

ESTRATEGIAS DEL USO EFICIENTE DE SEMEN SEXADO EN BOVINOS

P.S. Baruselli, M.F. Sá Filho, J.N.S. Sales, G.A. Crepaldi, A.H. Souza, C.M. Martins, R. V. Sala, K.A.L. Neves

Departamento de Reprodução Animal, FMVZ-USP, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brasil.

E-mail: barusell@usp.br ou manoelsa@usp.br

Durante anos, os pesquisadores vêm buscando manipular o sexo da prole antes da concepção (Garner e Seidel, 2008). Essa determinação do sexo em bovinocultura de corte e de leite pode ser um dos fatores determinantes para melhorar o desempenho produtivo e econômico da atividade. Por exemplo, em fazendas produtoras de leite, o bezerro macho tem pouco ou nenhum valor zootécnico. Porém, em fazendas de corte comerciais, o bezerro macho é o sexo de interesse devido maior potencial de produção. Levando em consideração essas particularidades, muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de se prever e/ou manipular a proporção do sexo dos bezerros. Uma biotecnologia já disponível em escala comercial é a utilização do sêmen sexado. A separação dos espermatozoides Y dos espermatozoides X é possível devido às diferenças no conteúdo do DNA dessas células espermáticas (espermatozoide X possui cerca de 4% mais material genético que espermatozoide Y), sendo realizada por citometria de fluxo. Essa biotécnica associa a emissão de raios laser, a coloração diferencial dos espermatozoides viáveis e não viáveis e as forças hidrodinâmicas que direcionam o espermatozoide no momento da leitura durante o processo de separação dos espermatozoides X e Y. Além disso, existem diferenças entre as raças de bovinos quanto quantidade DNA presente no cromossomo Y. (Figura 1, Garner, 2006). Essas diferenças devem ser levadas em consideração quando do emprego dessa tecnologia. Recentes avanços na forma da ponteira do citômetro de fluxo, no posicionamento das células espermáticas no momento da passagem pelo laser, assim como modificações na pressão e no tipo de coloração das células, melhoraram significativamente o processo de separação dos gametas X e Y (Revisado em Garner, 2006).

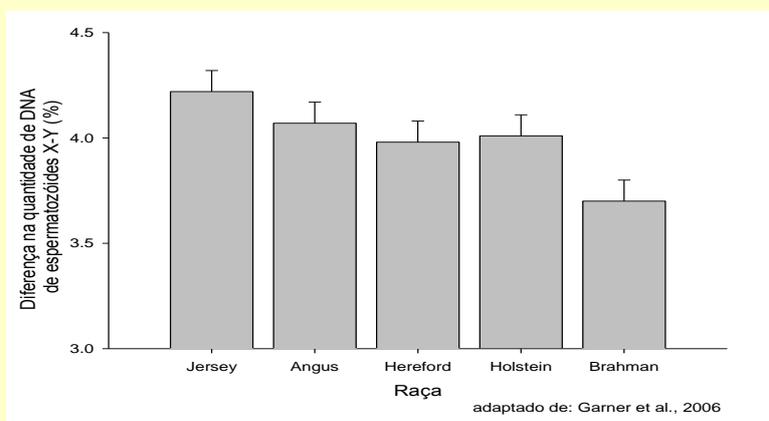


Figura 1. Diferença na quantidade de material genético (DNA) entre o cromossomo X e Y conforme a raça de bovinos

A velocidade de separação dos espermatozoides X e Y é relativamente lenta— aproximadamente 300.000 a 400.000 células por minuto. Desta forma, para a maior eficiência do processo, a dose de sêmen normalmente utilizada é de aproximadamente de 2×10^5 spz/palheta. Existem relatos na literatura que relacionam certos comprometimentos na fertilidade com o menor número de espermatozoides por dose nos grupos inseminados com sêmen sexado ($1,5-2.0 \times 10^6$ spz/dose) em comparação com a quantidade de espermatozoides utilizado com sêmen convencional ($\sim 10 \times 10^6$ spz/dose). Porém, trabalhos recentes indicam a mesma taxa de concepção quando inseminados com sêmen sexado ou convencional (Borchersen e Peacock, 2009).

Apesar dos resultados apresentados da literatura com vacas serem inconsistentes, a maioria das pesquisas realizadas com novilhas indica que a taxa de concepção após observação de cio e IA com sêmen sexado é de cerca de 70 a 90% da taxa atingida após o uso de sêmen convencional (revisado em: Seidel *et al.*, 1999), dependendo das condições de manejo das fazendas. Seidel *et al.* (1999) relataram, em uma combinação de vários experimentos, que as taxas de concepção de novilhas holandesas inseminadas com sêmen sexado variaram de 40% a 68% e com sêmen convencional de 67% a 82%. Porém, Seidel e Schenk

(2008) observaram apesar da taxa de prenhez ser menor no sêmen sexado, a variação dessa taxa foi maior no sêmen convencional (43 a 62%) do que no sêmen sexado (31 a 42%). Assim, essa revisão tem como objetivo apresentar informações de pesquisas que avaliaram a utilização de sêmen sexado em fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus* inseminadas após a detecção de cio ou tempo fixo (sem detecção de cio) ou após tratamentos superovulatórios.

IA com sêmen sexado após a detecção de cio

Atualmente, a taxa de concepção após o uso de sêmen sexado determina cerca 80% da taxa de concepção em inseminações com sêmen convencional (DeJarnette *et al.*, 2008), sendo encontrado em outro estudo, 70% em novilhas e 83% em vacas (Norman *et al.*, 2010). Apesar dos menores índices de prenhez, a utilização do sêmen sexado foi efetiva em aumentar a quantidade de bezerras fêmeas nascidas (sexado = 90%; convencional = 49%). Além disso, o uso de sêmen sexado tem reduzido o número de partos distócitos e natimortos tanto em vacas quanto em novilhas, principalmente nessa ultima categoria devido a maior incidência de nascimentos de fêmeas (Norman *et al.*, 2010).

