

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

DISSERTAÇÃO

**EFEITO DO ACETATO DE BUSERELINA ADMINISTRADO NO
MOMENTO DA INSEMINAÇÃO SOBRE A TAXA DE
CONCEPÇÃO DE VACAS LEITEIRAS INSEMINADAS COM
SÊMEN SEXADO.**

Mateus Gonçalves Costa

2024



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**EFEITO DO ACETATO DE BUSERELINA ADMINISTRADO NO
MOMENTO DA INSEMINAÇÃO SOBRE A TAXA DE
CONCEPÇÃO DE VACAS LEITEIRAS INSEMINADAS COM
SÊMEN SEXADO.**

Mateus Gonçalves Costa

Sob a Orientação do Professor
Rodrigo Vasconcelos de Oliveira

e a Co-orientação do Professor
Marco Roberto Bourg de Mello

Dissertação submetida como
requisito parcial para obtenção do
grau de **Mestre**, no Curso de Pós-
Graduação em Ciência Animal,
Área de Concentração Zootecnia.

Seropédica, RJ

Julho de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C837e Costa, Mateus Gonçalves , 1997-
Efeito do Acetato de Buserelina Administrado no
Momento da Inseminação Sobre a Taxa de Concepção de
Vacas Leiteiras nseminadas com Sêmen Sexado / Mateus
Gonçalves Costa. - Manga, 2024.
33 f.

Orientador: Rodrigo Vasconcelos de Oliveira.
Coorientador: Marco Roberto Bourg de Mello .
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, 2024.

1. Bovinocultura de leite. 2. Inseminação
artificial. 3. Taxa de prenhez. I. Vasconcelos de
Oliveira, Rodrigo , 1982-, orient. II. Bourg de Mello
, Marco Roberto , 1971-, coorient. III Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós
Graduação em Ciência Animal. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

MATEUS GONÇALVES COSTA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência Animal**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de Concentração em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO, APROVADA EM: 01/07/2024.

Assinatura

Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira. UFRRJ
(Orientador)

Assinatura

Dr. Rondineli Pavezzi Barbero. UFRRJ

Assinatura

Dr. Samuel Rodrigues Bonamichi do Couto.



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO
RIO DE JANEIRO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**



TERMO Nº 467 / 2024 - PPGZ (12.28.01.00.00.00.61)

Nº do Protocolo: 23083.031056/2024-14

Seropédica-RJ, 03 de julho de 2024.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

MATEUS GONÇALVES COSTA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre(a) no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de Concentração em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 01/07/2024

Marco Roberto Bourg de Mello. Dr.
UFRRJ (Presidente)

Rondineli Pavezzi Barbero. Dr. UFRRJ

Samuel Rodrigues Bonamichi do Couto.
Pós doutorando. CnPQ

(Assinado digitalmente em 03/07/2024 14:11) (Assinado digitalmente em 03/07/2024 10:17)

MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)
Matrícula: 1548043

RONDINELI PAVEZZI BARBERO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CoordCGZ (12.28.01.00.00.00.60)
Matrícula: 2316004

(Assinado digitalmente em 03/07/2024 10:26)
SAMUEL RODRIGUES BONAMICHI DO COUTO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 087.674.256-82

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp>
informando seu número: 467, ano: 2024, tipo: TERMO, data de emissão: 03/07/2024 e o código de verificação: c3f44a16c

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho de mestrado marca o fim de uma jornada intensa e gratificante, e não teria sido possível sem o apoio e a contribuição de várias pessoas e instituições, às quais dedico meus mais sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por sempre abençoar tudo que acontece em minha vida e colocar pessoas especiais em meu caminho. Meu eterno agradecimento aos meus pais (Aurelizo C. de Jesus e Edilza G. Costa) e a minha família, pela educação que me proporcionaram, pelo suporte incondicional em todas as fases da minha existência e por compreenderem minha ausência em muitos momentos e, mesmo assim, continuaram ao meu lado, oferecendo palavras de encorajamento e apoio.

Gostaria de expressar minha profunda gratidão aos meus orientadores Prof. Dr. Marco R. B. de Mello e Prof. Dr. Rodrigo V. Oliveira, pela orientação, amizade, paciência e incentivo no decorrer desse percurso, além das discussões, sugestões e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos.

Também agradeço aos membros da banca examinadora, os professores Dr. Rondineli P. Barbero e Dr. Samuel R. B. do Couto, por aceitarem o convite para avaliar este trabalho e pelas contribuições que certamente enriquecerão este estudo.

Não poderia deixar de mencionar o apoio dos meus colegas, amigos, professores e funcionários do Setor de Fisiopatologia da Reprodução e Inseminação Artificial pelo companheirismo, acolhimento e por sempre estarem presentes para compartilhar ideias, discutir problemas e oferecer apoio moral nos momentos mais desafiadores.

Agradeço aos proprietários, gestores e demais funcionários da Fazenda São Pedro, em especial ao meu amigo Mv. Luiz Carlos Filho, por cederem toda a estrutura, animais e insumos necessários para a idealização desse estudo. Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PGCA) e a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

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

BIOGRAFIA

MATEUS GONÇALVES COSTA, filho de Aurelizo Costa de Jesus e Edilza Gonçalves Costa, nasceu no município de Manga norte do estado de Minas Gerais em 27 de dezembro de 1997. Filho de pais professores que sempre incentivaram a buscar o conhecimento e a valorizar a educação como um dos pilares fundamentais para a construção de um futuro melhor.

