

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**CIRO MEIRELLES**

**EFICIÊNCIA DA INSEMINAÇÃO INTRACORNIAL PROFUNDA COM SÊMEN  
SEXADO EM BOVINOS**

**CURITIBA  
2009**

**Ciro Meirelles**

**EFICIÊNCIA DA INSEMINAÇÃO INTRACORNIAL PROFUNDA COM SÊMEN  
SEXADO EM BOVINOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki

Co-orientadores: Prof. Dr. Romildo R. Weiss e Prof. Dr. Nei Moreira

**CURITIBA  
2009**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada "EFICIÊNCIA DA INSEMINAÇÃO INTRACORNIAL PROFUNDA COM SÊMEN SEXADO EM BOVINOS" apresentada pelo Mestrando Ciro Meirelles, declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 78 da Resolução nº 62/03-CEPE/UFPR, que considerou o candidato aprovado para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Patologia Veterinária.

Curitiba, 12 de fevereiro de 2009

  
Prof. Dr. Luiz Ernandes Kozicki  
Presidente/Orientador

  
Prof. Dr. Romildo Romualdo Weiss  
Membro

  
Prof. Dr. Viviane Milczewski  
Membro

## DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos muitos amigos feitos durante sua realização, incluindo alunos, professores e funcionários das fazendas, sem os quais certamente esse não se concretizaria.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus pela orientação espiritual, sem a qual não há significado o esforço do corpo.

Aos funcionários das fazendas onde foi possível a realização do experimento, pela paciência em aguardar a execução dos trabalhos, pela força de vontade e disposição para ajudar, pela confiança depositada na importância do que estava sendo realizado e pelos muitos ensinamentos transmitidos que nenhuma sala de aula pode suprir.

Aos Professores da Academia e da vida, pelos preciosos momentos de aprendizado.

À empresa Vet-Maxi Maximização Pecuária Ltda, que sempre esteve disponível e aberta para a realização dos trabalhos.

Aos Veterinários, Professores e “Amigos” Márcio Saporski Segui e André Luís de Bastos Souza, que prontamente disponibilizaram meios para concretização do trabalho a campo.

Aos meus pais, Rubens Celso Meirelles e Sayonara Meirelles, que continuam sonhando junto comigo e acreditando. À minha namorada Anabella Mira, por sempre compreender minha ausência e distância.

Finalmente, ao meu orientador Luiz Ernandes Kozicki, pelo apoio e exemplo de profissionalismo, que inspira e desperta o comprometimento e a paixão pela Veterinária.

Meus sinceros agradecimentos.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**IA** - inseminação artificial

**IAIP**- inseminação artificial intracornual profunda

## RESUMO

A sexagem de sêmen é uma ferramenta da reprodução animal disponível comercialmente. O objetivo desse estudo é encontrar uma alternativa que favoreça o uso do sêmen sexado na inseminação artificial, tornando-o economicamente viável. Inicialmente é apresentada uma revisão sobre o processo da sexagem e fatores que afetam os resultados. O primeiro experimento (capítulo 1) foi realizado com o intuito de se avaliar a eficácia do uso da técnica de inseminação intracornual profunda (IAIP) com uma dose reduzida de sêmen, chegando a resultados de 67,4% (IAIP) e 48,8% na inseminação artificial convencional (IA) ( $p>0,05$ ). No segundo experimento (capítulo 2), observaram-se os resultados de um programa de IA com sêmen sexado em uma fazenda de bovinos de corte e avaliou-se o custo da produção de bezerros, obtendo-se 23,0% de taxa de nascimento com o sêmen sexado e 46,45% com o sêmen não-sexado ( $p<0,05$ ). Finalmente, o terceiro experimento (capítulo 3) aliou informações do primeiro e segundo, comparando-se a taxa de prenhez obtida com sêmen sexado pela IA e IAIP. Os resultados demonstraram uma diferença não significativa usando-se as duas técnicas, apesar das porcentagens de 36,0% na IAIP e 48,0% na IA ( $p<0,05$ ).

Palavras-chave: Sêmen sexado; bovinos de corte; inseminação intracornual profunda.

## ABSTRACT

The sexed semen is a tool of animal reproduction commercially available. The aim of this study is to find an alternative that promotes the use of sexed semen in artificial insemination, making it economically viable. The first part of this dissertation is a review of the sexing process and the factors that affect it results. The experiment 1 was carried out in order to evaluate the effectiveness of deep intracornual artificial insemination (DIAI) technique with a reduced dose of semen, the results were 67,4% in DIAI and 48,8% in conventional artificial insemination (AI) ( $p>0,05$ ). In the second experiment, we observed the results of a AI program with sexed semen in a beef cattle farm and evaluated the cost of calves production, obtaining 23,0% of birth rate with sexed sperm and 46,45% with the non-sexed sperm ( $p<0,05$ ). Finally, the third experiment was conducted to compare the sexed semen pregnancy rate obtained with AI and DIAI. The results show a non-significant difference using the two techniques, despite the percentages of 36,0% in DIAI and 48,0% in AI ( $p<0,05$ ).

Key-words: Sexed semen; beef cattle; intracornual deep insemination.

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>01</b>
<b>1.1</b> .....	<b>O</b>
OBJETIVOS GERAIS .....	03
<b>1.2</b> .....	<b>O</b>
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	03
<b>1.3</b> .....	<b>E</b>
STRUTURA DA DISSERTAÇÃO .....	03
<b>2</b> .....	<b>R</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>05</b>
<b>2.1</b> .....	<b>I</b>
Introdução.....	05
<b>2.2</b> .....	<b>H</b>
Histórico da sexagem espermática .....	06
<b>2.3</b> .....	<b>P</b>
Processo de sexagem por citometria de fluxo.....	08
<b>2.4</b> .....	<b>F</b>
Fatores que afetam os resultados do sêmen sexado .....	11
<b>3</b> .....	<b>C</b>
<b>CAPÍTULO 1 - INSEMINAÇÃO INTRACORNIAL PROFUNDA EM BOVINOS COM DOSE REDUZIDA DE SÊMEN</b> .....	<b>13</b>

4 .....	C
<b>APÍTULO 2 - EFICIÊNCIA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN SEXADO EM BOVINOS: ASPECTOS DE VIABILIDADE REPRODUTIVA E ECONÔMICA....</b>	
	24
5 .....	C
<b>APÍTULO 3 - EFICIÊNCIA DA INSEMINAÇÃO INTRACORNIAL PROFUNDA COM SÊMEN SEXADO EM BOVINOS.....</b>	
	35
6 .....	C
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	
	48
7 .....	R
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	
	49



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil passa por um período de alta nos preços pecuários, com valorização significativa do preço da carne bovina ao longo de 2008 em comparação a 2007 (Boi e Companhia, 2009). O país apresentou um aumento considerável nas exportações entre 2000 e 2005, com início da fase de alta na entressafra de 2006 (Anualpec 2005; Boi e Companhia, 2009). Apesar da onda de otimismo ao longo dos últimos anos, o final de 2008 foi marcado por uma situação de insegurança em função de uma crise econômica mundial, gerando incertezas quanto a seu real impacto no mercado de carne.

Certamente o mercado econômico ligado a diferentes setores da reprodução animal é influenciado pelas oscilações do mercado da carne. A demanda por produtos de origem animal e o retorno financeiro repassado ao produtor pesam nas decisões em se investir em tecnologias. Segundo o relatório da ASBIA (2007), houve um aumento de 11,3% na venda geral de sêmen entre 2006 e 2007, entretanto, o espaço para crescimento do setor ainda é grande, tendo em vista que apenas 7% do rebanho das fêmeas aptas à reprodução no rebanho brasileiro são inseminadas.

Como resultado desse período de alta na pecuária, o setor passa por uma revolução tecnológica e organizacional. A modernização e intensificação da produção bovina é um processo dinâmico, que deve incluir a melhoria da qualidade do produto gerado (genética), aumento da escala de produção de produtos de qualidade e aceleração do processo produtivo (precocidade). Segundo Galli e Lazzari (2004), a reprodução é uma das principais ferramentas na criação animal, pois, além da multiplicação do rebanho, potencializa o ganho genético dos animais. Para Neves et al. (1999), do ponto de vista econômico, o desempenho reprodutivo é um dos princípios pilares da pecuária, sendo cinco vezes mais importante que o ganho de peso e até dez vezes mais importante que o rendimento de carcaça.

A sexagem de sêmen é o mais recente estágio de evolução da reprodução animal, após as técnicas tradicionais de inseminação artificial, transferência de embriões, fertilização "in vitro", sexagem de embriões e bipartição de embriões. O sêmen sexado é uma biotecnologia disponível comercialmente, entretanto, seu uso na produção de bovinos deve atender premissas básicas de qualquer sistema de

produção, eficiência econômica. Certamente o custo dessa tecnologia e o seu resultado, avaliado pela taxa de prenhez, pesam na decisão de sua implantação.

Segundo Cézar (2001), a produção de um bezerro com custo elevado (devido à baixa eficiência reprodutiva) leva o produtor à perda de competitividade, diminuição na capacidade de investimento e depreciação da atividade como um todo. O preço do produto produzido na propriedade (ex. bezerros) é determinado pelo mercado e não pelo seu custo de produção, portanto, o produtor deve ter o cuidado de desenvolver atividades que conduzam a um melhor desempenho econômico do seu sistema de produção. A tomada de decisões seguras deve ser fundamentada no conhecimento e controle do desenvolvimento do seu rebanho por meio da determinação dos índices zootécnicos do rebanho, como exemplo as taxas de prenhez e natalidade. Inúmeras vezes, produtores são assediados por empresas que vendem biotecnologia para implantação de programas inovadores em suas propriedades, porém, sem possuir conhecimento ou condições suficientes, aplicar a técnica é condenar ao insucesso a realização da prática e conseqüente frustração do produtor.

De acordo com Segui (2007), os avanços alcançados pela pecuária nos últimos anos proporcionaram ganhos importantes no setor. Essas mudanças demandam uma forte necessidade de organização e utilização de técnicas ainda mais avançadas na condução do negócio da carne. A organização da cadeia de produção é uma necessidade inadiável na busca de um negócio mais eficiente e rentável, e que possa atender um consumidor moderno que quer produtos confiáveis, alimentos saudáveis, respeito ao meio ambiente e bem estar animal. O Médico Veterinário é parte fundamental no processo de produção de carne bovina, participando do início ao fim do processo produtivo. No que se refere à reprodução, o veterinário tem função transcendente, especialmente na incorporação de novas biotecnologias, não somente em função de sua capacidade de aplicação de conhecimentos médicos para diagnóstico ou em patologia e genética, mas também em adquirir habilidade de analisar o quão amplo será o impacto de uma tecnologia no sistema de produção, tendo em vista a necessidade de se adotar sistemas economicamente viáveis.

Uma melhora das técnicas atualmente utilizadas na reprodução animal, que contribuam para melhores resultados, deve ser foco de pesquisa de profissionais que atuam na área.

### **1.1 Objetivos gerais**

O objetivo desse estudo é encontrar uma alternativa que favoreça o uso do sêmen sexado na inseminação artificial, tornando-o economicamente viável pela diminuição no número de doses utilizadas por concepção.

### **1.2 Objetivos específicos**

- Avaliar a eficácia do uso da técnica de inseminação intracornual profunda (IAIP) com uma dose reduzida de sêmen (capítulo 1);
- Avaliar o resultado de um programa de inseminação artificial com sêmen sexado em uma fazenda de bovinos de corte, mantendo-se os padrões de rotina da propriedade, bem como fazer um levantamento comparativo de custos na produção de bezerros com o sêmen sexado e não sexado (capítulo 2);
- Comparar a taxa de prenhez obtida com o sêmen sexado pela técnica IAIP com o sêmen sexado depositado no corpo do útero pela inseminação convencional (capítulo 3).