A reduzida quantidade de espermatozoides por dose de sêmen sexado poderia ser outro fator envolvido com a redução nos índices de fertilidade. Um primeiro estudo, Bodmer *et al.*, (2005), utilizando a mesma concentração de espermatozoides por inseminação em vacas em lactação, obteve taxas de concepção semelhantes entre as fêmeas inseminadas com sêmen sexado (27.6%, n=105) ou convencional (28.1%, n=64). Seguindo esta linha de pesquisa, nosso grupo (Sá Filho *et al.*, 2010a) avaliou a utilização de dupla inseminação em novilhas Jersey recebendo o primeiro, segundo ou terceiro serviço. As novilhas (n=576) foram distribuídas em três tratamentos (1Dose12h, 2Dose12h ou 2Dose12/24h). Nos grupos 1Dose12h (n=193) ou 2Dose12h (n=193) as novilhas foram inseminadas com uma ou duas palhetas contendo 2.1 milhões de espermatozoides 12 horas após a detecção de cio, respectivamente. O grupo 2Dose12/24h (n=190) as novilhas receberam duas doses com 12 horas de intervalo entre as inseminações (primeira 12 horas e a segunda 24 horas após a detecção do cio). Não foram observadas diferenças entre os grupos na taxa de concepção [1Dose12h= 45.1% (87/193); 2Dose12h= 44.0% (85/193); 2Dose12/24h= 49.5% (94/190); P=0.51]. Entretanto, verificou-se efeito significativo do número de serviços (P=0.004) na taxa de concepção [Primeiro= 55.3%^a (115/208); Segundo= 46.1%^a (94/204); Terceiro= 34.8%^b (57/165); P=0.004]. Resultados semelhantes foram observados por DeJarnette *et al.* (2009), em que as taxas de prenhez reduziram em novilhas com o aumento do número de serviços (47% para o primeiro, 39 % para o segundo e 32% para o terceiro serviço). Portanto, em novilhas Jersey, o aumento da quantidade de espermatozoides por inseminação após observação de cio de 2,1 para 4,2 milhões e a realização da IA em dois momentos com intervalo de 12 horas não alteram a taxa de concepção.

Outra possibilidade para tentar aumentar a taxa de concepção de novilhas inseminadas com sêmen sexado seria a utilização de GnRH no dia da inseminação artificial. Em estudo recente, Sá Filho *et al.* (2010a) observaram que o tratamento com GnRH no dia da inseminação artificial com sincronização prévia com duas prostaglandinas não melhora a taxa de concepção em novilhas Jersey inseminadas com sêmen sexado [GnRH= 47.2% (100/212) vs. Não GnRH= 51.7 % (104/201); P=0.38].

Outro possível fator que poderia influenciar a taxa de prenhez utilizando sêmen sexado seria o local de deposição no útero. Em novilhas de leite, Kurykin *et al.* (2007) compararam a taxa de prenhez em diferentes locais de deposição do sêmen sexado no trato uterino. Nesse experimento, as novilhas foram inseminadas 80-82h após a segunda dose de PGF2 α (primeira dose de PGF2 α 14 dias antes da segunda dose) com sêmen sexado (2.2 x 10⁶ spztz/palheta). O lado da ovulação foi determinado por exame ultrassonográfico. As taxas de prenhez foram similares entre os diferentes locais de deposição do sêmen sexado no trato uterino de novilhas de leite.

Uso da radiotelemetria (Heat Watch) para a detecção do cio em programas de IA com sêmen sexado

Em estudo recente, Sá Filho *et al.* (2010a) avaliaram a utilização do sêmen sexado em novilhas Jersey inseminadas em diferentes momentos em relação ao início do cio identificado por radiotelemetria (Heat Watch[®]). Nesse estudo 638 novilhas Jersey foram inseminadas em diferentes momentos após o início do cio (12 a 16h; 16 a 20h; 20 a 24h e 24 a 30h). A taxa de concepção foi maior (P=0,03) nas novilhas inseminadas entre 16 e 24 horas em relação às inseminadas entre 12 e 16 horas. Valores intermediários foram obtidos em inseminações realizadas entre 24 e 30 horas após o início do cio (Figura 2).

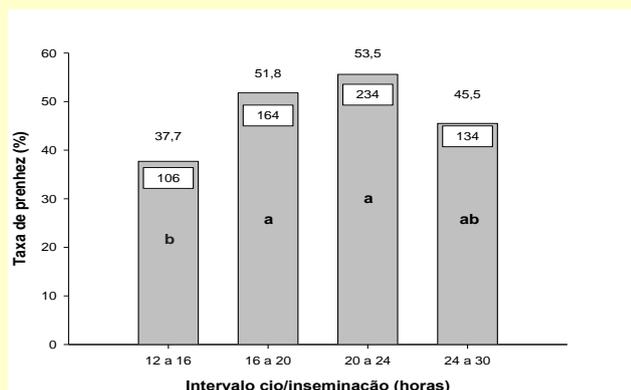


Figura 2. Taxa de concepção de novilhas Jersey de acordo com o intervalo entre início do cio e inseminação utilizando sêmen sexado (a ≠ b; P < 0,05).

Em outro estudo recente realizado, Sales *et al.* (2010) avaliaram a utilização do sêmen sexado ou convencional de três diferentes touros em novilhas Jersey inseminadas após o início do cio identificado por radiotelemetria (Heat Watch[®]). Verificou-se que o sêmen convencional [64,2% (238/371)] apresentou maior taxa de concepção do que o sêmen sexado [49,5% (189/382); P = 0,001]. Além disso, houve efeito de touro na taxa de concepção [Touro A = 50,0% (108/216)^b; Touro B = 63,4% (211/333)^a e Touro C = 53,5% (107/200)^b; P=0,008]. Nota-se que alguns touros apresentaram menores diferenças na taxa de concepção quando a inseminação artificial foi realizada com sêmen sexado ou convencional (Figura 3).

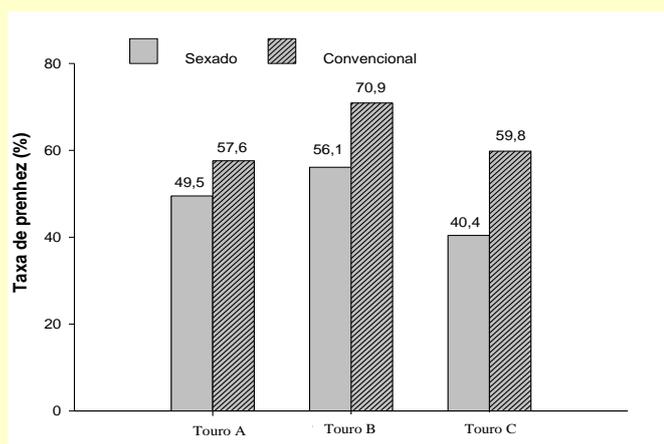


Figura 3. Taxa de concepção de novilhas Jersey submetidas à inseminação artificial de acordo com o touro (A, n=216; B, n= 333 e C, n=200) e o tipo de sêmen (sexado ou não sexado). Verificou-se efeito de touro (P = 0,008) e de sêmen (P = 0,001).

