (Apêndice 2) sob óleo mineral em atmosfera de 5% de CO₂ e temperatura controlada de 38°C até o laboratório de PIVE do Departamento de Reprodução Animal da UNESP.

Após chegar ao laboratório de PIVE os oócitos foram transferidos para placas contendo microgotas de 100 µL de meio de maturação sob óleo mineral, em incubadora com 5% de CO₂ em ar, temperatura de 38,5° C e umidade relativa de 95%. A quantidade de oócitos por gota variou de animal para animal, mas não excedeu 15 oócitos por gota. A maturação ocorreu por 24 horas, iniciada no criotubo durante o transporte e finalizada no laboratório.

Após a maturação os oócitos foram lavados por duas vezes em meio FIV gotas (Apêndice 3) para remoção do meio de MIV. Realizado o procedimento de lavagem, os oócitos foram transferidos para gotas de 50 µL de FIV gotas sob óleo mineral.

Foi utilizado sêmen sexado do mesmo touro para a fecundação dos oócitos do experimento. O sêmen foi descongelado em água a 36°C por 30 segundos e a técnica de seleção e recuperação de espermatozoides foi o gradiente de Percoll 45% e 90% equilibrado com solução 10x concentrada (Apêndice 4).

Após a recuperação dos espermatozoides foram coletados 30 µL do sedimento selecionado pelo Percoll e colocados em um microtubo (ependorf) contendo 30 µL de meio FIV gotas pré-equilibrado e adicionado uma quantidade de FIV gotas suficiente para que cada gota recebesse 8 µL de suspensão de sêmen com aproximadamente 80 milhões de espermatozoides por gota. Os oócitos foram

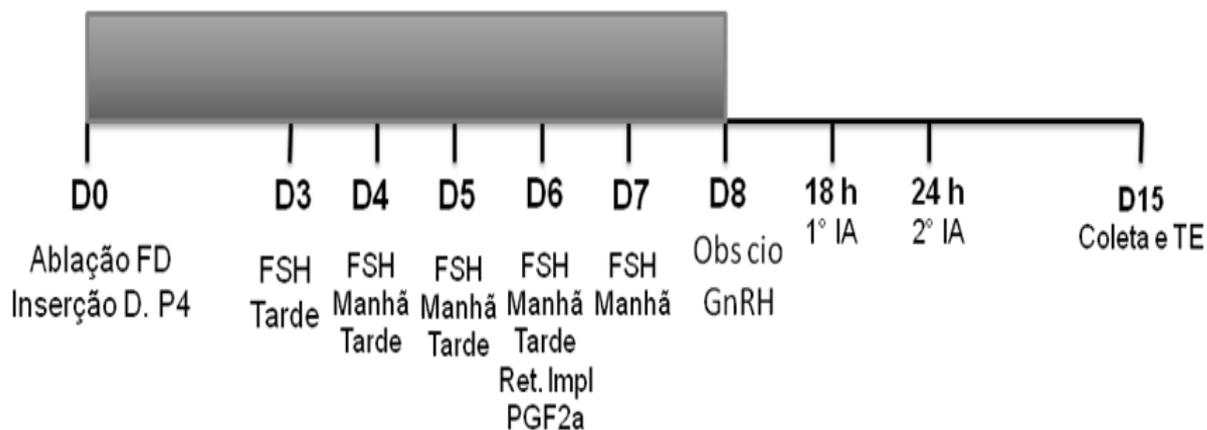
coincubados por 18 a 20 horas em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C para a fecundação.

Após aproximadamente 20h de fecundação, os prováveis zigotos foram removidos das gotas de fecundação, e lavados em meio TL-Sêmen (Apêndice 5) e tiveram parte das células do *cumulus* removidas por sucessivas pipetagens. Depois foram lavados em meio de desenvolvimento (Apêndice 6) e transferidos para microgotas de 100 µL contendo o mesmo meio. As trocas de meio (feeding) foram realizadas no terceiro e quinto dia de cultivo, quando foram retirados 50 µL de meio de cada gota e acrescentados 50 µL de meio de cultivo fresco pré equilibrado. Os embriões foram coincubados em atmosfera de 5% de CO₂, umidade relativa de 95% e temperatura de 38,5°C.

Após 7 dias, os embriões foram avaliados e embriões de boa qualidade, grau I e II (IETS, 1998), foram selecionados para a transferência de embriões. Estes foram envasados com meio de envase (Apêndice 7) em palhetas de 0,25 mL e acomodados no transportador de embriões (WTA, Cravinhos, Brasil) até a chegada ao local de transferência.

5.2.5 Produção *in vivo* de Embriões

Após avaliação do trato reprodutivo, as doadoras foram submetidas ao tratamento superovulatório com hormônio FSH (Pluset®, Laboratório Calier, Brasil) (Figura 4). Para tanto, foram utilizadas 400 UI para vacas e 200 UI para novilhas divididas em oito doses decrescentes, aplicadas duas vezes ao dia, por via intramuscular, com intervalos de 12 horas a cada aplicação.



Novilhas FSH 200 UI (40, 40, 30, 30, 20, 20, 10, 10 UI)

Vacas FSH 400 UI (80, 80, 60, 60, 40, 40, 20, 20 UI)

Figura 4. Tratamento superovulatório de novilhas e vacas doadoras de embriões.

Considerado como D0, foi realizada ablação do folículo dominante com auxílio do equipamento de ultrassom Aloka SSD 500 com transdutor microconvexo de 5 MHz, conectado na guia de aspiração transvaginal e inserção do implante auricular de progestágeno (Crestar®, Intervet, Brasil). Três dias (D3) após a ablação iniciou-se o tratamento superovulatório. No D8 retirou-se o implante de progestágeno, e observou-se o estro, após a manifestação de estro foi administrado 10 µg de buserelina (Sincroforte®, Ourofino, Brasil) e os animais foram inseminados 2 vezes, a primeira 18 horas após a observação de cio e a segunda 6 horas após a primeira IA.

Após 7 dias da segunda IA os embriões foram coletados por meio de lavagem uterina com solução de PBS. Inicialmente realizou-se a anestesia epidural com deposição de 5 mL de lidocaína 2% (Lidovet, Bravet, Rio de Janeiro, Brasil) na região entre a primeira e segunda vértebra coccígea, remoção do conteúdo fecal presente no reto, lavagem e higienização da região perineal. Em seguida dilatou-se a cérvix através da passagem de um expansor em todas as fêmeas para facilitar a introdução da sonda longa de silicone número 18 ou 20 que foi introduzida com o auxílio de um mandril até o seu posicionamento em um dos cornos uterinos.

Seguiu-se a retirada do mandril, insuflação do balão de ar e acoplamento da sonda a uma seringa de 60 mL contendo PBS. Realizaram sucessivas lavagens em

ambos cornos uterinos e o conteúdo recuperado foi armazenado e filtrado em filtro para embriões (EmCom®). O conteúdo do lavado foi colocado em placa de Petri e observado em lupa estereoscópica, a fim de se identificar e selecionar os embriões. Assim como descrito para a PIVE, embriões de grau I e II foram envasados em palhetas e transportados ao local da TE.