### **1.3 Estrutura da Dissertação**

A dissertação tem início com uma breve introdução sobre o tema abordado, evidenciando a situação atual da pecuária de corte e como a adoção de biotecnologias reprodutivas, como o sêmen sexado, interferem no sistema de produção. Na seqüência, uma revisão de literatura sobre sexagem espermática é apresentada com intuito de fornecer subsídios aos leitores para a compreensão das discussões expostas nos três capítulos seguintes. Os capítulos 1, 2 e 3 estão escritos na forma de artigo científico; o

capítulo 1 é referente à técnica de inseminação intracornual profunda (IAIP), cujo experimento objetivou avaliar o resultado da IAIP com uma dose de sêmen de concentração espermática inferior à convencional. O capítulo 2 discorre sobre os resultados de um programa de inseminação artificial com uso do sêmen sexado em uma fazenda de bovinos de corte. Finalmente, o capítulo 3 expõe os resultados da inseminação de um lote de animais com sêmen sexado pela técnica de IAIP. As considerações finais de todo o trabalho são apresentadas em seguida.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Introdução

O primeiro marco histórico da inseminação artificial é de autoria de Lazzaro Spallanzani (1780), que obteve produtos vivos e normais a partir da coleta do sêmen de um cão e inseminação de uma cadela. O veterinário e pesquisador Elias Ivanov teve um papel importante na evolução da técnica, demonstrando que a inseminação era possível a partir da diluição do sêmen com soro artificial, além de estudos esclarecedores sobre o papel do frio na conservação do sêmen. A prática da inseminação cresceu rapidamente na Europa. Somente na antiga União Soviética, em 1938, foram inseminadas 1.200.000 vacas. Estudos posteriores permitiram melhorias dos meios de conservação do sêmen, além da descoberta científica dos ingleses Polge, Smith e Parkes, em 1949, possibilitando o congelamento do sêmen com redução dos danos às células, o que favoreceu de maneira decisiva sua comercialização. O primeiro bezerro, produto de sêmen congelado, é referido por Stewart (1951) (Mies Filho, 1987).

A partir da concretização da técnica de inseminação artificial na produção animal, pesquisadores começaram a se indagar quanto à possibilidade de selecionar o sexo antes da concepção. A escolha prévia do sexo dos animais traria vantagens significativas tanto a produtores de leite como de bovinos de corte. Segundo McManus et al. (2002), o potencial de ganho em peso dos bovinos machos é superior ao das fêmeas, sendo interessante maior proporção de machos em rebanhos comerciais de corte. Na pecuária leiteira, o maior nascimento de fêmeas permitiria maior pressão de seleção, maior número de fêmeas em lactação, aumento da produtividade e redução dos custos com o nascimento de machos.

Vários estudos foram conduzidos na tentativa de permitir que apenas espermatozoides X ou Y alcançassem a porção superior do trato genital das fêmeas, o que potencialmente permitiria um aumento na taxa de nascimento do sexo almejado (Skjervold e James, 1979; Rorie, 1999). Alguns fatores sabidamente interferem nessa taxa, como o horário da inseminação (Wehner et al., 1987), alteração do pH vaginal (Daniell, 1983) e influência da dieta (Papa et al., 1983). Trabalhos conduzidos por Silva

et al. (2008) obtiveram resultados significativos na proporção de machos inseminando-se as fêmeas mais tardiamente após a sincronização das ovulações. Entretanto, apenas a técnica por citometria de fluxo consegue separar espermatozoides X e Y com alta fidelidade, permanecendo como a única técnica provada e confiável para produção de animais saudáveis e reprodutivamente funcionais com boa taxa de acurácia na determinação do sexo desejado (Tubman et al., 2004).

A principal limitação na comercialização dessa tecnologia consiste no processamento do sêmen, que demanda um tempo considerável para o preparo de uma dose, permitindo a produção eficiente para comercialização de doses com apenas aproximadamente 2 milhões de espermatozoides. Segundo Seidel Jr e Schenk (2008), limitações do processo ditam que a comercialização desse tipo de sêmen é possível apenas com baixas concentrações de espermatozoides por dose, resultando no comprometimento das taxas de prenhez.

Outro método disponível para sexagem espermática é a imunosexagem com anticorpo monoclonal para a detecção de antígenos de superfície sexo específicos dos espermatozoides. A identificação de uma proteína específica na membrana plasmática de espermatozoides “X” e “Y” pode gerar grandes oportunidades para a escolha do sexo (Hendriksen, 1999). É um método simples e de menor custo em comparação à citometria de fluxo, porém, ainda não disponível comercialmente.

O sêmen sexado pela técnica de citometria de fluxo está disponível comercialmente no Brasil desde 2004. Considerando a importância da técnica, esta revisão tem como objetivo levantar informações que sejam de interesse para a compreensão do atual uso dessa biotecnologia, resultados esperados, dificuldades encontradas e avanços obtidos.

## **2.2 Histórico da sexagem espermática**

A espécie bovina possui 60 cromossomos em suas células somáticas. Os gametas masculinos, células haplóides, possuem além dos 29 cromossomos autossômicos, um cromossomo sexual, sendo ele o X (fêmeas) ou o Y (machos). A determinação do sexo dos embriões ocorre em função do tipo de gameta que fertiliza o

oócito (X). Segundo Moruzzi (1979), a diferença total no DNA entre espermatozóides X e Y de bovinos é, em média, de 4,2%.

A exploração dessa diferença no DNA entre as duas populações de espermatozóides permitiu o uso da técnica de citometria de fluxo na sua separação. Garner et al. (1983) demonstraram que o citômetro de fluxo era capaz de determinar a diferença entre espermatozóides X e Y em bovinos, ovelhas, suínos e coelhos; porém, as células eram mortas no processo.

A tecnologia de sexagem espermática para aplicação em animais domésticos foi implantada inicialmente pela “USDA (United States Department of Agriculture) Bestsvile Agricultural Research Center”, ainda com problemas na morte celular pelo comprometimento das membranas plasmáticas dos espermatozóides durante o processo (Garner et al., 1983). Johnson (1988) alterou o protocolo, permitindo obtenção de resultados sem o comprometimento das membranas plasmáticas. Em 1989, Johnson et al. reportaram o sucesso na produção de proles de coelhos com o sexo pré-determinado; os espermatozóides foram separados de acordo com sua constituição de DNA e depositados no oviduto das fêmeas, gerando 81% de machos com espermatozóides Y e 94% de fêmeas com espermatozóides X.

Resultados experimentais satisfatórios desenvolvidos por Seidel et al. (1996) favoreceram a comercialização da tecnologia e formação da empresa XY Inc. A tecnologia também foi adaptada para o uso em humanos e comercializada pela “Genetics and IVF Institute (GIVF)” (Fugger, 1999).

A criopreservação do sêmen sexado foi desenvolvida nos mesmos moldes do sêmen convencional, permitindo a expansão da técnica (Schenk et al., 1999). Inicialmente, quatro companhias adquiriram licença para produção de sêmen sexado, são elas: ABS Global, Atlantic Breeders Cooperative, Mastercalf Ltd. e XY Inc (adquirida pela Sexing Technologies) (Garner e Seidel Jr, 2008).

### 2.3 Processo de sexagem por citometria de fluxo

Segundo Seidel e Garner (2002), apesar da pequena diferença entre os espermatozoides X e Y, essa é suficiente para a obtenção de uma alta acurácia na separação dos dois tipos celulares (aproximadamente 90%). Entretanto, cerca de 60% das células são descartadas no processo (não-sexadas) e perto de 10% dos espermatozoides são separados erroneamente.

A constituição do DNA da célula é determinada a partir da incorporação de um corante fluorescente, Hoechst 33342, capaz de penetrar a membrana plasmática e aderir ao DNA da célula. Portanto, espermatozoides X adquirem em torno de 4% a mais de corante em relação aos Y. A fluorescência ocorre apenas quando a substância é exposta à determinada onda de luz, proveniente de um laser. Posteriormente, um detector passa informações ao computador da intensidade de fluorescência. Espermatozoides X também possuem 4% a mais de fluorescência em relação aos Y (Seidel Jr, 2007). Segundo Yan et al. (2006), tanto o corante Hoechst 33342, quanto o laser ultravioleta são agentes potencialmente mutagênicos. Entretanto, Ambrogi et al. (2006) acreditam que o processo de sexagem não causa redução na viabilidade ou integridade do DNA; por outro lado, o estresse mecânico ao qual o espermatozoide é exposto é significativo.

Seidel Jr (2007) descreveu que o citômetro de fluxo consiste em uma bomba para mover o fluido contendo espermatozoides pelo laser ultravioleta e detector de fluorescência. Quando o fluido sai do citômetro de fluxo é induzida a formação de minúsculas gotas, contendo ou não espermatozoides. Algumas gotas possuem 2 ou mais espermatozoides. Gotas contendo espermatozoides X recebem uma carga elétrica positiva; espermatozoides Y recebem uma carga negativa; se as gotas não possuem espermatozoides, mais de uma célula, defeitos espermáticos ou não são distinguidos quanto ao seu conteúdo de DNA, nenhuma carga elétrica é adicionada à gota. Quando as gotas saem do citômetro de fluxo, a uma velocidade de 80 Km/h e pressão 50 psi, são expostas a um campo eletromagnético (positivo e negativo), que atrai as gotas eletricamente excitadas com a carga oposta. O que não é atraído pelo campo segue o fluxo para um recipiente de descarte.

Dentre os fatores acusados como responsáveis pela redução da qualidade do sêmen sexado estão: laser ultravioleta (Lubart et al., 1997; Montag et al., 2000), pressão (Suh e Schenk, 2005), efeitos da diluição do sêmen (Maxwell et al., 1996), carga elétrica e campo eletromagnético (Klinc e Rath, 2006). Segundo Vazquez et al. (2002), o corante de DNA não gera grande impacto na fertilidade dos espermatozóides. Para Breitbart et al. (1996) e Lubart et al. (1997), a exposição ao laser acelera o transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  nos espermatozóides, fortalecendo a ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  à membrana plasmática e diminuindo sua disponibilidade para as mitocôndrias. Mudanças na concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no citoplasma da célula interferem em sua função de controle da motilidade espermática e reação acrossômica.

A respeito da viabilidade do sêmen sexado, é interessante ressaltar a necessidade do processo de capacitação espermática, ou seja, o espermatozóide deve passar por uma série de mudanças no trato reprodutivo da fêmea antes de ser capaz de realizar sua reação acrossômica e, assim, fertilizar o oócito (Graham 1996). Para Mocé et al. (2006), após a criopreservação, o sêmen sexado apresenta reação acrossômica mais rapidamente; o processo de sexagem induz alterações na membrana espermática que culminam na aceleração do processo de capacitação espermática e reação acrossômica, o que diminui sua sobrevivência. De acordo com Maxwell et al. (2004), a limitação do sêmen sexado consiste em sua baixa sobrevivência, sugerindo uma reduzida viabilidade no trato reprodutivo da fêmea, o que sugere a necessidade de se depositar o sêmen profundamente no útero em um momento mais próximo à ovulação. Entretanto, para Seidel et al. (1999), mesmo modificando-se as técnicas de inseminação, a fertilidade do sêmen sexado permanece baixa.

Maxwell et al. (1996) descreveram que para a análise individualizada dos espermatozóides é necessário uma alta diluição do sêmen antes da sexagem e conseqüente concentração após o processo, por centrifugação. A membrana plasmática do espermatozóide é rica em lipídios, sensíveis à oxidação. A capacitação espermática inclui a peroxidação de lipídios da membrana plasmática, permitindo a reação acrossômica, porém, uma maior oxidação pode ser induzida pela manipulação dos espermatozóides, levando a alterações irreversíveis na membrana do acrossoma (Kodama et al. 1996; Whittington and Ford 1998). A defesa natural do sêmen contra a

oxidação é função do plasma seminal (reduzido em altas diluições) (Maxwell et al. 1996).

De acordo com Maxwell et al. (2007), a reintrodução do plasma seminal em alguns pontos do processamento do sêmen tem sido estudada como método para reversão dos efeitos negativos observados na criopreservação e sexagem.

Sobre a pressão induzida pelo citômetro de fluxo no processamento do sêmen, segundo Suh et al. (2005), uma redução de 50 para 40 psi na sexagem provoca menos injúrias aos espermatozóides sem comprometer a qualidade espermática, velocidade do processo ou acurácia da sexagem. Recentemente, a velocidade do processo de sexagem, com alta eficiência, atingiu 8000 espermatozóides por segundo (Sharpe e Evans, 2009). Apesar dos avanços, o tempo de preparo de uma dose de sêmen permanece longo para se obter uma concentração razoável de espermatozóides sexados. Para Parrilla et al. (2005), como consequência do tempo da sexagem, a população de espermatozóides se caracteriza pela heterogeneidade entre as células recém sexadas e outras armazenadas por mais tempo, o que pode interferir no seu potencial de fertilização.

A detecção e descarte de células mortas e defeituosas é auxiliada pela adição de um corante vermelho (“red food coloring”), não absorvido por células saudáveis. A fluorescência do Hoechst 33342 é inibida pelo corante vermelho, por isso, espermatozóides com reduzida fluorescência são descartados no processo (Seidel Jr, 2007).

