

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DA SEXAGEM DO SÊMEN NA FERTILIDADE A IATF E
NA PRODUTIVIDADE DAS FILHAS

ANDERSON KLOSTER MUNHOZ

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do
título de Mestre.

Botucatu – SP

Julho - 2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

EFEITO DA SEXAGEM DO SÊMEN NA FERTILIDADE A IATF E
NA PRODUTIVIDADE DAS FILHAS

ANDERSON KLOSTER MUNHOZ
Médico Veterinário

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos

Trabalho de apresentação ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia como parte das
exigências para obtenção do
título de Mestre.

Botucatu – SP

Julho - 2019

M966e Munhoz, Anderson Kloster
Efeito da sexagem do sêmen na fertilidade a IATF
e na produtividade das filhas / Anderson Kloster
Munhoz. -- Botucatu, 2019
43 f. : tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista (Unesp), Faculdade de Medicina Veterinária
e Zootecnia, Botucatu
Orientador: José Luiz Moraes Vasconcelos

1. Fertilidade. 2. Sincronização. 3. Sexagem. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp.
Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu.
Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

BIOGRAFIA DO AUTOR

Anderson Kloster Munhoz, nascido no município de Natal – RN, em 26 de Setembro de 1989, filho de Nelson Munhoz e Rosilda Aparecida Kloster Munhoz. No ano de 2007 iniciou seus estudos no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Uberlândia (UFU), durante a graduação focou seus estudos e estágio na área de produção e reprodução de bovinos.

No ano de 2012 mudou-se para Agropecuária Fazenda Brasil, Nova Xavantina - MT para realizar estágio de conclusão de curso, retornou para Uberlândia para finalizar a graduação e se mudou para o estado do Mato Grosso trabalhar na mesma empresa, com reprodução de gado de corte, mas agora na cidade de Canabrava do Norte - MT. No ano de 2014 mudou-se para Carmo do Rio Claro - MG onde participou de pesquisas na área de desenvolvimento de programas de sincronização do ciclo estral (IATF) em vacas de leite, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos. Em meados de 2014, mudou-se para Campinas - SP para desenvolver seu projeto de mestrado na fazenda Atibainha em gado de leite. Em 2015 mudou-se para Botucatu - SP e seguiu participando de projetos de pesquisa em gado de leite e corte junto ao professor Zequinha.

Em 2017 ingressou no programa de mestrado em zootecnia pela FMVZ-UNESP/Botucatu-SP, no departamento de pós graduação em produção animal sob a orientação do Prof. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos. Durante o mestrado desenvolveu trabalhos na área de fertilidade de vacas de corte e leite, tendo como trabalho para apresentação e obtenção do título de mestre intitulado como: Efeito da sexagem do sêmen na fertilidade a IATF e produtividade das filhas.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em minha vida, me guiando e protegendo em toda caminhada.

Ao meu pai Nelson Munhoz, minha mãe Rosilda Kloster e minha irmã Susi, como exemplo de humildade e dedicação, que nunca mediram esforços para que me dedicasse aos estudos e crescimento profissional, apoiando em toda decisão tomada. A toda minha família que sempre acreditou em meus sonhos.

Ao amigo e orientador Prof. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos pelas cobranças, puxões de orelha, convívio diário, conselhos e exemplo para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos Dr. Leandro Cruppe e Dr. Marcos Henrique Colombo Pereira por participarem da banca do Exame Geral de Qualificação e da Defesa de Dissertação, pelas sugestões e críticas que contribuíram para melhorar a dissertação além de conselhos para crescimento pessoal e profissional.

A Fazenda Atibainha em nome de Renato, Renata e André Rappa por permitir a realização do experimento.

Aos funcionários da Fazenda Atibainha, que foram essenciais para realização desse experimento, sempre me ajudando e se disponibilizando para colaborar com estudo. Em especial quero agradecer aos grandes amigos Flavio e Zé Maria.

Aos companheiros de pós-graduação, professores e estagiários por todo convívio, ensinamentos, companheirismo e pelos momentos de distração nesse período de mestrado: Eraldo Drago, João Pedro, Wedson Costa, Tiago Leiva, Tiago Guzela, Carlos Sanches, Marcos Pereira, Isabela Marconato, Ana Paula, João Paulo, Rafael Carvalho, Rogério Peres.

A minha namorada Camila Prado (Mobilete) pelo amor, paciência, dedicação e ajuda.

A todos que participam ou participaram dos serviços prestados pelo clube da IATF.

À todos os amigos de Uberlândia - MG, que apesar da distância sempre se mostraram presentes em minha vida e de minha família, convivendo e acompanhando meu pai e minha mãe, além de me proporcionarem excelentes momentos em minha cidade. Em especial Ícaro Lemes, Orlandino Jr, Gustavo Calixto, Marcio Paulo, Pedro Urias, Guilherme Gordão, Lucas Muleta, Marcos Muller, Pedro Artur, Fernando Catraca, Celso Jr, João Paulo, Douglas e Túlio Cunha.

À Republica Boi na Zona, pela amizade e companheirismo. Em especial ao Alce, Italiano, Chicuta, Leitoa, Kiçassa, Mexicano, Rodrigo, Tin-Tin, Barbela, Minero, Xanfro, Anzor, Frangão, Mateuzão, Pialo, Sanhaço, Cobre, Curtão, Cuspe e Xucro. Obrigado meus amigos!

Ao pessoal da UNESP, por todo período de convívio, amizade e companheirismo: em especial todos os amigos da CONAPEC Jr.

Aos funcionários da sessão de pós-graduação da UNESP – Botucatu: Cláudia e Ellen; departamento de produção Animal: Renato, pela disposição e prontidão para ajudar.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), pela bolsa fornecida.

A todos meus amigos e companheiros que de alguma maneira participaram desta caminhada.

MUITO OBRIGADO A TODOS!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
SUMÁRIO DE TABELAS.....	iii
SUMÁRIO DE FIGURAS.....	iv
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Fertilidade da vaca na IATF.....	3
2.2. Descarte voluntário e involuntário.....	6
2.3. Sêmen sexado.....	7
2.3.1 Processo de sexagem.....	7
2.3.2 Processo de Criopreservação.....	8
2.3.3 Fertilidade do sêmen sexado.....	8
2.4 Fertilidade de touros.....	11
2.5 Efeitos epigenéticos.....	11
3. Referências Bibliográficas	13
CAPÍTULO 2	23
Resumo.....	24
Abstract.....	25
1. Introdução.....	26
2. Objetivos.....	26
3. Hipóteses	27
4. Material e Métodos.....	27
4.1. Instalações, Animais e Dieta.....	27
4.2. Manejo Reprodutivo.....	28
4.3. Avaliação do escore de condição corporal (ECC).....	29
4.4. Avaliação de estruturas ovarianas.....	29
4.5. Detecção de estro.....	29
4.6. Sêmen.....	29
4.7. Temperatura retal.....	29
4.8. Produção de leite das matrizes.....	29
4.9. Diagnóstico de gestação.....	30
4.10. Gestação, taxa de nascimento e sexo da cria.....	30
4.11. Avaliação de crescimento e produtividade da progênie proveniente de sêmen convencional ou sexado.....	30
4.12. Análise estatística.....	30
Resultados e discussão.....	31
5. Conclusões.....	39
6. Referências Bibliográficas.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

BE – Benzoato de Estradiol

CEUA- Comissão de Ética no Uso de Animais

CIDR – Dispositivo intravaginal de progesterona

CL – Corpo Lúteo

DEL – Dias em lactação

DG – Diagnóstico de gestação

DNA - ácido desoxirribonucleico

E2 – Estradiol

ECC – Escore de condição corporal

ECP – Cipionato de estradiol

FIV – Fertilização *in vitro*

FMVZ – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofina

IA – Inseminação artificial

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

Mg – miligrama

P4 – Progesterona

P/IA – Prenhez por IA

PGF2 α – Prostaglandina

TE – Transferência de Embrião

TETF – Transferência de embrião em tempo fixo

UNESP- Universidade Estadual Paulista

US – Ultrassom

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1. Médias de produção de leite, ECC, DEL, número de inseminações, lactações entre os tratamentos

Tabela 2. Taxa de prenhez geral aos 31 e 59 dias e perdas de gestação de acordo com sêmen

Tabela 3. Taxa de prenhez aos 30 e 59 dias e perdas de gestação de acordo com categoria (número de lactações)

Tabela 4. Taxa de prenhez por sêmen aos 31 e 59 dias e perdas de gestação de acordo com ECC

Tabela 5. Taxa de prenhez por sêmen aos 31 e 59 dias e perdas de gestação de acordo com a temperatura retal no momento da inseminação artificial

Tabela 6. Taxa de prenhez aos 30 dias por touro

Tabela 7 - Porcentagem de partos, bezerras fêmeas nascidas e viáveis entre sêmen convencional e sexado

Tabela 8 - Características da progênie descendente de sêmen sexado ou convencional

Tabela 9 – Produção de leite da progênie descendente de sêmen convencional ou convencional

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1. Descrição do delineamento experimental

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), (2017), a técnica de Inseminação Artificial (IA) em Bovinos é utilizada em 6,23% das fêmeas leiteiras e 11,7% em fêmeas de corte no Brasil, com grande potencial de crescimento nos próximos anos em decorrência do uso da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). Verificou-se crescimento de 16,1% no mercado de IATF em relação ao ano anterior (2017 vs 2018). Em 2017 foram comercializados 11.416.196 protocolos de IATF, comparados aos 13.259.690 protocolos comercializados em 2018. Esses dados são indicativos de que 86% das inseminações no Brasil foram realizadas por IATF, demonstrando a consolidação dessa tecnologia no mercado de inseminação artificial (BARUSELLI et al., 2019), considerada eficiente e fundamental para difundir o melhoramento genético no rebanho e aumentar a eficiência reprodutiva, visto que elimina a necessidade de detecção de cio e aumenta a taxa de serviço.

Apesar do aumento da utilização da IATF nos últimos anos, ainda é pequeno o número de animais submetidos a inseminação quando comparado ao total de fêmeas em idade reprodutiva do rebanho brasileiro. Em contrapartida, os produtores adeptos a essas biotecnologias da reprodução, têm intensificado o seu uso buscando alternativas para melhorar seus índices produtivos. Nos sistemas de produção da pecuária de corte e leite, o sexo dos bezerros nascidos é um fator de grande importância para o desempenho econômico, por exemplo, quando ocorre o nascimento de uma cria do sexo masculino na pecuária de leite, verifica-se uma redução na lucratividade, podendo aumentar os custos de produção (HOSSEPIAN DE LIMA, 2006; BARUSELLI et al, 2007). Nos últimos anos, estudos foram realizados com objetivo de otimizar resultados, produzir bezerros de determinado sexo de acordo com o sistema de produção; e como ferramenta para buscar estes resultados estão sendo realizadas pesquisas voltadas a utilização de sêmen sexado. O interesse por sêmen sexado tem aumentado, porém, ao mesmo tempo que existem muitas oportunidades, seu uso ainda apresenta desafios quanto aos custos e eficiência.

