

## Avaliação do local de deposição do sêmen sexado na produção *in vivo* de embriões da raça Nelore

Evaluation of sexed semen deposition site on the *in vivo* embryo production of Nelore breed

Evaluación del sitio de depósito de semen sexado en la producción *in vivo* de embriones de la raza Nelore

Recebido: 08/08/2022 | Revisado: 25/08/2022 | Aceito: 01/09/2022 | Publicado: 09/09/2022

**Naia de Britto e Alves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1876-1807>  
Universidade Estadual do Maranhão, Brasil  
E-mail: [nbalves@gmail.com](mailto:nbalves@gmail.com)

**Jair Perez Osorio**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4714-9406>  
Universidad de La Salle, Colômbia  
E-mail: [jairperez@unisalle.edu.co](mailto:jairperez@unisalle.edu.co)

**Thiago Vaz Lopes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3192-1908>  
Universidade Federal do Acre, Brasil  
E-mail: [thiagovlopes@hotmail.com](mailto:thiagovlopes@hotmail.com)

**Francisco Carneiro de Lima**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3871-2359>  
Universidade Estadual do Maranhão, Brasil  
E-mail: [fcarneiro2020.lima@gmail.com](mailto:fcarneiro2020.lima@gmail.com)

**Astrid Lucila Paredes Cañon**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5766-2748>  
Universidad Nacional de Colombia, Colômbia  
E-mail: [mailto:astridparedes123@gmail.com](mailto:mailto:astridparedes123@gmail.com)

**Luciane Maria Laskoski**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0888-769X>  
Universidade Federal do Paraná, Brasil  
E-mail: [luci.laskoski@ufpr.br](mailto:luci.laskoski@ufpr.br)

**Fernando Andrade Souza**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9474-9404>  
Universidade Federal do Paraná, Brasil  
E-mail: [fernando.andrade@ufpr.br](mailto:fernando.andrade@ufpr.br)

### Resumo

Objetivou-se com este estudo descrever se o local de deposição do sêmen sexado influencia na quantidade e qualidade embrionária de vacas Nelore superovuladas. Foram utilizadas 12 fêmeas cíclicas, submetidas à protocolos de SOV e IATF para coleta de embriões. A IATF foi realizada 18 e 30h após a administração da Gonadorelina, com duas palhetas com concentração de  $2,1 \times 10^6$  de espermatozoides cada, sendo a coleta dos embriões realizada sete dias após a aplicação da gonadorelina. Foram feitas duas repetições, em delineamento *cross over*, de acordo com o local de deposição do sêmen, corpo ou corno uterino. No final do tratamento superestimulatório foram quantificados  $12,00 \pm 2,95$  e  $12,25 \pm 4,37$  folículos, de diâmetro médio de  $8,64 \pm 2,46$  e  $8,73 \pm 2,42$  mm, nos grupos corpo e corno, respectivamente. Observou-se que 66,7% (8/12) dos animais apresentavam CLs no dia da IATF, sendo quatro pertencentes ao grupo corpo e quatro ao grupo corno. O grupo corpo apresentou taxa de recuperação embrionária de 41,07% (23/56) e o grupo corno, 35,71% (15/42). Foi observada diminuição da taxa de recuperação entre repetições, obtendo-se 44,26% (27/61) na primeira repetição enquanto na segunda, 29,72% (11/37). Recuperou-se 52,17% (12/23) de embriões viáveis para o grupo corpo e 60% (9/15) para o grupo corno. Concluiu-se não haver disparidade na quantidade ou qualidade dos embriões recuperados quanto ao local de deposição do sêmen sexado no momento da IATF.

**Palavras-chave:** *Bos indicus*; Corno; Corpo; Superovulação.

### Abstract

This study's aim was to verify if the site of sexed semen deposition influences the quantity and quality of embryos from superovulated Nelore cows. Twelve females of proved cyclicity were used and went through SOV, FTAI and embryo collection protocols. FTAI was performed at 18 and 30h after the gonadorelin shot, with two straws each one containing  $2,1 \times 10^6$  sperm cells, and the embryo collection was done seven days after the gonadorelin shot. Two

repetitions were done, in a cross over design, according to semen deposition site, body or uterine horns. At the end of the treatment,  $12.00 \pm 2.95$  and  $12.25 \pm 4.37$  follicles were identified, with mean diameter of  $8.64 \pm 2.46$  and  $8.73 \pm 2.42$ mm, for the groups inseminated in the uterine body and horns, respectively. It was noted that 66.7% (8/12) of the animals had CLs at the day of FTAI, presenting four animals in each group. The group inseminated in the uterine body had embryo recovery rate of 41.07% (23/56) and the group inseminated in the uterine horns had 35.71% (15/42). It was seen a decrease in the embryo recovery rate between repetitions, where the first repetition achieved 44.26% (27/61) while the second showed embryo recovery rate of 29.72% (11/37). Yielded 52.17% (12/23) of viable embryos for the group inseminated in the uterine body and 60% (9/15) for the group inseminated in the uterine horns. It was concluded that there weren't differences at quantity or quality of recovered embryos according to the sexed semen deposition site at the time of FTAI.