Quanto à normalidade dos bezerros produzidos, inúmeros trabalhos foram realizados comparando-se a produção do sêmen sexado com o sêmen não sexado, incluindo proles de fêmeas nascidas como resultado de inseminação com sêmen sexado; para Seidel Jr (2007), os produtos gerados a partir de um sêmen sexado não apresentaram nenhuma diferença quanto a taxa de mortalidade, taxa de reabsorção embrionária, peso ao nascer, peso à desmama ou anormalidades morfológicas. Segundo Garner (2009) há poucas evidências de ocorrência de danos genéticos aos espermatozóides.

A técnica de sexagem evoluiu muito ao longo de 20 anos, ao ponto de se desenvolver sistemas em contínuo funcionamento (24 horas), em que um único

citômetro é capaz de produzir 300 palhetas por dia. A ineficiência do processo não foi completamente eliminada, resultando em mais de 50% de eliminação de células potencialmente normais. Uma maior precisão no sistema de identificação de espermatozoides X e Y por intensidade de fluorescência beneficiaria a viabilidade do processo (Sharpe e Evans, 2009).

Investigações futuras devem ser conduzidas no sentido de se evitar os problemas inerentes à sexagem e criopreservação, por meio da prevenção da desestabilização da membrana espermática, redução da pressão durante o processo e adição de plasma seminal em diferentes estágios (Maxwell et al., 2004).

#### **2.4 Fatores que afetam os resultados do sêmen sexado**

Segundo Klinc e Rath (2007), uma série de fatores pode afetar os resultados obtidos pela inseminação com sêmen sexado, entre eles, o reprodutor utilizado, a qualidade espermática, a concentração espermática das doses, o estado reprodutivo das fêmeas, o horário da inseminação após o estro, o local da deposição do sêmen, a habilidade do inseminador e o manejo da propriedade. A reduzida fertilidade do sêmen é o fator de maior impacto econômico na aplicação dessa biotecnologia (Seidel Jr et al., 2003; Meirelles et al., 2008).

Para Seidel Jr e Schenk (2008), a comercialização do sêmen sexado é viável apenas com baixas concentrações de espermatozoides, como consequência do elevado valor do equipamento, a velocidade e a eficiência da sexagem. Segundo Bodmer et al. (2005) e Schenk e Seidel Jr (2007), a fertilidade do sêmen sexado é reduzida em comparação ao sêmen não sexado, porém, não se sabe em que proporção esse efeito é atribuído ao processo de sexagem ou à baixa concentração de espermatozoides por dose. Na opinião de Klinc e Rath (2007), os resultados somente podem ser melhorados com o aumento da sobrevivência dos espermatozoides, alterando-se o protocolo de sexagem e criopreservação.

Estudos conduzidos por Frijters et al. (2009), avaliaram o resultado de inseminações com sêmen dos mesmos reprodutores nas seguintes concentrações: sêmen não sexado com 15 e 2 milhões de espermatozoides e sêmen sexado com 15 e

2,1 milhões de espermatozoides; foi identificada uma redução de 13,6% na taxa de prenhez com sêmen sexado contendo 2,1 milhões de espermatozoides, atribuindo 8,6% dessa redução à baixa concentração do sêmen e 5,0% ao processo de sexagem.

Experimentos realizados por Seidel et al. (1997), Den Das et al. (1998) e Bodmer et al. (2005), demonstraram a importância da fertilidade dos touros nos resultados obtidos com sêmen sexado. De acordo com Frijters et al. (2009), os efeitos da baixa concentração e da sexagem diferem entre os reprodutores, sendo que a fertilidade do reprodutor com o sêmen sexado não pode ser avaliada pela observação dos resultados com um sêmen não sexado.

## **CAPÍTULO 1**

## **INSEMINAÇÃO INTRACORNIAL PROFUNDA EM BOVINOS COM DOSE REDUZIDA DE SÊMEN**

MEIRELLES C.<sup>1\*</sup>, KOZICKI L.E.<sup>2</sup>, WEISS R.R.<sup>3</sup>, SEGUI M.S.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias UFPR;

<sup>2,3</sup> Departamento de Medicina Veterinária da UFPR;

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária da PUCPR.

**RESUMO** - O objetivo do experimento foi comparar a técnica de inseminação artificial intracornual profunda (IAIP) com a técnica de inseminação transcervical no corpo do útero (IA), utilizando-se dose reduzida de sêmen em um rebanho bovino de corte. Foram selecionadas 89 vacas, sendo 74 animais da raça Nelore e 15 vacas cruzadas (Nelore X Red Angus), em outubro e novembro de 2006. O sêmen em palhetas era proveniente de uma central de inseminação artificial, apresentando comprovada fertilidade. A concentração espermática de cada palheta era de aproximadamente 12 milhões de espermatozóides viáveis. Para cada inseminação a palheta era dividida ao meio antes do descongelamento. Procedeu-se a IA via transcervical com depósito do sêmen na porção mais profunda do corno ipsilateral ao ovário que continha o folículo ovulatório. A identificação dos folículos ovulatórios era feita por palpação antes da IA. Dos 89 animais inseminados ocorreu um percentual de prenhez de 67,4% para o Grupo IAIP e de 48,8% para o Grupo IA ( $p>0,05$ ). Levando-se em consideração o baixo número de animais pesquisados, concluiu-se que não houve diferença significativa entre os grupos.

Palavras-chave: Inseminação intracornual profunda; dose reduzida de sêmen; bovino de corte.

## DEEP INTRACORNIAL INSEMINATION IN CATTLE WITH REDUCED DOSE OF SEMEN

**ABSTRACT** - The aim of this experiment was to compare the deep intracornial artificial insemination technique (DIAI) with the conventional insemination in the body of the uterus (AI) using a reduced dose of semen in a beef cattle herd. A group of 89 cows were selected, 74 Nelore and 15 Nelore X Red Angus cows, in October and November 2006. The semen was from an artificial insemination company and was examined for fertility guarantee. The sperm concentration of each dose was approximately 12 million of viable sperm. For each insemination the dose was split in half. The semen was deposited in the deepest portion of the horn of the ovary containing the ovulatory follicle. The identification of ovulatory follicles was made by palpation before the AI. The percentage of pregnancy was 67,4% for DIAI Group and 48,8% for AI Group ( $p > 0,05$ ). There was no significant difference between groups.

Key-words: Deep intracornial insemination; low dose; bovine.

## INTRODUÇÃO

O Brasil utiliza a inseminação artificial (IA) em aproximadamente 7% do seu rebanho. Apesar de ser uma técnica padronizada e amplamente utilizada, essa porcentagem demonstra o potencial de crescimento e melhoria da IA dentro do rebanho nacional, levando em consideração que a inseminação artificial é a técnica que apresenta melhor resultado quando se pretende realizar a seleção e o melhoramento genético de um rebanho como um todo (ASBIA, 2007). No entanto, avanços nos estudos relativos à reprodução de bovinos devem ser empregados, com o objetivo de melhorar as técnicas atualmente utilizadas. Um exemplo ímpar disso é quanto ao uso de sêmen sexado na inseminação artificial, que apresenta uma tendência a menores taxas de prenhez (Bodmer et al., 2005; Kurykin et al., 2007). Tendo ciência que a técnica de sexagem por citometria de fluxo ainda está em evolução e que mudanças no processo reduzem a eficiência da separação dos espermatozóides (Suh e Schenk, 2003), seria de grande valia uma melhora na eficiência da técnica de inseminação artificial atualmente utilizada, tornando viável a utilização de doses de sêmen com concentrações inferiores ou de menor fertilidade.

Quanto às técnicas atualmente disponíveis para inseminação artificial, um melhor entendimento da anatomia e fisiologia da reprodução, como o transporte e sobrevivência dos gametas, além de processos envolvidos na fertilização, permitem aos pesquisadores ousar intervenções mais eficientes na inseminação (Hunter e Greve, 1998). A vantagem da deposição de sêmen no corpo uterino em comparação à deposição na cérvix não gera mais dúvidas. Entretanto, dúvidas são levantadas quanto ao melhor local para deposição do sêmen após a cérvix (López-Gatius, 2000). Segundo Hawk et al. (1983), Larsson et al. (1985), Nelson et al. (1987) e Seidel Jr et al. (1999) o sêmen depositado perto da junção útero-tubárica diminuirá as perdas de espermatozóides pelo fluxo retrógrado no muco cervical e perdas por fagocitose durante a migração uterina, além de proporcionar um acréscimo na sobrevivência do espermatozóide.

Vários estudos já foram desenvolvidos para determinar o melhor local de deposição do sêmen na inseminação artificial (López-Gatius e Camom, 1988;

Mackenna, 1990; López-Gatius, 2000; Andersson et al., 2004), porém, não há um consenso entre os autores quanto à inseminação intracornual profunda.

Alguns experimentos obtiveram maiores taxas de prenhez quando a inseminação era realizada no corno uterino ipsilateral à ovulação em comparação com a inseminação no corpo do útero e no corno contralateral à ovulação (Senger et al., 1988; López-Gatius, 2000). Entretanto, Hawk e Tanabe (1986), Momont et al. (1989) e Andersson et al. (2004) não obtiveram diferença significativa na taxa de prenhez comparando as mesmas técnicas.

A razão da discrepância entre os resultados desses estudos ainda não foi totalmente esclarecida, porém é sabido que uma série de fatores pode influenciar na prenhez (López-Gatius, 2000); acredita-se que a alta concentração de espermatozoides possa mascarar os resultados, uma vez que o aumento da concentração da dose de sêmen contribui para aumentar a taxa de prenhez em uma correlação dependente da fertilidade do touro utilizado (Den Daas et al., 1998; Andersson et al., 2004; Kurykin et al., 2006). Outras variáveis devem ser analisadas, como: inseminação unicornual ou bicornual, observação de estro ou indução, período pós-parto, manejo e experiência do inseminador. Todos esses fatores dificultam a comparação dos resultados.

O objetivo desse estudo é comparar uma técnica de inseminação intracornual profunda (IAIP) com a técnica de inseminação transcervical padrão no corpo do útero (IA), usando uma dose reduzida de sêmen em um programa de inseminação artificial com observação de estro de uma fazenda de bovinos de corte; uma vez que a maioria dos experimentos realizados nesse contexto é conduzida em animais com predisposição racial para produção de leite.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi desenvolvido na Fazenda Sanga Puitã, localizada no município de Iguatemi - MS. Foram selecionadas 89 vacas de um lote de vacas solteiras, sendo 74 vacas da raça Nelore e 15 vacas cruzadas (Nelore x Red Angus) e escore corporal variando de 2,5 a 3,5 (1=muito magra a 5=muito gorda), de acordo com Lowman et al. (1976). Todos os animais foram manejados da mesma forma, sendo a

base alimentar *Brachiaria decumbens* com suplementação de sal mineral em sistema rotacionado de pastejo. A inseminação foi realizada do dia 18 de outubro de 2006 ao dia 03 de novembro de 2006, com observação de estro natural e auxílio de rufiões. Os animais foram observados pela manhã e tarde sendo a inseminação realizada 12 horas após a identificação do estro. Todos os animais foram inseminados por um único inseminador, sendo padronizada a formação dos grupos tratados.

O sêmen utilizado era proveniente de uma central processadora de sêmen comercial credenciada. Foram utilizadas doses de dois touros: Nelore para as vacas cruzadas (Nelore X Red Angus) e um Red Angus para as vacas Nelores, com a mesma partida de congelamento para cada touro. A concentração média das meias doses de sêmen, obtida por contagem em câmara de Neubauer, foi de 5,6 milhões de espermatozoides viáveis para um touro da raça Red Angus e de 4,0 milhões para um touro da raça Nelore. Para cada inseminação o processo foi o mesmo: a palheta era dividida ao meio, antes do descongelamento da dose, com uma lâmina de aço, e apenas a metade da palheta que continha a extremidade com a bucha era utilizada para a inseminação, justamente para que fosse possível a deposição do sêmen (tomando o cuidado para não depositar a bucha); a outra metade da palheta foi novamente guardada no botijão de nitrogênio, com a extremidade cortada lacrada com papel alumínio, de forma a permitir uma posterior avaliação da concentração de cada palheta. Foi realizada a análise de motilidade, vigor, concentração e patologia espermática de duas doses intactas (não utilizadas para inseminação) de cada touro após o descongelamento padrão (aproximadamente 37°C por 30 segundos), para comparações com as análises das meias doses guardadas novamente no nitrogênio (sem diferenças significativas).

Para a execução da IAIP utilizou-se um cateter longo medindo 65 cm, especialmente desenvolvido para esse fim. Na seqüência introduziu-se o sêmen na porção mais profunda do corno ipsilateral ao ovário que continha o folículo ovulatório. Feito isso, a posição correta do cateter era verificada por palpação do útero e só então a meia dose do sêmen depositada. A identificação do folículo ovulatório foi feita por palpação dos ovários antes da inseminação e identificação do maior folículo presente, assim como sua consistência. A inseminação no corpo do útero (IA) seguiu a forma

padrão, porém, assim como na IAIP, foi utilizada apenas meia dose do sêmen, e registrados os dados referentes ao folículo ovulatório.