5.2.6 Sincronização de Receptoras para Transferência de Embriões

O protocolo de sincronização do estro nas receptoras iniciou-se no dia zero (D0), com a inserção do dispositivo intravaginal com 1g de progesterona (P4) (Sincrogest® Ourofino, Brasil) e aplicação intramuscular de 2mg de benzoato de estradiol (BE) (Sincrodiol® Ourofino, Brasil). No quinto dia (D5), foi realizada uma aplicação intramuscular de 200UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG), (Folligon®, Intervet, Brasil). No oitavo dia (D8), o dispositivo de progesterona foi retirado, e aplicado por via intramuscular 500 µg de cloprostenol sódico (Sincrocio®, Ourofino, Brasil). No nono dia (D9) foi feita outra aplicação intramuscular de 1mg de benzoato de estradiol (Figura 5).

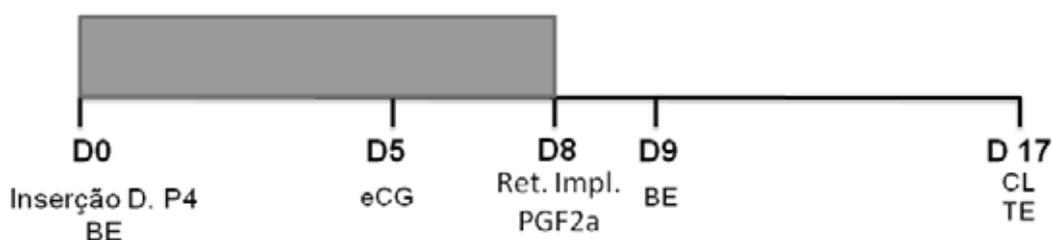


Figura 5. Protocolo de sincronização do estro em receptoras de embriões.

No 17º dia (D17), as receptoras tiveram seus ovários avaliados por ultrassonografia para determinar a presença do CL e o lado da ovulação. Aquelas que apresentaram um ou mais corpos lúteos estavam aptas para receberem os embriões, as que não possuíam CL, portanto não responderam ao protocolo, eram descartadas.

5.2.7 Transferência de Embriões

Cada receptora antes da inovulação foi anestesiada com 5mL de cloridrato de lidocaína 2% (Lidovet®, Bravet, Brasil), na região entre a primeira e segunda vértebra coccígea, a vulva foi higienizada com água corrente e papel-toalha. A camisa sanitária plástica foi usada para prevenir a contaminação uterina e removida quando o inovulador alcançava o primeiro anel cervical. O inovulador, com a bainha e a palheta contendo o embrião, era levado à porção cranial do corno ipsilateral ao CL, onde o embrião foi depositado, tendo a palpação retal como ferramenta de orientação.

Os embriões foram transferidos pela mesma pessoa em três propriedades do município de Guarani D'Oeste, SP. Foram transferidos 50 embriões PIVE e 40 produzidos *in vivo*.

5.2.8 Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado 30 a 40 dias após a data da inseminação utilizando o aparelho de ultra-som Aloka SSD-900 V (Corometrics Medical Systems Inc., Wallingford, CT, USA) e transdutor linear trans-retal UST- 7,5 MHz.

5.3 Análise Estatística

Os resultados de porcentagem de prenhez obtidos foram analisados quanto as categorias e as técnicas pelo teste Qui-quadrado (χ^2), apresentando diferenças significativas quando $p < 0,05$.

As análises foram realizadas utilizando o programa estatístico "Statistical Analysis System" (SAS).

6. RESULTADOS

6.1 Experimento 1

Os resultados de concepção, após inseminação artificial, com sêmen convencional, novilhas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) ou vacas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) foram de 68% (17/25) e 72% (18/25), respectivamente e não apresentaram diferença estatística (Tabela 1).

Tabela 1. Resultado de concepção nas categorias de novilhas e vacas após inseminação artificial com sêmen convencional

Categoria	N total	N Prenhe (%)	Valor X²	p
Novilha	25	17 (68%)	0,0952	0,7576
Vaca	25	18 (72%)		

Diferença significativa pelo teste X² quando P < 0,05

A taxa de concepção após inseminação artificial, com sêmen sexado, novilhas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) ou vacas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) foram de 52% (13/25) e 44% (11/25), respectivamente, não apresentando diferença significativa (Tabela 2).

Tabela 2. Resultado de concepção nas categorias de novilhas e vacas após inseminação artificial com sêmen sexado

Categoria	N total	N Prenhe (%)	Valor X²	p
Novilha	25	13 (52%)	0,3205	0,5713
Vaca	25	11 (44%)		

Diferença significativa pelo teste X² quando P < 0,05

Os resultados de concepção em novilhas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) após inseminação artificial com sêmen convencional ou sêmen sexado foram de 68% (17/25) para o sêmen convencional, 52% (13/25) para o sêmen sexado e não tiveram diferença significativa (Tabela 3).

Tabela 3. Resultado de concepção após inseminação com sêmen convencional e sexado em novilhas mestiça Girolando

Sêmen	N total	N Prenhe (%)	Valor χ^2	p
Convencional	25	17 (68%)	1,3333	0,2482
Sexado	25	13 (52%)		

Diferença significativa pelo teste χ^2 quando $P < 0,05$

Os resultados de concepção em vacas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) após inseminação artificial com sêmen convencional ou sêmen sexado foram de 72% (18/25) para o sêmen convencional, 44% (11/25) para o sêmen sexado e apresentaram diferença estatística, onde o sêmen convencional apresentou melhor resultado do que o sêmen sexado (Tabela 4).

Tabela 4. Resultado de concepção após inseminação com sêmen convencional e sexado em vacas mestiça Girolando

Sêmen	N total	N Prenhe (%)	Valor χ^2	p
Convencional	25	18 (72%)	4,0230	0,0449
Sexado	25	11 (44%)		

Diferença significativa pelo teste χ^2 quando $P < 0,05$

Os resultados de concepção, após inseminação artificial com sêmen convencional e sêmen sexado, novilhas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) ou vacas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) foram de 60% (30/50) para as novilhas, 58% (29/50) para as vacas e não apresentaram diferença estatística (Tabela 5).

Tabela 5. Resultado de concepção em novilhas e vacas após inseminação artificial com sêmen convencional e sexado

Categoria	N total	N Prenhe (%)	Valor χ^2	p
Novilha	50	30 (60%)	0,0413	0,8389
Vaca	50	29 (58%)		

Diferença significativa pelo teste χ^2 quando $P < 0,05$

Os resultados de concepção em novilhas e vacas (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) após inseminação artificial com sêmen convencional e sêmen sexado foram de 70% (35/50) para o sêmen convencional, 48% (24/50) para o sêmen sexado e apresentaram diferença significativa, onde o sêmen convencional apresentou resultado superior ao sêmen sexado (Tabela 6).

Tabela 6. Resultado de concepção em novilhas e vacas após inseminação artificial com sêmen convencional e sexado

Sêmen	N total	N Prenhe (%)	Valor χ^2	p
Convencional	50	35 (70%)	5,0021	0,0253
Sexado	50	24 (48%)		

Diferença significativa pelo teste χ^2 quando $P < 0,05$

6.2. Experimento 2

Os resultados de concepção, após a transferência de embriões produzidos *in vitro*, Girolando (1/2 sangue), para as categorias de receptoras, novilhas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) ou vacas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) foram de 28% (7/25) e 24% (6/25), respectivamente, os resultados não apresentaram diferença estatística (Tabela 7).

Tabela 7. Resultados de concepção em novilhas ou vacas transferidas com embriões Girolando (1/2 sangue) produzidos *in vitro*.