Os resultados são indicativos de que a adequação do momento das inseminações em relação ao início do cio melhora a taxa de concepção, apesar do processo de sexagem estar reduzindo a eficiência da técnica em novilhas. Vale ressaltar a diferença individual de fertilidade entre touros. Essa informação tem relevante aplicação prática, pois possibilita a seleção de touros de maior desempenho após a sexagem. O efeito individual da fertilidade de touros após a sexagem também tem sido foco de outros grupos de pesquisa (Borchersen e Peacock, 2009).

Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com sêmen sexado

Atualmente, são raras as publicações que tentam relacionar taxas de concepção após o uso de sêmen sexado em vacas de corte e de leite inseminadas em tempo fixo. Uma das possíveis razões da diminuição dos índices de fertilidade após o uso de sêmen sexado é o menor tempo de viabilidade, associado com diferentes padrões de motilidade espermática (Schenk *et al.*, 2006). Alguns autores relataram que o sêmen sexado necessita de menos tempo para a capacitação devido ao processo de separação por citometria de fluxo (Lu *et al.*, 2004). Uma das possibilidades de diminuir a variação do momento da ovulação é o emprego de técnicas de sincronização, o que poderia colaborar na eficiência de programas de inseminação artificial com sêmen sexado.

Vacas de corte e de leite sincronizadas com progestágenos e estradiol ovulam cerca de 70-72h após a retirada dos implantes (Souza et al., 2006, Baruselli et al., 2006, Sales et al., 2008).

Baseado nesses princípios, nosso grupo de pesquisa em parceria com a Sexing, Lagoa da Serra e Intervet realizou um primeiro estudo em vacas Nelore (*Bos indicus*, n=389) paridas entre 30 e 60 dias, no qual a inseminação foi realizada em tempo fixo com o sêmen convencional (40×10^6 esptz/dose) ou com sêmen sexado (2.1×10^6 esptz/dose) em dois diferentes momentos relativos à retirada do implante auricular contendo Norgestomet (Crestar), 54h (16-18 horas antes da ovulação) ou 60h (10-12 horas antes da ovulação). Nossa hipótese foi que a IATF próxima à ovulação aumentaria a taxa de concepção utilizando sêmen sexado por apresentar menor período de viabilidade e tempo para capacitação no trato reprodutivo. Nesse experimento, o sêmen foi preparado levando em consideração cada ejaculado. No laboratório, os ejaculados foram divididos, sendo metade submetida ao congelamento tradicional e a outra metade, ao processo de sexagem seguida de congelamento. Não foi observada diferença na taxa de concepção quando a IATF com sêmen sexado foi realizada 60 horas após a retirada do implante de norgestomet (Figura 4). Além disso, constatou-se que não houve diferença na taxa de concepção entre o uso do sêmen convencional (58,9%), sexado-X (52,0%) e sexado-Y (49,0%), indicando eficiência semelhante para o sêmen sexado em ambos os sexos. Os resultados da sexagem fetal realizados por ultrassonografia 60 dias após IATF demonstraram 93,9% de eficiência de obtenção do sexo desejado. Apesar de não ter sido verificada diferença estatisticamente significativa, o atraso na IATF aumentou 9,0% a taxa de concepção no grupo de animais inseminados com o sêmen sexado.

Com base nos efeitos numericamente positivos do experimento anterior, outro estudo foi realizado para verificar o efeito de maior atraso para a realização da IATF (60 vs. 64 horas após a retirada; Souza et al., 2008). Foram utilizadas 383 vacas Nelore com período pós-parto de 50 dias. O sêmen foi preparado seguindo o mesmo delineamento dos experimentos anteriores. Os resultados demonstram que ocorre redução na taxa de concepção quando a IATF é realizada 64 horas após a retirada do implante (Figura 5). Assim, os resultados sugerem que o momento mais adequado para realização da IATF com sêmen sexado possa ser 60h da retirada da fonte de progesterona /progestágeno (10 a 12 horas antes da ovulação).

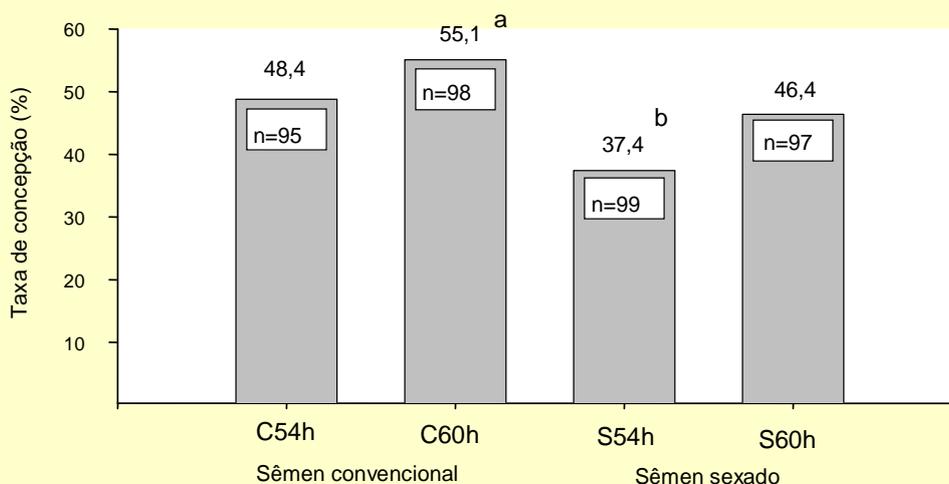


Figura 4. Efeito do momento da IA (54h ou 60h após a retirada do implante auricular contendo Norgestomet) e do tipo de sêmen (convencional ou sexado) na taxa de concepção após IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) pós-parto.