A palpação das vacas para obtenção dos resultados da inseminação foi realizada quando a última fêmea inseminada apresentava mais de 45 dias pós-inseminação. Além da prenhez, também foi observado o corno uterino onde se encontrava o feto.

Os dados analisados foram: prenhez com IAIP X IA; influência dos touros utilizados; influência do uso de um cateter para IAIP estéril X cateter reaproveitado após a lavagem do equipamento com água e sabão; influência do tipo de folículo ovulatório (consistência I – folículo duro; II – médio; III – maduro; IV - ovulado) no resultado da prenhez; e a correlação entre o lado do folículo ovulatório com o corno gestacional.

A análise estatística desenvolvida fez uso de tabelas de contingência e o teste do Qui-quadrado com correção de Yates ( $p < 0,05$ ) para cada comparação realizada.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos: 31 vacas gestantes de 46 inseminadas pelo método IAIP (67,4%) e 21 vacas gestantes de 43 inseminadas pelo método da IA tradicional (48,8%). Observa-se que ao se utilizar a IAIP o percentual de prenhez foi maior, porém não significativo ( $p > 0,1$ ), conforme observado na tabela 1.

TABELA 1 – Resultado da taxa de prenhez no grupo IAIP e IA após a utilização de dose reduzida de sêmen (Iguatemi – MS, 2006) (n=89)

<b>Grupo Animal</b>	<b>Total Animais (n)</b>	<b>Total Fêmeas Prenhes (n)</b>	<b>Total Fêmeas Não Prenhes (n)</b>	<b>Taxa de Prenhez (%)</b>
<b>IAIP</b>	46	31	15	67,4 <sup>a</sup>
<b>IA</b>	43	21	22	48,8 <sup>a</sup>

a:b  $p < 0,05$

IAIP – inseminação intracornual profunda;

IA – inseminação artificial

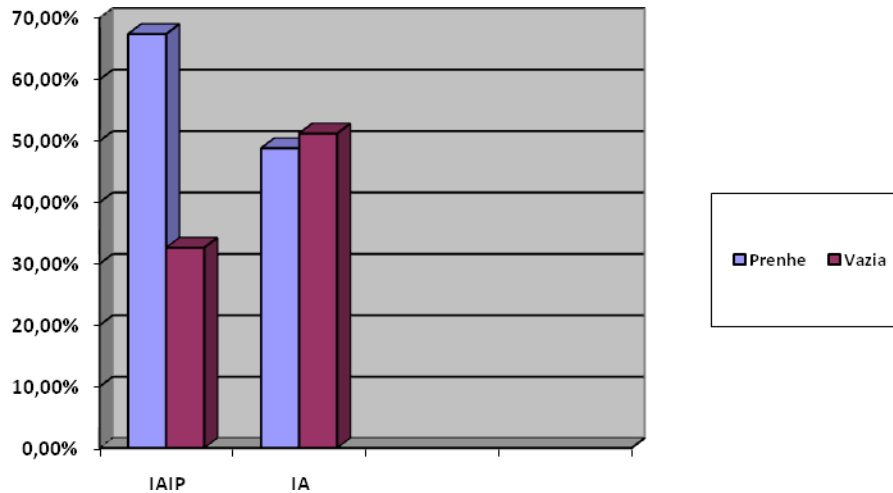
De acordo com Verberckmoes et al. (2004), o sêmen depositado próximo à junção útero-tubárica (principal reservatório espermático próximo ao local da inseminação) reduz as perdas de espermatozoides, o que favorece a técnica de

inseminação profunda com concentrações reduzidas. Os estudos de Dalton et al. (1999), fortalecem essa teoria, tendo o autor chegado à conclusão de que o acesso dos espermatozoides ao oócito é favorecido na IAIP, porém isso não garante melhores taxas de prenhez. Em contrapartida, Hawk e Tanab (1986), não observaram diferença significativa em experimentos na mesma linha de pesquisa.

Para López-Gatius (2000), a grande vantagem da IAIP seria a diminuição do risco da inseminação ser feita na cérvix, baseado no fato de que técnicos experientes fariam o serviço da IAIP, enquanto, cada vez mais, inseminadores menos qualificados são responsáveis pela inseminação na propriedade. No presente experimento, o mesmo técnico foi responsável pelas duas formas de inseminação, obtendo resultados diferenciados, apesar de não significativos. Entretanto, de fato a presença de um técnico qualificado, acompanhando todo o programa de inseminação e realizando as inseminações após o exame clínico ginecológico dos animais, deve culminar em resultados diferenciados, o que torna discutível, do ponto de vista econômico, a presença de um técnico apto a esse tipo de exame em uma fazenda de bovinos de corte durante um programa de inseminação, principalmente quando se tratar de um sêmen de custo mais alto.

É possível que o número de animais utilizados em cada tratamento tenha sido insuficiente para configurar uma análise estatística favorável à IAIP, acarretando dessa maneira em resultados de não significância estatística entre as técnicas utilizadas. Não temos evidências para rejeitar a hipótese de que os tratamentos utilizados na inseminação são iguais. Apesar do baixo nível de significância (10%) do teste Qui-quadrado, é razoável supor que o número de animais prenhes está relacionado com a Inseminação profunda (IAIP) e os não prenhes com a Inseminação normal (IA), conforme as proporções apresentadas pela figura 1.

FIGURA 1 – Comparativo entre as taxas de prenhez da IAIP e IA (IGUATEMI-MS, 2006)



Quanto às outras variáveis analisadas, em relação às raças dos touros e das vacas, o teste do Qui-quadrado não apontou diferença significativa no resultado de animais prenhes ( $p > 0,05$ ), apesar das concentrações médias desiguais nas meias doses de sêmen de cada touro (4 milhões e 5,6 milhões). Para Andersson et al. (2004), uma concentração de 2 milhões de células totais por dose afeta significativamente a taxa de prenhez dependendo da fertilidade do touro. No experimento de Verberckmoes et al. (2005) foram utilizadas doses de 2, 4, 8 e 12 milhões de células totais por dose, variando o local da inseminação (corpo e corno uterino), nenhuma diferença significativa foi obtida nos resultados das taxas de prenhez de touros com fertilidade adequada. Segundo Foote (1997), uma variação entre 10 e 40 milhões de células totais por dose não influencia no resultado da inseminação artificial desde que se mantenham adequadas condições de coleta do sêmen, processamento e técnica de inseminação artificial (contando a experiência do inseminador).

Apesar das análises do sêmen dos dois touros apresentarem boas condições de vigor, motilidade, patologia espermática e concentração, a técnica de corte da palheta antes do descongelamento da dose pode causar uma variação na concentração da meia dose inseminada, tendo em vista que a concentrações das meias-doses

analisadas tiveram uma variação de até 3,4 milhões de células viáveis. É possível que o corte da palheta antes do descongelamento não seja uma técnica adequada para garantir a divisão de duas metades iguais em concentração de células.

Os resultados mostram que não existe uma associação significativa entre o estado de prenhez do animal e a consistência do folículo dominante obtida por palpação retal no momento da inseminação ( $p>0,05$ ). Não existiu diferença significativa entre a utilização do cateter novo esterilizado e o cateter lavado reaproveitado ( $p>0,05$ ).

Quanto ao lado da prenhez, obtido pela palpação retal do corno gestante, a correlação com o ovário ipsilateral, que continha o folículo dominante no momento da inseminação, é altamente significativa ( $p<0,01$ ), sendo essa relação mais precisa no ovário direito. Esse resultado garante que é possível obter uma boa precisão da palpação do folículo dominante no momento da inseminação. Para López-Gatius (1997) e López-Gatius (2000), apesar do ovário direito ser um pouco maior e mais ativo, essa assimetria não influenciaria na IAIP e no resultado de prenhez. A desvantagem da palpação ovariana antes da inseminação ainda não é clara; certamente há possibilidades de ruptura de folículos maduros durante a manipulação, porém, acredita-se que profissionais experientes tenham reduzidas taxas de ruptura. Segundo Hunter (1998), na ruptura folicular o oócito ainda pode ser capturado pelas fímbrias.

## **CONCLUSÃO**

Apesar da evidente tendência de melhores resultados ao se utilizar a IAIP, a deposição de dose reduzida de sêmen próximo à junção útero-tubárica não apresentou significativas vantagens sobre a taxa de prenhez em comparação à técnica tradicional de inseminação.

## **CAPÍTULO 2**

**EFICIÊNCIA DA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL COM SÊMEN SEXADO EM BOVINOS:  
ASPECTOS DE VIABILIDADE REPRODUTIVA E ECONÔMICA**

MEIRELLES, C.<sup>1\*</sup>; FARIA, V.R.<sup>2</sup>; SOUZA, A.B.<sup>2</sup>; WEISS, R.R.<sup>3</sup>; SEGUI, M.S.<sup>4</sup>; KOZICKI, L.E.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias UFPR;

<sup>2</sup> Médico Veterinário;

<sup>3</sup> Departamento de Medicina Veterinária da UFPR;

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária da PUCPR.

**RESUMO** - A técnica de citometria de fluxo é utilizada com sucesso visando a sexagem de espermatozoides, gerando bezerros machos ou fêmeas, de acordo com a preferência do produtor. O objetivo do presente experimento foi avaliar a taxa de nascimento ao se utilizar um sêmen comercial sexado e comparar a eficiência com sêmen não sexado, bem como analisar o custo-benefício do sêmen sexado. Foram utilizadas 342 novilhas da raça Nelore localizada no município de Guaraniaçu-PR. O experimento foi realizado em outubro e novembro de 2006. Todos os animais pertenciam à mesma categoria animal com idade média de 24 meses. Os animais eram criados a pasto (*Brachiaria decumbens*) em sistema de rotação de pastagem, com suplementação de sal mineral. Foram formados dois grupos de animais: Grupo I (controle – sêmen não sexado) formado por 155 novilhas e Grupo II (sêmen sexado) por 187 novilhas. Os animais estavam com o escore de condição corporal entre 2,5 e 3,0 (variação de 1 a 5). Em ambos os grupos de novilhas foi realizada a inseminação artificial (IA) com observação de estro (manhã e tarde), inseminando-se 12 horas após a observação. No Grupo I foi utilizado um sêmen comercial não sexado de um touro Nelore, proveniente de uma Central de coleta e congelamento. No Grupo II foi utilizado um sêmen sexado para gerar fêmea, proveniente da mesma Central de IA, porém de um reprodutor diferente ao do Grupo I. Os resultados demonstraram uma diferença significativa entre as taxas de nascimento ( $p < 0,05$ ), de 23,0% para o sêmen sexado e 46,45% para o não sexado, gerando um aumento no custo do bezerro produzido com o sêmen sexado. Apesar da reduzida taxa de prenhez do sêmen sexado, a acurácia da sexagem observada no nascimento foi de 93,02%.

Palavras-chave: sêmen sexado; Nelore; inseminação artificial.

**EFFICIENCY OF ARTIFICIAL INSEMINATION WITH SEXED SEMEN IN CATTLE:  
REPRODUCTIVE VIABILITY AND ECONOMICS ASPECTS**

**ABSTRACT** - The insemination with sorted sperm by flow-cytometry technique has been used successfully for produce of male or female calves, according to the choice of the producer. The aim of this experiment was to evaluate the rate of birth of a commercial sorted sperm and compare its efficiency with a not sexed semen and analyse the economic viability of the sexed semen. The experiment was conducted in October and November 2006, in Guaraniaçu-PR council, where 342 Nelore heifers were used. All animals belonged to the same category animal and age (24 months). The animals were managed in a system of rotation of pasture (*Brachiaria decumbens*), with supplemental mineral. They were separate in two groups of animals: Group I (control - not sexed semen) formed by 155 heifers and Group II (sexed semen) formed by 187 heifers. The animals were with the body condition score between 2,5 and 3,0 (range from 1 to 5). In both groups was used the estrus observation system (morning and afternoon), and the artificial insemination (AI) occurred 12 hours after estrus. In Group I was used a commercial not sexed semen of a bull (Nelore), from a company of collection and freezing semen. In Group II was used female sexed semen, from the same company of AI, but from another sire. The results showed a significant difference in the rates of birth ( $p < 0,05$ ), 23,0% in the sexed semen and 46,45% for conventional, generating an increase in the cost of calf produced with sexed semen. The accuracy of sexed semen was 93,02%.

Key-words: sexed semen; Nelore; artificial insemination.

## INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma técnica amplamente utilizada para melhorar a eficiência na produção de bovinos, apresentando melhores resultados quando se pretende realizar a seleção e o melhoramento genético de um rebanho. Contudo, novos avanços biotecnológicos devem ser agregados a esta biotécnica, com vistas à melhoria do que atualmente se utiliza.

O sêmen sexado pela técnica de citometria de fluxo está disponível comercialmente no Brasil desde 2004. A acurácia do resultado esperado no sexo dos bezerros é elevada, sendo anunciado um mínimo de 85% pelas empresas processadoras do sêmen. As vantagens no uso do sêmen sexado são diversas: melhor programação das populações do rebanho, maior ganho na produção de carne e leite, facilidade em direcionar a reposição de matrizes, ganhos genéticos e redução de tempo na seleção de plantéis, melhor direcionamento nos testes de progênie, entre outras. Entretanto, o custo desse sêmen é maior do que o sêmen não sexado (convencional), tornando necessária uma análise econômica prévia ao uso dessa tecnologia (Lima, 2005)

A eficácia econômica do uso dessa tecnologia na produção de bovinos certamente depende do número de bezerros produzidos, que fica reduzido com um sêmen menos fértil. Estudos desenvolvidos por Seidel Jr et al. (1999) demonstraram uma queda significativa na taxa de prenhez ao se utilizar o sêmen sexado em comparação a um sêmen não sexado. Sabe-se que a concentração espermática de uma dose de sêmen sexado, comercializado pelas empresas do ramo, é significativamente inferior à do sêmen não sexado, residindo aí uma justificativa para a queda na fertilidade. É desta forma que o mercado disponibiliza o sêmen aos produtores, que, dependentes deste modelo, precisam avaliar o custo-benefício do uso dessa tecnologia.

As vantagens do sêmen sexado para a produção de bovinos são várias. No entanto, devem-se salientar as limitações, as quais muitas vezes limitam a utilização

dessa tecnologia. A técnica de citometria de fluxo induz alterações na membrana espermática, acelerando o processo de reação acrossômica no espermatozóide após a criopreservação (pré-capacitação) (Mocé et al., 2006). Segundo Maxwell et al. (2004) e Mocé et al. (2006), o processo acarreta uma redução da sobrevivência do espermatozóide sexado. Para Mocé et al. (2006) esse fato justifica a deposição do sêmen próximo do local da fertilização, assim como no momento mais próximo possível à ovulação, podendo este fato constituir-se em solução, objetivando o aumento das taxas de prenhez. Contudo, mais pesquisas ainda são necessárias para elucidar tais dúvidas.

Enquanto não se define a melhor técnica de inseminação com sêmen sexado (local de deposição do sêmen, hora da IA e protocolo de inseminação em tempo fixo), permitindo a obtenção de melhores resultados, permanece a cargo do produtor assumir responsabilidades a respeito das taxas de prenhez apenas razoáveis (Lima, 2006).

Dado a importância econômica da taxa de nascimento e do custo por prenhez em uma fazenda de bovinos de corte, o presente trabalho tem como objetivo analisar e comparar a taxa de nascimento ao se utilizar um sêmen sexado e um sêmen não sexado (convencional), verificando-se também os percentuais de sexo dos bezerros nascidos, a eficiência do sêmen sexado (número de bezerros nascidos do sexo escolhido) e a análise financeira dos resultados.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Foram utilizadas 342 novilhas da raça Nelore em uma fazenda de cria, recria e engorda localizada no município de Guaraniaçu-PR. O experimento foi realizado em outubro e novembro de 2006. Todos os animais pertenciam à mesma categoria animal com idade média de 24 meses, submetidos ao mesmo sistema de manejo nutricional, sendo criadas à pasto (*Brachiaria decumbens*) e em sistema de rotação de pastagem com suplementação de sal mineral no cocho.

Foram formados dois grupos de animais: Grupo I (controle – inseminadas com sêmen não sexado) formado por 155 novilhas e Grupo II (sêmen sexado), com 187 novilhas. Os animais estavam com escore de condição corporal entre 2,5 e 3,0 (variação de 1 a 5). Em ambos os grupos foi realizada a IA com observação de estro

(manhã e tarde) com auxílio de rufiões, inseminando-se 12 horas após a observação. No Grupo I foi utilizado um sêmen comercial não sexado de um touro Nelore, proveniente de uma empresa de coleta e congelamento. No grupo II foi utilizado um sêmen sexado para gerar fêmea, proveniente da mesma empresa de IA do sêmen não sexado.

Após o descongelamento, a concentração espermática do sêmen não sexado era em torno de seis milhões de espermatozoides viáveis por palheta e citopatologia espermática total máxima de 20%, conforme exigências do Ministério da Agricultura, com custo de R\$ 20,00 por dose. No Grupo II utilizou-se um sêmen sexado direcionado para fêmea de um touro Nelore diferente do utilizado no Grupo I; neste caso, a concentração de espermatozoides viáveis após o descongelamento era em torno de 1,2 milhões/dose, sendo o sêmen sexado pela técnica de citometria de fluxo com custo de R\$ 55,00 por dose.

Os resultados da taxa de nascimento foram obtidos na estação de nascimento do ano seguinte (2007) com a identificação do sexo dos bezerros. Seguiu-se então à análise econômica comparativa dos dados coletados, utilizando-se o método do Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ). Para análise econômica, procurou-se estabelecer um comparativo entre o valor do investimento em sêmen e a divisão desse valor por unidades de bezerros gerados.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Relativamente às taxas de nascimento, no grupo animal que foi inseminado com sêmen não sexado, de 155 animais pesquisados houve o nascimento de 72 bezerros (46,45%), sendo 40 fêmeas (55,56%) e 32 machos (44,44%). Por outro lado, no Grupo II (sêmen sexado), dos 187 animais pesquisados houve uma taxa de nascimento de 23,0%, sendo 40 fêmeas (93,02%) e 3 machos (6,98%), conforme pode-se observar na tabela 1.

Tabela 1- Resultado da taxa de nascimento; de sexagem dos bezerros; e de custos por bezerros gerados após a utilização de sêmen sexado e não sexado, em novilhas da raça Nelore, inseminadas de modo convencional (Guaraniaçu-PR, 2007) (N=342).

<b>Grupo Animal</b>	<b>Total Animais (n)</b>	<b>Taxa de nascimento (%)</b>	<b>Fêmeas (n)</b>	<b>Machos (n)</b>	<b>Nascidos (n)</b>	<b>Fêmeas (%)</b>	<b>Custo bezerro (R\$)</b>
<b>G I (controle)</b>	155	46,45 <sup>a</sup>	40	32	72	55,56% <sup>c</sup>	43,0,6
<b>G II (sêmen sexado)</b>	187	23,00 <sup>b</sup>	40	3	43	93,02% <sup>d</sup>	239,19
<b>Simulação com sêmen não sexado</b>	187	46,45	48	39	87	55,56%	42,99

a,b,c,d letras diferentes, na coluna, indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ )

Com base nos resultados obtidos verifica-se a baixa taxa de nascimento auferida com o sêmen sexado, significativamente inferior à do sêmen não sexado ( $p < 0,05$ ). Apesar da elevada acurácia na obtenção do sexo desejado com o sêmen sexado ( $p < 0,05$ ), ao se executar uma análise simulada com as porcentagens obtidas com o sêmen não sexado, de forma a equalizar o número de animais e permitir melhor comparação entre os grupos, teríamos em 187 animais para cada grupo, 40 fêmeas obtidas com o sêmen sexado e 48 fêmeas com o sêmen não sexado, resultando, portanto, em 8 fêmeas a mais com o sêmen não sexado. Com o mesmo raciocínio e de posse das porcentagens obtidas no experimento relativamente aos machos, o uso do sêmen não sexado forneceria 36 machos a mais que o sêmen sexado, o que geraria um peso econômico representativo para o produtor.

O custo do bezerro produzido neste caso ficou em R\$239,19 com sêmen sexado e R\$43,06 com sêmen não sexado. A discrepância entre os valores é devido ao elevado custo da dose do sêmen sexado, aliado à baixa taxa de nascimento. O custo por fêmea produzida, ou seja, o valor do investimento dividido pelo número de fêmeas geradas, ficou em R\$257,13 com sexado e R\$77,50 com não sexado.

Alguns estudos enfatizam a importância econômica da precocidade sexual em bovinos de corte. Características ligadas à precocidade sexual em fêmeas apresentam-se como critérios significativamente importantes na seleção de animais sexualmente precoces. Deste modo, o uso de sêmen sexado para obtenção de fêmea poderia

aumentar o número de fêmeas para seleção, acelerando o processo. Para tanto, Neves et al. (2008) desenvolveram um estudo de simulação a fim de se avaliar diferentes estratégias de uso de sêmen sexado como meio de intensificar a seleção por precocidade sexual. Em uma projeção de tempo de 10 anos, todas as estratégias de uso de sêmen sexado proporcionaram resultado econômico inferior ao da estratégia de uso do sêmen não sexado, principalmente em virtude da venda de menor número de machos; entretanto, em algumas meta-simulações com mais de 10 anos, os resultados seriam satisfatórios, demonstrando vantagem econômica ao se utilizar sêmen sexado voltados para fêmea por curto período, até se atingir um maior nível de precocidade sexual e fertilidade, sobretudo em primíparas. O uso de sêmen sexado para macho por curto período permitiu explorar o maior valor da venda dos mesmos e também proporcionou importante impacto econômico na simulação.

Com base nesses trabalhos ficou claro que o uso do sêmen sexado nos rebanhos deve ser projetado estrategicamente, levando-se em consideração o valor agregado a outras características, como a precocidade sexual das fêmeas. A inseminação de novilhas precoces com sêmen sexado para fêmea pode gerar produtos com considerável valor agregado. Entretanto, os resultados do presente experimento, em que se mantiveram as condições usuais de inseminação em uma fazenda de corte bem manejada, com inseminadores treinados e animais em boa condição corporal (condições semelhantes a outras propriedades que utilizam IA), demonstraram um menor número de fêmeas obtidas com o sêmen sexado em relação ao sêmen não sexado, acreditando-se que mesmo em novilhas precoces o sêmen não sexado geraria maior número de produtos com maior precocidade sexual.

Diversas variáveis podem afetar o resultado da IA, tais como fertilidade do touro, concentração da dose inseminante, acurácia na detecção do estro, tempo entre a detecção do estro e a IA propriamente dita e habilidade do inseminador (Andersson et al. 2004, Verberckmoes et al. 2004 e Bodmer et al. 2005). Entretanto, adotando-se o mesmo manejo e cuidado para o sêmen sexado e o não sexado, ainda assim os resultados com sêmen sexado foram inferiores. Em um estudo feito por Andersson et al. (2004) a inseminação com baixa concentração espermática (2 milhões) resultou em menores taxas de prenhez comparativamente a uma concentração espermática de 15

milhões por dose, usando um sêmen não sexado. Trabalhos conduzidos por Bodmer et al. (2005) demonstraram que novilhas inseminadas no corpo do útero com uma concentração de 2 milhões de espermatozóides de sêmen sexado apresentaram taxas de prenhez significativamente inferiores em relação ao sêmen não sexado na mesma concentração, salientando ainda a fragilidade dos espermatozóides sexados como uma possível causa da redução na taxa de prenhez, porém, concluindo que a concentração do sêmen é o fator mais importante para essa diminuição. Segundo Andersson et al. (2004), a razão específica para a menor fertilidade do sêmen sexado não é conhecida, porém, alguns recursos usados no processamento são apontados por Klinc e Rath (2006) como possíveis responsáveis pela menor qualidade do sêmen, tais como, a exposição ao laser-ultravioleta, os efeitos da diluição do sêmen, a pressão e a carga elétrica. Para aumentar a qualidade e a fertilidade do sêmen sexado, Seidel Jr (2003) e Suh e Schenk (2003) demonstraram que a motilidade e fertilidade espermática era consideravelmente superior quando se reduzia a pressão no processamento do sêmen. Entretanto, tais mudanças no processamento reduziram a eficiência da separação dos espermatozóides X e Y (Suh e Schenk, 2003).

A variação na fertilidade do sêmen também pode ser influenciada por diferenças individuais na fertilidade dos touros (Bodmer et al., 2005) e na concentração da dose do sêmen (Seidel et al., 1999), o que não se manteve constante nesse experimento; porém, o sêmen dos dois grupos foi obtido de uma empresa de comercialização de sêmen, sendo essa a forma disponível no mercado. Apesar da comparação do sêmen entre touros e concentrações por dose diferentes serem variáveis não estudadas neste trabalho, esses resultados influenciam na escolha do produtor por ser essa a condição acessível no mercado.