O processo de sexagem de sêmen é uma tecnologia importante para o setor de produtos lácteos, pois cria maior oferta de novilhas de reposição e acelera o ganho genético (DE VRIES et al., 2008, CHEBEL et al., 2010), possibilitando um crescimento de rebanho e aumento do descarte voluntário. Portanto, entender melhor sobre a utilização do sêmen sexado como uma ferramenta para aumentar a taxa de nascimento de fêmeas, possibilitando uma reposição adequada e crescimento do rebanho foi o principal objetivo desse projeto. Além disso, buscou-se entender quais fatores ou variáveis podem interferir na fertilidade do sêmen convencional vs. sexado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FERTILIDADE DA VACA NA IATF

Nos últimos anos, muitos estudos foram reportados levando em consideração a base fisiológica e o uso prático da IATF para o manejo reprodutivo de gado leiteiro (BARUSELLI et al., 2012; BINELLI et al., 2014; WILTBANK e PURSLEY, 2014), recentemente reunidos em revisão por Vasconcelos et. al, (2018) demonstrando pontos críticos para o desenvolvimento dos programas que estão em uso atual para a IATF em gado leiteiro no Brasil, onde basicamente 4 processos fisiológicos essenciais para o sucesso da sincronização da ovulação e momento de inseminação são citados, sendo esses: 1 - sincronização da emergência de nova onda folicular, 2 - otimização do ambiente para desenvolvimento folicular e seleção de folículo dominante, 3 - indução de completa regressão do CL com baixa circulação de P4 próximo a inseminação e 4 - sincronização da ovulação combinado com adequado programa de IATF (PEREIRA et al., 2013a;2013b; 2014; 2015; 2016; 2017a; 2017b).

1. Sincronização da emergência de nova onda folicular

Entender as ondas foliculares foi essencial para o desenvolvimento inicial dos protocolos de IATF e sua melhora subsequente (THATCHER AND SANTOS, 2007;

WILTBANK et al., 2011a; WILTBANK AND PURSLEY, 2014). A sincronização de uma nova onda folicular perto do início de um protocolo de IATF tem sido geralmente realizada por dois métodos: ovulação do folículo dominante com GnRH ou inibição da secreção de gonadotrofinas com BE, levando à regressão da onda folicular atual e à emergência de uma nova onda folicular. Vasconcelos et al., (2011b) comparou os efeitos de dois protocolos para sincronização da ovulação (protocolo a base de GnRH vs. E2) nas concentrações de P4 e fertilidade em vacas leiteiras submetidas a IATF ou TETF. Utilizaram 883 vacas Holandesas em lactação ($166,2 \pm 3,3$ dias após o parto, produzindo $36,8 \pm 0,34$ kg de leite / dia) de oito fazendas leiteiras comerciais e dentro de cada fazenda, as vacas foram aleatoriamente designadas para receber um dos dois tratamentos seguintes para sincronização da ovulação: 1) Grupo GnRH: dia -10: inserção do dispositivo de P4 (1,9 g de P4; CIDR®) + GnRH, dia -3: remoção dispositivo de P4 + PGF, dia -2: ECP, dia 0 IATF ou dia 7 TETF (nIATF= 180; nTETF= 260); e 2) Grupo BE: semelhante ao grupo anterior, substituindo GnRH no dia -10 por BE (nIATF = 174; nTETF = 269).

Não houve efeitos de GnRH vs. BE na sincronização da ovulação (87,0% [383/440] vs. 85,3% [378/443]), P/IA aos 60 dias (27,2% [49/80] vs. 25,9 % [45/174]) ou P/TE (38,8% [101/260] vs. 36,4% [98/269]). Também não foi observado diferença quando apenas as vacas sincronizadas foram consideradas para P/IA aos 60 dias (35,3% [55/156] vs. 33,8% [50/148]) ou P/TE (50,7% [115/227] vs. 51,3% [118/230]). Assim, GnRH ou BE podem ser usados no início do protocolo. Vacas tratadas com GnRH apresentaram maior P4 durante o protocolo do que as que receberam BE, entretanto, o desempenho reprodutivo foi semelhante.

2. Otimização do ambiente para desenvolvimento folicular e seleção de folículo dominante

Diferentes métodos foram avaliados com o objetivo de aumentar a fertilidade em programas de sincronização da ovulação, entre eles: aumento da concentração de P4 durante o desenvolvimento do folículo ovulatório (BISINOTTO et al.,2010; MARTINS et

al., 2011; WILTBANK et al., 2011b), aumento da duração do proestro (PEREIRA et al., 2013b), manipulação da idade do folículo ovulatório (CERRI et al., 2009; SANTOS et al., 2010) e suplementação com E2 durante o proestro (CERRI et al., 2004; SOUZA et al., 2011).

3. Indução de completa regressão do CL com baixa circulação de P4 próximo a inseminação

Baixas concentrações de P4 próximo ao momento da inseminação é fator essencial para melhorar a fertilidade em protocolos a base de GnRH ou E2/P4. Diversos estudos foram realizados buscando garantir baixa P4 até o momento da IATF, incluindo a realização de tratamentos com PGF antes da remoção do dispositivo de P4 em programas de IATF a base E2/P4 (MENEGETTI et al., 2009; PERES et al., 2009; PEREIRA et al., 2013b) e tratamentos com duas doses de PGF (BRUSVEEN et al., 2009; PEREIRA et al., 2015; WILTBANK et al., 2015; MELO et al., 2016). Tratamentos esses, buscando permitir mais tempo para a regressão do CL e reduções subsequentes na P4 circulante associada a maior fertilidade.

4. Sincronização da ovulação combinado com adequado programa de IATF

Diversos estudos comparando a indução da ovulação com GnRH vs. ECP (SOUZA et al., 2009) ou ECP vs. BE (MELO et al., 2016) foram realizados no Brasil, nos quais, todos esses hormônios indutores de ovulação produziram fertilidade semelhante apesar das diferenças no intervalo entre o tratamento e a ovulação.

Em vacas leiteiras em lactação sincronizadas com protocolo a base de E2/P4 que usaram ECP para indução da ovulação, a expressão do estro afetou a fertilidade em Pereira et al., (2016), os quais demonstraram que a expressão do estro durante protocolos para IATF ou TETF foi associada a um aumento na fertilidade e redução na perda de gestação.

2.2 DESCARTE VOLUNTÁRIO E INVOLUNTÁRIO

O descarte de vacas leiteiras é uma prática complexa e depende dos objetivos da propriedade, havendo a necessidade de se considerar a idade da vaca, o estágio de lactação, o histórico, a sanidade, o nível de produção de leite e a performance reprodutiva (SANTOS et al., 2001).

Descartar nada mais é que eliminar do processo produtivo. O descarte de uma vaca leiteira pode ser uma escolha do produtor, sendo então considerado voluntário, ou por um motivo alheio à sua vontade sendo, nesse caso, involuntário. Já selecionar é eleger, dentre os animais viáveis da população, os superiores, para que possam reproduzir-se com maior intensidade e, oportunamente, produzirem a próxima geração. Basicamente, selecionar animais implica em dar-lhes a oportunidade de deixar descendentes enquanto que descartar vacas significa impedir que animais que já deixaram progênie (ou que tiveram essa chance) continuem em reprodução (RIBEIRO et. al., 2003).

Outro aspecto a ser considerado é o do custo adicional ou perda de receita quando uma vaca apresenta um problema que a enquadre no descarte involuntário. Esse tipo de descarte aumenta o custo de reposição e reduz a oportunidade de que vacas com altas produções permaneçam no rebanho (ROGERS et al., 1991). Godden et al., (2003) avaliaram 624.614 vacas descartadas ou mortas em 5.749 diferentes rebanhos, em intervalos de 21 dias, quanto ao momento da lactação em que os animais foram descartados, e observaram, que o maior número de animais descartados aconteceu nos primeiros 62 dias de lactação. Economicamente, quanto mais cedo a vaca deixa o rebanho, maior é o custo com descarte.

Nos Estados Unidos, Queiroz & McAllister (1996) encontraram que o descarte involuntário no Estado do Kentucky, foi responsável por 73,73% das remoções do rebanho, em que as taxas de descarte voluntário e involuntário foram 5,08 e 14,26%, respectivamente, totalizando 19,34%. No Brasil, Lemos et al. (1996), trabalhando com animais cruzados, encontraram como principais responsáveis pela remoção dos

animais do rebanho, problemas reprodutivos (27,1%), mastite (18,8%) e morte (18,8%).

Para cada animal que deixa o rebanho, é necessário que outro o reponha. A utilização do sêmen sexado é uma ferramenta fundamental no Brasil para reposição nos rebanhos, buscando ganho genético, aumento do nascimento de fêmeas onde o custo de uma novilha de qualidade para reposição é bastante elevado. Em *benchmark* no ano 2018 pela Equipe Gestão Leite – Rehagro Consultoria, o valor estimado de uma novilha ficou em torno de R\$ 4027,00 – R\$ 4363,00, podendo variar de acordo com o sistema de produção utilizado.

2.3 SÊMEN SEXADO

2.3.1 Processo de Sexagem

Para realização da sexagem espermática, foram testadas diversas técnicas com intuito de tornar o processo mais eficaz e economicamente viável. Estas técnicas foram baseadas nas características dos espermatozoides, tais como: sensibilidade ao pH (EMMENS, 1960), morfologia do núcleo e cabeça (SHETTLES, 1960), antígenos de superfície (KOO et al., 1973), carga elétrica da superfície da membrana (KANEKO et al., 1984) e diferença no conteúdo de DNA (JOHNSON et al., 1987; JOHNSON; FLOOK; HAMK, 1989). A sexagem de espermatozoides por citometria de fluxo é o método mais utilizado atualmente (SEIDEL, 2007; GARNER AND SEIDEL, 2008; RATH et al., 2013). A quantidade de DNA entre os cromossomos X e Y varia significativamente entre as espécies e, atualmente, é a única diferença estabelecida e validada cientificamente para a separação eficiente de espermatozoides X ou Y in vitro (JOHNSON; WELCH, 1999). Essa diferença varia de 3,70 a 4,44% nos touros (SHARPE; EVANS, 2009), mas também foi descrita em outras espécies de mamíferos (GARNER et al., 1983; JOHNSON et al., 1994) como em coelhos (3%), porcos (3,6%), cavalos (3,7%), carneiros (4,2%) e cães (3,9%) (JOHNSON; WELCH, 1999). Com base nesta diferença, pode ser realizada a seleção do sexo dos espermatozoides.

A qualidade do ejaculado influencia diretamente a velocidade do processo de sexagem, que por sua vez interfere diretamente na pureza do sêmen. Em relação à eficiência do processo de sexagem pela técnica, em condições ótimas, são necessários, atualmente, cerca de nove minutos para se produzir uma palheta de sêmen sexado, que se traduz em aproximadamente sete palhetas por hora na concentração de 2×10^6 espermatozoides por dose (GARNER; SEIDEL JR., 2008). A velocidade de separação é geralmente de 3.000 a 4.000 células vivas por segundo com acurácia de, em média, 90%; o que já é considerado um grande avanço se comparado aos resultados obtidos anos atrás (SEIDEL JR., 2003).

2.3.2 Processo de Criopreservação

O processo de criopreservação tem como finalidade suspender o metabolismo e manter as características espermáticas por mais tempo (SCHENK et al., 1999), porém, células sexadas congeladas tendem a perder a viabilidade mais cedo que as células não sexadas, uma vez que o processo de sexagem diminui a viabilidade espermática, o que é intensificado pelo processo de congelamento (GARNER, 2006). Tal processo, promove danos não só a motilidade espermática, como também a integridade do DNA, afetando algumas regiões do genoma. Este fato é relevante, pois estudos têm demonstrado a importância dos genes paternos para o desenvolvimento embrionário inicial (VALCARCE et al., 2013).