Categoria	N total	N Prenhe (%)	Valor χ^2	p
Novilha	25	7 (28%)	0,1040	0,7471
Vaca	25	6 (24%)		

Diferença significativa pelo teste χ^2 quando $P < 0,05$

Os resultados de concepção, após a transferência de embriões produzidos *in vivo*, Girolando (1/2 sangue), para as categorias de receptoras, novilhas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) ou vacas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) foram de 45% (9/20), tanto para as novilhas como para as vacas e não apresentaram diferença estatística (Tabela 8).

Tabela 8. Resultado de concepção em novilhas ou vacas transferidas com embriões Girolando (1/2 sangue) produzidos *in vivo*.

Categoria	N total	N Prenhe (%)	Valor χ^2	p
Novilha	20	9 (45%)	0,0000	1,0000
Vaca	20	9 (45%)		

Diferença significativa pelo teste χ^2 quando $P < 0,05$

Os resultados de concepção, após a transferência de embriões produzidos *in vitro* e *in vivo*, Girolando (1/2 sangue), para as categorias de receptoras, novilhas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) ou vacas mestiças (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) foram de 35,5% (16/45) para as novilhas, 33,3% (15/45) para as vacas e não apresentaram diferença significativa (Tabela 9).

Tabela 9. Resultado de concepção em novilhas ou vacas transferidas com embriões Girolando (1/2 sangue) produzidos *in vitro* e *in vivo*.

Categoria	N total	N Prenhe (%)	Valor χ^2	p
Novilha	45	16 (35,5%)	0,0492	0,8244
Vaca	45	15 (33,3%)		

Diferença significativa pelo teste χ^2 quando $P < 0,05$

Os resultados de concepção em novilhas (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) utilizadas como receptoras de embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo* foram de 28% (7/25) para os embriões produzidos *in vitro*, 45% (9/20) para os embriões produzidos *in vivo* e não apresentaram diferença significativa (Tabela 10).

Tabela 10. Resultado de concepção em novilhas transferidas com embriões Girolando (1/2 sangue) produzidos *in vitro* ou *in vivo*.

Embriões	N total	N Prenhe (%)	Valor χ^2	p
<i>In vitro</i>	25	7 (28%)	1,4014	0,2365
<i>In vivo</i>	20	9 (45%)		

Diferença significativa pelo teste χ^2 quando $P < 0,05$

Os resultados de concepção em vacas (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) utilizadas como receptoras de embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo* foram de 24% (6/25) para os embriões produzidos *in vitro*, 45% (9/20) para os embriões produzidos *in vivo* e não apresentaram diferença estatística (Tabela 11).

Tabela 11. Resultado de concepção em vacas transferidas com embriões Girolando (1/2 sangue) produzidos *in vitro* ou *in vivo*.

Embriões	N total	N Prenhe (%)	Valor χ^2	p
<i>In vitro</i>	25	6 (24%)	2,2050	0,1376
<i>In vivo</i>	20	9 (45%)		

Diferença significativa pelo teste χ^2 quando $P < 0,05$

Os resultados de concepção em novilhas e vacas (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) utilizadas como receptoras de embriões produzidos *in vitro* ou *in vivo* foram de 26% (13/50) para os embriões produzidos *in vitro*, 45% (18/40) para os embriões produzidos *in vivo* e não apresentaram diferença estatística (Tabela 12).

Tabela 12. Resultado de concepção em novilhas e vacas transferidas com embriões Girolando (1/2 sangue) produzidos *in vitro* ou *in vivo*.

Embriões	N total	N Prenhe (%)	Valor X²	p
<i>In vitro</i>	50	13 (26%)	3,5528	0,0594
<i>In vivo</i>	40	18 (45%)		

Diferença significativa pelo teste X² quando P < 0,05

7. DISCUSSÃO

7.1 Experimento 1

A taxa de concepção da inseminação artificial com sêmen convencional no presente estudo apresentou diferença significativa da técnica de inseminação artificial utilizando sêmen sexado apresentando melhor resultado. Seidel Júnior e Schenk (2008) também observaram diferença estatística entre as técnicas.

Vários autores observaram diferença estatística quando compararam a utilização de sêmen sexado e convencional tanto com a observação de estro (BODMER et al. 2005, ANDERSON et al., 2006, SÁ FILHO et al., 2013) como para a IATF (MALLORY et al., 2013, SALES et al., 2011, SÁ FILHO et al., 2013). No entanto, a utilização de sêmen sexado é recomendada após a detecção de estro para que possa obter resultados melhores (MALLORY et al., 2013).

Vacas mestiças Gir x Holandesa inseminadas 12 h após a detecção de estro com sêmen sexado apresentaram maior proporção de prenhez por inseminação (32%) do que vacas inseminadas após IATF (22%) (SÁ FILHO et al., 2013).

A expressão do estro antes IATF não afetou a prenhez por inseminação quando o sêmen convencional foi utilizado (70% contra 67%) enquanto que a taxa de concepção com sêmen sexado foi maior para novilhas detectadas em estro (46% versus 26%) (MALLORY et al., 2013).

O estresse físico e químico durante o processo de separação pode danificar os espermatozoies, o que resultaria em uma semi-vida curta do esperma (SÁ FILHO et al., 2010), além de acelerar o processo de capacitação e reação acrossômica (MOCÉ; GRAHAM; SCHENK, 2006).

Portanto, inseminar o animal no período mais próximo da ovulação, ou seja, atrasar a inseminação como foi feito no presente estudo pode melhorar a fertilidade do espermatozoide classificado por sexo. Novilhas Jersey inseminadas com sêmen classificados por sexo, a taxa de concepção foi maior com IA 16-24 h (54%) vs 12 a 16 horas (37,7%) após a o início do estro (SÁ FILHO et al., 2010). Adicionalmente, os resultados do presente estudo e os apresentados por Seidel Júnior e Schenk

(2008) e Sá Filho et al. (2010) foram os que apresentaram melhores resultados, e ambos utilizaram um intervalo maior entre o estro e inseminação reforçando o que foi citado acima.

Já para utilização com sêmen convencional não observou diferença na taxa de concepção quando a inseminação foi realizada mais próxima da ovulação (SALES et al., 2011) pois, diferentemente do sêmen sexado o intervalo ideal entre o primeiro evento de manifestação de estro a IA com sêmen convencional é quando IA ocorre entre 4 e 12 horas após a o início da atividade de cio (DRANSFIELD et al., 1998).

Em relação à categoria animal, ao comparar vacas e novilhas com as técnicas de inseminação artificial com sêmen convencional e sexado no presente estudo, não se observou diferença significativa. Dominguez et al. (2011) também não observaram diferença estatística entre as categorias de vacas e novilhas Nelores inseminadas com sêmen sexado. No entanto há poucos trabalhos que comparam separadamente o efeito da categoria animal sobre as taxas de concepção.

Para ambos os tipos de sêmen, novilhas leiteiras têm maior fertilidade e alcança melhor taxa de concepção do que vacas em lactação (GARNER; SEIDEL, 2008, SEIDEL JÚNIOR; SCHENK, 2008). Sendo assim, o sêmen sexado é recomendado para uso em novilhas porque são mais férteis em comparação com vacas mais velhas das gerações anteriores (MALLORY et al., 2013). Vários trabalhos mostram que mesmo com sêmen convencional a taxa de concepção de vacas holandesas mantém-se baixa (CHEBEL et al., 2010, DEJARNETTE et al., 2010, DEJARNETTE et al., 2011, ANDERSON et al., 2006), isto pode estar relacionado aos problemas relacionados ao estresse térmico, balanço energético negativo e alta metabolização de esteróides (SAGSRITAVONG et al., 2002, WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011, DE RENSIS; SCARAMUZZI, 2003, ROTH et al., 2001, SHEHAB -EL - DEEN et al., 2010, CHEBEL et al., 2004).