## **CONCLUSÃO**

Muito embora o sêmen sexado bovino constitua-se em um avanço biotecnológico de grande repercussão e consideravelmente útil em diversas situações relacionadas à

produção de bovinos de corte, uma criteriosa análise dos custos do investimento e retorno financeiro deve ser feita, visando a avaliação do uso do sêmen sexado. Concluiu-se neste estudo que o sêmen sexado apresentou índices inferiores (menor taxa de nascimento e elevado custo/bezerro), porém a acurácia quanto à sexagem foi significativa, ao se comparar com o sêmen não sexado.

## **CAPÍTULO 3**

## EFICIÊNCIA DA INSEMINAÇÃO INTRACORNIAL PROFUNDA COM SÊMEN SEXADO EM BOVINOS

MEIRELLES C.<sup>1\*</sup>; KOZICKI L.E.<sup>2</sup>; WEISS R.R.<sup>3</sup>; SEGUI M.S.<sup>4</sup>; SOUZA, A.B.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Mestrando do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias UFPR;

<sup>2, 3</sup> Departamento de Medicina Veterinária da UFPR;

<sup>4</sup> Departamento de Medicina Veterinária da PUCPR.

<sup>5</sup> Médico Veterinário – Vet-Maxi Maximização Pecuária Ltda.

**RESUMO** – A sexagem espermática em bovinos é uma biotécnica disponível comercialmente, porém, sua aplicação na produção animal depende da sua eficiência econômica. As taxas de prenhez obtidas com o sêmen sexado pesam na decisão de sua implantação ou não por parte do produtor. O objetivo do presente experimento foi avaliar a taxa de prenhez obtida com um sêmen sexado pela técnica de inseminação artificial convencional (IA) em comparação à técnica de inseminação intracornual profunda ipsilateral ao folículo ovulatório (IAIP), identificado no momento da inseminação. O experimento foi realizado em uma fazenda de bovinos de corte com 50 fêmeas Nelore de um lote de vacas primíparas solteiras. A inseminação foi realizada com observação de estro (manhã e tarde), inseminando-se 12 horas após a observação. O sêmen sexado para fêmeas era proveniente de uma Central de coleta e congelamento. Os resultados demonstraram uma taxa de prenhez de 36,0% na IAIP e 48,0% na IA, gerando uma diferença não significativa com o número de animais avaliados ( $p>0,05$ ).

Palavras-chave: Inseminação intracornual profunda; sêmen sexado; bovinos.

**ABSTRACT** - The bovine sexing sperm technology is a commercially available biotechnology, but its application in animal production is dependent of its economic efficiency. Pregnancy rate obtained with sexed semen has a big influence in the producer's decision to deploy or not the technology. The purpose of this experiment was to evaluate the pregnancy rate obtained with sexed semen by conventional artificial insemination technique (AI) compared to deep intracornual insemination technique (IAIP), in the same side of the ovulatory follicle. The experiment was conducted in a beef cattle farm with 50 female of a first calf cows lot. The insemination was performed with estrus observation (morning and afternoon), 12 hours after observation. The sexed semen for females was from a collection and freezing company. The results showed a pregnancy rate of 36,0% in IAIP and 48,0% in IA, creating a non-significant difference with the number of animals evaluated ( $p>0,05$ ).

Key-words: Deep intracornual insemination; sexed semen; bovine.

## INTRODUÇÃO

Na reprodução natural de bovinos, as taxas de nascimento de machos e fêmeas não variam muito além de 50% para cada sexo. Por muito tempo, pesquisadores apenas sonhavam com a possibilidade de se pré-determinar o sexo do bezerro na inseminação artificial. Uma série de sugestões foram propostas, como mudanças no manejo, idade das vacas inseminadas e horários da inseminação artificial após a observação do estro (Skjervold e James, 1979; Rorie, 1999), entretanto, alterações na taxa de nascimento de machos e fêmeas eram apenas singelas e de pouca repetibilidade. Na bovinocultura de corte e leite o direcionamento do sexo geraria um impacto interessante no desempenho do agronegócio. A partir da aplicação do citômetro de fluxo para a sexagem de espermatozóides esse sonho tornou-se possível, garantindo uma acurácia de 85-95% do sexo escolhido em bovinos, e similar em outras espécies (Garner e Seidel Jr, 2008)

A tecnologia de sexagem espermática por citometria de fluxo é a técnica atualmente usada para comercialização do sêmen sexado. Pesquisadores do USDA (United States Department of Agriculture) foram os pioneiros na tecnologia de separação de espermatozóides baseada na diferença no DNA de cromossomos X e Y (Johnson et al., 1987). De acordo com Moruzzi (1979), a diferença total na constituição do DNA entre bovinos machos e fêmeas é de aproximadamente 4,2%, pequena, mas suficiente para separação dos espermatozóides; em humanos, em que a sexagem espermática também é aplicada, a diferença é de aproximadamente 2,8% (Karabinus 2009). Apesar do crescente uso do sêmen sexado, evidenciado pela produção de 2 milhões de doses em 2007 e expectativa de 4 milhões de doses em 2008 (Sharpe e Evans, 2009), a citometria de fluxo permanece como a única técnica provada e confiável para produção de animais saudáveis e reprodutivamente funcionais com boa taxa de acurácia na determinação do sexo desejado (Tubman et al., 2004). A principal limitação na comercialização dessa tecnologia consiste no processamento do sêmen, que demanda um tempo considerável para o preparo de uma dose, permitindo a produção eficiente para comercialização de doses com apenas aproximadamente 2 milhões de espermatozóides. Segundo Seidel Jr e Schenk (2008), o elevado valor do

equipamento, a velocidade e a eficiência da sexagem ditam que a comercialização desse tipo de sêmen será possível apenas com baixas concentrações de espermatozóides por dose, resultando no comprometimento das taxas de prenhez.

Os primeiros resultados satisfatórios na sexagem espermática foram obtidos pela técnica de citometria de fluxo a partir de 1980 (Seidel Jr, 2007), entretanto, o processo utilizado provocava a remoção das membranas plasmáticas dos espermatozóides, culminando em sua morte. Somente a partir dos experimentos de Johnson (1988) foi possível a sexagem sem remoção das membranas plasmáticas. Em 1989, Johnson et al. reportaram o sucesso na produção de proles de coelhos com o sexo pré-determinado. Atualmente, estudos têm demonstrado resultados satisfatórios em várias espécies animais, com consideráveis avanços na aplicação comercial de sêmen sexado em bovinos e humanos (O'Brien et al., 2009)

Experimentos conduzidos por Seidel et al. (1999), com a finalidade de estabelecer a taxa de concepção do sêmen sexado em bovinos, compararam a inseminação de 1 a 1,5 milhões de espermatozóides sexados, no corpo e corno uterino, com a inseminação de 20 a 40 milhões de espermatozóides não sexados, chegando sempre a resultados inferiores com o sêmen sexado (70 a 90% do sêmen convencional). Segundo Seidel e Schenk (2008), a fertilidade com baixas doses de sêmen sexado ainda permanece menor em comparação à fertilidade de doses normais do sêmen não sexado. É perceptível a pouca evolução obtida nos resultados com o sêmen sexado ao longo dos anos, mesmo com os avanços obtidos e esforços em se aumentar o número de espermatozóides seguramente sexados por unidade de tempo e melhorias no processo de sexagem, tornando-o menos agressivo aos espermatozóides (Suh et al., 2005).

Atualmente, o uso do sêmen sexado deve ser cauteloso e estrategicamente planejado em virtude do seu elevado custo e resultados inferiores. A expectativa dos resultados deve ser de redução de 20 a 30% na taxa de prenhez esperada com um sêmen não sexado (Xu e Chaubal, 2009). Segundo DeJarnette et al. (2009), o sêmen sexado, na produção de bovinos de leite, deve ser usado preferencialmente em novilhas, com cuidadosa interpretação dos sinais de estro. Em bovinos de corte também é recomendada a utilização em novilhas e vacas em condições reprodutivas

ideais e alta expectativa de fertilidade; experimentos de Seidel Jr e Schenk (2008) demonstraram não haver diferenças no resultado dessas duas categorias animais. Centrais de venda de sêmen sugerem o atendimento de alguns pontos antes do uso dessa tecnologia, entre eles, a obtenção de bons resultados no uso do sêmen convencional, infra-estrutura adequada da propriedade, uma rotina de inseminação já existente, sanidade do rebanho e capacitação do inseminador.

A eficiência econômica no uso dessa tecnologia na produção de bovinos certamente depende das taxas de prenhez alcançadas, o que diminui com um sêmen menos fértil. Melhorias no processamento do sêmen, evitando a fragilização dos espermatozoides, e nas técnicas de inseminação artificial, poderiam contribuir positivamente nos resultados do sêmen sexado.

Quanto às técnicas atualmente disponíveis para inseminação artificial, avanços no entendimento da anatomia e fisiologia da reprodução, como o transporte e sobrevivência dos gametas e processos envolvidos na fertilização, permitem aos pesquisadores ousar intervenções mais eficientes na inseminação (Hunter e Greve, 1998). Segundo Hawk (1983), Larsson et al. (1985) e Nelson et al. (1987), o sêmen depositado perto da junção útero-tubárica diminui as perdas de espermatozoides pelo fluxo retrógrado no muco cervical e perdas por fagocitose durante a migração uterina, além de proporcionar um acréscimo na sobrevivência do espermatozoide.

Vários estudos já foram desenvolvidos para determinar o melhor local de deposição do sêmen na inseminação artificial (López Gatus, 1988; MacKenna, 1990; López Gatus, 2000), entretanto, não há um consenso entre os autores quanto à inseminação intracornual profunda (IAIP) e ainda muito pouco se sabe sobre o efeito na taxa de prenhez quando se varia o local da inseminação usando um sêmen sexado (Kurykin et al., 2007).

A técnica de IAIP vem sendo estudada por vários pesquisadores com a finalidade de se utilizar menor concentração de espermatozoides sem culminar em uma queda na taxa de prenhez ou melhorar os resultados obtidos com um sêmen menos fértil (Hunter e Greve, 1998, Kurykin et al., 2006). Entretanto, resultados conflitantes entre os experimentos já realizados sugerem a necessidade de estudos adicionais para determinar a eficiência da IAIP com um sêmen de fertilidade inferior, e determinar o

melhor local de deposição do sêmen (Kurykin et al., 2006). É aceitável pensar na IAIP como uma alternativa para melhorar o uso do sêmen sexado (Maxwell e Johnson, 1999; Hunter, 2001).

O objetivo do presente trabalho é comparar a taxa de prenhez obtida com o sêmen sexado pela técnica IAIP com o mesmo sêmen depositado no corpo do útero pela inseminação convencional.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi desenvolvido entre outubro de 2007 e janeiro de 2008 em uma fazenda de bovinos de corte localizada no município de Guaraniaçu-PR, que realiza ciclo completo de produção (cria, cria e engorda). Todos os animais do experimento eram provenientes da propriedade, sendo a amostra composta por fêmeas da raça Nelore. Os animais pertenciam ao mesmo lote e categoria animal, primíparas solteiras, ou seja, fêmeas com idade aproximada de 4 anos que não conceberam na estação reprodutiva de 2006 e entraram no início da estação de 2007 (outubro) sem bezerro ao pé (bezerro desmamado). Essa situação permite a entrada dessa categoria animal com boa condição corporal no início da estação reprodutiva, entre 2,5 e 3,5 (variação de 1 a 5). Todos os animais foram submetidos ao mesmo sistema de manejo nutricional, criados a pasto (*Brachiaria decumbens*) com sistema de rotação de pastagem e suplementação de sal mineral no cocho. A fazenda possui um veterinário responsável pelo programa sanitário e nutricional dos animais, que realiza o controle dos índices de desenvolvimento da propriedade (índices zootécnicos), estando esta em condições superiores em relação à média nacional.

Foram selecionadas 50 fêmeas de um lote de 209 animais à medida que estas apresentavam sinais de estro. Os animais foram observados pela manhã e à tarde, sendo a inseminação realizada 12 horas após a identificação segura do estro. Foram utilizados rufiões (média de 1 para cada 20 fêmeas) com buçal marcador para auxílio na observação do estro. Todas as inseminações foram realizadas por um único inseminador (veterinário responsável pelo experimento).

O sêmen utilizado nas inseminações era proveniente de uma empresa de comercialização credenciada e especializada na produção de sêmen congelado. Foram utilizadas doses de 0,25 mL de sêmen sexado congelado numa concentração espermática média de 2 milhões de células viáveis (de acordo com o fabricante), proveniente de um touro da raça Nelore com fertilidade comprovada. A descongelação das doses foi realizada em equipamento próprio para esse fim, submergindo as palhetas em água com temperatura de 35°C a 37°C por, no mínimo, 20 segundos.