**Keywords:** *Bos indicus*; Body; Horn; Superovulation.

### Resumen

El objetivo de este estudio fue describir si la ubicación de la deposición de semen sexado influye en la cantidad y calidad embrionaria de vacas Nellore superovuladas. Se utilizaron 12 hembras cíclicas, sometidas a los protocolos SOV y FTAI para la colecta de embriones. El IATF se realizó a las 18 y 30h de la administración de Gonadorelina, con dos pajuelas con una concentración de  $2,1 \times 10^6$  de espermatozoides cada una, y los embriones se recolectaron siete días después de la aplicación de la gonadorelina. Se realizaron dos repeticiones, en diseño cruzado, según el lugar de deposición del semen, cuerpo o cuerno uterino. Al final del tratamiento superestimulador se cuantificaron  $12,00 \pm 2,95$  y  $12,25 \pm 4,37$  folículos, con un diámetro medio de  $8,64 \pm 2,46$  y  $8,73 \pm 2,42$  mm, en los grupos cuerpo y cuerno, respectivamente. Se observó que el 66,7% (8/12) de los animales tenían CL el día de la IATF, cuatro pertenecientes al grupo cuerpo y cuatro al grupo cuerno. El grupo de cuerpo mostró una tasa de recuperación embrionaria de 41,07% (23/56) y el grupo de cuerno, 35,71% (15/42). Se observó una disminución en la tasa de recuperación entre repeticiones, obteniendo 44,26% (27/61) en la primera repetición, mientras que en la segunda, 29,72% (11/37). Se recuperó el 52,17% (12/23) de embriones viables para el grupo de cuerpo y el 60% (9/15) para el grupo de cuerno. Se concluyó que no hubo disparidad en la cantidad o calidad de los embriones recuperados con respecto al lugar de depósito del semen sexado al momento de la IATF.

**Palabras clave:** *Bos indicus*; Cuerno; Cuerpo; Superovulación.

## 1. Introdução

O Brasil destaca-se no cenário mundial da bovinocultura, com o segundo maior rebanho efetivo, com mais de 211.000.000 de cabeças (IBGE, 2013). Desde 2004 o Brasil assumiu a liderança nas exportações, com um quinto da carne comercializada internacionalmente e vendas em mais de 180 países (MAPA, 2013). Assim, há permanente busca por técnicas para melhorias na produtividade do rebanho (Thomazi *et al.*, 2009).

As biotecnologias aplicadas à reprodução têm contribuído significativamente no aumento da produção animal. O controle do ciclo estral, associado à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e à transferência de embriões (TE) influenciam o aumento da produtividade dos rebanhos, algo que cresceu aceleradamente nas últimas décadas (Gonçalves *et al.*, 2008).

Como complemento à IATF, o uso do sêmen sexado de bovinos tem crescido, juntamente com sua aceitação no mercado. O controle do sexo no nascimento permite maior avanço genético e melhor produtividade (Rath *et al.*, 2003). Contudo, como a disponibilidade deste tipo de sêmen é baixa e de alto custo, tem-se grande interesse no uso associado a ovulações múltiplas – superovulação (SOV), programas de TE e produção *in vitro* (Johnson, 2000).

Assim, no uso do sêmen sexado em programas de superovulação, o melhor indicativo de sucesso é o número de bezerros nascidos do sexo desejado por doadora, sendo que a imprevisibilidade na resposta superestimulatória, na taxa de ovulação e na alta proporção de embriões não transferíveis resultantes da falha na fecundação e da degeneração dos embriões no trato reprodutivo das doadoras antes da coleta, resultam no alto custo de produção de embriões bovinos nos métodos usados atualmente em programas de TE.

Outros fatores como qualidade oocitária, falha no transporte espermático, capacitação, sobrevivência e/ou danos causados durante o processo de sexagem, podem ser responsáveis pela alta taxa de falha na fecundação em animais

superovulados. Entretanto, algumas evidências apontam para a falta de sêmen no local da fecundação como a causa mais frequente na falha de fecundação (Schenk *et al.*, 2006).

Apesar de se obter menores taxas de embriões com o uso do sêmen sexado, a eficácia deste no produto final ainda é melhor. Pois o menor número de embriões do sexo desejado, compensa a perda de aproximadamente 50% dos embriões do sexo não desejado, obtidos com o uso do sêmen congelado convencional (Hayakawa *et al.*, 2009).

Desta maneira, objetivou-se com este estudo avaliar o efeito do local de deposição do sêmen sexado na produção *in vivo* de embriões produzidos em vacas da raça Nelore superovuladas.

## 2. Material e Métodos

O estudo foi realizado no município de Miranda do Norte, na microrregião de Itapecuru-Mirim / Maranhão, latitude 03° 34' 08'' S e longitude 44° 35' 02'' O. Os animais foram manejados em sistema extensivo, mantidos em pasto de *Brachiaria brizantha*, tendo livre acesso à água e suplementação mineral *ad libitum* em cocho coberto. Utilizaram-se doze vacas multíparas da raça Nelore (*Bos indicus*) com idade entre 3 e 5 anos, tendo escore corporal de 3,5, segundo Ferreira e Torres (1993), sendo avaliadas previamente para determinar se estavam cíclicas.

Todos os animais passaram por protocolos de IATF e SOV, para tanto receberam dispositivo intravaginal de progesterona (1,9 g P4; CIDR®, Pfizer, USA) e 2 mg de benzoato de estradiol por via intramuscular (I.M.) (BE, Estrogin®, Farmavet, Brasil) no dia 0 (D0 - 07:00h) do protocolo de IATF, sendo o processo de SOV induzido com FSH-p (133 mg de Folltropin-V® I.M., Bioniche, Canadá) em 8 doses decrescentes a cada 12 horas, a partir do D4 da IATF. No D6, foram administradas duas doses (07:00 e 19:00h, I.M.) de 25 mg de PGF2α (I.M., dinoprost trometamina, Lutalyse®, Pfizer, USA). Os dispositivos de P4 foram retirados 36 horas após a primeira dose de PGF2α e foram administrados 0,25 mg de Gonadorelina (Fertagyl® I.M., Intervet Shcering-Plough, USA) 48 horas após a primeira dose de PGF2α.