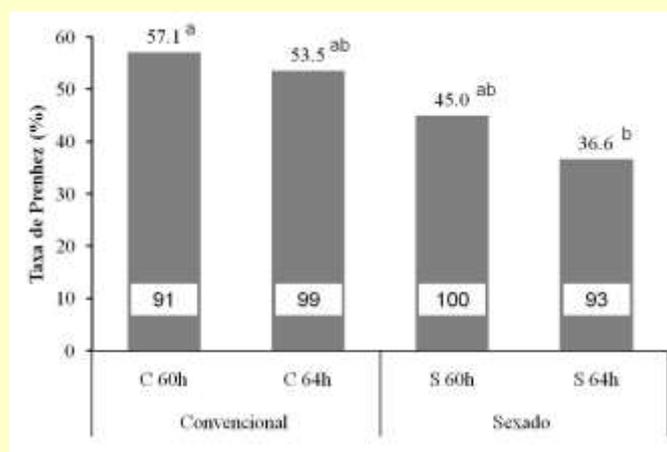


Figura 5. Efeito do momento da IA (60h ou 64h após a retirada do implante de progesterona) e do tipo de sêmen (convencional ou sexado) na taxa de concepção após IATF em vacas Nelore (*Bos indicus*) no pós-parto.

Em função dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, Sales *et al.* (2011) avaliaram qual seria o melhor momento para realizar a IATF com sêmen sexado em relação ao momento da ovulação. Nesse estudo, 339 vacas de cortes lactantes foram distribuídas aleatoriamente para receber a IATF com sêmen sexado 36, 48 ou 60 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. Exames ultrassonográficos foram realizados de 12/12 horas em todos os animais para determinar o momento da ovulação. As ovulações ocorreram em média $71,8 \pm 7,8$ horas após a retirada do dispositivo. Observou-se maior taxa de prenhez nas vacas inseminadas próximas à ovulação. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Risco de prenhez de acordo com o intervalo entre a IATF e a ovulação em vacas de corte lactantes inseminadas com sêmen sexado.

Intervalo IATF /ovulação	Taxa de prenhez (%) No./No.	Risco de prenhez (95% IC) ¹	P
> 24	5,8 5/87 ^c	0,24 (0,08-0,70)	<0,01
> 12 a 24	19,4 21/108 ^b	Referência	
> 0 a 12	37,9 36/95 ^a	2,34 (1,22-4,51)	0,01
Após a ovulação	36,4 8/22 ^{ab}	1,80 (0,64-5,03)	0,27

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna, difere estatisticamente (P < 0.05).

¹ IC = Intervalo de confiança.

Em outro estudo realizado no Texas – EUA, avaliou-se o efeito do atraso de 6 horas no momento da IATF com sêmen sexado em novilhas Jersey cíclicas sincronizadas e inseminadas em tempo fixo (Sales *et al.*, 2011). Os animais foram sincronizados com CIDR + 2mg de BE + PGF no dia 0; retirada do CIDR + PGF no dia 8; BE (1mg) no dia 9 e IATF no dia 10 (54 ou 60 horas da retirada do CIDR). Houve interação entre o tipo de sêmen e o momento da IATF na taxa de concepção (p=0,06), sendo observado aumento na taxa de concepção quando a IATF foi realizada com sêmen sexado 60 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. No entanto, esse efeito não foi verificado para o sêmen convencional (Figura 6).

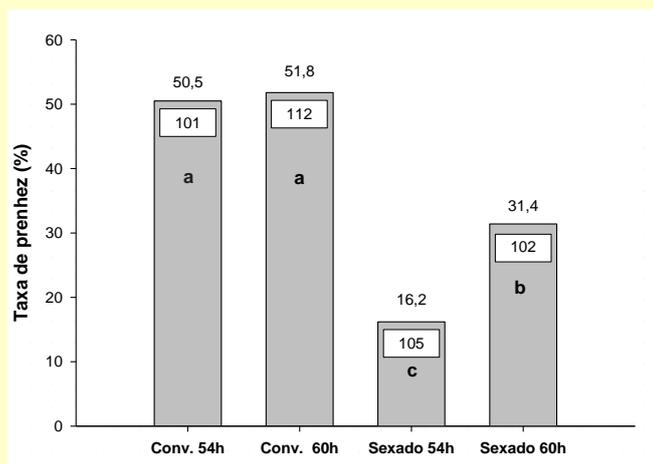


Figura 6. Efeito do momento da IA (54h ou 60h após a retirada do dispositivo de progesterona; 16 a 18 h ou 10 a 12 h antes da ovulação) e do tipo de sêmen (sexado e convencional) na taxa de concepção após IATF em novilhas Jersey.

Nesse experimento foram empregados 3 touros. Verificou-se diferença na taxa de concepção entre os touros utilizados no experimento, indicando mais uma vez que pode haver diferenças entre reprodutores quando da utilização de sêmen convencional e sexado (Figura 7).

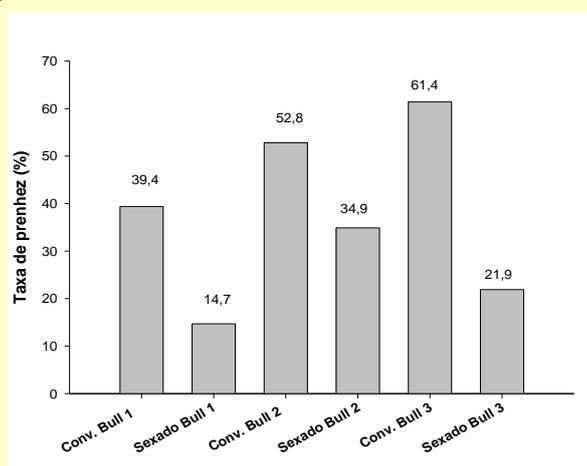


Figura 7. Taxa de concepção de Novilhas Jersey inseminadas em tempo fixo de acordo com o touro e o tipo de sêmen (sexado ou convencional). Verificou-se efeito de touro ($P = 0,001$) e de sêmen ($P = 0,001$).

Após a determinação do melhor momento para a realização da IATF com sêmen sexado, outros estudos foram realizados com o objetivo de verificar o efeito do diâmetro folicular no momento da IATF e a expressão de estro na taxa de concepção. Estudos anteriores demonstraram que fêmeas com folículo de maior diâmetro no momento da IATF (Sá Filho *et al.*, 2010b) e vacas que expressaram estro antes da IATF (Sá Filho *et al.*, 2011) apresentam melhores índices de concepção com sêmen convencional.