A formação do grupo controle e do grupo testado foi aleatória, com o cuidado na padronização dos animais, procedendo a inseminação simultânea dos dois grupos à medida que os animais apresentavam sinais de estro.

No grupo I, controle-IA (n=25), a inseminação seguiu a forma padrão, sendo o sêmen depositado no corpo do útero com o uso de pipetas de inseminação artificial (IA) tradicionais. No grupo II, testado-IAIP (n=25), foi utilizada a inseminação intracornual profunda (IAIP), onde um cateter longo medindo 65 cm, especialmente desenvolvido para essa finalidade, foi introduzido na porção mais profunda do corno ipsilateral ao folículo ovulatório, até encontrar o mínimo de resistência; só então o sêmen foi depositado. A identificação do folículo ovulatório foi realizada por palpação retal dos ovários logo antes da inseminação e identificação do maior folículo presente, assim como sua consistência.

A confirmação dos resultados no diagnóstico de gestação foi obtida por meio da ultrassonografia, quando o último animal inseminado apresentava 75 dias pós-inseminação. Além do diagnóstico reprodutivo, também foi verificado o lado correspondente ao corno uterino onde se encontrava o feto para posterior correlação com o folículo ovulatório.

Os dados analisados foram: prenhez pela IAIP X IA com sêmen sexado; influência do tipo de folículo ovulatório (consistência I – folículo duro; II – médio; III – maduro; IV - ovulado) no resultado da prenhez; e a correlação entre o lado do folículo ovulatório com o corno gestacional.

A análise estatística foi desenvolvida por meio de tabelas de contingência e o teste do Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ) para cada comparação realizada. Foi realizada a

correção de continuidade de Yates para análise comparativa entre a IAIP X IA e na correlação entre o lado do folículo ovulatório com o corno gestacional.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos relativos à IAIP e à IA convencional com sêmen sexado podem ser observados na tabela 1. A taxa de prenhez total no experimento foi de 42,0%, variando de 36,0% na técnica IAIP e 48,0% na técnica IA convencional. Apesar da maior porcentagem na taxa de prenhez do grupo inseminado pela técnica convencional (IA), não há evidência estatística significativa ( $p>0,05$ ) para concluir que existe diferença nas taxas de prenhez apresentadas nos dois grupos animais, dentro das condições do experimento.

TABELA 1 – Resultado da taxa de prenhez no grupo IAIP e IA após a utilização de sêmen sexado em bovinos da raça Nelore (Guaraniaçu-PR, 2007) (n=50)

<b>Grupo Animal</b>	<b>Total Animais (n)</b>	<b>Total Fêmeas Prenhes (n)</b>	<b>Total Fêmeas Não Prenhes (n)</b>	<b>Taxa de Prenhez (%)</b>
<b>IAIP</b>	25	9	16	36,0 <sup>a</sup>
<b>IA</b>	25	12	13	48,0 <sup>b</sup>
<b>Total</b>	50	21	29	42,0

a:b  $p>0.05$

IAIP – inseminação intracornual profunda

IA – inseminação artificial

No presente estudo, apenas animais com clara manifestação de estro foram utilizados nas inseminações. Trabalhos conduzidos por Kurykin et al. (2007) apontam um aumento de 25% na taxa de prenhez entre animais com forte manifestação de estro.

O lado do folículo dominante, identificado pela palpação retal, coincidiu com o corno gestacional em uma taxa de 85%, resultando em uma associação estatisticamente significativa ( $p<0,05$ ). Resultados superiores (94,2%) foram obtidos por Kurykin et al. (2007), entretanto, foi utilizado o ultra-som para verificação dos ovários.

Segundo Schenk (2008), apesar da eficiência na separação dos espermatozoides pela citometria de fluxo, o potencial de fertilidade do sêmen é consideravelmente reduzido durante o processo. Uma série de estudos comparativos, com variadas concentrações de espermatozoides por dose (1 a 6 milhões de células viáveis), já foram realizados (Seidel et al., 1999; Schenk e Seidel, 2007; Seidel e Schenk, 2008; DeJarnette et al, 2008), em sua maioria em novilhas; entretanto, os resultados permanecem inferiores em relação ao sêmen não sexado. Mesmo quando uma dose maior de espermatozoides sexados (10 milhões) é usada, apesar de ser impraticável do ponto de vista comercial, as taxas de prenhez permanecem inferiores (Schenk, 2008). Uma importante consideração feita por Seidel e Schenk (2008) é de que a taxa de prenhez não sofre variação significativa após a inseminação de 1 a 6 milhões de espermatozoides sexados no corpo uterino de novilhas.

Seidel e Schenk (2008), desenvolveram estudos comparando a inseminação intracornual bilateral (meia dose em cada corno uterino) com a inseminação no corpo do útero, obtendo resultados muito semelhantes com uma concentração de 3 milhões de espermatozoides sexados em relação à taxa de prenhez (44% no corpo uterino e 43% no corno uterino), incluindo uma tendência (não significativa  $p>0,05$ ) a resultados inferiores na inseminação intracornual com uma dose de 1 milhão de espermatozoides sexados (28%). Deve-se ressaltar que no experimento foram usadas novilhas holandesas inseminadas após a sincronização de estro com PGF2 $\alpha$  e posterior observação. Os mesmos pesquisadores observaram diferença significativa em vacas Angus lactantes após a inseminação de 3 milhões de espermatozoides sexados bilateralmente nos cornos uterinos em comparação a 20 milhões de espermatozoides não sexados no corpo uterino (50%,  $n=21$  e 76%,  $n=42$ , respectivamente).

Na mesma linha de pesquisa, Kurykin et al. (2006) obtiveram uma tendência de aumento ( $p>0,05$ ) na taxa de prenhez após a inseminação intracornual profunda de vacas com 2 milhões de espermatozoides não sexados em relação à deposição no meio do corno; entretanto, os mesmos pesquisadores, Kurykin et al. (2007), usando 2,2 milhões de sêmen sexado em novilhas após sincronização do estro com PGF2 $\alpha$ , não encontraram resultados significativos quando se variava o local de deposição do sêmen no útero. A taxa total de prenhez no experimento foi de 43,1%. O experimento

apresentado no Capítulo 1 (dados não publicados) também obteve uma tendência ( $p > 0,05$ ) de melhores resultados com a inseminação intracornual profunda (67,2%) em relação à inseminação no corpo do útero (48,8%) quando foi usado meia dose de sêmen não sexado (4 a 5,5 milhões de espermatozoides viáveis).

No presente experimento, resultados semelhantes aos de Seidel e Schenk (2008) e Kurykin et al. (2007) foram observados. Há especulações de que a maior dificuldade na realização da técnica, também observada nesse experimento, possa causar traumas na mucosa uterina, interferindo no resultado da prenhez. Outro ponto observado é em relação ao tempo de manipulação do animal, que por vezes era consideravelmente maior na IAIP, resultando em maior estresse dos animais contidos.

O resultado da taxa de prenhez com sêmen sexado depositado no corpo do útero (IA) no presente estudo (48%), apesar de ser compatível com os resultados apresentados por Seidel e Schenk (2008) e Kurykin et al. (2007), foram maiores que os obtidos por Meirelles et al. (2008) com deposição do sêmen sexado no corpo do útero de novilhas (23%); vale ressaltar que no presente experimento apenas 25 animais de um lote de 209 foram selecionados, excluindo-se do programa animais com débil manifestação de estro, além do exame ginecológico realizado por um veterinário antes da inseminação.

Um estudo realizado por Frijters et al. (2009) observou que a causa da diminuição da fertilidade do sêmen sexado pode ser atribuída tanto à baixa concentração espermática quanto aos efeitos do processamento do sêmen, assim como a fertilidade dos reprodutores.

Vários fatores podem ser apontados como causa da redução na fertilidade do sêmen sexado durante seu processamento, incluindo a armazenagem do sêmen por longo período, com o intuito de se acumular um número razoável de espermatozoides para ser processado e envasado; exposição a altas concentrações do corante de DNA, que, segundo Garner e Suh (2002), afeta negativamente os espermatozoides; exposição a um forte laser, altas pressões e centrifugação para concentração e posterior envase, fragilizando ainda mais as células (Garner e Suh, 2002; Suh et al., 2005).

Para Meirelles et al. (2008), embora o sêmen sexado bovino constitua-se em um avanço biotecnológico de grande repercussão e consideravelmente útil em diversas situações relacionadas à produção de animais de corte, uma criteriosa análise dos custos do investimento e retorno financeiro deve ser feita, visando a avaliação do uso do sêmen sexado.

Enquanto os avanços na pesquisa não definem a melhor forma de processamento do sêmen ou técnica de inseminação, devemos assumir resultados apenas razoáveis com o sêmen sexado. Portanto, a sugestão de Seidel et al. (2007) é a utilização de sêmen sexado apenas de touros com conhecida fertilidade em baixas concentrações espermáticas (2 milhões de células) além das ideais condições de manejo. Para Schenk (2008), o sucesso nas taxas de prenhez com sêmen sexado depende do adequado manejo nutricional dos animais, cuidados na manipulação do sêmen, excelente detecção de estro e inseminadores bem treinados.

## **CONCLUSÃO**

Concluimos que a deposição de aproximadamente 2,2 milhões de espermatozoides sexados próximo à junção útero-tubárica ipsilateral ao folículo dominante no momento da inseminação não apresenta vantagens em relação à deposição do sêmen no corpo do útero de vacas primíparas solteiras, Nelore, em sistema de observação de estro e inseminação com 12 horas.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base no que foi observado nesse estudo, concluímos que:

- Os resultados da inseminação convencional com sêmen sexado, em uma fazenda de bovinos de corte, foram significativamente inferiores em relação ao sêmen não sexado, adotando-se o mesmo manejo de um programa de inseminação artificial tradicional, o que implica maior custo na produção de bezerros. Esses dados justificam a procura de metodologias diferenciadas para aplicação do sêmen sexado, ou melhorias na viabilidade dos espermatozóides;
- Há uma tendência, não significativa, de melhores resultados depositando-se uma dose reduzida de sêmen próximo à junção útero-tubárica, ipsilateral ao folículo ovulatório identificado no momento da inseminação, em comparação à inseminação convencional no corpo do útero;
- Apesar do sucesso na realização da técnica de inseminação intracornual profunda, demonstrando que há possibilidades de obtenção de produtos, esta não apresentou resultados satisfatórios, usando-se 2,2 milhões de espermatozóides sexados sob as condições avaliadas. Não houve diferença significativa nos resultados em relação à técnica convencional de inseminação artificial.

Inúmeros experimentos foram desenvolvidos com o foco de se melhorar a eficiência da sexagem pelo citômetro de fluxo, porém, é possível a substituição dessa técnica por outra de menor custo a partir do momento que ficarem estabelecidos novos métodos, fornecendo maior flexibilidade econômica para sua adoção. Estudos devem ser conduzidos no sentido de se melhorar a sobrevivência dos espermatozóides sexados, buscando taxas de prenhez comercialmente aceitáveis, independente do local de deposição do sêmen.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROGI, M. et al. Viability and DNA fragmentation in differently sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**. v.66, p.1994–2000, 2006

ANDERSSON, M.; TAPONEMA, J.; KOSKINEM, E.; DAHLBOM, M. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. **Theriogenology**, v.61, p.1583-88, 2004

ANUALPEC - Anuário da Pecuária Brasileira. Disponível em: [www.fnp.com.br](http://www.fnp.com.br) Acesso em 2005.

BODMER, M. et al. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. **Theriogenology**, v.64, p.1647-55, 2005

BOI E VACA GORDA BALANÇO 2008. **Boi e Companhia – Informativo Pecuário Semanal**, Ano 16, n. 798, janeiro, 2009. Edição especial.

BREITBART, H. et al. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membrane irradiated at 633 nm (Hene laser). **Journal of Photochemistry and Photobiology B**. v.34, p.117-121, 1996.

CÉZAR, I. M. Racionalização de investimentos em pastagens: uma abordagem sistêmica no processo decisório. In: Simpósio sobre Manejo de Pastagens, 18, 2001, Piracicaba. **Anais...Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários “Luis de Queiroz”**, 2001. p.351-369.

DANIELL, J.F. Sex-selection procedures. **Journal of Reproduction Medicine**. v. 28, n.4, p. 235-237, 1983.