Entretanto, o presente estudo obteve boas taxas de concepção utilizando sêmen convencional quando comparado com os demais, porém tratava-se de animais mestiços cuja fertilidade é melhor (BORGES; CARVALHO; RUAS, 2009, HEINS; HANSEN; SEYKORA, 2006, HEINS; HANSEN, 2012, SCHAEFER et al., 2011).

Mesmo utilizando animais mestiços, os mesmos resultados não foram observados no presente estudo pela utilização do sêmen sexado, nem em outros trabalhos com outras raças, inclusive com a raça de corte que também apresentaram baixos resultados utilizando sêmen sexado (SÁ FILHO et al., 2013, SALES et al., 2011). No entanto a taxa de concepção com uso de sêmen sexado é em torno de 60% a 90% da observada na utilização do sêmen convencional (SCHENK et al., 2009, HEALY; HOUSE; THOMSON, 2012, DEJARNETTE; NEBEL; MARSHALL, 2009, DEJARNETTE et al., 2010) e os resultados do presente estudo encontram-se dentro desta variação (61,1% - 76,4%).

Para animais inseminados com sêmen convencional, a taxa de concepção do presente estudo foi de 72% (18/25) para vacas e de 68% para novilhas (17/25), já a taxa de concepção do presente estudo para vacas inseminadas com sêmen sexado foi de 44% (11/25) e 52% para novilhas (13/25). Seidel Júnior e Schenk (2008) tiveram uma taxa de concepção semelhante ao inseminar novilhas e vacas Angus 12 a 24 horas após detecção de estro com sêmen convencional que foi de 67% e 76% respectivamente, e ao inseminar novilhas com sêmen sexado (54%). No entanto, para vacas lactantes apresentaram uma taxa de concepção de 57%, superior ao do presente estudo.

Outro fator importante que afeta a taxa de concepção com sêmen sexado é a fertilidade individual do touro, que se torna um motivo de inconsistência nas taxas de concepção (SALES et al., 2011). Sêmen de touros diferentes reage de maneira diferente para o processo de separação dos espermatozoides (DEJARNETTE et al., 2008, SALES et al., 2011) portanto, é possível que interpretação dos resultados possa ser diferente quando se usa um touro diferente (MALLORY et al., 2013). Reconhecemos que usando uma única ejaculação de um único touro, os resultados são restritos a esse particular indivíduo.

7.2. Experimento 2

A taxa de concepção pela técnica de produção *in vivo* de embriões não diferiu da produção *in vitro* de embriões no presente estudo. Todavia, não há relatos semelhantes na literatura comparando a taxa de concepção entre as técnicas de produção *in vivo* e *in vitro* de embriões utilizando sêmen sexado.

Os baixos resultados do presente estudo para a taxa de concepção de embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* podem estar relacionado ao fato de que embriões derivados de espermatozoides classificados por sexo teria competência inferior para estabelecer a prenhez após transferir para uma receptora, por causa de danos causados esperma durante o processo de separação (RASMUSSEN et al., 2013).

O processo de separação dos espermatozoides não afeta somente a motilidade, a cinética (CARVALHO et al., 2009, HOLLINSHEAD et al., 2004; BLONDIN et al., 2009), o processo de capacitação (MOCÉ; GRAHAM; SCHENK, 2006) e o período de vida curto) (SÁ FILHO et al., 2010) dos espermatozoides como também a expressão de vários genes importantes para o desenvolvimento embrionário ou seja, há efeitos deletérios do processo de sexagem de espermatozoides além daqueles anteriormente reconhecido, e que estas alterações são transferíveis para o embriões resultantes (MORTON et al., 2007). Libbus et al. (1987) e Gosálvez et al. (2011b) observaram que o tratamento e a manipulação a que os espermatozoides são submetidos durante o processo de classificação contribui substancialmente para danos no acromossoma.

Quaisquer alterações na fisiologia do espermatozoide que modifique sua estabilidade de membrana, sua motilidade e seu acrossoma têm um impacto direto na capacidade de fertilização, enquanto que a qualidade do DNA pode afetar a qualidade do embrião após a fertilização e singamia (GOSÁLVEZ et al., 2011b).

No entanto, ao utilizar o sêmen do mesmo touro do presente estudo em outro experimento utilizando a técnica de inseminação artificial com animais mestiços (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) obtivemos resultados satisfatórios. Sendo assim acredita-se que o processo de separação do sêmen não foi o maior contribuinte para

os baixos resultados do presente estudo. Este resultado pode ser devido à origem do embrião, onde as doadoras de oócitos eram vacas Holandesas de alta produção, pois os embriões de vacas zebuínas são mais resistentes ao efeito do choque térmico do que embriões de vacas taurinas (PAULA-LOPEZ et al., 2003) e a termotolerância celular de embriões mestiços depende do genótipo do oócito e não do genótipo dos espermatozoides. Os embriões produzidos *in vitro* utilizando oócitos de animais de raça zebuína foram mais termotolerantes do que embriões produzidos *in vitro* utilizando oócitos de raça taurina, fertilizados com o sêmen do mesmo touro. Em contraste, a raça do touro não tinha nenhum efeito sobre a resistência térmica de embriões produzidos *in vitro* utilizando sêmen de touros zebuínos e taurinos (BLOCK; CHASE JÚNIOR; HANSEN, 2002).

Ao comparar a categoria animal de vacas e novilhas do presente estudo com as técnicas de embriões produzidos *in vitro* e *in vivo* não se observou diferença. Wilson et al. (2005) também não observaram diferença estatística na taxa de concepção de vacas lactantes e novilhas para embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado. Contudo não foi possível encontrar trabalhos avaliando em conjunto as taxas de concepção de embriões produzidos *in vivo* com PIVE utilizando sêmen sexado e comparando a categoria animal de vacas ou novilhas.

As taxas concepção obtidas no presente estudo de 24% para as vacas e de 28% para as novilhas, que receberam embriões produzidos *in vitro*, podem ser consideradas baixa como eficiência reprodutiva. Entretanto autores como Wilson et al. (2005) Rasmussen et al. (2013) também obtiveram resultados de concepção, próximos aos destes nosso experimento utilizando como receptoras vacas lactantes e novilhas da raça Holandesa. No entanto, devemos ressaltar que no presente estudo utilizamos novilhas e vacas mestiças como receptoras (1/2 e 3/4 *Bos taurus* x *Bos indicus*) que apresentam melhor taxa de fertilidade, quando comparado com os animais puros de origem holandesa. Em se tratando de vacas lactantes os efeitos relacionados com alta produção, estresse térmico, alta metabolização de esteroides, balanço energético negativo, dentre outros afetam mais os animais da raça holandesa do que os mestiços (BORGES; CARVALHO; RUAS, 2009, HEINS; HANSEN; SEYKORA, 2006, HEINS; HANSEN, 2012, SCHAEFFER et al., 2011, SAGSRITAVONG et al., 2002, WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011, DE RENSIS;

SCARAMUZZI, 2003, ROTH et al., 2001, SHEHAB -EL - DEEN et al., 2010, CHEBEL et al., 2004).