2.3.3 Fertilidade do sêmen sexado

Apesar dos avanços na no processo de sexagem, menor P/IA tem sido obtida quando se utiliza sêmen sexado (DEJARNETTE et al., 2009, 2010, 2011; SALES et al., 2011; SÁ FILHO et al., 2012).

Dejarnette et al., (2010) reportaram que o aumento da concentração de espermatozoides sexados de $2,1 \times 10^6$ para $3,5 \times 10^6$ não resultou em melhoria nas taxas de concepção em vacas ou novilhas holandesas comparado ao sêmen convencional (15×10^6), o que se assemelha a resultados encontrados em ambas categorias por DeJarnette et al., (2008) e Seidel e Schenk, (2008). Também nesse estudo de Dejarnette et al., (2010), foi reportado que as taxas de concepção de ambas

as dosagens de espermatozoides sexados foram menores do que as do sêmen convencional em quase todas as comparações, variando apenas devido ao touro. As taxas de concepção de sêmen sexado foram de 74% para a dosagem de $2,1 \times 10^6$ e 78% para a dosagem de $3,5 \times 10^6$ quando expressada em porcentagem da taxa de concepção obtida com o uso do sêmen convencional, o que está de acordo com resultados encontrados por Seidel et al., (1999) e Schenk et al., (2009). Porém, em outro experimento, Bodmer et al., (2005), utilizaram a mesma concentração de espermatozoides por IA em vacas em lactação inseminadas 12h após detecção de cio, e as taxas de concepção aos 30-40 dias foram similares entre os grupos sexado (27.6%, n=105) e convencional (28.1%, n=64), porém, válido ressaltar que o número de animais do estudo é pequeno para a realização de inferências em variáveis com a taxa de concepção.

Outro questionamento quanto a utilização de sêmen sexado, é em relação ao local de deposição do sêmen. Kurykin et al (2007), realizou um estudo em novilhas de leite, no qual, foi utilizado sêmen sexado com $2,2 \times 10^6$ espermatozoides/palheta, e os animais foram inseminados 80-82h após a segunda dose de PGF2a (primeira dose de PGF2a foi recebida 14 dias antes da segunda dose), divididos entre os tratamentos: 1) IA convencional no corpo do útero; 2) deposição do sêmen na parte mediana do corno uterino; 3) deposição do sêmen próximo a junção útero-tubárica com a ajuda de um inovulador de embriões. A prenhez foi verificada 30 a 32 dias após a inseminação e reconfirmada depois de 3 semanas aproximadamente, e os resultados foram: 1) IA corpo uterino 41,8% (38/91); 2) IA no meio do corno uterino 49,1% (28/57) e 3) IA no final do corno uterino 39,3% (24/61); o que demonstra que o local de deposição do sêmen sexado parece não interferir nas taxas de prenhez quando se utiliza uma dose inseminante de pelo menos $2,2 \times 10^6$ espermatozoides. No entanto, novamente, o número de animais utilizado no estudo é pequeno.

Além do local de deposição do sêmen, Kurykin et al (2007), avaliaram no momento da IA o comportamento de cio das novilhas classificando-o como: 1) fortes sinais de comportamento de cio ou 2) sinais fracos de comportamento de cio e

concluíram que independentemente do local de deposição de sêmen, animais que expressaram fortes sinais de cio apresentaram melhor fertilidade [45,9% (85/185)] quando comparado aos animais com fracos sinais de cio [20,8% (5/34)]. Fator este, demonstrado posteriormente por Pereira et. al, (2015); que observaram que a expressão de estro durante protocolos de IATF (sêmen convencional) e TETF, está associada com um aumento na fertilidade e redução da perda de prenhez, sugerindo que o ambiente hormonal o qual caracteriza uma falta de expressão de estro, também produz alterações uterinas que diminuem a probabilidade de manutenção da gestação durante o período crítico entre o primeiro e o segundo mês de gestação.

Alguns pesquisadores da Finlândia, (ANDERSSON et al., 2006), realizaram experimentos comparando a utilização do sêmen sexado e convencional, e relataram taxa de concepção média de 21% com sêmen sexado e de 46% com sêmen convencional após o primeiro serviço em vacas holandesas sem sincronização do estro e ovulação. Em outro estudo, (SCHENK et al., 2009) utilizaram vacas holandesas (lactação 1 a 4 e entre 20 a 140 dias de lactação) inseminadas com sêmen sexado ou convencional após sincronização (com prostaglandina ou Ovsynch) ou após observação de cio natural. As taxas de concepção gerais foram de 25% para vacas recebendo sêmen sexado e 37,7% para vacas recebendo sêmen convencional; sendo assim, uma relação (sexado/convencional) de 66%.

Sales et. al., (2011) avaliaram o horário da inseminação artificial em animais submetidos a protocolo de IATF, utilizando novilhas da raça Jersey inseminadas com sêmen convencional ou sexado em dois grupos distintos, G1) vacas inseminadas 54h após a retirada do dispositivo de P4, G2) vacas inseminadas 60h após a retirada do dispositivo de P4, e observaram que a P/IA foi a mesma nos animais inseminados com sêmen convencional (54h = 50,5% vs. 60h = 51,8%; $p = 0,95$), porém, nos animais inseminados com sêmen sexado, maior P/IA foi observada no grupo 60h (54h = 16,2% vs. 60h = 31,4%; $p < 0,01$). Esses resultados foram similares aos encontrados por Schenk et. al., (2009) que relataram melhor fertilidade na inseminação com sêmen sexado mais próximo ao momento da ovulação.

Segundo os mesmos autores, o processo de sexagem causa alterações nos espermatozoides, o que pode alterar a vida funcional e uma possível pré capacitação do mesmo.

2.4 FERTILIDADE DE TOUROS

Trabalhos indicam a influência do touro nos resultados obtidos, visto que alguns touros têm capacidade de gerar a mesma taxa de concepção independente se usados como sêmen convencional ou sexado, já outros, diminuem significativamente a fertilidade quando utilizados para a produção de sêmen sexado (BORCHERSEN AND PEACOCK, 2009).

Serafim et. al, (2018) avaliaram a influência do touro doador de sêmen sexado na taxa de formação de blastocistos e resultados de concepção de embriões produzidos in vitro e os resultados obtidos demonstraram grande variação nas taxas de produção de embriões, que oscilaram entre 16,09% a 47,83%, havendo uma tendência de influência do touro/sêmen sexado na taxa de produção de embriões ($P=0.0659$) e efeito significativo do touro/sêmen sexado para a taxa de concepção dos embriões transferidos ($P=0.0230$).

A menor vida útil no útero e o efeito do touro são fatores que determinam a fertilidade após o uso de sêmen sexado em bovinos (MAXWELL et al., 2004; FRIJTERS et al., 2009; UNDERWOOD et al., 2009; DEJARNETTE et al., 2010, 2011; UNDERWOOD et al., 2010; GOSÁLVEZ et al., 2011). Outra consideração relevante é que embora a separação de células resulte na eliminação de espermatozoides mortos ou lesados, as células que sobrevivem ao processo de sexagem tendem a se deteriorar mais rapidamente, em touros e em bodes, mas aparentemente, isso não ocorre em sêmen de garanhões e de carneiros (MORRIS et al., 2003; GARNER, 2006).

2.5 EFEITOS EPIGENÉTICOS

A epigenética é definida como modificações do genoma que são herdadas pelas próximas gerações, mas que não alteram a sequência do DNA. Ela compreende um conjunto de mecanismos que promovem a regulação da expressão gênica a nível

transcricional através de modificações químicas no DNA e na cromatina, como metilação, acetilação e fosforilação, que resultam na consequente mudança fenotípica do indivíduo. Durante muito tempo, os genes foram considerados os únicos capazes de passar características biológicas de uma geração a outra, porém, atualmente sabe-se que variações não genéticas ou epigenéticas adquiridas durante a vida de um indivíduo podem ser passadas aos seus descendentes.

Em contrapartida de todos avanços no processo de sexagem de sêmen, velocidade de separação e acurácia em relação ao sexo do espermatozoide, verificou-se fatores no processo que podem ser lesivos ao espermatozoide como uso do corante de DNA (H33342), reaquecimento e incubação, forças mecânicas durante a passagem pelo citômetro de fluxo, a exposição intensa ao laser UV, a carga elétrica, a alta gravidade durante a desaceleração dentro do tubo coletor, a alta diluição, pressão elevada e resistência a mudanças na composição dos meios diluidores, podendo levar a diminuição na capacidade de fertilização espermática na inseminação artificial e, consequentemente, em menor taxa de desenvolvimento embrionário, comparado ao sêmen não sexado/convencional (GARNER; SEIDEL JR., 2003; GARNER, 2006; MOCÉ et al., 2006; GRAAF et al., 2007; GARCIA et al., 2007). Todos esses fatores podem causar danos estruturais nos espermatozoides (BLONDIN et al., 2009; CARVALHO et al., 2010), tais como danos no DNA, o que poderia afetar o desenvolvimento embrionário. Danos no DNA espermático podem ser causados por compactação anormal da cromatina, fragmentação de DNA e defeitos epigenéticos (TAVALAEE; RAZAVI; NASR-ESFAHANI, 2009). Entretanto, a avaliação da fragmentação de DNA tem sido o único método para avaliar o efeito da sexagem por citometria de fluxo na integridade da cromatina (BOEHANSEN et. al., 2005; BLONDIN et. al., 2009; CARVALHO et. al., 2010; GOSALVEZ et. al., 2011), não havendo estudos que avaliem possíveis mudanças epigenéticas que possam acontecer após esse processo.

Estudos indicam que o processo pode danificar o DNA espermático e aumentar a incidência de anormalidades genéticas (GARNER, 2001), porém mais de mil

nascimentos originados de sêmen sexado apresentaram-se aparentemente normal fenotipicamente (SEIDEL, 1999b, c; CRAN, 2000). Djedović et al., (2016) avaliaram o efeito do tipo de semen (sexado e convencional) e obtiveram redução na taxa de concepção ($p<0,001$), peso ao nascimento ($p<0,001$), viabilidade das bezerras 48 horas após nascimento ($p<0,001$), e aumento na taxa de natimortos ($p<0,01$).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (ASBIA) - Index ASBIA – 2017.

ANDERSSON M, TAPONEN J, KOMMERI M, DAHLBOM M, 2006: Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction Domestic Animal**, 41, 95-97.

BARUSELLI PS, SOUZA AH, MARTINS CM, GIMENES LU, SALES JNS, AYRES H, ARRUDA RP. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. *Revista Brasileira Reprodução Animal*, 31:374-381, 2007.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M.F. ; FERREIRA, R.M. ; SALES, J.N.S. ; GIMENES, LINDSAY UNNO ; VIEIRA, L.M. ; MENDANHA, M.F. ; BÓ, GABRIEL A . Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in Domestic Animals** (1990), v. 47, p. 134-141, 2012.

BARUSELLI, P.S. Avaliação do mercado de IATF no Brasil. Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP, 1. ed., 2019. Acesso < <http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>>

BINELLI M, SARTORI R, VASCONCELOS JLM, MONTEIRO JR PLJ, PEREIRA MHC, RAMOS RS. 2014. Evolution in fixed-time: from synchronization of ovulation to improved fertility. In: **2014 Proceedings 9th International Ruminant Reproduction Symposium**, Obihiro City, Hokkaido, Japan. Burton-On-Trent, UK: Context. pp. 493-506.