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

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

DALTON, J.C; NADIR, S; BAME, J.H; SAACKE, R.G. Effect of a deep uterine insemination on spermatozoa accessibility to the ovum in cattle: a competitive insemination study. **Theriogenology**, v.51, p.883-890, 1999

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

- DEN DAAS, J. H. G. et al. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the reproductive efficiency of individual dairy bulls. **Journal of Dairy Science**. v.81, p.1714–1723, 1998.
- FOOTE, R.H; KAPROTH, M.T. Sperm numbers inseminated in dairy cattle and nonreturn rates revisited. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.3072-3076, 1997.
- FRIJTERS, A. C. J. et al. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? **Theriogenology**. v. 71, p. 64-67, 2009.
- FUGGER, E. F. Clinical experience with flow cytometric separation of human X- and Y-chromosome bearing sperm. **Theriogenology**. v. 52, p.1345–440, 1999.
- GARNER, D. L. et al. Quantification of the X- and Y-chromosome- bearing sperm of domestic animals by flow cytometry. **Biology of Reproduction**. v. 28, p.312–321, 1983.
- GARNER, D. L. Hoechst 33342: the dye that enabled differentiation of living X- and Y-chromosome bearing mammalian sperm. **Theriogenology**. v.71, p. 11-2, 2009.
- GALLI, C.; LAZZARI, G. Nuevas Tecnologías de La Reproducción. In: Proceedings of the 7th World Conference of the brown swiss cattle breeders, 2004, Verona, Italia, s.1, p. 225-229, 2004.
- GARNER, D. L.; SEIDEL JR, G. E. History of commercializing sexed semen for cattle, **Theriogenology**, v. 69, p. 886–895, 2008.
- GARNER, D. L.; SUH, T. K. Effect of Hoechst 33342 staining and laser illumination on viability of sex-sorted bovine sperm. **Theriogenology**, v. 57, p. 746, 2002 (Abstract).
- GRAHAM, J. K. Methods for induction of capacitation and the acrosome reaction of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v. 12, p. 111-117, 1996.
- HAWK, H. W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. **Journal of Dairy Science**, v.66, p.2645–2660, 1983.
- HAWK, H.W. et al. Fertilization rates in superovulating cows after deposition of semen on the infundibulum, near the uterotubal junction or after insemination with high number of sperm. **Theriogenology**, v.29, p.1131-1143, 1983.
- HAWK, H.W.; TANABE, T.Y. Effect of unilateral cornual insemination upon fertilization rate in superovulating and single ovulating cattle. **Journal of Animal Science**. v.63, n.55, p.560, 1986.
- HENDRIKSEN, P.J.M. Do X and Y spermatozoa differ in proteins? **Theriogenology**, v.52, p.1295-1307, 1999.

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

HUNTER, R. H. F.; GREVE, T. Deep uterine insemination in cattle: a fruitful way forward with small numbers of spermatozoa. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.39, p.149-63, 1998.

JOHNSON, L. A. Flow sorting of intact X and Y chromosomebearing mammalian spermatozoa. **Cytometry (Suppl)**, v. 2, p. 66, 1988 (abstract).

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

JOHNSON L. A.; FLOOK, J. P.; LOOK, M. V. 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, p. 203–212, 1987

KARABINUS, D. S. Flow cytometric sorting of human sperm: MicroSort1 clinical trial update. **Theriogenology**, v. 71, p. 74–79, 2009.

KLINC, P.; RATH, D. Effects of processing procedures after flow sorting to sex bovine spermatozoa and cryopreservation on sperm quality and fertility. **Slovenian Veterinary Research**. v.43 p.97-107, 2006.

KLINC, P.; RATH, D. Reduction of Oxidative Stress in Bovine Spermatozoa During Flow Cytometric Sorting *Reprod Dom Anim*, v.42, p. 63–67, 2007.

KODAMA, H., KURIBAYASHI, Y.; GAGNON, C. 1996: Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. **Journal Andrology**, v.17, p.151–157, 1996.

KURYKIN, J. et al. Low semen dose intracornual insemination of cows at fixed time after PGF2 $\alpha$  treatment or at spontaneous estrus. **Animal Reproduction Science**. v.95, p.116–124, 2006.

KURYKIN, J. et al. Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. **Theriogenology**, v.67, p.754-759, 2007.

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

LIMA, V.H. Como e quando a sexagem de espermatozoides faz a diferença. **DBO Genética – A revista de negócio da pecuária**. p. 38-40, Setembro, 2005.

LIMA, V.H. Qual o limite da sexagem. **DBO Genética – A revista de negócio da pecuária**. v.311, p. 74, Setembro, 2006.

LÓPEZ-GATIUS, F. Transuterine sperm transport is not affected by bilateral asymmetry of the reproductive system in dairy cows. **Theriogenology**, v.47: 13 19-I 325, 1997

LÓPEZ-GATIUS, F. Site of semen deposition in cattle: a review. **Theriogenology**, v.53, p.1407-1414, 2000.

LÓPEZ-GATIUS, F; CAMON, U.J. Increase of pregnancy rate in dairy cattle after preovulatory follicle palpation and deep cornual insemination. **Theriogenology**, v. 29, p.1099-1103, 1988

LOWMAN, B.G; SCOTT, N.A; SOMERVALLE, S.H. Condition scoring of cattle. Edinburgh: **The East of Escotland College of Agriculture**, p. 1-13, 1976 (Bulletin, 6).

LUBART, R. Changes in calcium transport in mammalian sperm mitochondria and plasma membranes caused by 780 nm irradiation. **Lasers in Surgery and Medicine**. v.21, p.493-499, 1997.

MACKENNA, T. et al. Nonreturn rates of dairy cattle following uterine body or cornual insemination. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.1779-1783, 1990.

MAXWELL, W. M. et al. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. **Society for Reproduction and Fertility**. v.64, p.13-38, 2007.

MAXWELL, W.M.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F.K.; BATHGATE, R.; DE GRAAF, S.P.; ERIKSSON, B.M.; et al. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**. v.82-83, p.79–95, 2004

MAXWELLI, W. M. C.; JOHNSON, L. A. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v.52, p.1353–1362, 1999.

MAXWELL, W. M.; WELCH, G. R.; JOHNSON, L. A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction Fertility and Development**. v.8, p.1165-1178, 1996.

MCMANUS, C. et al. Componentes reprodutivos e produtivos no rebanho de corte da embrapa Cerrados. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.31, n. 2, p. 648-657, 2002.

MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. 6ª ed, Porto Alegre-RS, editora Sulina, 1987, volume 2.

MEIRELLES, C.; FARIA, V.R.; SOUZA, A.B.; WEISS, R.R.; SEGUI, M. S.; KOZICKI, L. E. Eficiência da inseminação artificial com sêmen sexado bovino: aspectos de viabilidade reprodutiva e econômica. **Archives of Veterinary Science**, v.13, n.2, p.98-103, 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 acrossome reaction. **Theriogenology**, v.66, p.929-36, 2006.

MOMONT, H.W.; SEGUIN, B.E.; SINGH, G.; STASIUKYNAS, E. Does intrauterine site of insemination in cattle really matter? **Theriogenology**. v.32, p.19–26, 1989.

MONTAG, M. et al. Laser-induced immobilization and plasma membrane permeabilization in human spermatozoa. **Human Reproduction**. v. 15, n. 4, p.846-852, 2000.

MORUZZI, J. F. Selecting a mammalian species for the determination of X- and Y-chromosome-bearing sperm. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 57, p. 319–23, 1979

NELSON, V.E. et al. Sperm discharge and distribution within the cow reproductive tract and after A.I. **Journal of Animal Science**, v.65, p.401, 1987

NEVES, H.H.R. et al. Uso de sêmen sexado para intensificar a seleção por precocidade sexual em zebuínos de corte. **Beefpoint**. Disponível em: <http://www.beefpoint.com.br/?noticialD=39666&actA=7&areaID=60&secaoID=170>. Acesso em: 10/02/2008

NEVES, J. P.; GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, J. F. C. Fatores que afetam a eficiência reprodutiva na vaca. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, p.99-106, 1999.

O'BRIEN, J. K.; STEINMAN, K.J.; ROBECK, T.R. Application of sperm sorting and associated reproduction technology for wildlife management and conservation. **Theriogenology**, v. 71, 2009.

PAPA, F.; HENRION, R.; BREART, G. Preconceptional selection of fetal sex using an ionic method. A dietary regime. Results of a prospective clinical study over 2 years. **J. de Gynécologie, Obstétrique et Biologie de la Reproduction**, v.12, p. 415-422, 1983

PARRILLA, I. *et al.* Influence of storage time on functional capacity of flow cytometrically sex-sorted boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 64, p.86-98, 2005

Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen 2007. **Associação Brasileira de Inseminação Artificial – ASBIA**. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/download/mercado/relatorio2006.pdf> Acesso em: 05/07/2007.

RORIE, R. W. Effect of timing of artificial insemination on sex ratio. **Theriogenology**, v. 52, p. 1273-1280, 1999.

SCHENK, J. L. Sexing bovine Sperm. In: 3<sup>o</sup> Simpósio Internacional de Reprodução aplicada, 2008, Londrina. **Anais e palestras...** Londrina-PR: p. 127- 132. CD-ROM.

SCHENK J. L. et al. Cryopreservation of flow-sorted bovine sperm. **Theriogenology**. v.52 p.1375–1391, 1999.

SCHENK, J. L.; SEIDEL JR, G. E. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed spermatozoa: effects of laser intensity, staining conditions and catalase. **Society for Reproduction and Fertility**. v. 64, p.165–177, 2007

SEGUI, M. S. Reprodução de bovinos de corte e sua viabilidade comercial no Brasil. In: XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, v.31, n.2, p. 224-226, 2007 Curitiba, **Anais...** Curitiba, disponível em: <[www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br)>. Acesso em: 10/05/2008.

SEIDEL Jr., G .E. et al. Artificial insemination with X- and Y-bearing bovine sperm. **Theriogenology**, v.45, n.1, p.309, 1996.

SEIDEL JR, G. E. et al. Uterine horn insemination of heifers with very low numbers of non frozen and sexed spermatozoa. **Theriogenology**, v.48, p.1255-1264, 1997.

SEIDEL JR, G.E. et al. Insemination of heifers with sexed sperm. **Theriogenology**, v.52, p.1407-1420, 1999.

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

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

SEIDEL JR, G.E.; BRINK, Z.; SCHENK, J.L. Use of heterospermic insemination with fetal sex as the genetic marker to study fertility of sexed sperm. **Theriogenology**, v.59, p.515, 2003 (abstract).

SEIDEL Jr, G. E.; GARNER, DL. Current status of sexing mammalian spermatozoa. **Reproduction**. **Theriogenology**. v.124,p.733–743, 2002.

SEIDEL JR, 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**, v. 105, p.129–138, 2008.

SENGER P. L. et al. Influence of cornual insemination on conception in dairy cattle. **Journal of Animal Science**. v.66, p.3010-3016, 1988.

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

SILVA, A. E. F. *et al.* Influência do momento da inseminação artificial sobre a fertilidade e o sexo da cria de novilhas da raça Nelore. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 4, p. 997-1003, 2008

SKJERVOLD, H.; JAMES, J. Causes of variation in sex ratio in dairy cattle. **Z Tierzuchtungsbiol**, v. 95, p. 293-305, 1979.

SUH, T. K.; SCHENK, J. L. Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics. **Theriogenology**. v.59, p.516, 2003.

SUH, T. K.; SCHENK, J. L. Pressure during flow sorting of bull sperm affects post-thaw motility characteristics. **Theriogenology**. v.64, p.1035-48, 2005.

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

TUBMAN, L. M. et al. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. **Journal of Animal Science**. v.82, p.1029–1036, 2004

VAZQUEZ, J. M. et al. Motility characteristics and fertilizing capacity of boar spermatozoa stained with Hoechst 33342. **Reproduction in Domestic Animals**. v.37, p.369-374, 2000.

VERBERCKMOES, S. et al. Assessment of a new utero-tubal junction insemination device in dairy cattle. **Theriogenology**. v.61, p.103–115, 2004.

VERBERCKMOES, S. et al. Low dose insemination in cattle with the Ghent device. **Theriogenology**, v.64, p.1716–1728, 2005.

YAN, J. et al. Influence of swim-up time on the ratio of X- and Y- bearing spermatozoa. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 129, p. 150-154, 2006.

WEHNER, G. R. et al. Efficiency of the ovatec unit for estrus detection and calf sex control in beef cows. **Animal Reproduction Science**. v. 46, p. 27-34, 1997.

WHITTINGTON, K.; FORD, W. C. The effect of incubation periods under 95% oxygen on the stimulated acrosome reaction and motility of human spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v.4, p.1053–1057, 1998.

XU, J.; CHAUBAL, F. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. **Theriogenology**, v. 71, p. 39–47, 2009.