As fêmeas foram inseminadas em tempo fixo 18 e 30 horas após a indução da ovulação, utilizando-se duas palhetas de 2,1 x 10<sup>6</sup> spz/mL por inseminação. Os animais foram distribuídos em dois grupos experimentais, de acordo com o local da inseminação (corpo *vs* terço médio do corno uterino). Para tanto, os animais foram distribuídos nos grupos de acordo com o número de folículos presentes no D7, para evitar que as fêmeas com folículos maiores ou em maior quantidade fossem alocadas no mesmo tratamento.

Todas as partidas de sêmen foram obtidas de um mesmo touro e provenientes do mesmo ejaculado, buscando-se minimizar o efeito touro nos resultados. As palhetas foram avaliadas previamente às inseminações, após a montagem do dispositivo de inseminação, para verificar a motilidade, objetivando-se ter no mínimo 30%.

Foram realizados exames ultrassonográficos (CHISON D600VET, USProducts Eletromedicina, Brasil) com transdutor linear transretal de 7,0 MHz nos dias 0 e do D4 ao D9, a cada 48 horas. Para determinar a taxa de ovulação foi realizado exame ultrassonográfico no momento da coleta embrionária, D15, quando foram quantificados os corpos lúteos (CLs). As imagens foram armazenadas e posteriormente transferidas para o computador para análise e mensuração, utilizando o software IMAGEJ® (National Institute of Mental Health, USA).

A taxa de ovulação foi obtida pelo número de CLs verificados, ultrassonograficamente, no D15 dividido pelo número de folículos potencialmente ovulatórios ( $\geq 8$  mm) detectados ultrassonograficamente no D9. Já a taxa de recuperação de estruturas embrionárias foi obtida pelo número de estruturas recuperadas no D15, dividido pelo número de CLs visualizados no exame ultrassonográfico no mesmo dia. Ambos os valores obtidos foram multiplicados por 100.

A recuperação das estruturas embrionárias foi realizada sete dias após a aplicação de Gonadorelina, através do método não cirúrgico de lavagem uterina. Para a coleta das estruturas, utilizou-se sonda Foley (Rusch® 18, Carolina do Norte, USA) por meio de “flushing” uterino utilizando como veículo o meio DPBS-Flush® (Nutricell, Campinas, Brasil). O líquido

recuperado passou por filtro de coleta de embriões com malha de 80  $\mu$  (Millipore®, Bedford, MA, USA), sendo transferido para placas de cultivo celular 100 x 20 mm contendo meio de cultivo de embriões Holding® (Nutricell, Campinas, Brasil).

As estruturas recuperadas foram quantificadas e avaliadas com auxílio de um estereomicroscópio de aumento final de 50x e, posteriormente, classificadas em viáveis e não viáveis de acordo com os padrões de morfologia estrutural da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões – IETS (Stringfellow & Seidel, 1998).

O trabalho foi desenvolvido de forma descritiva, calculando-se a média e o desvio padrão ( $X \pm S.D.$ ) de cada resposta. Utilizou-se o delineamento *cross over* em esquema de blocos 2 (corno e corpo) x 6 (animais), para que todos os animais passassem por todos os tratamentos, totalizando duas repetições com intervalo de 60 dias.

Todos os procedimentos foram aprovados pela comissão de ética e experimentação animal da Universidade Estadual do Maranhão, n. protocolo 28/2010.

### 3. Resultados e Discussão

Para a separação dos grupos foram quantificados 149 folículos totais, apresentando média e desvio padrão de  $12,41 \pm 2,06$ , em ambos os ovários, ficando  $12,00 \pm 2,09$  folículos para o grupo corpo e  $12,83 \pm 2,13$  folículos para o grupo corno. Estes dados referem-se ao último dia do tratamento superovulatório (D7) da primeira repetição.

Resultados similares foram obtidos por Teixeira et al (2013), em estudo com vacas Curraleiro pé-duro, com dose e método de administração equivalentes, onde encontraram médias de total de folículos parecidas entre os grupos estudados;  $12,6 \pm 6,2$ ;  $14,2 \pm 7,4$  e  $15,8 \pm 7,6$  para os grupos controle, P24 (dispositivo de progesterona retirado 24h após a primeira aplicação de PFG2 $\alpha$ ) e P36 (dispositivo de progesterona retirado 36h após a primeira aplicação de PFG2 $\alpha$ ), respectivamente. Porém, os dados do presente estudo foram inferiores quando comparados ao estudo de Nasser (2006), com média de  $23,0 \pm 3,7$ , realizados em animais Nelore (*Bos indicus*).

Obteve-se média e desvio padrão de  $5,2 \pm 2,38$  folículos, no início do tratamento superovulatório (D4), para os animais pertencentes ao grupo corpo. Após o final do tratamento superovulatório, no dia da IATF (D9), a média e desvio padrão foram de  $12,00 \pm 2,95$  folículos, com diâmetro médio de  $8,64 \pm 2,46$  mm.