Trigal et al. (2012) obtiveram taxa de concepção utilizando novilhas mestiças como receptoras de embriões de PIVE bem acima (52,8%) do observado no presente estudo (28%). Já Pontes et al. (2010), ao utilizarem vacas e novilhas mestiças como receptoras tiveram uma taxa de concepção de 37%, que foi superior ao do presente estudo e inferior ao observado por Trigal et al. (2012). Porém as categorias de vacas e novilhas do trabalho de Pontes et al. (2010), não foram avaliadas separadamente. Outro fator que pode explicar essa diferença nos resultados é que o presente estudo utilizou sêmen de um único touro, ou seja, os resultados são restritos a esse particular touro, diferentemente de Pontes et al. (2010) que utilizaram 15 touros e Trigal et al. (2012), 5 touros, mas nesses estudos a taxa de concepção não foi avaliada separadamente para cada touro, somente a produção de embriões.

A taxa de concepção do presente estudo para embriões produzidos *in vivo* com sêmen sexado foi de 45% (9/20) tanto para vacas como para novilhas. Vascelos et al. (2006) obtiveram uma taxa de concepção semelhante de 45,8% ao do presente estudo para embriões produzidos *in vivo* para vacas lactantes. No entanto, eram vacas da raça Holandesa onde se espera que a fertilidade seja menor do que raças de animais mestiços usadas no presente estudo (BORGES; CARVALHO; RUAS, 2009, HEINS; HANSEN; SEYKORA, 2006, HEINS; HANSEN, 2012, SCHAEFFER et al., 2011).

Hayakawa et al. (2009) observaram uma taxa de concepção de 53,1% em seu estudo para novilhas que receberam embrião produzido *in vivo*, no entanto a raça da receptora não foi informada. Schenk, Suh e Seidel Júnior (2006) tiveram uma taxa de concepção de 63%, porém também não citou a raça nem a categoria animal dessas receptoras.

8. CONCLUSÕES

8.1. Experimento 1

Conclui-se que a inseminação artificial de animais mestiços com sêmen sexado 18 a 24 horas após detecção de estro mostrou-se eficaz, igualmente ao sêmen convencional tanto para nulíparas quanto para múltiparas.

8.2. Experimento 2

Conclui-se que foram idênticas as taxas de concepção para embriões produzidos *in vivo* como *in vitro* utilizando sêmen sexado de um mesmo touro.

São necessários mais estudos utilizando sêmen sexado de vários touros na produção *in vitro* de embriões e MOET para rebanhos de fêmeas mestiças leiteiras.

9. REFERÊNCIAS

ANDERSON, M.; TAPONEN, J.; KOMMERI, M.; DAHLBOM, M. Pregnancy rates in lactating Holstein–Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 41, n. 1, p. 95-97, 2006.

ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOSKINENA, 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**, Philadelphia, v. 61, n. 1, p. 1583-1588, 2004.

BARREIROS, T. R. R.; BLASCHI, W.; BORSATO, E. A.; LUDWIG, H. E.; SILVA, D. R. M.; SENEDA, M. M. Comparação das taxas de prenhez entre receptoras com corpos lúteos cavitários ou compactos após protocolo de sincronização com cloprostenol ou transferência de embriões em tempo fixo. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 4, p. 657-664, 2006.

BENDER, K.; WALSH, S.; EVANS, A. C. O. FAIR, T.; BRENNAN, L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 139, n. 1, p. 1047-1055, 2010.

BESENFELDER, U.; HAYLICEK, V.; KUZMANY, A.; BREM, G. Endoscopic approaches to manage in vitro and in vivo embryo development: use of the bovine oviduct. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 73, n. 1, p. 768-776, 2010.

BISINOTTO, R. S.; RIBEIRO, E. S.; MARTINS, L. T.; MARSOLA, R. S.; GRECO, L. F.; FAVORETO, M. G.; RISCO, C. A.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 93, n. 1, p. 5798-5808, 2010.

BLOCK, J.; CHASE JÚNIOR, C. C.; HANSEN, P. J. Inheritance of resistance of bovine preimplantation embryos to heat shock: relative importance of the maternal vs. paternal contribution. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, n.1, p. 32-37, 2002.

BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V.; MORIN, N.; CRAWFORD, L.; MADAN, P.; KING, W. A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 71, n. 1, p.30-38, 2009.

BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 81, n. 1. P. 38-48, 2014.

BODMER, M.; JANETT, F.; HÄSSIG, M.; DAAS, N. D.; REICHERT, P.; THUN, R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. **Theriogenology**, Philadelphia, p. 64, n.1, p. 1647-1655.

BORGES, A. M.; CARVALHO, B. C.; RUAS, J. R. M. Manejo reprodutivo da vaca mestiça: estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 1, n.6, p. 157-162, 2009.

CARAVIELLO, D. Z. Crossbreeding dairy cattle. **Reproduction and Genetics**, v. 1, n. 610, p. 1-6, 2004.

CARVALHO, J. O.; SARTORI, R.; LEMES, A. P.; MOURÃO, G. B.; DODE, M. A. N. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 44, n. 10, p. 1346-1351, 2009.

CASSEL, B.; MCALLISTER, J. Dairy Crossbreeding Research: Results from Current Projects. **Virginia cooperative extension**, Richmond, v. 404, n. 94, p. 1-6, 2009.

CHEBEL, R. C.; GUAGNINI, F. S.; SANTOS, J. E. P.; FETROW, J. P.; LIMA, J. R. Sex-sorted semen for dairy heifers: effects on reproductive and lactational performances. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 93, n. 6, p. 2496-2507, 2010.

CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. P.; REYNOLDS, J. P.; CERRI, R. L. A.; JUCHEM, S. O.; OVERTON, J. M. Factors affecting conception rate after artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 84, n. 1, p. 239-255, 2004.

DEJARNETTE, J. M.; LEACH, M. A.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E.; MCCLEARY, C. R.; MORENO, J. F. Effects of sex-sorting and sperm dosage on conception rates of Holstein heifers: Is comparable fertility of sex-sorted and conventional semen plausible? **Journal of Dairy Science**, New York, v. 94, n. 7, p. 3477-3483, 2011.

DEJARNETTE, J. M.; MCCLEARY, C. R.; LEACH, M. A.; MORENO, J. F.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E. Effects of 2.1 and 3.5×10^6 sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 93, n. 1, p. 4079-4085, 2010.

DEJARNETTE, J. M.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E.; MORENO, J. F.; MCCLEARY, C. R.; LENZ, R. W.; Effect os sex-xorted sperm dosage on conception rates in Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 91, n. 5, p. 1778-1785, 2008.

DEJARNETTE, J. M.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, Evaluating the success of sex - sorted semen in US dairy herds from on farm records. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 71, n. 1, p. 49-58, 2009.

DE LOSS, F.; KASTROP, P.; VAN MAURYK, P.; VANBENEDEN T. H.; KRUIP, T. A. Heterologous cell contacts and metabolics coupling in bovine cumulus oocyte complexes. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 28, n. 3, p. 255-259, 1991.

DE RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R. J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - a review. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 60, p. 1139-1151, 2003.

DE VRIES, A.; OVERTON, M.; FETROW, J.; LESLIE, K.; EICKER, S.; ROGERS, G. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 91, n. 1, p. 847-856, 2008.

DHAKAL, K.; MALTECCA, C.; CASSADY, J. P.; BALOCHE, G.; WILLIAMS, C. M.; WASHBURN, S. P. Calf birth weight, gestation length, calving ease, and neonatal calf mortality in Holstein, Jersey, and crossbred cows in a pasture system. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 96, n. 1, p. 690-698, 2013.

DISKIN, M. G.; MACKEY, D. R.; ROCHE, J. F.; SREENAN, J. M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 1, p. 345-370, 2003.