Quando essa metodologia (diâmetro do folículo na IATF) foi empregada utilizando sêmen sexado (Sá Filho *et al.*, 2011, dados ainda não publicados) observou-se interação ($P=0,02$) entre o tipo do sêmen e o tamanho do folículo dominante [Convencional $\geq 8\text{mm} = 58,9\%$ (126/214); Convencional $< 8\text{mm} = 49,5\%$ (101/204); Sexado $\geq 8\text{mm} = 56,8\%$ (134/236) e Sexado $< 8\text{mm} = 31,2\%$ (59/189); Figura 8]. Nesse estudo, verificou-se que a diferença entre os tipos de semen (convencional e sexado) na probabilidade de prenhez aos 30 diminui a medida em que o diâmetro dos folículos na IATF aumenta ($P=0,001$; Figura 9). No estudo em que se avaliou a expressão do estro em protocolos de IATF com semen sexado, verificou-se que não houve interação entre o tipo do sêmen e a ocorrência de estro entre a retirada do dispositivo de progesterona e a IATF ($P=0,87$; Figura 10). Porém, verificou-se diferença estatística entre semen convencional e sexado ($P=0,05$) e entre a ocorrência de estro ou não ($P=0,003$) na taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* submetidas à IATF.

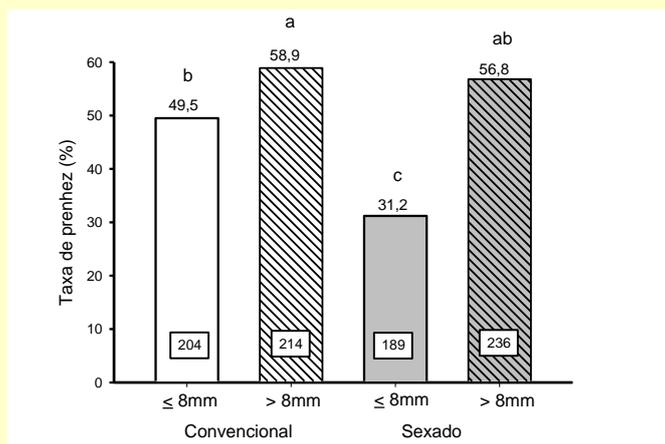


Figura 8. Taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* de acordo com o tipo de sêmen (convencional ou sexado) e o diâmetro do FD (≤ 8mm ou > 8mm) na IATF. Verificou-se interação entre o tipo de sêmen o diâmetro do FD na IATF ($P = 0,02$). ^{a,b,c} Barras com letras diferentes são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$).

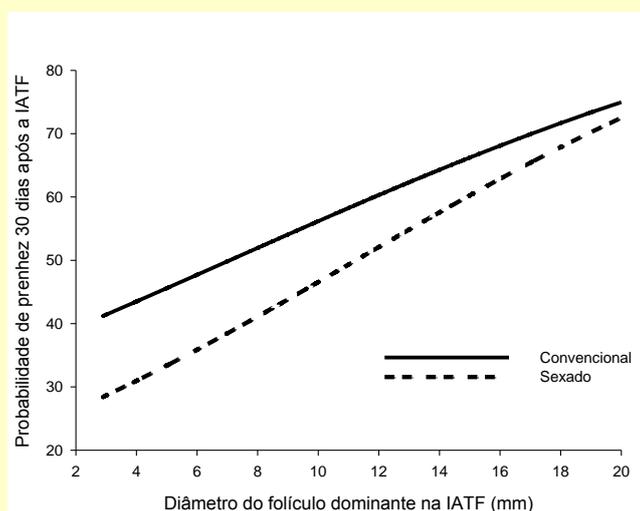


Figura 9. Probabilidade de prenhez 30 dias após a IATF em vacas *Bos indicus* ($n = 1344$) de acordo com o tipo de sêmen [Convencional ($n = 673$) e Sexado ($n = 671$) e o diâmetro do FD na IATF [Convencional = $\exp(-0,6018 + 0,0850 \cdot \text{Diâmetro do FD na IATF}) / 1 + \exp(-0,6018 + 0,0850 \cdot \text{Diâmetro do FD na IATF})$; $P < 0,0001$) e Sexado = $\exp(-1,2449 + 0,1107 \cdot \text{Diâmetro do FD na IATF}) / 1 + \exp(-1,2449 + 0,1107 \cdot \text{Diâmetro do FD na IATF})$; $P < 0,0001$].

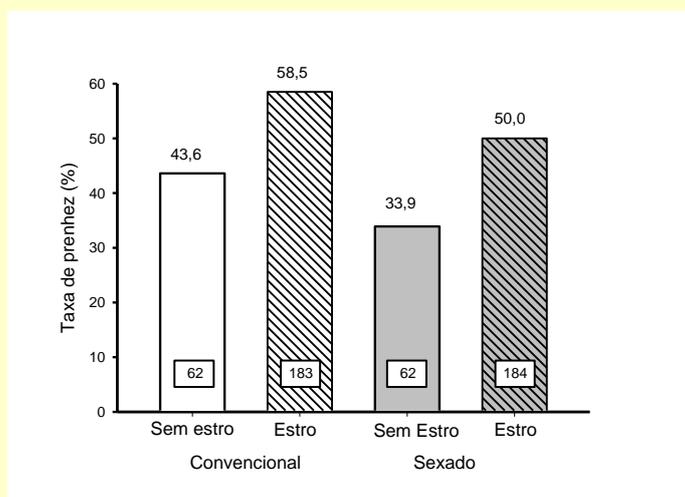


Figura 10. Taxa de prenhez de vacas *Bos indicus* de acordo com o tipo de semen (convencional ou sexado) e a ocorrência de estro (presença ou não de estro) entre a retirada do dispositivo de progesterona e a IATF. Não houve interação entre o tipo de semen e a ocorrência de estro (P=0.87).

Como citado anteriormente, outro possível fator que poderia influenciar a taxa de concepção utilizando sêmen sexado seria o local de deposição no útero. Em um estudo recente Sala *et al.*, (2011, dados ainda não publicados) compararam a taxa de concepção de vacas Nelore lactantes recebendo IATF no corpo (n=100) ou no corno (n=100) do útero. Nesse experimento, as vacas foram inseminadas 60-64h após a retirada do dispositivo, sendo que somente fêmeas apresentando diâmetro folicular >8mm foram incluídas na análise. As inseminações realizadas no corno uterino, o sêmen foi depositado no corno ipsilateral ao maior folículo presente no momento da IATF (Figura 11). As taxas de concepção foram similares entre os diferentes locais de deposição do sêmen sexado no trato uterino de vacas Nelore lactantes.