Para os animais pertencentes ao grupo corno, obteve-se média e desvio padrão de  $5,5 \pm 1,87$  folículos no início do tratamento superovulatório (D4). Após o final do tratamento superovulatório, no dia da IATF (D9), a média e desvio padrão foram de  $12,25 \pm 4,37$  folículos, de diâmetro médio de  $8,73 \pm 2,42$  mm. Estes resultados são inferiores quando comparados com a literatura. Carvalho et al. (2008) encontraram média de pequenos folículos na emergência folicular de  $39,7 \pm 4,9$  e  $26,5 \pm 3,1$  quando trabalharam com novilhas Nelore e Gir, respectivamente. Estes também foram menores dos encontrados em vacas mestiças, Hereford e Angus, onde se encontraram  $14,6 \pm 2,2$  pequenos folículos no dia da emergência (BÓ et al., 1996) ou vacas Holandesas, que apresentaram  $13,8 \pm 0,8$  e  $12,4 \pm 1,5$ , respectivamente, para os grupos P36LH48 e P36LH60; onde P36 refere-se à permanência do dispositivo de progesterona e LH48 ou LH60 referem-se ao momento da aplicação do LH em relação à aplicação de PGF (Martins et al., 2012).

A baixa resposta superovulatória pode ser explicada pela assincronia existente entre a maturação citoplasmática e nuclear nos oócitos de vacas sob tratamento de superovulação (assincronia intrafolicular), bem como pelos perfis esteroidogênicos anômalos nos folículos de doadoras, o que prejudica a maturação oocitária (Hyttel et al., 1991). No entanto, ressalta-se que no presente estudo essas variáveis não foram estudadas.

Demonstrou-se que os folículos continuaram com seu crescimento após o tratamento superestimulatório, como é visto nos dados referentes ao diâmetro folicular médio dos grupos, nos dias D7 e D9, apresentados na Figura 1, valores de diâmetro próximos aos encontrados por Thomazi et al. (2009), quando estudaram vacas Nelore. Porém, estes mesmos autores observaram menos folículos no dia da IATF, sugerindo que os animais estudados estariam aptos a ovularem após a última

aplicação hormonal. No estudo de Thomazi et al (2009), estas diferenças indicam que as ovulações teriam começado anteriormente, possivelmente por não ser um estudo sobre superovulação, o contrário do presente trabalho.

**Figura 1** – Média e desvio padrão ( $X \pm S.D.$ ) da quantidade (n) e diâmetro folicular (mm) nos dias D7 e D9.

Dia	Variável	Tratamento	
		Corpo ( $X \pm S.D.$ )	Corno ( $X \pm S.D.$ )
D7	n	11,41 $\pm$ 2,35	10,41 $\pm$ 3,14
	Diâmetro	7,69 $\pm$ 2,74	7,95 $\pm$ 2,45
D9	n	12,00 $\pm$ 2,95	12,25 $\pm$ 4,37
	Diâmetro	8,64 $\pm$ 2,46	8,73 $\pm$ 2,42

Fonte: Autores.

As vacas foram inseminadas com 18 e 30h após a aplicação do indutor, pois somente quatro animais apresentaram cio 12 horas após a indução da ovulação. De acordo com Soares et al (2011), inseminações realizadas com 18 e 30h tiveram melhores resultados, numéricos e percentuais, do que o grupo inseminado com 12 e 24h após a aplicação de LH, possivelmente devido a inseminação ter sido mais próxima ao período da ovulação.

No dia da IATF (D9) 66,7% (8/12) dos animais apresentaram CLs, sendo 33,3% (4/12) em cada grupo, observando um total de 7 CLs para o grupo corpo e 6 no grupo corno. Estima-se que essas observações influenciaram o processo superovulatório, conseqüentemente, influenciando nas taxas de ovulação e recuperação embrionária. Nota-se que esses dados apareceram durante a segunda repetição, o que pode ter influenciado na menor taxa de recuperação observada.

No dia do lavado uterino (D15), o grupo corpo apresentou 19 (2,11  $\pm$  1,61) folículos anovulatórios, enquanto no grupo corno foram 46 (4,6  $\pm$  3,13). O estudo de Teixeira et al. (2013) demonstrou médias parecidas, obtendo 3,7  $\pm$  2,8; 2,8  $\pm$  2,1 e 3,9  $\pm$  3,1 para os grupos controle, P24 (dispositivo de progesterona retirado 24h após a primeira aplicação de PFG2 $\alpha$ ) e P36 (dispositivo de progesterona retirado 36h após a primeira aplicação de PFG2 $\alpha$ ), respectivamente. Estes resultados podem ser explicados pelo alto nível de P4 circulante, proveniente dos CLs encontrados no dia da IATF. Ginther et al. (1989) relataram que folículos dominantes se tornam anovulatórios quando em presença de altos níveis de P4, por reduzir a frequência na pulsatilidade do LH.

No grupo corpo, um animal (8,33%) não apresentou resposta ao indutor de ovulação, enquanto no grupo corno isso aconteceu em três animais (25%). Estes animais não apresentaram CLs em seus ovários e, conseqüentemente, não tiveram estruturas recuperadas. Estes dados são corroborados por estudos anteriores, que estimam que 30% dos animais tratados não demonstram resposta (Monteiro Jr et al., 2011).

Observou-se 65,11% (56/86) de ovulações para o grupo corpo, com média e desvio padrão de 4,66  $\pm$  4,71 para o grupo e 5,09 CLs/doadora; enquanto o grupo corno apresentou 44,68% (42/94), com média e desvio padrão de 3,5  $\pm$  2,71 para o grupo e 4,66 CLs/doadora. Em comparação com o estudo de Teixeira et al. (2013) que encontraram 11,3  $\pm$  5,8; 12,3  $\pm$  5,6 e 11,9  $\pm$  5,4 CLs para os grupos controle, P24 (dispositivo de progesterona retirado 24h após a primeira aplicação de PFG2 $\alpha$ ) e P36 (dispositivo de progesterona retirado 36h após a primeira aplicação de PFG2 $\alpha$ ), respectivamente, o presente estudo apresentou menores quantidades de CLs no D15. Estes achados podem ser explicados pelas diferenças do protocolo, onde os autores citados realizaram uma pré sincronização do ciclo estral, diferentemente do presente estudo.