BISINOTTO RS, RIBEIRO ES, MARTINS LT, MARSOLA RS, GRECO LF, FAVORETO MG, RISCO CA, THATCHER WW, SANTOS JEP. 2010. 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**, 93:5798-5808.

BLONDIN P, BEALIEUM M, FOURNIER V, MORIN N, CRAWFORD L, MADAN P, KING WA. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, v.71, p.30-38, 2009.

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

BORCHENSEN, S AND PEACOCK, M. 2009. Danish A.I. field data with sexed sêmen. **Theriogenology**, v.71, p.59-63.

BRUSVEEN DJ, SOUZA AH, WILTBANK MC. 2009. Effects of additional prostaglandin F2 α and estradiol-17 β during Ovsynch in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 92:1412-1422.

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

CERRI RLA, SANTOS JEP, JUCHEM SO, GALVAO KN, CHEBEL RC. 2004. Timed artificial insemination with estradiol cypionate or insemination at estrus in highproducing dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 87:3704-3715.

CERRI RLA, RUTIGLIANO HM, CHEBEL RC, SANTOS JEP. 2009. Period of dominance of the ovulatory follicle influences embryo quality in lactating dairy cows. **Reproduction**, 137:813-823.

CRAN, D. G.; JOHNSON, L. A.; POLGE, C. Sex preselection in cattle: a field trial. **The Veterinary Record**, London, v. 136, n. 19, p. 495-6, 1995.

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

DE VRIES, A., M. OVERTON, J. FETROW, K. LESLIE, S. EICKER, AND G. ROGERS. 2008. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, 91:847–856.

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

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

DEJARNETTE, J.M., MCCLEARY, C.R., LEACH, M.A., MORENO, J.F., NEBEL, R.L., MARSHALL, C.E., 2010. Effects of 2.1 and 3.5 x 10⁶ sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. **Journal Dairy Science**, 93, 4079-4085.

DEJARNETTE, J. M., NEBEL.R. L. AND MARSHALL. C. E. 2009. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. **Theriogenology**, 71:49–58.

DJEDOVIĆ. R., BOGDANOVIĆ. V.; STANOJEVIĆ. D.; NEMES. Z.; GÁSPÁRDY. A.; CSEH. S. Involuntary reduction in vigour of calves born from sexed sêmen. **Acta Veterinaria Hungarica**. 64 (2), pp. 229–238 (2016).

EMMENS, C. W. Insemination pH and the sex ratio in rabbits. **Journal Herald**, v. 51. P.156-157, 1960.

FRIJTERS ACJ, MULLAART E, ROELOFS RMG, VAN HOORNE RP, MORENO JF, MORENO O, MERTON JS, 2009: What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? **Theriogenology**, 71, 64–67.

GARCIA, E. M.; VÁSQUEZ, J.M.; PARRILLA, I.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; CABALLERO, I.; ROCA, J.; VASQUEZ, J. L.; MARTÍNEZ, E. A. Improving the fertilizing ability of sex sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v.68, p.771-778, 2007.

GARNER DL (2001) Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. **Journal of Andrology** 22:519–526

GARNER, D. L., AND G. E. SEIDEL JR. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, 69:886–895.

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

GARNER, D.L.; SEIDEL, JR, G. E. Past, Present and future perspectives on sexing sperm. **Canadian Journal of Animal Science**, v.83, p. 375-384, 2003.

GRAAF, S. P.; EVANS, G.; GILLAN, L.; GUERRA, M. M. P.; MAXWELL, W. M. C.; O'BRIEN, J. K. The influence of antioxidant, cholesterol and seminal plasma on the in vitro quality of sorted and non-sorted ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 67, p. 217-227, 2007.

GOSÁLVEZ, J., RAMIREZ, M.A., LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C., CRESPO, F., EVANS, K.M., KJELLAND, M.E., MORENO, J.F., 2011. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: II. Dynamic features. **Theriogenology**, 75, 206-211.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Controle de qualidade na seleção de espermatozoides de bovinos por centrifugação em gradientes descontínuos de densidade de sílica coloidal modificada (Percoll®) e iodixanol (Optiprep TM). 2005, 214f. **Tese (Livre-docência) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal**, 2005.

JOHNSON LA AND WELCH GR (1999) Sex preselection: high-speed flow cytometric sorting of X and Y sperm for maximum efficiency **Theriogenology**, v.52, p.1323–1341.

JOHNSON LA, FLOOK JP AND HAWK HW (1989) Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. **Biology of Reproduction**, v.41, p.199–203.

JOHNSON LA, FLOOK JR AND LOOK MV (1987) Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. **Gamete Research**, v.17, 203–212

JOHNSON LA, WELCH GR AND GARNER DL (1994) Improved flow sorting resolution of X- and Y-chromosome bearing viable sperm separation using dual staining and dead cell sorting Cytometry **17 Supplement 7** (Abstract 83) 28.

KANEKO S, OSHIRO S, KOBAYASHI T, ITZUKA R AND MOHRI H (1984) Human X- and Y-bearing sperm differ in cell surface sialic acid content. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.124, 950–955.

KOO, G.C.; STACKPOLE, C.W.; BOYSE, E.A.; HÄMMERLING, U. Topographical, localization of the H-Y antigen on mouse spermatozoa by immunoelectron microscopy. **Production National Academy Science**. New York, v. 70, p. 1502-1505, 1973.

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

LEMOS, A.M.; TEODORO, R.L.; MADALENA, F.E. Comparative performance of six Holstein-Friesian X Guzerá grades in Brazil. Stayability, herd life and reasons for disposal. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19, n.2, p.259-264, 1996.

MARTINS JPN, POLICELLI RK, NEUDER LM, RAPHAEL W, PURSLEY JR. 2011. Effects of cloprostenol sodium at final prostaglandin F2 α of Ovsynch on complete luteolysis and pregnancy per artificial insemination in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 94:2815-2824.

MELO LF, MONTEIRO PLJ, SURJUS RS, DRUM JN, WILTBANK MC, SARTORI R. 2016. Progesterone-based fixed-time artificial insemination protocols for dairy cows: gonadotropin-releasing hormone versus estradiol benzoate at initiation and estradiol cypionate versus estradiol benzoate at the end. **Journal of Dairy Science**, 99:9227-9237.

MENEGHETTI M, SA FILHO OG, PERES RF, LAMB GC, VASCONCELOS JL. 2009. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus*

cows I: basis for development of protocols. **Theriogenology**, 72:179-189.

MAXWELL, W.M.C., EVANS, G., HOLLINSHEAD, F.K., BATHGATE, R., DE GRAAF, S.P., ERIKSSON, B.M., GILLAN, L., MORTON, K.M., O'BRIEN, J.K., 2004. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**, 82-83, 79-95.

MOCÉ E, GRAHAM JK, SCHENK JL. Effect of sex- sorting on the ability of fresh and 495 cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology** 2006; 66: 496 929-936.

MORRIS, L. H. A.; HOLLINSHEAD, F. K.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. The longevity and acrosome status of stallion flow-sorted spermatozoa. **Theriogenology**, v. 59, p.512, 2003. Abstract.

PEREIRA, M.H.C.; RODRIGUES, A.D.P. ; MARTINS, T. ; OLIVEIRA, W.V.C. ; SILVEIRA, P.S.A. ; WILTBANK, M.C. ; VASCONCELOS, J.L.M. . Timed artificial insemination programs during the summer in lactating dairy cows: Comparison of the 5-d Cosynch protocol with an estrogen/progesterone-based protocol. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 6904, 2013a.

PEREIRA, M.H.C.; SANCHES, C.P.; GUIDA, T.G. ; RODRIGUES, A.D.P. ; ARAGON, F.L. ; VERAS, M.B. ; BORGES, P.T. ; WILTBANK, M.C. ; VASCONCELOS, J.L.M. . Timing of prostaglandin F2 α treatment in an estrogen-based protocol for timed artificial insemination or timed embryo transfer in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, p. 2837-2846, 2013b.

PEREIRA, M.H.C.; RODRIGUES, A.D.P. ; DE 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**, v. 97, p. 1454-1464, 2014.

PEREIRA, M.H.C.; WILTBANK, M.C. ; BARBOSA, L.F.S.P. ; COSTA, W.M. ; CARVALHO, M.A.P. ; VASCONCELOS, J.L.M. . Effect of adding a gonadotropin-releasing-hormone treatment at the beginning and a second prostaglandin F2 α treatment at the end of an estradiol-based protocol for timed artificial insemination in

lactating dairy cows during cool or hot seasons of the year. **Journal of Dairy Science**, v. 98, p. 947-959, 2015.

PEREIRA, M.H.C.; WILTBANK, M.C.; VASCONCELOS, J.L.M. . Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. **Journal of Dairy Science**, v. 99, p. 2237, 2016.

PEREIRA, M.H.C.; SANCHES, C.P. ; GUIDA, T.G. ; WILTBANK, M.C. ; VASCONCELOS, J.L.M. . Comparison of fertility following use of one versus two intravaginal progesterone inserts in dairy cows without a CL during a synchronization protocol before timed AI or timed embryo transfer. **Theriogenology**, v. 89, p. 72-78, 2017a.

PEREIRA, M.H.C.; WILTBANK, M.C. ; GUIDA, T.G. ; LOPES, F.R. ; VASCONCELOS, J.L.M. . Comparison of 2 protocols to increase circulating progesterone concentration before timed artificial insemination in lactating dairy cows with or without elevated body temperature. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 8455-8470, 2017b.

PERES RF, CLARO I JR, SA FILHO OG, NOGUEIRA GP, VASCONCELOS JLM. 2009. Strategies to improve fertility in Bos indicus postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, 72:681-689.

QUEIROZ, S.A.; McALLISTER, A.J. Avaliação do tipo de descarte de vacas sobre a rentabilidade de rebanhos leiteiros no Estado do Kentucky. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., 1996, Fortaleza. **Anais... Fortaleza: Sociedade Brasileira de Zootecnia**, 1996. v.1, p. 467-469.

RATH, D., BARCIKOWSKI, S., DE GRAAF, S., GARRELS, W., GROSSFELD, R., KLEIN, S., KNABE, W., KNORR, C., KUES, W., MEYER, H., MICHL, J., MOENCH-TEGEDER, G., REHBOCK, C., TAYLOR, U., WASHAUSEN, S., 2013. Sex selection of sperm in farm animals: status report and developmental prospects. **Reproduction**, 145, R15-R30.

ROGERS, G.W.; HARGROVE, G.L.; COOPER, J.B. et al. Management and genetic

influences on survival in Jerseys. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.279-285, 1991.

SÁ FILHO M.F, GIROTTTO R, ABE EK, PENTEADO L, CAMPOS FILHO EP, MORENO JF ET AL. Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. **Journal Animal Science** 2012; 90:1816–23.

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

SANTOS JEP, DEPETERS EJ, JARDON PW, HUBER JT. 2001. Effect of prepartum dietary protein level on performance of primigravid and multiparous Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 84:213-224.

SANTOS JEP, BISINOTTO RS, RIBEIRO ES, LIMA FS, GRECO LF, STAPLES CR, THATCHER WW. 2010a. Applying nutrition and physiology to improve reproduction in dairy cattle. **Soc Reprod Fertil Suppl**, 67:387-403.