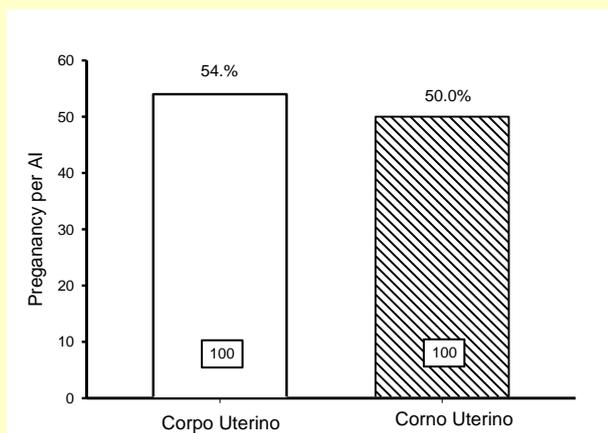


Figura 11. Taxa de concepção vacas *Bos indicus* lactantes de acordo com o local de deposição do sêmen sexado (Corno vs. Corpo do útero). Não houve efeito do local de deposição (P>0,05).

Com o intuito de reduzir o número de manejos nos protocolos de IATF com sêmen sexado, vacas Nelore lactantes foram submetidas a dois diferentes protocolos de sincronização da ovulação (BED9 e RBE9; n=593, Sá Filho *et al.* 2010d). No BED9, os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona associado à administração i.m. de 2 mg de benzoato de estradiol (D0). No D8, o dispositivo de progesterona foi removido, administrou-se i.m. 0,25 mg de cloprostenol sódico e 300UI de eCG. Vinte e quatro horas após a retirada do dispositivo, administrou-se i.m. 1 mg de benzoato de estradiol (BE). A IATF foi realizada entre 60 e 63 horas após a remoção do dispositivo. No grupo RBE9, as fêmeas foram sincronizadas utilizando o mesmo protocolo descrito para o grupo BED9, porém permaneceram com o dispositivo intravaginal durante nove dias, administrou-se 1 mg de BE no momento da retirada do dispositivo e a IATF com sêmen sexado foi realizada entre 50-53 horas após a remoção do dispositivo. Não foi verificado efeito do protocolo de sincronização sobre a taxa de prenhez (BED9 = 47,1%; 140/297 vs. RBE9 = 41,0%; 121/295; P = 0,25). Conclui-se que é possível reduzir o número de manejos sem afetar a eficiência do protocolo de sincronização da ovulação em vacas inseminadas com sêmen sexado.

Transferência de embriões

A viabilidade e a concentração de sêmen utilizados em procedimentos de transferência de embriões são importantes, pois animais submetidos a tratamentos superovulatórios apresentam, em geral, menores taxas de fertilização de óocitos que animais não superovulados (Saacke *et al.*, 1998). Portanto, existem muitas dúvidas quanto ao uso do sêmen sexado em animais superovulados, principalmente devido alterações relacionadas ao transporte espermático no trato uterino em fêmeas superestimuladas.

Com o intuito de avaliar a produção de embriões em vaca Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo foi realizado um experimento para comparar a eficiência do sêmen sexado e do sêmen convencional (Baruselli *et al.*, 2007). As doadoras foram sincronizadas e inseminadas em tempo fixo. A IATF com sêmen sexado ($4,2 \times 10^6$ esptz/IA) e convencional (40×10^6 esptz/IA) foram realizadas 12 e 24 horas após a administração do indutor da ovulação (GnRH). O sêmen foi produzido de um reprodutor levando em consideração cada ejaculado e todas as vacas passaram por todos os tratamentos (*cross-over*). Os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Produção de embriões de vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado ou convencional, Cassilândia, MS, 2007.

Variables	Sêmen Convencional	Sêmen Sexado	Valor de P
N. vacas	10	10	
Total de estruturas	9,90 ± 0,78	8,40 ± 1,40	0,28
Emb. transferíveis (Grau 1, 2 e 3)	6,80 ± 0,66	4,20 ± 0,74	0,03
Emb. congeláveis (Grau 1 e 2)	5,90 ± 0,71	3,50 ± 0,65	0,03
Oócitos não fertilizados	1,50 ± 0,48	3,70 ± 0,88	0,01
Degenerados	1,60 ± 0,37	0,50 ± 0,16	0,04
Taxa de emb. transferíveis (%)	68,7 ± 6,3	50,0 ± 5,1	0,01
Taxa de emb. congeláveis (%)	59,6 ± 5,1	41,7 ± 5,2	0,02

Doadoras inseminadas com sêmen sexado apresentaram menor número de embriões transferíveis e congeláveis, aumento do número de embriões não fertilizados e redução na taxa de embriões transferíveis e congeláveis. Apesar da menor produção de embriões com o emprego do sêmen sexado é possível produzir mais embriões do sexo de interesse quando a acurácia dessa biotecnologia atinge 90% de determinação do sexo (Figura 12).

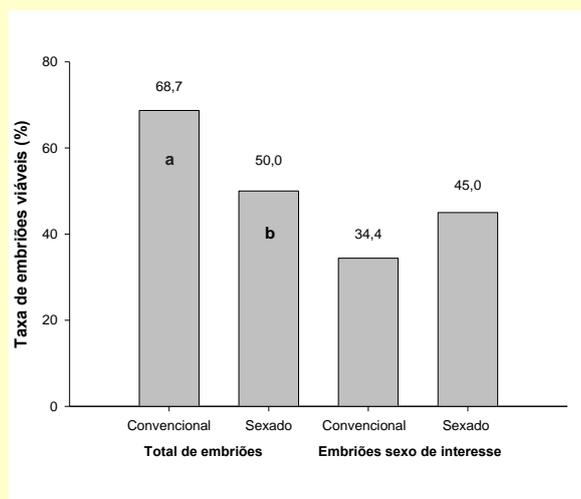


Figura 12. Estimativa de produção de embriões transferíveis (macho ou fêmea) com o emprego de sêmen convencional e sexado em doadoras Nelore superovuladas e inseminadas em tempo fixo (estimativa de 90 % de acurácia na sexagem).

Nesse experimento parte dos embriões produzidos foi transferida à fresco em receptoras sincronizadas para receber um embrião em tempo fixo (Tabela 3). Taxas de prenhez semelhantes foram verificadas tanto aos 30 quanto aos 60 dias de gestação para embriões produzidos com sêmen sexado ou convencional. Após a sexagem por ultrassonografia confirmou-se 90,0 % de fêmeas para o sêmen sexado e 52,7 % para o sêmen convencional.

Tabela 3. Taxa de prenhez aos 30 e 60 dias após a transferência de embriões provenientes de inseminação com sêmen convencional e sexado e porcentagem de fêmeas na sexagem fetal.