DOBSON, H.; SMITH, R. F.; ROYAL, M. D.; KNIGHT, C. H.; SHELDON, I. M. The high producing dairy cow and its reproductive performance. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, n. 2, p. 17-23, 2007.

DOMINGUEZ, J. H.; COSTA, D. S.; CENTURION, V. J.; FARIA, F. J. Pregnancy rate of Nelore females inseminated with male-sexed sêmen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 129, n. 1, p. 127-131, 2011.

DRANSFIELD, M. B. G.; NEBEL, R. L.; PEARSON, R. E.; WARNICK, L. D. Timing of insemination for dairy cows identified in estrus by a radiotelemetric estrus detection system. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 81, n. 1, p. 1874-1882, 1998.

FACÓ, O.; LOBO, R. N. B.; MATINS FILHO, R.; LIMA, F. A. M. Idade ao primeiro parto e intervalo de partos de cinco grupos genéticos Holandês x Gir no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Piracicaba, v. 34, n.6, p. 1920-1926, 2005.

FERNANDES, C. A. C.; FIGUEIREDO, A. C. S.; OBA, E.; VIANA, J. H. M. Fatores predisponentes para cistos ovarianos em vacas da raça Holandesa. **ARS Veterinária**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 287-295, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS-FAO. **Faostat**: Production Livestock Primary. 2012. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/291/default.aspx>> Acesso em 04 mar 2014.

FORRO, A.; TSOUSIS, G.; BEINDORFF, N.; SHARIFI, R.; JÄKEL, L.; BOLLWEINLL, H. Combined use of Ovsynch and progesterone supplementation after artificial insemination in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 95, n. 1, p. 4372-4381, 2012.

GARNER, D. L.; SEIDEL JR, G. E. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 69, n. 1, p. 886-895, 2008.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008, cap. 14, p. 61-91.

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, v. 75, n. 1, p. 197-205, 2011a.

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: II. Dynamic features. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 75, n. 1, p. 206-211, 2011b.

GRUMMER, R. R. Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: Management of the dry period. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 68S, n. 1, p. 281-288, 2007.

HANSEN, P. J. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 68, n. 1, p. 242-249, 2007.

HAYAKAWA, H.; HIRAI, T.; TAKIMOTO, A.; IDETA, A.; AOYAGI, Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 71, n. 1, p. 68-73, 2009.

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, v. 96, n. 1, p. 1905-1914, 2013.

HEINS, B. J.; HANSEN, L. B.; HAZEL, A. R.; SEYKORA, A. J.; JOHNSON, D. G.; LINN, J. G. *Short communication*: Jersey × Holstein crossbreds compared with pure Holsteins for body weight, body condition score, fertility, and survival during the first three lactations. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 95, n. 1, p. 4130-4135, 2012.

HEINS, B. J.; HANSEN, L. B. *Short communication*: Fertility, somatic cell score, and production of Normande × Holstein, Montbéliarde × Holstein, and Scandinavian Red × Holstein crossbreds versus pure Holsteins during their first 5 lactations. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 95, n. 2, p. 918-924, 2012.

HEINS, B. J.; HANSEN, L. B.; SEYKORA, A. J. Fertility and survival of pure holsteins versus crossbreds of holstein with normande, montbeliarde, and scandinavian red. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 89, n. 1, p. 4944-4951, 2006.

HEINS, B. J.; HANSEN, L. B.; SEYKORA, A. J.; HAZEL, A. R.; JOHNSON, D. G.; LINN, J. G. Crossbreds of Jersey x Holstein Compared with Pure Holsteins for Body Weight, Body Condition Score, Dry Matter Intake, and Feed Efficiency During the First One Hundred Fifty Days of First Lactation. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 91, n. 1, p. 3716-3722, 2008.

HOLLINSHEAS, F. K.; O'BRIEN, J. K.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics after flow cytometric sorting of frozen-thawed bull spermatozoa. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 62, n. 1, p. 958-968, 2004.

HOSSEIN-ZADEH, N. G. Evaluation of the genetic trend of milk yield in the multiple ovulation and embryo transfer populations of dairy cows, using stochastic simulation. **Comptes Rendus Biologies**, Paris, v. 333, n.1, p. 710-715, 2010.

LIBBUS, B. L.; PERREAULT, S. D.; JOHNSON, L. A.; PINKEL, D. Incidence of chromosome aberrations in mammalian sperm stained with Hoechst 33342 and UV-laser irradiated during flow sorting. **Mutation Research**, v. 182, n.1, p. 265-274, 1987.

LÓPEZ-GATIUS, F. Factors of a noninfectious nature affecting fertility after artificial insemination in lactating dairy cows. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 77, n. 1, p. 1029-1041, 2012.

LOPEZ, H.; CARAVIELLO, D. Z.; SATTER, L. D.; FRICKE, P. M.; WILTBANK, M. C. Relationship Between Level of Milk Production and Multiple Ovulations in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 88, n. 1, p. 2783-2793, 2005.

LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 209-223, 2004.

LUCY, M. C. Functional differences in the growth hormone and insulin-like growth factor axis in cattle and pigs: implications for post-partum nutrition and reproduction. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, n. 2, p. 31-39, 2008.

LUCY, M. C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of Dairy Science**, New York, v. 84, n. 1, p. 1277-1293, 2001.

LUNDGREN, A. **Crossbreeding in dairy cattle**. 2011. 14 f. Dissertação (Bacharelado em Ciência Animal) – Faculty of Veterinary Medicine na Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2011.

MALLORY, D. A.; LOCK, S. L.; WOODS, D. C.; POOCK, S. E.; PATTERSON, D. J. *Hot topic*: Comparison of sex-sorted and conventional semen within a fixed-time artificial insemination protocol designed for dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 96, n. 2, p. 854-856, 2013.

MCCULLOCK, K.; HOAG, D. L. K.; PARSONS, J.; LACY, M.; SEIDEL JR, G. E.; WAILES, W. Factors affecting economics of using sexed semen in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 96, n. 1, p. 6366-6377, 2013.

MEE, J. F. Prevalence and risk factors for dystocia in dairy cattle: A review. **The Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 93–101, 2008.

MCDOWELL, R. E. Crossbreeding in tropical areas with emphasis on milk, health, and fitness. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 68, n. 1, p. 2418-2435, 1985.

MCMANUS, C.; TEIXEIRA, R. A.; DIAS, L. T.; LOUVANDINI, E.; OLIVEIRA, E. M. B. Características produtivas e reprodutivas de vacas Holandesas e mestiça Holandes x Gir no Planalto Central. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 5, p. 819-823, 2008.

MOCÉ, E. GRAHAM, J. K.; SCHENK, J. L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 66, n. 1, p. 929-936, 2006.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONÇALVES, P. B. D.; FREITAS, V. J. F.; LOPES JÚNIOR, E. S. Controle do estro e da ovulação em ruminantes In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008, cap.3, p.33-56.

MORTON, K. M.; HERRMANN, D.; SIEG, B.; STRUCKMANN, C.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilisation in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, v. 74, n.1, p. 931-940, 2007.

MULLIGAN, F. J.; DOHERTY, M. L. Production diseases of the transition cow. **The Veterinary Journal**, London, v. 176, n. 1, p. 3-9, 2008.

NORMAN, H. D.; HUTCHISON, J. L.; MILLER, R. H. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 93, n. 1, p. 3880–3890, 2010.