Os resultados também foram menores dos que os obtidos nos estudos de Carvalho et al. (2008) e Bó et al (1996) que encontraram 22,4  $\pm$  0,5 e 16,6  $\pm$  3,4 em animais Nelore e mestiços de Angus e Hereford, respectivamente. Resultados também menores dos que foram encontrados em vacas Pardo Suíço (*Bos taurus*) onde Monteiro Jr et al. (2011) encontraram médias de CLs de 9,88  $\pm$  3,31, 9,22  $\pm$  3,31 e 10,00  $\pm$  4,53 para os grupos de inseminação com sêmen convencional 12 e 24h, sêmen sexado 12 e 24h e sêmen sexado 24 e 36h, quando utilizaram o protocolo onde o dispositivo de progesterona é retirado 36h

após a primeira aplicação de cloprostenol, e 25mg de LH (Lutropin®), 24h após a remoção do dispositivo de P4, para indução da ovulação.

O grupo corpo apresentou taxa de recuperação de 41,07% (23/56) e o grupo corno apresentou taxa de 35,71% (15/42). Estes dados são inferiores aos encontrados no estudo de Teixeira et al (2013), que relataram  $48,8 \pm 26,6\%$ ;  $60,9 \pm 30,5\%$  e  $58,2 \pm 26,7\%$  de taxa de recuperação embrionária para os grupos controle, P24 (dispositivo de progesterona retirado 24h após a primeira aplicação de PFG2 $\alpha$ ) e P36 (dispositivo de progesterona retirado 36h após a primeira aplicação de PFG2 $\alpha$ ), respectivamente. Estas diferenças podem ser explicadas pelo uso do sêmen congelado convencional e pelo uso da pré sincronização do ciclo estral por estes autores. Entretanto, Larson et al. (2010) encontraram taxa média de 74% e similares entre os grupos, não havendo diferença no uso de sêmen sexado ou convencional. Em um estudo que comparou doses inseminantes e local de deposição do sêmen, Andersson et al. (2004) não encontraram diferença na taxa de concepção entre os locais de deposição quando utilizaram a concentração de  $2 \times 10^6$ /palheta de sêmen convencional, alcançando 31,1% e 31,7% com inseminações no corpo e corno, respectivamente.

Entretanto, 33,33% (4/12) dos animais do grupo corpo não tiveram estruturas recuperadas em seus respectivos lavados, sendo que um dos animais apresentava secreção uterina mucopurulenta no D15. Já no grupo corno 16,67% (2/12) não tiveram estruturas recuperadas, sendo que um desses animais não foi coletado, por não se ter conseguido transpassar a cérvix para colocação da sonda uterina.

A inseminação realizada no corpo do útero produziu um total de 23 estruturas recuperadas ( $2,09 \pm 2,73$ /doadora), enquanto a IA no corno uterino gerou 15 recuperações ( $1,87 \pm 1,55$ /doadora). Este resultado obtém suporte de estudo anterior, o qual não encontrou diferença entre inseminações próximas à junção útero-tubárica, no meio do corno uterino ou no corpo uterino, no percentual de prenhez (Kurykin et al., 2007). Porém, são resultados inferiores aos encontrados por Monteiro Jr et al. (2011) em estudo feito em vacas Pardo Suíço superovuladas e inseminadas com sêmen convencional e sexado, que encontraram média total de  $9,59 \pm 6,89$  estruturas por doadora. Essa diferença pode ser explicada pelos diferentes grupos experimentais (G1 – sêmen convencional, G2 – sêmen sexado 12 e 24h após administração de LH e G3 – sêmen sexado 24 e 36h após administração de LH) os quais não apresentaram diferença estatística nas estruturas recuperadas, mas sim na maior porcentagem de estruturas fecundadas do G1; e pelas diferenças genéticas entre animais *Bos indicus* e *Bos taurus*, mesmo com estudos que apontam maiores quantidades de pequenos folículos, no dia da emergência folicular, em diversas raças de animais *Bos indicus* (30 a 60), quando comparados à *Bos taurus* (15 a 33) (Sartori et al., 2010), os quais teriam mais chance de se tornarem embriões em programas de SOV. Um estudo com vacas Nelores e Holandesas, sob condições tropicais, obtiveram melhores resultados no número total de estruturas recuperadas com animais *Bos taurus*,  $9,0 \pm 3,8$  e  $12,4 \pm 3,8$ , respectivamente (Soares et al., 2011).

Foi observada diminuição da taxa de recuperação entre repetições, obtendo-se 44,26% (27/61) na primeira e 29,72% (11/37) na segunda repetição, respectivamente. Estes resultados corroboram com o estudo de Larson et al. (2010), que encontraram tendência para mais e melhores embriões na primeira repetição. Isso é explicado por Galli et al. (2003) que relataram que repetidos tratamentos superovulatórios afetam a fertilidade em vacas e novilhas, podendo causar síndromes císticas e dificuldades em prenhez futuras.

O presente estudo obteve resultados parecidos com pesquisas anteriores, que demonstram que 20-30% destas não respondem ao tratamento, portanto não produzem embriões (Baruselli et al., 2006; Monteiro Jr et al., 2011), havendo grande variação na produção embrionária por doadora (Baruselli et al., 2003; Larson et al., 2010), onde um terço dos animais não respondem ao tratamento superestimulatório, outro terço produzem em média de um a três embriões e somente um terço tem boa resposta superovulatória, dando um alto número de embriões (Boland et al., 1991).