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

SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; SEIDEL JR, G.E. Cryopreservation of flow-sorted bovine spermatozoa. **Theriogenology**, Stonehan, v. 52, p. 1375-11391, 1999.

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

SEIDEL, G. E. JR., AND J. L. SCHENK. 2008. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: Effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. **Animal Reproduction Science**, 105:129–138.

SEIDEL, G. E. JR., J. L. SCHENK, L. A. HERICKHOFF, S. P. DOYLE, Z. BRINK, R. D. GREEN, AND D. G. CRAN. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, 52:1407–1420.

SERAFIM, PR; GOMES, GM; GOMES, LPM; BORN, JLB; BORGES, MS; CRESPILO, AM. Sêmen bovino sexado: A produção in vitro de embriões pode ser influenciada pelo touro doador do material genético?. **Revista de Saúde**. 2018 Jan./Jun.; 09 (1): 04-08.

SHARPE, J.C.; EVANS, K.M. Advances in flow cytometry for sperm sexing. **Theriogenology**, v. 71, p. 4–10, 2009.

SHETTLES, L.B. Nuclear structure of human spermatozoa. **Nature**, London, v.188, p. 918-919, 1960.

SIQUEIRA, L. G. B.; DIKMEN. S.; ORTEGA. M. S.; HANSEN. P. J. Postnatal phenotype of dairy cows is altered by in vitro embryo production using reverse X-sorted semen. **Journal of Dairy Science**. Vol. 100 No. 7, 2017.

SOUZA AH, VIECHNIESKI S, LIMA FA, SILVA FF, ARAUJO R, BO GA, WILTBANK MC, BARUSELLI PS. 2009. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, 72:10-21

TAVALAEE, M.; RAZAVI, S.; NASR-ESFAHANI, M.H. Influence of sperm chromatin anomalies on assisted reproductive technology outcome. **Fertility and Sterility**, New York, v.91, p. 1119-1126, 2009.

THATCHER WW, SANTOS JE. 2007. Control of ovarian follicular and corpus luteum development for the synchronization of ovulation in cattle. **Soc Reprod Fertil Suppl**, 64:69-81.

UNDERWOOD, S.L., BATHGATE, R., MAXWELL, W.M.C., EVANS, G., 2009. Development of procedures for sex-sorting frozen-thawed bovine spermatozoa. **Reproduction Domestic Animal**, 44, 460-466.

UNDERWOOD, S.L., BATHGATE, R., MAXWELL, W.M.C., EVANS, G., 2010. Birth fo offspring after artificial insemination of heifers with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. **Animal Reproduction Science**, 118, 171-175.

VALCARCE, D.G.; CARTÓN-GARCÍA, F.; RIESCO, M.F; HERRÁEZ, M.P.; ROBLES, V. Analysis of DNA damage after human sperm cryopreservation in genes

crucial for fertilization and early embryo development. **Andrology**, v. 1, p. 723-730, 2013.

VASCONCELOS JLM, JARDINA DTG, SÁ FILHO OG, ARAGON FL, VERAS MB. 2011b. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropinreleasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, 75:1153-1160.

VASCONCELOS, J.L.M.; PEREIRA, M.H.C. ; WILTBANK, M.C. ; GUIDA, T.G. ; LOPES JR., F. R. ; SANCHES JR., C. P. ; BARBOSA, L. F. S. P. ; COSTA JR., W. M. ; MUNHOZ, A. K. . Evolution of fixed-time AI in dairy cattle in Brazil. In: International Ruminant Reproduction Symposium, 10, 2018, Foz do Iguaçu-PR. Abstracts... Anim Reprod., Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA, 2018. v. 15. p. 950-951.

WILTBANK MC, BAEZ GM, COCHRANE F, BARLETTA RV, TRAYFORD CR, JOSEPH RT. 2015. Effect of a second treatment with prostaglandin F-2 alpha during the Ovsynch protocol on luteolysis and pregnancy in dairy cows. **Journal of Dairy Science**, 98:8644-8654.

WILTBANK MC, PURSLEY JR. 2014. The cow as an induced ovulator: timed AI after synchronization of ovulation. **Theriogenology**, 81:170-185.

WILTBANK MC, SARTORI R, HERLIHY MM, VASCONCELOS JLM, NASCIMENTO AB, SOUZA AH, AYRES H, CUNHA AP, KESKIN A, GUENTHER JN, GUMEN A. 2011a. Managing the dominant follicle in lactating dairy cows. **Theriogenology**, 76:1568-1582.

WILTBANK MC, SOUZA AH, CARVALHO PD, BENDER RW, NASCIMENTO AB. 2011b. Improving fertility to timed artificial insemination by manipulation of circulating progesterone concentrations in lactating dairy cattle. **Reprod Fertil Dev**, 24:238-243.

CAPÍTULO 2

**Efeito da sexagem do sêmen na fertilidade a IATF e na
produtividade das filhas**

Resumo

Este estudo compara a fertilidade do sêmen sexado e convencional de 6 diferentes touros Holandeses em vacas holandesas lactantes submetidas a protocolo de (IATF). Foram utilizadas 116 novilhas e 978 vacas em lactação, sincronizadas com o seguinte protocolo de IATF: D-11, 2mg de benzoato de estradiol i.m (Gonadiol®, Zoetis, SP, Brasil) + 100 mg diacetatetetraidratado de gonadorelina i.m (vacas) (Cystorelin®, Merial, SP, Brasil) administrados concomitante à inserção do dispositivo intravaginal de 1,9 g de P4 (CIDR®, Zoetis, SP, Brasil); No D-4, foi administrado 25 mg de dinoprost i.m (vacas) ou 12,5 mg (novilhas) (Lutalyse®, Zoetis, SP, Brasil); No D-2, 25 mg de dinoprost i.m (vacas) ou 12,5 mg (novilhas) (Lutalyse®, Zoetis, SP, Brasil) + 1,0 mg (vacas) ou 0,5 mg (novilhas) de cipionato de estradiol i.m (ECP, Zoetis, SP, Brasil) + remoção do dispositivo intravaginal; no D0 IATF os animais foram divididos aleatoriamente para serem inseminados com sêmen sexado ou convencional. A taxa de concepção média do sêmen convencional foi maior que a do sêmen sexado aos 31 dias [35,6% (198/557) vs. 25,7% (138/537)], e aos 59 dias [28,7% (160/557) vs. 20,7% (111/537)], respectivamente. As perdas de gestação não diferiram entre sêmen convencional e sexado [19,2% (38/198) vs. 19,6% (27/138)]. Não houve diferença na taxa de concepção aos 31 dias no sêmen convencional e sexado em novilhas [45,76% (27/59) vs. 42,11% (24/57)]; em primíparas [34,69% (51/147) vs. 30,6% (41/134)] em secundíparas [33,33% (53/159) vs. 25,64% (40/156)] porém, foi diferente em múltiparas [34,9% (67/192) vs. 17,37% (33/190)]. Houve efeito de touro no sêmen convencional e sexado. A porcentagem de número de partos foi igual, porém a porcentagem de fêmeas nascidas foi de 51,7% (62/120) no convencional e 87,5% (77/88) no sêmen sexado. A produção de leite da progênie acumulada aos 100 dias foi igual entre os tratamentos (CV = 3049,1kg vs. SX = 2987,7 kg). Diferentes estratégias na utilização do sêmen sexado podem ser utilizadas para conseguir resultados semelhantes ao sêmen convencional, como utilização em novilhas, primíparas e secundíparas.

Palavras – chave: fertilidade, sincronização, sexagem

Abstract

Semen sexing effect on fertility TAI and productivity of daughters

This study aimed to evaluate the fertility of sexed and conventional semen from 6 different bulls in Dairy lactating cows submitted to a TAI protocol. The total of 116 heifers and 978 lactating cows synchronized with the following TAI protocol: D-11, 2mg estradiol benzoate i.m (Gonadiol®, Zoetis, SP, Brazil) + 100mg gonadorelin diacetatetetrahydrate i.m (cows) (Cystorelin®, Merial, Brazil) administered concomitantly with the insertion of the intravaginal device of 1.9 mg P4 (CIDR®, Zoetis, SP, Brazil); In D-4, 25 mg (cows) or 12,5 mg (heifers) of dinoprost i.m (Lutalyse®, Zoetis, SP, Brazil) was administered; In D-2, 25 mg (cows) and 12,5 mg (heifers) of dinoprost i.m (Lutalyse®, Zoetis, SP, Brazil) + 1.0 mg (cows) or 0.5mg (heifers) estradiol cypionate i.m (ECP, Zoetis, SP, Brazil) + intravaginal device removal; in D0 TAI. The animals were randomly divided to be inseminated with either sexed or conventional semen. The conventional mean was higher than the sexed at 31 days [35.6% (198/557) vs. 25.7% (138/537) and at 59 days [28.7% (160/557) vs. 20.7% (111/537)], respectively. Pregnancy loss did not differ between conventional and sexed semen [19.2% (38/198) vs. 19.6% (27/138)]. There was no difference in conception rate at 31 days in conventional and sexed semen in heifers [45.76% (27/59) vs. 42.11% (24/57)]; in primiparous [34.69% (51/147) vs. 30.6% (41/134)] in second part [33.33% (53/159) vs. 25.64% (40/156)], but it was different in multiparous [34.9% (67/192) vs. 17.37% (33/190)]. There was a bull's effect on conventional and sexed semen. The percentage of births was the same, but the percentage of females born was 51.7% (62/120) in the conventional and 87.5% (77/88) in sexed semen. The progeny milk production accumulated in 100 days was equal between the treatments (CV = 3049.1 kg vs. SX = 2987.7 kg). Different strategies can be applied in the use of sexed semen to obtain similar results to conventional semen, such as the use in heifers, primiparous and secondiparous.

Key words: fertility, synchronization, sexing

1. Introdução

A teoria de que o ambiente materno durante a gestação modula a saúde e a doença da prole tem sido repetidamente demonstrada (WADHWA et al., 2009; SCHULZ, 2010). A programação do fenótipo adulto pode ocorrer nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, durante o período de pré-implantação (FLEMING et al. 2015 e HANSEN et al. 2016). Além disso, mudanças epigenéticas em gametas masculinos também podem desempenhar um papel na programação do fenótipo da progênie (RANDO E SIMMONS, 2015 e SCHAGDARSURENGIN E STEGER, 2016).

Em estudo retrospectivo, Siqueira et. al., (2017) observaram características de sobrevivência, crescimento e produção da progênie provenientes de IA (sêmen convencional), FIV (sêmen convencional), FIV (sêmen sexado) e TE (sêmen convencional). Relataram que bezerros provenientes de FIV (sêmen sexado) tiveram uma mortalidade cumulativa maior de 90 a 180 dias de idade em comparação com a prole de IA e o fenótipo alterado da prole da FIV (sêmen sexado) estendeu-se à produção de leite na vida adulta, onde vacas derivadas dessa técnica produziram menos leite, gordura e proteína em sua primeira lactação em comparação com vacas leiteiras derivadas de IA.

Os procedimentos associados à produção in vitro de embriões envolvendo o uso de sêmen sexado para fertilização resultam em uma alteração da programação embrionária que persiste após o nascimento e causa um efeito na produção de leite na vida adulta.