Embriões produzidos	n	Taxa de prenhez 30 dias (%)	Taxa de prenhez 60 dias (%)	Sexagem fetal (% de fêmeas)
Sêmen convencional	68	57,3 (39/68)	52,9 (36/68)	52,7 (19/36)

Sêmen sexado	42	57,1 (24/42)	47,6 (20/42)	90,0 (18/20)
--------------	----	--------------	--------------	--------------

Outro experimento foi estabelecido para avaliar o efeito do atraso de 6 horas na IATF com sêmen sexado em doadoras Nelore superovuladas (Soares *et al.*, 2011). As doadoras foram sincronizadas e inseminadas em tempo fixo. No grupo controle, a IATF com sêmen sexado ($4,2 \times 10^6$ esptz/IA, Sexado12-24h) e convencional (40×10^6 esptz/IA) foram realizadas 12 e 24 horas após a administração do indutor da ovulação (LH). Outro grupo (Sexado18-30h) foi inseminado com sêmen sexado ($4,2 \times 10^6$ esptz/IA) 18 e 30 horas após o LH. O sêmen foi produzido de um reprodutor levando em consideração cada ejaculado, semelhante aos experimentos anteriores. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

O atraso da IATF de 12/24 horas para 18/30 horas após a administração de LH aumentou o número de embriões produzidos em vacas Nelore superestimuladas e inseminadas com sêmen sexado. No entanto, os resultados ainda são inferiores aos obtidos com a utilização de sêmen convencional. Esses dados são indicativos de que existe a possibilidade de aumentar a eficiência da produção de embriões com o emprego de sêmen sexado atrasando em 6 horas o momento da IATF após o tratamento para indução da ovulação com LH.

Tabela 4. Produção de embriões de vacas Nelore (*Bos indicus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado e convencional de acordo com o momento da IATF, 2011.

	Tratamentos			Valor P
	Convencional	Sexado	Sexado	
	12/24	12/24	18/30	
N. de vacas	17	18	19	---
Total estruturas	8,0 ± 3,2	7,1 ± 3,3	9,0 ± 3,8	0,14
N. embriões transferíveis	6,8 ± 2,6 ^a	2,4 ± 1,8 ^c	4,5 ± 3,0 ^b	< 0,001
% embriões transferíveis ^d	86,1 ± 11,9 ^a	37,3 ± 26,7 ^c	48,2 ± 25,9 ^b	< 0,001
N. embriões congeláveis	6,0 ± 2,4 ^a	2,0 ± 1,4 ^c	3,7 ± 2,8 ^b	< 0,001
% embriões congeláveis ^e	76,3 ± 19,2 ^a	31,8 ± 24,5 ^c	38,0 ± 26,5 ^b	< 0,001
N. embriões degenerados	0,7 ± 0,7	0,9 ± 1,6	1,6 ± 2,1	0,05
N. óocitos não fertilizados	0,5 ± 0,7 ^a	3,7 ± 3,6 ^b	2,9 ± 2,6 ^b	< 0,001

^a≠^b≠^c, Linhas com diferentes letras diferem estatisticamente (P < 0,05)

^d Percentual do número de embriões transferíveis sobre o total de estruturas recuperadas.

^e Percentual do número de embriões congeláveis sobre o total de estruturas recuperadas.

Experimento semelhante ao de vacas *Bos indicus* (Nelore) de produção *in vivo* de embriões com sêmen sexado foi conduzido em novilhas *Bos taurus* (Holandesas; Soares *et al.*, 2011). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Produção de embriões de vacas holandesas (*Bos taurus*) superovuladas e inseminadas em tempo fixo com sêmen sexado e convencional de acordo com o momento da IATF, 2011.

	Tratamentos			Valor P
	Convencional	Sexado	Sexado	
	12/24	12/24	18/30	
N. de vacas	11	11	11	---
Total estruturas	10,4 ± 3,4	11,3 ± 4,4	12,4 ± 3,8	0,4
N. embriões transferíveis	8,7 ± 2,8 ^a	4,6 ± 3,0 ^b	6,4 ± 3,1 ^{ab}	0,007
% embriões transferíveis ^d	85,9 ± 14,0 ^a	40,7 ± 21,3 ^c	54,2 ± 23,2 ^b	< 0,001
N. embriões congeláveis	6,9 ± 1,8 ^a	3,2 ± 1,8 ^b	5,4 ± 3,4 ^{ab}	0,007
% embriões congeláveis ^e	69,9 ± 16,8 ^a	29,9 ± 15,5 ^c	45,3 ± 26,6 ^b	< 0,001

N. embriões degenerados	0,7 ± 0,9	1,4 ± 1,8	1,3 ± 1,7	0.43
N. óocitos não fertilizados	0,9 ± 1,4 ^a	5,2 ± 3,1 ^b	4,6 ± 2,6 ^b	0.0003

^a≠^b≠^c, Linhas com diferentes letras diferem estatisticamente (P < 0,05)

^d Percentual do número de embriões transferíveis sobre o total de estruturas recuperadas.

^e Percentual do número de embriões congeláveis sobre o total de estruturas recuperadas.

Os resultados são indicativos de que o atraso em 6 horas nas inseminações artificiais com sêmen sexado em programas de transferência de embriões pode ser uma medida para aumentar a eficiência dessa biotecnologia em protocolos de superovulação com o emprego de inseminação artificial em tempo fixo, tanto em *Bos indicus* como em *Bos taurus*.

Conclusão

Os dados apresentados demonstram que as taxas de concepção após detecção de cio em novilhas inseminadas com sêmen sexado são aceitáveis. Ainda, com a adequação do momento da inseminação em relação ao início do estro está melhorando a taxa de concepção. Melhores resultados são obtidos quando as inseminações são realizadas entre 16 a 24 horas após o início do estro (ou seja, 6 a 14 horas antes da ovulação). A taxa de concepção após o uso da sincronização da ovulação para IATF com sêmen sexado foi satisfatória, desde que o momento da IATF seja ajustado para 60 horas após a retirada do implante (10 horas antes da ovulação). O uso do sêmen sexado em programas de superovulação está diminuindo a produção de embriões viáveis. No entanto, o atraso de 6 horas nas inseminações (IATF 18 e 30 horas após o indutor de ovulações), é uma alternativa para aumentar o número e embriões viáveis do sexo desejado. É importante salientar que existe grande variação individual na fertilidade de touros submetidos ao processo de sexagem. Essas diferenças devem ser levadas em consideração no momento da escolha do reprodutor para programas de inseminação artificial e de transferência de embriões. Mais experimentos são necessários para melhor compreender os fatores que afetam a fertilidade do sêmen sexado em fêmeas bovinas.