As melhores candidatas para o processo de superovulação e uso de sêmen sexado são as fêmeas que tem em seu histórico produção de grandes quantidades de embriões (Larson et al., 2010). Assim, no presente estudo, na tentativa de excluir animais que não respondem ao tratamento, 15 animais foram superovulados, utilizando-se para o experimento os 12 que obtiveram melhores resultados. Porém, essa escolha não foi possível na segunda repetição, pois, necessariamente, utilizaram-se os mesmos animais da primeira repetição para que eles pudessem passar pelo tratamento subsequente, fechando o delineamento *cross over*.

A baixa quantidade de estruturas recuperadas não pode ser explicada pela baixa concentração do sêmen sexado ( $2,1 \times 10^6$ ), pois foram feitas duas inseminações (18 e 30h após o indutor de ovulação), com duas doses inseminantes.

Inseminações múltiplas podem manter o número mínimo de espermatozoides para concepção, como comprovou o estudo de Sartori et al. (2004), que observou que as novilhas inseminadas uma única vez tinham menos espermatozoides acessórios ligados à zona pelúcida. Duas inseminações mantêm a quantidade adequada para fecundar o ovócito dentro do trato reprodutivo feminino, na mesma proporção que uma inseminação única de  $20 \times 10^6$  de sêmen sexado (Schenk et al., 2006).

Sartori et al. (2004), em estudo com novilhas Holandesas superovuladas e inseminadas profundamente nos cornos uterinos, com sêmen convencional e sexado, demonstraram diferença significativa na recuperação embrionária quando compararam os grupos de sêmen sexado e convencional. Embora os grupos de sêmen sexado (inseminação única de  $20 \times 10^6$  vs duas inseminações de  $10 \times 10^6$ ) não demonstraram diferença, sendo o grupo de dupla inseminação o de maior quantidade de estruturas recuperadas.

Entretanto, Verberckmoes et al. (2004) obtiveram diferença estatística na taxa de concepção dos grupos que utilizaram o dispositivo de Ghent (cateter de plástico descartável que pode facilmente seguir a curvatura dos cornos uterinos e, assim, alcançar a junção útero-tubária), para inseminações no corpo ou cornos uterinos, alcançando melhores resultados nas inseminações realizadas nos cornos. Embora tenham sido melhores, não houve diferença quando este grupo foi comparado ao grupo de inseminação com o aplicador convencional de inseminação (dispositivo de Cassou) no corpo uterino. Quando comparados os resultados entre vacas e novilhas, observou-se que houve tendência para maiores taxas de concepção para inseminações nos cornos em vacas, enquanto as taxas de concepção de novilhas foram iguais. Este estudo utilizou sêmen convencional com concentração de  $20-30 \times 10^6$  spz/mL.

Estudos de Kurykin et al. (2007) sugeriram que o local de deposição possa vir a ser importante, deveria existir uma redução ainda maior na concentração de espermatozoides, e tendendo a inseminações próximas à junção útero-tubária. Outra explicação para as baixas taxas de fecundação e, conseqüentemente, recuperação, pode ser referente à distúrbios no transporte ovocitário e do espermatozoide e a menor qualidade do ovócito (Kafi & McGowan, 1997). As diferenças referentes ao transporte dos espermatozoides, entre fêmeas superovuladas ou não, não podem ser compensadas pelo simples aumento na quantidade espermática (Larson et al., 2010).

O menor potencial espermático do sêmen sexado juntamente a essas condições adversas encontradas no trato genital de fêmeas superovuladas resultam em menores taxas de fecundação, quando comparadas com sêmen convencional (Sartori et al., 2004). Estes mesmo autores encontraram maior percentual de estruturas fecundadas degeneradas nos grupos de sêmen sexado, que indicam que o processo de sexagem pode acarretar em danos após a fecundação, também como à diminuição do potencial espermático já conhecido (Seidel & Garner, 2002), sendo este causado por perda de parte das funções espermáticas, redução da motilidade total e progressiva quando comparado a células não sexadas (Rath et al., 2003), no número de células com membranas plasmática e acrossomal íntegras (Carvalho et al., 2010), pré capacitação espermática e no número reduzido de células para a inseminação (Schenk et al., 2009).

Diversos estudos afirmam que o ponto chave na produção embrionária com o uso de sêmen sexado não é o número de espermatozoides por dose inseminante nem o local de deposição do sêmen (Sartori et al., 2004; Schenk et al., 2006; Larson et

al., 2010). O melhor percentual para estruturas fecundadas seria obtido com a adequação do tempo para a IATF nos protocolos de SOV (Sartori et al., 2004; Schenk et al., 2006). Contudo, isso não foi observado no presente estudo.

Dentre as estruturas recuperadas, as seguintes classificações foram encontradas: oócitos não fecundados (ONF), zonas pelúcidas (ZP), embriões degenerados (Dg), mórulas (Mo) e blastocistos iniciais (Bi) (Figura 2).

**Figura 2** – Número total de estruturas recuperadas segundo o local de deposição do sêmen.

<b>Estruturas</b>	<b>CLs</b>	<b>Corpo (%)</b>	<b>CLs</b>	<b>Corno (%)</b>
Oócito não fecundado		2 (8,69)		0
Degenerado		4 (17,39)		6 (40,00)
Mórula grau 1		7 (30,43)		8 (53,33)
Mórula grau 2	56	1 (4,34)	42	0
Mórula grau 3		1 (4,34)		0
Mórula grau 5		2 (8,69)		0
Blastocisto inicial		4 (17,39)		1 (6,66)
Zona pelúcida		2 (8,69%)		0
<b>TOTAL</b>		<b>23</b>		<b>15</b>

Fonte: Autores.