2. Objetivos

Este estudo tem como objetivo comparar a fertilidade do sêmen sexado e convencional de 6 diferentes touros, utilizando novilhas e vacas holandesas em lactação submetidas a protocolo de IATF a base de GnRH + E2/P4. Também foram avaliados efeitos após concepção, como: taxa de nascimento dos diferentes tipos de sêmen, porcentagem de partos, porcentagem de fêmeas viáveis, produtividade da

progênie como idade a primeira inseminação artificial, idade a prenhez confirmada e produção de leite acumulada até 100 dias da primeira lactação e média de produção diária.

3. Hipóteses

A hipótese desse estudo foi que haveria efeito de touro na fertilidade assim como na proporção entre o sêmen sexado em relação ao convencional de cada touro.

A produtividade da progênie proveniente de sêmen sexado teria menor produção de leite comparada a progênie do sêmen convencional.

4. Material e métodos

4.1 Instalações, Animais e Dieta

O experimento foi conduzido de junho de 2014 a junho de 2018. Foi realizado em fazenda comercial no município de Itatiba, SP. Todos os procedimentos com animais seguiram as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, aprovado pelo CEUA da FMVZ, UNESP – campus de Botucatu, protocolo de número 0178/2017.

Foram utilizados animais da raça Holandesa, sendo, 116 novilhas e 978 vacas em lactação com mais de 42 dias pós-parto, mantidas em free - stall com aspersores e ventiladores na linha de cocho, alimentadas com dieta a base de silagem de milho, capim (*Cynodon dactylon* cv. Tifton-85), milho moído, caroço de algodão, farelo de soja e suplemento mineral e vitamínico, balanceadas de acordo com as exigências nutricionais de animais em lactação (NRC, 2001), acesso *ad libitum* à dieta e a água. Os animais foram ordenhados três vezes ao dia no sistema de ordenha duplo 12 paralela de saída rápida. A produção de cada vaca era registrada automaticamente através da leitura do chip de identificação do animal e registrada a produção diária no programa Dairy Plan-C21 GEA®. Todos os procedimentos relacionados ao estudo foram realizados no centro de manejo reprodutivo após ordenha.

4.2 Manejo Reprodutivo:

Somente animais saudáveis (ausência de doença) eram considerados aptos a receber o protocolo de IATF no D-11. Dentro da fazenda os animais foram divididos em lotes por paridade (novilhas, primíparas, múltiparas), DEL e produção de leite. O período voluntário de espera utilizado foi de 42 dias. Todos animais foram sincronizados com o seguinte protocolo de IATF (figura 1): D-11, 2mg de benzoato de estradiol i.m (Gonadiol®, Zoetis, SP, Brasil) + 100 mg diacetatotetraidratado de gonadorelina i.m (vacas) (Cystorelin®, Merial, SP, Brasil) administrados concomitante à inserção do dispositivo intravaginal de 1,9 g de P4 (CIDR®, Zoetis, SP, Brasil); No D-4, foi administrado 25 mg (vacas) ou 12,5 mg (novilhas) de dinoprost i.m (Lutalyse®, Zoetis, SP, Brasil); No D-2, 25 mg (vacas) ou 12,5 mg (novilhas) de dinoprost i.m (Lutalyse®, Zoetis, SP, Brasil) + 1,0 mg (vacas) ou 0,5mg (novilhas) de cipionato de estradiol i.m (ECP, Zoetis, SP, Brasil) + remoção do implante (CIDR); no D0 IATF (Figura 1). Os touros eram divididos em 2 blocos com 3 touros por bloco, onde dentro do bloco obrigatoriamente continha sêmen sexado e convencional do mesmo touro. A IATF foi realizada utilizando 50% de sêmen sexado e 50% convencional de cada touro.

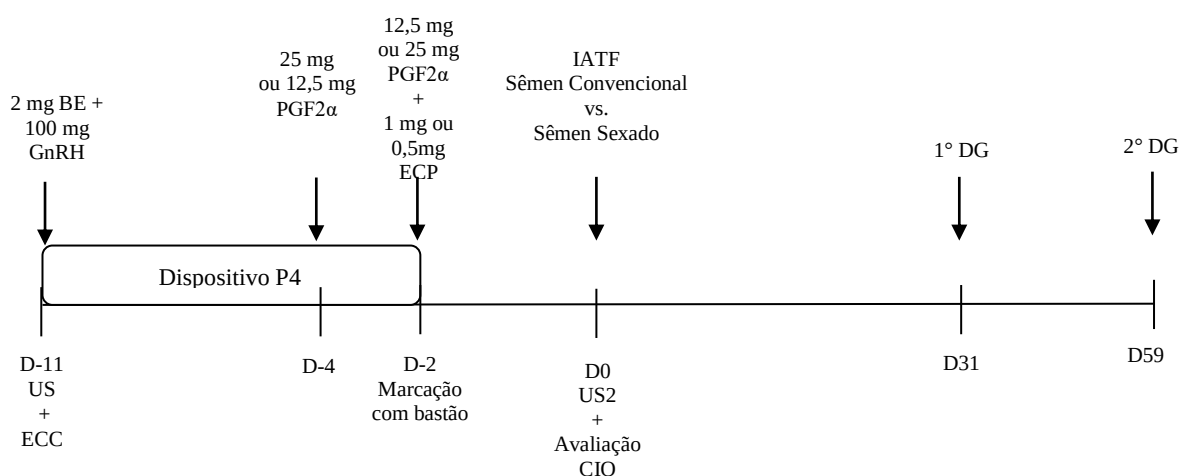


Figura 1. Descrição do delineamento experimental

4.3 Avaliação do escore de condição corporal (ECC)

O escore de condição corporal dos animais foi avaliado no início do protocolo de IATF, seguindo a escala de 0,25 e variação de 1 (extremamente magra) a 5 (extremamente gorda) (Wildman et al., 1982).

4.4 Avaliação de estruturas ovarianas

Foram avaliados os ovários por ultrassonografia transretal (Mindray modelo DP10 VET, com transdutor linear multifrequencial na opção 7,5MHz) no D-11 para determinar a presença de CL e no D0 para mensuração do diâmetro do maior folículo.

4.5 Detecção de estro

Todos os animais foram marcados com bastão de cera na base da cauda após a remoção do dispositivo de P4 no D-2. Os animais foram consideradas em estro quando eram detectados aceitando monta ou quando tinham a marcação na base da cauda completamente removida no momento da IATF.

4.6 Sêmen

Foram utilizados sêmen de 6 touros Holandeses na proporção: 50% sêmen convencional e 50% sêmen sexado de cada touro. Todo sêmen passou pelo controle de qualidade exigido dentro da empresa Sexing Technology® e ABS PECPLAN®.

4.7 Temperatura retal

A temperatura retal dos animais foi mensurada no momento da IATF, através de termômetro digital com faixa de medição: 32,0 °C – 43,9 °C; resolução: 0,1°C; (Termômetro Veterinário Digital ANIMED®).

4.8 Produção de leite das matrizes

A coleta de dados de produção de leite foi referente a média da semana do início do protocolo de IATF, registrada no programa Dairy Plan-C21 GEA®.

4.9 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 31 e 59 dias após a IATF através de ultrassonografia. A P/IA foi calculada dividindo o número de vacas prenhas no diagnóstico de 31 ou 59 d após IATF pelo número de vacas inseminadas. A perda de gestação foi calculada dividindo o número de vacas que perderam gestação entre 31 e 59 dias pelo número de vacas que estavam prenhas no diagnóstico de 31 dias.

4.10 Gestação, taxa de nascimento e sexo da cria

Após o segundo diagnóstico de gestação (D59), os animais com prenhez positiva foram acompanhados durante toda gestação até o momento do parto, quando foi avaliado duração da gestação, % de fêmeas nascidas e % fêmeas viáveis (animais vivos 48 horas após parto).

4.11 Avaliação de crescimento e produtividade da progênie proveniente de sêmen convencional ou sexado

Os animais foram avaliados durante seu desenvolvimento quanto ao peso aos 16 meses de idade, idade à 1° IA; idade da prenhez confirmada. Foi avaliado também a média de produção diária até os 100 dias de lactação, assim como a produção acumulada 100d, registrados no programa Dairy Plan-C21 GEA®.

4.12 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software computacional SAS versão 9.4 para Microsoft Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC). Análise de variáveis resposta do tipo binárias (taxa de concepção aos 31 dias, taxa de concepção aos 59 dias, perda gestacional entre 31 e 59 dias, porcentagem de nascimento de fêmeas, natimortos) foram realizadas por regressão logística utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS. A seleção do modelo que melhor se encaixou para cada variável de interesse foi realizada encontrando o modelo com o menor valor do Critério de

Informação de Akaike Corrigido (AICC) usando o procedimento de eliminação “stepwise” que removia todas variáveis com $P > 0,20$ do modelo. O efeito fixo de tratamento (sêmen convencional e sexado) se manteve em todos modelos até o modelo final.

A análise estatística de variáveis contínuas como produção de leite da filha acumulada aos 100 dias, peso aos 16 meses de idade; idade da primeira IA e idade da prenhez foram realizadas pelo procedimento GLIMMIX do SAS incluindo a opção Dist=gaussian, já que as variáveis apresentaram distribuição normal dos resíduos quando estudadas usando o PROC UNIVARIATE do SAS.

Diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias estudadas foram consideradas quando o P valor obtido foi $\leq 0,05$. Valores de $P > 0,05$ e $\leq 0,10$ foram considerados tendência. Os dados binários foram apresentados na forma de porcentagem (n/n) e os dados contínuos como média dos quadrados mínimos $\pm$ erro padrão da média.

5. Resultados e Discussão

Não houve diferença ($P > 0,05$) entre a produção de leite, ECC, DEL, número de inseminações e lactações entre as vacas que foram inseminadas utilizando sêmen convencional ou sexado (Tabela 1). A expressão de cio ao protocolo de IATF foi de 90%. Não foi observado efeito do diâmetro folicular entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 1. Médias de produção de leite, ECC, DEL, número de inseminações, lactações entre os tratamentos:

Item	SÊMEN		EPM	P=
	CV	SX		
Prod. Leite (kg)	31.1	31.5	0.41	0.45
ECC	3.09	3.1	0.018	0.51
DEL(dias)	147.3	149.3	4.3	0.75
n°IA	1.68	1.75	0.08	0.52
n°LACT	2.16	2.16	0.07	0.99

Os dados de fertilidade mostraram uma redução quando utilizado sêmen sexado, P/IA 31d ($P < 0,01$) e 59d ($P < 0,01$), porém não houve efeito nas perdas de gestação ($p = 0,90$) (Tabela 2). A redução na fertilidade com o uso de sêmen sexado, já havia

sido relatada por Andersson et al. (2006), utilizando vacas holandesas em lactação, obtiveram 21% de P/IA com sêmen sexado e 46% com sêmen convencional e a relação de 46%. Os demais pesquisadores, Dejarnette et. al., (2009,2010,2011); Sales et. al., (2011) e Sá filho et. al., (2012), também obtiveram menor fertilidade quando comparado sêmen sexado com convencional, o que pode ser explicado devido taxas de fertilização diminuídas (SCHENK et al., 2006) e menor desenvolvimento embrionário após a inseminação com espermatozoides sexados (SARTORI et al., 2004; POTTER et al., 2009; LARSON et al., 2010), fatores que tendem a implicar que o procedimento de sexagem pode causar danos não compensáveis à integridade ou função dos espermatozoides, ou seja, a dosagem de espermatozoides não afetam as taxas de concepção (FRIJTERS et al., 2009; DEJARNETTE et al., 2011).