Agradecimentos

À Sexing Technologies, à Lagoa da Serra, à Intervet e ao Dalhart Jersey Ranch pela parceria que possibilitou o desenvolvimento dos experimentos realizados no Brasil e EUA.

Referências Bibliográficas

- Baruselli, P.S., Ayres, H., Souza, A.H., Martins, C.M., Gimenes, L.U., Torres-Júnior, J.R.S. 2006. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina, PR. *Anais do 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo. Vol. 1, p.113-132.
- Baruselli, P.S., Souza, A.H., Martins, C.M., Gimenes, L.U., Sales, J.N.S., Ayres, H., Arruda, R.P. 2007. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. *Revista Brasileira Reprodução Animal* 31: 374-381.
- Bodmer, M., Janett, F., Hassig, M., Den Daas, N., Reichert, P., Thun, R. 2005. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. *Theriogenology* 64:1647-1655.
- Borchersen, S., Peacock, M. Danish, A.I. 2009. Field data with sexed semen. *Theriogenology* 71: 59-63, 2009.
- Dejarnette, J.M., Nebel, R.L., Marshall, C.E. 2009. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. *Theriogenology* 71: 49 - 58.
- Dejarnette, J.M., Nebel, R.L., Marshall, C.E., Moreno, J.F., McCleary, C.R., Lenz, R.W. 2008. Effect of Sex-Sorted Sperm Dosage on Conception Rates in Holstein Heifers and Lactating Cows. *Journal Dairy Science* 91:1778-1785.
- Garner, D.L. 2006. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology* 65: 943-957.
- Garner, D.L., Seidel Jr., G.E. 2008. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology* 69: 886-895.
- Kurykin, J., Jaakma, U., Jalakas, M., Aidnik, M., Waldmann, A., Majas, L. 2007. Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. *Theriogenology* 67:754-759.
- Lu, K.H., Seidel Jr., G.E. 2004. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage rates of bovine oocytes inseminate with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology* 62:819-830.
- Norman, H.D., Hutchison, J.L., Miller, R.H. 2010. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. *Journal Dairy Science* 93: 3880-3890.
- Sá Filho, M.F., Ayres, H., Ferreira, R.M., Nichi, M., Fosado, M., Campos Filho, E.P., Baruselli, P.S. 2010a. Strategies to improve pregnancy per insemination using sexed semen in dairy heifers detected in estrus. *Theriogenology* 74: 1636 - 1642.

- Sá Filho, M.F., Crespihlo, A.M., Santos, J.E.P., Perry, G.A., Baruselli, P.S. 2010b. Ovarian follicle diameter at timed insemination and estrous response influence likelihood of ovulation and pregnancy after estrous synchronization with progesterone or progestin-based protocols in suckled *Bos indicus* cows. *Animal Reproduction Science* 120: 23 – 30.
- Sá Filho, M.F., Baldrighi, J.M., Penteado, L., Campos Filho, E.P., Baruselli, P.S. 2010c. Follicle diameter at timed insemination influences the pregnancy in suckled *Bos indicus* cows inseminated with sexed semen. 8th *International Ruminant Reproduction Symposium*, Alaska (submitted).
- Sá Filho, M.F., Sales, J.N.S., Giroto, R., Penteado, L., Campos Filho, E.P., Baruselli, P.S. 2010d. Otimização do uso de sêmen sexado e redução de manejos em programas de IATF em vacas Nelore lactantes. *Acta Sci Vet*, p. 370.
- Sá Filho, M.F., Santos, J.E.P., Ferreira, R.M., Sales, J.N.S., Baruselli, P.S. 2011. Importance of estrus on pregnancy per insemination in suckled *Bos indicus* cows submitted to estradiol/progesterone-based timed insemination protocols. *Theriogenology* (in press)
- Saacke, R.G., Dejarnette, J.M., Bame, J.H., Karabinus, D.S., Whitman, S.S. 1998. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology* 50: 117-128.
- Sales, J.N.S., Neves, K.A.L., Souza, A.H., Crepaldi, G.A., Sala, R.V., Fosado, M., Campos, Filho, E.P., De Faria, M., Sá Filho, M.F., Baruselli, P.S. 2011. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex sorted semen. *Theriogenology* (in press).
- Sales, J.N.S., Crepaldi, G.A., Fosado, M., Campos Filho, E.P., Baruselli, P.S. 2010. Timing of insemination with sexed or nonsexed semen on pregnancy rates of Jersey heifers detected in heat by radiotelemetry. In: Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, 2010, Córdoba. *Reprod Fertil. Develop.* 22: 178-178.
- Sales, J.N.S., Carvalho, J.B.P., Crepaldi, G.A., Maio, J.R.G., Carvalho, C.A.B., Baruselli, P.S. 2008. Rate and timing of ovulation in Nelore cows treated with estradiol Cypionate or Benzoate to induce ovulation on FTAI protocols. *Reprod. Dom. Anim.* 43: 181 (Abstract).
- Schenk, J.L., Suh, T.K., Seidel Jr., G.E. 2006. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology* 65:299-307.
- Seidel Jr., G.E., Schenk, J.L. 2008. Pregnancy rates in cattle with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate and site of sperm deposition. *Animal Reproduction Science* 105: 129 -138.
- Seidel Jr., G.E., Schenk, J.L., Herickhoff, L.A., Doyle, S.P., Brink, Z., Green, R.D., Cran, D.G. 1999. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology* 52:1407-1420.
- Soares, J.G., Martins, C.M., Carvalho, N.A.T., Nicacio, A.C., Silva, A.L.A., Campos Filho, E.P., Sá Filho, M.F., Baruselli, P.S. 2011. Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with *Bos indicus* and *Bos taurus* superovulated donors. *Animal Reproduction Science* (in press).
- Souza, A.H., Martins, C.M., Torres Jr., J.R., Ayres, H., Baruselli, P.S. 2006. Efeito do eCG e do cipionato de estradiol em protocolos para inseminação artificial em tempo fixo em vacas Holandesas de alta produção. *Acta Sci Vet* 34: 404 (Resumo).
- Souza, A.H., Sales, J.N.S., Crepaldi, G.A., Teixeira, A.A., Baruselli, P.S. 2008. Effect of type of semen (sexed vs. non-sexed) and time of AI (60h vs 64h) on pregnancy rates of postpartum Nelore cows inseminated in a fixed time. *Anim. Reprod.* 6:224 (Resumo).