Destes, somente mórulas graus 1 e 2 e blastocistos iniciais foram classificados como embriões viáveis, obtendo então 52,17% (12/23) de embriões viáveis para o grupo corpo e 60% (9/15) para o grupo corno. Tendo então média de  $4,0 \pm 3,0$  de embriões viáveis para o grupo corpo e  $4,5 \pm 4,94$  para o grupo corno. Médias próximas às encontradas por Larson et al. (2010), que encontraram  $5,9 \pm 1,0$  e  $3,8 \pm 0,9$  de embriões totais para os grupos de sêmen convencional e sexado, respectivamente. E números mais baixos do que relatado por Galli et al. (2003), que relataram média de quatro a seis embriões viáveis por doadora. Podendo este ser explicado pelo uso do sêmen sexado no presente estudo.

Sartori et al. (2004) não obtiveram diferença significativa no número de embriões viáveis com o uso do sêmen sexado. Contudo, o sêmen convencional obteve maior quantidade de embriões viáveis e diferença significativa na taxa de estrutura fecundadas recuperadas, resultados similares aos de Soares et al. (2011), que não obtiveram diferença estatística significativa entre os grupos de sêmen sexado ou convencional para embriões totais. No entanto, obtiveram diferença estatística entre os grupos de sexado e convencional nos resultados de embriões viáveis e embriões congeláveis. Estes também corroboram com o estudo de Larson et al (2010), que não obtiveram diferenças quanto à quantidade total de estruturas recuperadas ( $10,9 \pm 1,8$  e  $10,5 \pm 1,6$  para os grupos convencional e sexado, respectivamente). Todavia, houve diferença em relação a embriões grau 1 e estruturas não fecundadas; obtendo melhores resultados no grupo de sêmen convencional. Estes resultados podem estar relacionados ao diferente protocolo de sincronização utilizado, e pela diferente raça estudada, Angus.

Soares et al. (2011) em estudo com sêmen convencional e sexado, encontraram valores próximos aos do presente estudo, com total de  $9,0 \pm 3,8$  estruturas recuperadas e  $4,5 \pm 3,0$  de embriões viáveis para o grupo de sêmen sexado e inseminação com 18 e 30h pós indução;  $7,1 \pm 3,3$  e  $2,4 \pm 1,8$  de estruturas recuperadas e embriões viáveis, respectivamente, para o grupo de sêmen sexado e inseminação 12 e 24h pós indução, e  $8,0 \pm 3,2$  e  $6,8 \pm 2,6$  de estruturas recuperadas e embriões viáveis, respectivamente, para o grupo de sêmen convencional e inseminação 12 e 24h pós indução.

Estes resultados não tiveram diferença no número total de estruturas recuperadas, enquanto houve diferença nos números de embriões viáveis e dos congeláveis, observando melhor resultado no grupo se sêmen convencional, seguido pelo grupo de sêmen sexado e inseminação com 18 e 30h pós-indução e, posteriormente, pelo grupo de sêmen sexado e inseminação com 12 e 24h pós-indução. Valores também inferiores aos encontrados em vacas Pardo Suíço (*Bos taurus*,

Monteiro Jr et al., 2011) que encontraram  $10,00 \pm 7,23$  e  $10,40 \pm 11,25$  estruturas recuperadas nos grupos de sêmen sexado, inseminadas com 12 e 24h após a indução com LH e 24 e 48h após a indução com LH, respectivamente; e  $8,63 \pm 5,37$  no grupo de sêmen convencional inseminado com 12 e 24h após a indução com LH.

Estes mesmos pesquisadores encontraram médias de embriões degenerados de  $5,38 \pm 6,41$ ;  $0,67 \pm 1,00$  e  $1,40 \pm 3,13$ , respectivamente para os grupos: sêmen convencional, sexado 12/24h e sexado 24/48h. Enquanto o presente estudo obteve taxas percentuais de 17,39 (4/23) e 40% (6/15) de embriões degenerados para os grupos corpo e corno, respectivamente. Sartori et al. (2004) não encontraram diferença significativa entre os grupos de sêmen sexado ou convencional, apesar de haver uma tendência para mais embriões degenerados em ambos os grupos que utilizaram sêmen sexado, resultados contrários ao estudo de Larson et al. (2010), que obtiveram maiores tendências para embriões degenerados no grupo de sêmen congelado convencional.

Enquanto o grupo corpo obteve 8,69% (2/23) de estruturas não fecundadas, o grupo corno não teve recuperação dessas estruturas. Dados da literatura mostram que estudos anteriores encontraram médias de  $0,5 \pm 0,7$ ;  $3,7 \pm 3,6$  e  $2,9 \pm 2,6$  para ovócitos não fecundados nos grupos: sêmen convencional, sexado 12/24h e sexado 18/30h, respectivamente, (Soares et al., 2011) e  $2,38 \pm 2,56$ ;  $9,00 \pm 7,45$  e  $6,60 \pm 3,44$  para os grupos sêmen convencional e inseminação 12/24h, sêmen sexado e inseminação 12/24h e sêmen sexado e inseminação 24/48h, respectivamente (Monteiro Jr et al., 2011). Um estudo que também utilizou inseminação cornual, juntamente com sêmen sexado e superovulação (Sartori et al., 2004) encontrou percentual parecido quanto as estruturas fecundadas/lavado, obtendo  $63,5 \pm 9,2$  e  $61,9 \pm 6,3$  nos grupos de sêmen sexado e  $90,9 \pm 4,0\%$  para sêmen convencional.