OLSON, K. M.; CASSEL, B. G.; MCALLISTER, A. J.; WASHBUM, S. P. Dystocia, stillbirth, gestation length, and birth weight in Holstein, Jersey, and reciprocal crosses from a planned experiment. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 92, n. 1, p. 6167-6175, 2009.

OLYNK, N. J.; WOLF, C. A. Expected Net Present Value of Pure and Mixed Sexed Semen Artificial Insemination Strategies in Dairy Heifers. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 90, n. 1, p. 2569–2576, 2007.

PAULA-LOPES, F. F.; CHASE JÚNIOR, C. C.; AL-KATANANI, Y. M.; KRININGER, C. E.; RIVERA, R. M.; TEKIN, S.; MAJEWSKI, A. C.; OCON, O. M.; OLSON, T. A.; HANSEN, P. J. Genetic divergence in cellular resistance to heat shock in cattle: differences between breeds developed in temperate versus hot climates in responses of preimplantation embryos, reproductive tract tissues and lymphocytes to increased culture temperatures. **Reproduction**, Cambridge, v. 125, n. 1, p. 285-294, 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 sêmen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 111, n.1, p. 80-92, 2009.

PEIXOTO, M. G. C. D.; BERGMANN, J. A. G.; FONSECA, C. G.; PENNA, V. M.; PEREIRA, C. S. Effects of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 58, n. 4, p. 567-574, 2006.

PEREIRA, M. H. C.; RODRIGUES, A. D. P.; CARVALHO, R. J.; WILTBANK, M. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Increasing length of an estradiol and progesterone timed artificial insemination protocol decreases pregnancy losses in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 97, n. 1, p. 1454-1464, 2014.

PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER, F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 74, n.1, p. 1349-1355, 2010.

RASMUSSEN, S.; BLOCH, J.; SEIDEL JÚNIOR, G. E.; BRINK, Z.; MCSWEENEY, K.; FARIN, P. W.; BONILLA, L.; HANSEN, P. J. Pregnancy rates of lactating cows after transfer of *in vitro* produced embryos using X-sorted sperm. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 79, n. 1, p. 453-461, 2013

REICHENBACH, H.; MORAES, J. C. F.; NEVES, J. P. Tecnologia de sêmen e inseminação artificial em bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008a, cap. 4, p. 57-81.

REICHENBACH, H.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; ANDRADE, J. C. O.; TENÓRIO FILHO, F.; SANTOS, M. H. B.; OLIVEIRA FILHO, B. D.; MEIRINHOS, M. L. G.; SANTOS FILHO, A. S. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008b, cap. 12, p. 201-239.

ROCHA, A.; RANDEL, R. D.; BROUSSARD, J. R.; LIM, J. M.; BLAIR, R. M.; ROUSSEL, J. D. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 49, n. 1, p. 657-665, 1998.

ROCHE, J. R.; FRIGGENS, N. C.; KAY, J. K.; FISHER, M. W.; STAFFORD, K. J.; BERRY, D. P. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 92, n. 1, p. 5769–5801, 2009.

RODRIGUES, C. A.; TEIXEIRA, A. A.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; MANCILHA, R. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder holstein cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, n. 1, p. 110-117, 2010.

ROTH, Z.; INBAR, G.; ARAV, A. Comparison of oocyte developmental competence and follicular steroid content of nulliparous heifers and cows at different stages of lactation. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 69, n. 1. p. 932-939, 2008.

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; NICHI, M.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; BARUSELLI, P. S. Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 74, n. 1, p. 1636-1642, 2010.

SÁ FILHO, M. F.; MENDANHA, M. F.; SALA, R. V.; CARVALHO, F. J.; GUIMARÃES, L. H. C.; BARUSELLI, P. S. Use of sex-sorted sperm in lactating dairy cows upon estrus detection or following timed artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 143, n. 1, p. 19-23, 2013.

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**, Philadelphia, v. 76, n. 1, p. 427-435, 2011.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L. E.; WILTBANK, M. C. High Feed Intake Increases Liver Blood Flow and Metabolism of Progesterone and Estradiol-17 β in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 85, n. 1, p. 2831-2842, 2002.

SANTOS, J. E. P. Pregnancy Losses : Prevalence , Timing and Associated Causes. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, Bogotá, v. 56, n. 1, p. 241-252, 2009.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 87, n. 1, p. 905-920, 2004.

SARTORI, R.; SATOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 85, n. 1, p. 2803-2812, 2002.

SCHAEFFER, L. R.; BURNSIDE, E. B.; GLOVER, P.; FATEHI, J. Crossbreeding results in canadian dairy cattle for production, reproduction and conformation. **The Open Agriculture Journal**, v. 5, n. 1, p. 68-73, 2011.

SCHENK, J. L.; GRAN, D. G.; EVERETT, R. W.; SEIDEL JUNIOR, 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**, Philadelphia, v. 71, n. 1, p. 717-728, 2009.

SCHENK, J. L.; SUH, T. K.; SEIDEL JÚNIOR, G. E. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 65, n. 1, p.299-307, 2006.

SEIDEL JÚNIOR, G. E.; SCHENK, J. L.; HERICKHOFF, L. A.; DOYLE, S. P.; BRINK, Z.; GREEN, R. D.; GRAN, D. G. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 52, n. 1, p. 1407-1420, 1999.

SEIDEL JÚNIOR, G. E.; SCHENK, J. L. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 105, n.1, p. 129-138, 2008.

SHEHAB-EL-DEEN, M. A. M. M.; LEROY, J. L. M. R.; FADEL, M. S.; SALEH, S. Y. A.; MAES, D.; VAN SOOM, A. Biochemical changes in the follicular fluid of the dominant follicle of high producing dairy cows exposed to heat stress early postpartum. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 117, n. 1, p. 189-200, 2010.

SHNEIDER, B.; CHAIME, M. E.; GILAD, D.; HALACHMI, L. Mathematical optimization to improve cows' artificial insemination services. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 92, n. 1, p. 2306-2316, 2009.

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 donors. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 127, n. 1, p. 148-153, 2011.

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

SWANGCHAN-UTHAI, T.; WALSH, S. W.; ALEXANDER, S. L. H.; CHENG, Z.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C. O.; WATHES, D. C. Comparison of mRNA for IGFs and their binding proteins in the oviduct during the peri-oestrous period between dairy heifers and lactating cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 142, n. 1, p. 457-465, 2011.

TIEZZI, F.; MALTECCA, C.; CECCHINATO, A.; PENASA, M.; BITTANTE, G. Genetic parameters for fertility of dairy heifers and cows at different parities and relationships with production traits in first lactation. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 95, n. 1, p. 7355-7362, 2012.

TOUCHBERRY, R. W. Crossbreeding Effects in Dairy Cattle: The Illinois Experiment, 1949 to 1969. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 75, n. 1, p. 640-667, 1992.

TRIGAL, B.; GÓMEZ, E.; CAAMAÑO, J. N.; MUÑOZ, M.; MORENO, J.; CARROCERA, S.; MARTÍN, D.; DIEZ, C. *In vitro* and *in vivo* quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 78, n. 1, p. 1465-1475, 2012.

Universidade Estadual Paulista - UNESP . Canal CLIMA da UNESP Ilha Solteira - Área de Hidráulica e Irrigação: DADOS CLIMÁTICOS DIÁRIOS - Estação POPULINA. Unesp: Ilha Solteira, 2014. Disponível em: <<http://clima.feis.unesp.br/index.php>> Acesso em: 15 jul. 2014.