Tabela 2. Taxa de prenhez geral aos 31 e 59 dias e perdas de gestação de acordo com sêmen:

Item	SÊMEN		P=
	CV	SX	
P/IA 31d	35.6 ^a (198/557)	25.7 ^b (138/537)	<0.01
P/IA 59d	28.7 ^a (160/557)	20.7 ^b (111/537)	<0.01
Perdas	19.2 (38/198)	19.6 (27/138)	0.90

Já a perda de gestação foi igual entre os dois tipos de sêmen utilizados, resultado de acordo com o encontrado por Seidel and Garner (2002). Por outro lado, Karakaya et. al., (2014) em seu estudo, utilizando 302 vacas holandesas em lactação, obtiveram uma perda de gestação de 19,1% (9/47) no sêmen sexado e 4,8% (3/63) no sêmen convencional. Apesar da diferença de perda de gestação encontrada entre o sêmen convencional e sexado em alguns estudos, a maioria deles indica que bezerros nascidos de espermatozoides sexados são normais (DOYLE et al., 1999; SEIDEL E GARNER, 2002).

Foi avaliada a proporção de prenhez do sêmen sexado em relação ao sêmen convencional e no geral foi de 72% aos 31 e 59 dias, visto que as perdas de gestação

foram igual entre os tratamentos ($p=0.90$). Considerando a mesma relação, Seidel et. al., (1999) encontraram o valor de 70-90%, e Dejarnette et. al., (2008), encontraram de 75-80% em vacas leiteiras em lactação.

Ao avaliarmos os animais de acordo com a categoria animal (número de lactações), houve interação entre categoria animal e sêmen na P/IA 31d ($P=0,04$), entretanto não foi observado na P/IA 59d ($P=0,16$) e perdas de gestação ($P=0,96$) (Tabela 3).

Através da avaliação entre a proporção de prenhez do sêmen sexado em relação ao sêmen convencional por ordem de parto aos 31 dias obtivemos: Novilhas - 92%; Primíparas – 88%; Secundíparas – 77% e Multíparas – 50%. Já aos 59 dias: Novilhas - 95%; Primíparas – 92%; Secundíparas – 72% e Multíparas – 48%.

Tabela 3. Taxa de prenhez aos 31 e 59 dias e perdas de gestação de acordo com categoria (número de lactações):

Item	Categoria				Cat.	Sem.	Interação
	Novilha	Primípara	Secundípara	*Multípara			
P/IA 31d							
Convencional	45.76 ^a (27/59)	34.69 ^a (51/147)	33.33 ^a (53/159)	34.90 ^a (67/192)	<0.01	0.04	0.04
Sexado	42.11 ^a (24/57)	30.6 ^a (41/134)	25.64 ^{ab} (40/156)	17.37 ^b (33/190)			
P/IA 59d							
Convencional	42.40 (25/59)	25.85 (38/147)	27.70 (44/159)	27.60 (53/192)	<0.01	0.01	0.16
Sexado	40.35 (23/57)	23.88 (32/134)	19.87 (31/156)	13.16 (25/190)			
Perda de gestação (31-59)							
Convencional	7.41 (2/27)	25.49 (13/51)	16.98 (9/53)	20.90 (14/67)	0.05	0.90	0.96
Sexado	4.17 (1/24)	21.95 (9/41)	22.50 (9/40)	24.24 (8/33)			

* foi considerado multípara vaca com 3 ou mais crias

Os dados de fertilidade por número de lactações estão de acordo com os resultados observados por DeJarnette et. al., (2008), os quais encontraram P/IA [1° cria = 30,4% (368/1212) vs. 2° cria = 31,1% (185/595) vs. ≥ 3° cria = 25,6% (144/562); $p=0,12$] demonstrando que a prenhez tende a ser influenciada pela paridade das

vacas. Em similaridade, Karakaya et. al., (2014) através de protocolo Ovsynch, avaliaram a fertilidade de primíparas e multíparas utilizando sêmen sexado ou convencional e obtiveram menor P/IA aos 62 dias em multíparas no sêmen convencional (Prim - 48,5% vs. Mult - 31,8%) e no sêmen sexado (Prim - 33,3% vs. Mult - 20,5%), respectivamente.

Carvalho et. al., (2014) encontraram melhor P/IA em primíparas do que em multíparas (49,8% vs. 38,4%; $p=0,008$), respectivamente. Sabe-se que as vacas multíparas apresentam reduzida P/IA e maior risco de perda de gestação em comparação com as primíparas, e essas diferenças foram atribuídas a diferenças na produção de leite, balanço energético e incidência de doenças periparturientes, mastite e claudicação (Santos et al. 2004), o que pode ter alterado negativamente a fertilidade do sêmen sexado nessa categoria.

Baez et al., (2015) avaliando o tamanho do útero através de mensuração de comprimento, diâmetro e volume, observaram que nos três quesitos, multíparas apresentaram útero maior que primíparas ($p=0,0001$). O volume uterino médio aumentou da primeira para a segunda lactação ($126,9 \pm 2,4$ vs $141,2 \pm 3,1$ cm³; $P = 0,0003$) e da segunda para a terceira lactação ($141,2 \pm 3,1$ a $156,5 \pm 3,4$ cm³; $P = 0,001$) e correspondentemente, houve decréscimos na P/IA da primeira para a segunda lactação (50,5 vs. 39,3% $P = 0,02$), mas nenhuma mudança da segunda para a terceira lactação (39,3 versus 38,2%; $P = 0,9$). Para primíparas, aquelas que emprenharam tenderam a ter diâmetro uterino menor ($P = 0,08$), menor comprimento uterino ($P = 0,06$) e menor volume uterino total ($P = 0,06$). Em multíparas, as prenhas tinham diâmetro uterino menor ($P = 0,003$), volume uterino ($P = 0,002$) e tendiam a ter comprimento uterino reduzido ($P = 0,12$). Este estudo demonstrou um efeito negativo no aumento do tamanho do útero na fertilidade de vacas leiteiras em lactação, sugerindo um novo mecanismo intrigante para a fertilidade alterada em bovinos, e talvez uma oportunidade para investigar a utilização de sêmen sexado em animais com útero menor, buscando melhores resultados.

Quanto a avaliação de escore de condição corporal e fertilidade, houve interação entre tipo de sêmen e ECC na P/IA 31d ($P=0,01$) e aos 59d ($P=0,01$) onde animais com ECC maior que 3,0 no sêmen convencional tiveram maior fertilidade que os demais. Não houve interação entre as perdas de gestação ($P=0,94$), porém animais com ECC maior que 3,0 tiveram menor perda de gestação ($P<0,01$) (Tabela 4).

Tabela 4. Taxa de prenhez por sêmen aos 31 e 59 dias e perdas de gestação de acordo com ECC:

Item	ECC		ECC	Valor P	
	$\leq 3,0$	$> 3,0$		Sem.	Interação
P/IA 31d					
Convencional	27.5 ^a (98/357)	49.5 ^b (97/196)	<0.01	<0.01	0.01
Sexado	24.4 ^a (82/336)	28.4 ^a (56/197)			
P/IA 59d					
Convencional	20.5 ^a (73/357)	43.4 ^b (85/196)	<0.01	<0.01	0.01
Sexado	18.5 ^a (62/336)	24.9 ^a (49/197)			
Perda de gestação (31-59)					
Convencional	25.5 ^a (25/98)	12.4 ^b (12/97)	<0.01	0.97	0.94
Sexado	24.4 ^a (20/82)	12.5 ^b (7/56)			

Resultados similares aos encontrados por Santos et. al., (2009), onde animais com menor ECC tem pior fertilidade aos 30 e 58d, além de maior perdas de gestação, P/IA 30d [$< 3,0 = 33,6\%$ (897/2667) vs. $3,00 - 3,5 = 41,1\%$ (1210/2945) vs. $\geq 3,75 = 46,3\%$ (237/512); $p=0,005$] aos 58d [$< 3,0 = 28,0\%$ (746/2661) vs. $3,00 - 3,5 = 35,9\%$ (1057/2941) vs. $\geq 3,75 = 43,4\%$ (222/512); $p=0,003$] e perdas de gestação [$< 3,0 = 16,2\%$ (145/893) vs. $3,00 - 3,5 = 12,3\%$ (149/1207) vs. $\geq 3,75 = 6,3\%$ (15/237); $p=0,04$].

Pereira et. al., (2017) utilizando ponto de corte de $39,1^{\circ}\text{C}$; observaram que os animais com temperatura abaixo de $39,1^{\circ}\text{C}$ durante o protocolo de IATF apresentaram melhor fertilidade comparado aos animais com temperatura acima de $39,1^{\circ}\text{C}$, P/IA 60

dias [$< 39,1 = 34,1\%$ vs. $\geq 39,1 = 22,8\%$; $p < 0,01$]. Levando em consideração esse ponto de corte de temperatura, dividimos os animais e não houve interação entre temperatura retal no momento da IA e sêmen na P/IA aos 31d ($P=0,85$), 59d ($P=0,83$) e perdas de gestação ($P=0,96$). Entretanto foi observado efeito de temperatura, onde vacas com temperatura retal menor que $39,1^{\circ}\text{C}$ tiveram maior P/IA do que vacas com temperatura maior ou igual $39,1^{\circ}\text{C}$ [$34,1\%$ (258/756) vs. $23,2\%$ (78/336)], assim como aos 59 dias [$27,4\%$ (207/756) vs. $19,0\%$ (64/336)]. Já as perdas de gestação foram iguais [$19,8\%$ (51/258) vs. $17,9\%$ (14/78)]; (Tabela 5).

Tabela 5. Taxa de prenhez por sêmen aos 31 e 59 dias e perdas de gestação de acordo com a temperatura retal no momento da inseminação artificial:

Item	Temperatura retal (°C)		Temp.	Valor P	
	<39.1	≥39.1		Sem.	Interação
P/IA 31d					
Convencional	39.5 (151/382)	27.2 (47/173)	<0.01	<0.01	0.85
Sexado	28.6 (107/374)	19.0 (31/163)			
P/IA 59d					
Convencional	31.7 (121/382)	22.5 (39/173)	0.01	0.02	0.83
Sexado	23.0 (86/374)	15.3 (25/163)			
Perda de gestação (31-59)					
Convencional	19.9 (30/151)	17.0 (8/47)	0.74	0.99	0.96
Sexado	19.6 (21/107)	19.4 (6/31)			

A fertilidade geral dos touros variou de $24,6\%$ (32/130) a $42,3\%$ (96/227) e foi encontrado efeito de touro na P/IA 30d ($P < 0,01$) (Tabela 6). Ao avaliarmos a proporção entre sêmen sexado e convencional no estudo entre os touros, obtivemos relação variando de 40 a 106% , onde não necessariamente a melhor proporção corresponde a melhor fertilidade. Demonstrando a grande variação de fertilidade entre os touros e tipo de sêmen.