#### 4. Conclusão

Não houve disparidade na quantidade ou qualidade dos embriões recuperados quanto ao local de deposição do sêmen sexado no momento da IATF.

#### Referências

- Andersson, M., Taponen, J., Koskinen, E., & Dahlbom, M. (2004). Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology*, 61, 1583-1588.
- Baruselli, P. S., Marques, M. O., Reis, E. L., Nasser, L. F. T., Silva, R. C. P., Menegatti, J. A., Valentin, R., & Santos, I. C. C. (2003). Adequação da dose de FSH (Follitropin-V) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo. *Acta Scientia Veterinae*, 31, 244-245.
- Baruselli, P. S., Sá Filho, M. F., Martins, C. M., Nasser, L. F., Nogueira, M. F. G., Barros, C. M., & Bó, G. A. (2006). Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, 65, 77 -88.
- Bó, G. A., Adams, G. P., Pierson, R. A., & Mapletoft, R. J. (1996). Effect of progestogen plus E-17b treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, 45, 897 – 910.
- Boland, M. P., Goulding, D., & Roche, J. F. (1991). Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*, 35, 5-17.
- Carvalho, J. B. P., Carvalho, N. A. T., Reis, E. L., Nichic, M., Souza, A. H., & Baruselli P. S. (2008). Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* × *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 69, 167-175.
- Carvalho, J. O., Sartori, R., Machado, G. M., Mourão, G. B., & Dode M. A. N. (2010). Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, 74, 1521-1530.
- Galli, C., Duchi, R., Grotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., Lagutina, I., & Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59, 599-616.
- Gonçalves, P. B. D., Figueiredo, J. R., & Freitas, V. J. F. (2008). Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal, (2ª ed.), Ed. Roca, 398.
- Ginther, O. J., Knopf, L., & Kastelic, J. P. (1989). Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87, 223-230.
- Hayakawa, H., Hirai, T., Takimoto, A., Ideta, A., & Aoyagi, Y. (2009). Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology*, 71, 68-73.

- Hyttel, P., Callesen, H., Greve, T., & Schmidt, M. (1991). Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology*, 35, 91-108.
- IBGE. (2014). <http://economia.estadao.com.br/noticias/economia-brasil,rebando-ovino-brasileiro-e-o-segundo-maiordomundo,167062,0.htm>.
- Johnson, L. A. (2000). Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Animal Reproduction Science*, 61, 93-107.
- Kafi, M., & McGowan, M. R. (1997). Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science*, 48, 137-157.
- Kurykin, J., Jaakma, Ü., 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.
- Larson, J. E., Lamb, G. C., Funnell, B. J., Bird, S., Martins, A., & Rodgers, J. C. (2010). Embryo production in superovulated Angus cows inseminated four times with sexed-sorted or conventional, frozen-thawed semen. *Theriogenology*, 73, 698-703.
- MAPA. (2013) <http://www.agricultura.gov.br/animal/especie/bovinosebubalinos>.
- Martins, C. M., Rodrigues, C. A., Vieira, L. M., Mapletoft, R. J., Bó, G. A., Sá Filho, M. F., & Baruselli, P. S. (2012). The effect of timing of the induction of ovulation on embryo production in superstimulated lactating Holstein cows undergoing fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*, 78, 974-980.
- Monteiro Jr, P. L. J., Batista, A. M., Silva, F. L. M., Silva, S. V., Carneiro, G. F., & Guerra, M. M. P. (2011). Produção in vivo de embriões bovinos a partir de sêmen sexado. *Ciência Veterinária nos Trópicos*, v. 14, p. 20-28, 2011.
- Rath, D., Sieg, B., Leigh, J., Klinc, P., Besseling, M., Krüger, C., Wolken, A., Frenzel, A., Westermann, P., Probst, S., Grobfeld, R., Haderl, K. G., & Ehling, C. (2003). Current perspectives of sperm sorting in domestic farm animals. 19<sup>th</sup> Meeting Association Europeenne de Transfert Embryonnaire. *Proceeding...* 125-28.
- 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.
- Schenk, J. L., Cran, D. G., Everett, R. W., & Seidel Jr., G. E. (2009). Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. *Theriogenology*, 71, 717-728.
- Seidel Jr., G. E., & Garner, D. L. (2002). Sexing mammalian sperm by flow cytometry. *Reproduction*, 124, 733-743.
- Soares, J. G., Martins, C. M., Carvalho, N. A. T., Nicacio, A. C., Abreu-Silva, A. L., Campos Filho, E. P., Torres Júnior, J. R. S., Sá Filho, M. F., & Baruselli, P. S. (2011). Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with *Bos indicus* and *Bos taurus* superovulated donos. *Animal Reproduction Science*, 127, 148-153.
- Stringfellow, D. A., & Seidel, S. M. (1998). Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. IETS, p. 112 – 113, Illinois.
- Teixeira, H. C. A., Mariante, A. S., Nascimento, N. V., Driessen, K., & Ramos, A. F. (2013). Protocols with Different Time of Progesterone Exposure on Superstimulatory Response and Embryo Production of Locally Adapted Curraleiro Pé-Duro Cows. *Journal of Animal Science Advances*, 3, 261-269.
- Thomazi, S., Pinto-Neto, A., Silva, R. Z., Mota, M. F., Mello, N. M., & Fonseca, J. F. Dinâmica ovariana e concentração de progesterona de vacas Nelore submetidas à IATF. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*, 12(2), 135 – 140, 2009.
- Verberckmoes, S., Van Soom, A., De Pauw, I., Dewulf, J., Vervaeke, C., & De Kruif, A. (2004). Assessment of a new utero-tubal junction device in dairy cattle. *Theriogenology*, 61, 103 – 115.