VASCONCELLOS, B. F.; PÁDUA, J. T.; MUÑHOZ, M. F. C.; TONHATI, H. Efeitos genéticos e ambientais sobre a produção de leite, o intervalo de partos e a duração da lactação em um rebanho leiteiro com animais mestiços, no Brasil. **Revista Universidade Rural**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 39-45, 2003.

VASCONCELOS, J. L. M.; DEMÉTRIO, D. G. B.; SANTOS, R. M.; CHIARI, J. R.; RODRIGUES, C. A.; SÁ FILHO, O. G. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 65, n.1, p. 192-200, 2006.

VAZQUEZ, J. M.; PARRILLA, I.; GIL, M. A.; CUELLO, C.; CABALLERO, I.; VAZQUEZ, J. L.; ROCA, J.; MARTÍNEZ, E. A. Improving the Efficiency of Insemination with Sex-sorted Spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, n. 4, p. 1-8, 2008.

WALLACE, L. D.; BREINER, C. A.; BREINER, R. A.; SPELL, A. R.; CARTER, J. A.; LAMB, G. C.; STEVENSON, J. S. Administration of human chorionic gonadotropin at embryo transfer induced ovulation of a first wave dominant follicle, and increased progesterone and transfer pregnancy rates. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 75, n. 1, p. 1506–1515, 2011.

WALSH, S. W.; WILLIAMS, E. J.; EVANS, A. C. O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 127–138, 2011.

WATANABE, Y. F.; ACCORSI, M. F.; WATANABE, M. R.; DAYAN, A.; MEIRELLES, F. V. Aspecto comercial de embriões produzidos *in vitro*. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008, cap. 15, p.293-301.

WEIGEL, K. A.; BARLASS, K. A. Results of a producers survey regarding crossbreeding on US dairy farms. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 86, n. 1, p. 4148-4154, 2003.

WEIGEL, K. A. Exploring the Role of Sexed Semen in Dairy Production Systems. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 87, E. suppl., p. 120-130, 2004.

WHEELER, M. B.; RUTLEDGE, J. J.; FISCHER-BROWN, A.; VANETTEN, T.; MALUSKY, S.; BEEBE, D. J. Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 65, n. 1, p. 219-227, 2006.

WILSON, R. D.; WEIGEL, K. A.; FRICKE, P. M.; RUTLEDGE, J. J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; MATTHEWS, D. L.; SCHUTZKUS, V. R. In vitro production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 88, n. 2, p. 776-782, 2005.

WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, Philadelphia, v.65, n.1, p. 17-29, 2006.

WOLFENSON, D.; INBAR, G.; ROTH, Z.; KAIM, M.; BLOCH, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 62, n. 1, p.1042-1055, 2004.

XU, J.; CHAUBAL, S. A.; DU, F. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 71, n. 1, p.39-47, 2009.

APÊNDICES

Apêndice 1: PBS Completo

O PBS é composto por água Milli-Q suplementado com 137mM de Cloreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 2,7mM de Cloreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 8mM de Fosfato de Sódico bibásico anidro (Casa da Química, Diadema, Brasil), 1,5mM de Fosfato de Potássico monobásico (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,7mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,5mM de Cloreto de Magnésio hexahidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 5,5mM de DI-Glucose e 83,4µg/mL de Sulfato de Amicacina (Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil).

Apêndice 2: Meio maturação dos oócitos

O meio base utilizado para a MIV foi o TCM 199 com sais de Earle (Gibco, Grand Island, EUA) suplementado com 26mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 1,0µg/mL de FSH (Calier, Juatuba, Brasil), 50µg/MI de hCG (Serono, Aubonne, Suíça), 1,0µg/mL de Estradiol 17β, 0,20mM de Piruvato Sódico (Biochemical, Nova York, EUA), 83,4µg/mL de Sulfato Amicacina (Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil). Como fonte protéica na Maturação foi utilizado 10% de SFB (Crypion, Andradina, Brasil).

Apêndice 3: Meio FIV gotas

O meio FIV gotas é composto por TL-Stock [114mM de Cloreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 3mM de Cloreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,5mM de Cloreto de Magnésio hexahidratado ((Merck, Darmstadt, 83 Alemanha), 0,3mM de Fosfato de Sódico bibásico anidro (Casa da Química, Diadema, Brasil), 25mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 2mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 12mM de

DLÁcido Lático (60%) e 30 μ M de *Phenol Red* (Sal Sódico Cristalino)], 83,4 μ g/mL de Sulfato Amicacina (Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil), 100mM de Piruvato Sódico (Biochemical, Nova York, EUA), PHE [29,4mM de DL-Ácido Lático (60%), 1,0 μ g/mL de Bissulfito de Sódio, Salina 0,9% e 2mM de D-Penicilamina], 176UI/mg de Heparina e 6mg/mL de BSA (FIV).

Apêndice 4: Solução de Percoll 90%

A solução de Percoll 90% é composta por 31mM de Cloreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 3mM de Dihidrofosfato de Sódio monohidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 800mM de Cloreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 50mM de Hepes Ácido, 50mM de Hepes Sódico, 1,0M de Cloreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 100mM de Cloreto de Magnésio hexa-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 26,4mM de DL-Ácido Lático (60%) e 20mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA).

Apêndice 5: Meio TL-Sêmen

O meio TL-Sêmen é composto por 100mM de Cloreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 3mM de Cloreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,4mM de Cloreto de Magnésio hexahidratado ((Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,3mM de Fosfato de Sódio bibásico anidro (Casa da Química, Diadema, Brasil), 25mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 2mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 26mM de DL-Ácido Lático (60%), 30 μ M de *Phenol Red* (Sal Sódico Cristalino) e 10mM de Hepes Ácido.

Apêndice 6: Meio SOF

O meio SOF é constituído por 1,1M de Cloreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 72mM de Cloreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 12mM de Fosfato de Potássio Monobásico (Merck, Darmstadt, Alemanha), 7,4mM de Sulfato de Magnésio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 50 μ M de DL-Ácido Lático

(60%), 250mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 260µM de *Phenol Red* (Sal Sódico Cristalino), 178mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 200mM de L-Glutamina, BME Essenciais 50x, MEM Não-Essenciais 100x, 2,8mM de Myo- Inositol, 340µM de Tri-Citrato de Sódio Di-Hidratado, 100mM de Piruvato Sódico (Biochemical, Nova York, EUA), 16,67 µg/mL de Sulfato Amicacina (Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil), 5mg/mL de BSA (CIV) e 2,5% de SFB.

Apêndice 7: Meio HSOF

O meio HSOF é constituído por 1,1M de Cloreto de Sódio (J. T. Baker, Center Valley, USA), 72mM de Cloreto de Potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 12mM de Fosfato de Potássio Monobásico (Merck, Darmstadt, Alemanha), 7,4mM de Sulfato de Magnésio (Merck, Darmstadt, Alemanha), 50µM de DL-Ácido Lático (60%), 250mM de Bicarbonato de Sódio (Mallinckrodt, Hazelwood, USA), 260µM de *Phenol Red* (Sal Sódico Cristalino), 178mM de Cloreto de Cálcio di-hidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha), 125 mM de Hepes Sódico, 125mM de Hepes Ácido, 200mM de L-Glutamina, BME Essenciais 50x, MEM Não-Essenciais 100x, 2,8mM de Myo-Inositol, 340µM de Tri-Citrato de Sódio Di-Hidratado, 100mM de Piruvato Sódico (Biochemical, Nova York, EUA), 83,4µg/mL de Sulfato Amicacina (Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil), 5mg/ml de BSA (CIV) e 2,5% de SFB.