Tabela 6. Taxa de prenhez aos 31dias por touro:

Item	TOUROS						Touro	Valor P	
	1	2	3	4	5	6		Sem.	Interação
P/IA 31d									
Convencional	46.2* (54/117)	35.8 (43/120)	34.4 (42/122)	25.8 (17/66)	36.9 (24/65)	26.9 (18/67)			
Sexado	38.2* (42/110)	26.5 (31/117)	20.2 (23/114)	27.3 (18/66)	14.9 (10/67)	22.2 (14/63)	<0.01	<0.01	0.25
combinado	42.3 (96/227)	31.2 (74/237)	27.5 (65/236)	26.5 (35/132)	25.8 (34/132)	24.6 (32/130)			

DeJarnette et. al., (2008) observaram efeito do touro em seu estudo, onde obtiveram, [touro c = 53% vs. touro b = 41% vs. touro a = 46%; $P < 0,05$]. Sá Filho et. al., (2014) encontraram efeito significativo do touro na P/IA quando utilizado somente sêmen sexado, observando variações de 11,6% a 46,1%, mostrando que as variações entre touro podem alterar a P/IA e que a fertilidade do mesmo é uma grande preocupação quando se utiliza sêmen sexado em programas comerciais de inseminação artificial. De Jarnette et. al., (2010) também encontraram efeito do touro utilizando sêmen convencional e sexado, além de interações entre eles, o que impede o uso de estimativas de fertilidade baseadas em sêmen convencional para prever com precisão o sucesso com sêmen sexado.

A duração da gestação foi igual entre os dois grupos [(sêmen sexado 276 dias vs. sêmen convencional 276 dias); $P = 0,42$], resultados semelhantes ao encontrado por Chebel et. al. (2010), que ao avaliar dois rebanhos distintos, encontraram: rebanho A [gestação sêmen sexado (276.8 ± 1.2) vs. gestação convencional (275.8 ± 0.9); $p = 0,22$] e rebanho B [(277.4 ± 1.0 vs. 275.9 ± 0.3); $P = 0,22$], respectivamente.

Houve efeito na porcentagem de fêmeas nascidas ($P < 0.01$); (Tabela 7). Resultados semelhantes já haviam sido encontrados por De Jarnette et. al., (2009), os quais obtiveram a proporção de 89% de fêmeas nascidas através de sêmen sexado e 50%

através de sêmen convencional, número exatamente igual a média nacional americana apresentado por Cole et. al., (2007).

Em relação a taxa de natimortos, foi observado efeito do tipo de sêmen onde [Conv = 4,8% (6/125) vs. Sex = 12,5% (11/88); $P=0,04$]. De Jarnette et. al., (2009) observaram 10,4% de natimortos quando utilizado sêmen sexado e 11,8% sêmen convencional, números próximos a média nacional americana observada por Cole et. al., (2007).

Tabela 7 - Porcentagem de partos, bezerras fêmeas nascidas e viáveis entre sêmen convencional e sexado:

Item	Conv.	Sex.	P=
% N° Partos	80.0 (128/160)	81.1 (90/111)	0.77
% fêmeas	51.7 (62/120)	87.5 (77/88)	<0.01
*% fêmeas viáveis	93.6 (58/62)	87.0 (67/77)	0.15
*fêmeas vivas 48 horas após nascimento			

Avaliação da progênie

Não foi observado efeito do tipo do sêmen no peso da progênie aos 16 (16 ± 7.1) meses ($P=0,85$), e na idade a 1ª IA ($P=0.52$). Entretanto animais provenientes de sêmen sexado emprenharam antes comparados aos provenientes de sêmen convencional, ($P=0,02$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Características da progênie descendente de sêmen convencional ou sexado:

Item	SÊMEN		EPM	P=
	CV	SX		
Peso 16 meses (Kg)	391.0 (36)	393.3 (49)	8.8	0.85
Idade 1ª IA (meses)	461.7 (39)	467.7 (50)	6.3	0.52
Idade prenhez (meses)	498.0 (37)	485.1 (48)	8.8	0.02

Foi avaliado o desempenho produtivo de animais nascidos de semen sexado e convencional descendentes do mesmo touro, provenientes de fêmeas inseminadas

aleatoriamente para produzir a prole estudada, dentro do mesmo rebanho. Não houve efeito na produção de leite no acumulado aos 100 dias da primeira lactação ($P=0,39$) e média ($P=0,39$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Produção de leite da progênie descendente de sêmen convencional ou sexado:

Item	SÊMEN		EPM	P=
	CV	SX		
Acumulado 100d	3049.1 (29)	2987.7 (43)	46.4	0.39
Média 100d	30.49 (29)	29.88 (43)		

Em contrapartida do encontrado por Siqueira et. al., (2017) o qual avaliou retrospectivamente a produção de leite projetada aos 305 dias de animais provenientes de IA (sêmen convencional), FIV (sêmen convencional), FIV (sêmen sexado) e TE (semen convencional), onde animais provenientes do grupo IA tiveram maior produção de leite que animais do grupo FIVsx ($p<0,01$). Analisando por outro lado, a alteração no fenótipo adulto observado pode estar relacionada com o processo de fertilização in vitro ou transferencia de embrião e não ao procedimento de sexagem de sêmen, ou talvez uma interação entre ambos.

6. Conclusões

A fertilidade do sêmen sexado depende da categoria animal o qual será utilizado, pois quanto menor o número de partos, melhor é o desempenho do sêmen sexado.

A progênie do sêmen sexado tem produtividade igual a proveniente de sêmen convencional.

7. Referências Bibliográficas

ANDERSSON M, TAPONEN J, KOMMERI M, DAHLBOM M, 2006: Pregnancy rates in lactating Holstein-Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction Domestic Animal**, 41, 95-97.

CARVALHO, P.D, SOUZA, A.H, AMUNDSON, M.C et. Al., 2014. Relationships between fertility and postpartum changes in body condition and body weight in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97:1-18.

BAEZ GM, BARLETTA RV, GUENTHER JN, GASKA JM, WILTBANK MC. Effect of Uterine Size on Fertility of Lactating Dairy Cows, **Theriogenology** (2015), doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.04.022.

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

COLE, J. B., G. R. WIGGANS, AND P. M. VANRADEN. 2007. Genetic evaluation of stillbirth in United States Holsteins using a sirematernal grandsire threshold model. **Journal of. Dairy Science**, 90:2480–2488.

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

DEJARNETTE, J.M., MCCLEARY, C.R., LEACH, M.A., MORENO, J.F., NEBEL, R.L., MARSHALL, C.E., 2010. Effects of 2.1 and 3.5 x 10⁶ sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. **Journal Dairy Science**, 93, 4079-4085.

DEJARNETTE, J. M., NEBEL.R. L. AND MARSHALL. C. E. 2009. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. **Theriogenology**, 71:49–58.

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

DOYLE SP, SEIDEL GE JR, SCHENK JL, HERICKHOFF LA, CRAN DG, GREEN RD. Artificial insemination of lactating Angus cows with sexed semen. **Proc Western Sect Am Sot Animal Science** 1999;50:203- 205.

FLEMING, T. P., A. J. WATKINS, C. SUN, M. A. VELAZQUEZ, N. R. SMYTH, AND J. J. ECKERT. 2015. Do little embryos make big decisions? How maternal dietary protein restriction can permanently change an embryo's potential, affecting adult health. **Reprod. Fertil. Dev.** 27:684. <https://doi.org/10.1071/RD14455>.

FRIJTERS ACJ, MULLAART E, ROELOFS RMG, VAN HOORNE RP, MORENO JF, MORENO O, MERTON JS, 2009: What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? **Theriogenology**, 71, 64–67.

HANSEN, P. J., K. B. DOBBS, A. C. DENICOL, AND L. G. B. SIQUEIRA. 2016. Sex and the preimplantation embryo: Implications of sexual dimorphism in the preimplantation period for maternal programming of embryonic development. **Cell Tissue Res.** 363:237–247. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2287-4>.

KARAKAYA, E., YILMAZBAS-MECITOGLU, G., KESKIN, A., ALKAN, A., TASDEMIR., SANTOS J.E.P., GUMEN, A. Fertility in Dairy Cows After Artificial Insemination Using Sex Sorted Sperm or Conventional Semen. **Reproduction in Domestic Animals**, n.49, 333-337(2014).

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

NRC. 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.

PEREIRA, M.H.C.; WILTBANK, M.C.; GUIDA, T.G. ; LOPES, F.R.

; VASCONCELOS, J.L.M. . Comparison of 2 protocols to increase circulating progesterone concentration before timed artificial insemination in lactating dairy cows with or without elevated body temperature. **Journal of Dairy Science**, v. 100, p. 8455-8470, 2017.

POTTER, S. R., B. J. PAUS, J. M. DEJARNETTE, AND R. L. NEBEL. 2009. A case study of experiences with use of sex-sorted semen in superovulated Holstein cows and heifers in a single herd. **Journal of. Dairy Science**, 92(E-Suppl. 1):79. (Abstr.).

RANDO, O. J., AND R. A. SIMMONS. 2015. I'm eating for two: Parental dietary effects on offspring metabolism. **Cell** 161:93–105. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.02.021>.

SÁ FILHO MF, GIROTTTO R, ABE EK, PENTEADO L, CAMPOS FILHO EP, MORENO JF ET AL. Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. **Journal Animal Science** 2012.90:1816–23.

SÁ FILHO, M. F.; MARQUES, M. O.; GIMENES, L. U.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; BATISTA, E. O. S.; CARVALHO, J. P. B.; BARUSELLI, P. S. Prostaglandin treatment at the onset of norgestomet and estradiol-based synchronization protocols did not alter the ovarian follicular dynamics or pregnancy per timed artificial insemination in cyclic *Bos indicus* heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 144, p. 1-5, 2014.

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

SARTORI, R., A. H. SOUZA, J. N. GUENTHER, D. Z. CARAVIELLO, L. N. GEIGER, J. L. SCHENK, AND M. C. WILTBANK. 2004. Fertilization rate and embryo quality in superovulated Holstein heifers artificially inseminated with X-sorted or unsorted sperm. **Animal. Reproduction**. 1: 86–90.

SANTOS, J. E. P., RUTIGLIANO, H. M., AND SÁ FILHO, M. F. (2009). Risk factors

for resumption of postpartum estrous cycles and embryonic survival in lactating dairy cows. **Animal. Reproduction. Science.** **110**, 207–221.

SANTOS JEP, THATCHER WW, CHEBEL RC, CERRI RLA, GALVÃO KN, 2004: The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. **Animal Reproduction Science** 82–83, 513–535.

SAS Institute. 2004. SAS OnlineDoc 9.1.2. SAS Inst. Inc., Cary, NC.

SCHAGDARSURENGIN, U., AND K. STEGER. 2016. Epigenetics in male reproduction: Effect of paternal diet on sperm quality and offspring health. **Nat. Rev. Urol.** 13:584–595. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.157>.

SCHENK JL, SUH TK, SEIDEL JR GE. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology**, 65:299-307, 2006.

SIQUEIRA, L. G. B.; DIKMEN. S.; ORTEGA. M. S.; HANSEN. P. J. Postnatal phenotype of dairy cows is altered by in vitro embryo production using reverse X-sorted semen. **Journal of Dairy Science.** Vol. 100 No. 7, 2017.

SEIDEL JR GE, SCHENK JL, HERICKHOFF SP. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, v.62, p.248-252.

SCHULZ, L. C. 2010. The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 107:16757–16758. <https://doi.org/10.1073/pnas.1012911107>.

WADHWA, P. D., C. BUSS, S. ENTRINGER, AND J. M. SWANSON. 2009. Developmental origins of health and disease: Brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. **Semin. Reprod. Med.** 27:358–368. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1237424>.

WILDMAN, E.E., JONES, G.M., WAGNER, P.E. et al. 1982. A dairy body condition scoring system and its relationship to selected production characteristics. **Jounal Dairy Science**, 65(3):495-501.