Sua jornada educacional iniciou na educação infantil na Escola Municipal Rui Barbosa no município de Malhada – BA no ano de 2002. O ensino fundamental I teve início no Colégio Estadual Ministro Petrônio Portela localizado no município de Manga – MG no ano de 2004 e concluindo no ano de 2007 na Escola Municipal Felinto Gonçalves de Oliveira. O ensino fundamental II realizado no Colégio Municipal São Sebastião entre 2008/2011 e ensino médio no Colégio Estadual Luís Eduardo Magalhães entre 2012 e 2014 ambos localizados no município de Malhada – BA.

Em junho de 2015, matriculou-se no Curso Técnico em Zootecnia no Instituto Federal de Ciências e Tecnologias Baiano – Campus Guanambi finalizando em julho de 2016 e ingressou no Curso de Graduação em Medicina Veterinária em agosto de 2016 no Centro Universitário UniFG localizado no município de Guanambi-BA, concluindo em dezembro de 2020.

Durante toda a graduação exerceu diversas atividades, inicialmente focadas em nutrição de pequenos ruminantes e posteriormente estágio em reprodução bovina, sendo está a principal atividade realizada praticamente em toda a graduação. Contudo, exerceu outras atividades como monitoria das disciplinas de Anatomia Veterinária e Fisiopatologia da Reprodução, além de estágio frente a Agência de Defesa Agropecuária do Estado da Bahia (ADAB).

Atualmente, cursou o mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PGCA) sob orientação do professor Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira e co-orientação do professor Dr. Marco Roberto Burg de Mello.

RESUMO

COSTA, Mateus Gonçalves. **Efeito do Acetato de Buserelina Administrado no Momento da Inseminação Sobre a Taxa de Concepção de Vacas Leiteiras Inseminadas com Sêmen Sexado**. 2024. 33p Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Instituto de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

A menor fertilidade do sêmen sexado tem sido atribuída a fatores como a concentração espermática e danos causados durante o processo de sexagem, reduzindo sua viabilidade no sistema reprodutivo das fêmeas. Sendo assim, o momento da inseminação em relação à ovulação é de fundamental importância para melhorar a fertilidade da técnica. Portanto, a administração de análogos do GnRH, como o acetato de buserelina (AB), no momento da inseminação, pode se tornar uma estratégia interessante no intuito de antecipar a ovulação. Assim, a hipótese do presente estudo é que a aplicação de AB no momento da inseminação aumenta a taxa de concepção de vacas leiteiras inseminadas com sêmen sexado. Neste contexto, o objetivo geral do presente estudo foi comparar as taxas de concepção de fêmeas leiteiras inseminadas com sêmen sexado após a aplicação ou não de AB. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos da ciclicidade das fêmeas no início da sincronização e do diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO) nas taxas de concepção. Para tanto, 116 fêmeas bovinas mestiças (Girolando) provenientes de fazendas leiteiras comerciais foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação. As fêmeas foram divididas aleatoriamente em dois grupos: Grupo acetato de buserelina (GB; n=58), que recebeu 10µg de AB no momento da inseminação e Grupo Controle (GC; n=58), que não recebeu qualquer hormônio no momento da inseminação. O protocolo de sincronização utilizado incluiu a inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona associado a 2mg de benzoato de estradiol em dia aleatório do ciclo estral (D0). Nove dias depois (D9), o dispositivo foi removido e foram aplicadas 300UI de gonadotrofina coriônica equina + 1mg de cipionato de estradiol + 500µg de cloprostenol sódico (prostaglandina). A inseminação foi realizada com sêmen sexado e ocorreu 48 horas após a remoção do dispositivo de progesterona (D11). No D0 e D11 as fêmeas foram submetidas à avaliação ultrassonográfica para determinação da ciclicidade e mensuração do diâmetro do FPO. O diagnóstico de gestação foi realizado entre 30 e 40 dias após a inseminação. As variáveis concepção, tratamentos, ciclicidade, ECC (Escore de Condição Corporal), categoria, fazenda, touro e interações foram avaliadas por regressão logística multivariada utilizando o programa Bioestat 5.3. A variável diâmetro do FPO foi primeiro analisada para heterogeneidade de variância e normalidade e posteriormente comparada por ANOVA. Não foi observada diferença significativa ($P = 0,13$) entre as taxas de concepção dos grupos GB e GC (22,4% e 13,8%, respectivamente). No entanto, quando comparou-se as taxas de concepção apenas dos animais que estavam em anestro ao início do tratamento, houve tendência ($P=0,07$) da taxa de concepção ser maior nos animais do GB. Quando as taxas de concepção foram comparadas de acordo com o diâmetro do FPO, observou-se que animais do GB com FPO <13mm apresentaram maiores taxas de concepção em relação aqueles com FPO ≥ 13 mm ($P=0,01$). Portanto, conclui-se que o acetato de buserelina administrado no momento da inseminação em fêmeas bovinas inseminadas com sêmen sexado não melhora a taxa de concepção, exceto quando estas apresentam FPO <13mm.

Palavras-chave: Bovinocultura de leite, Inseminação Artificial, Taxa de Prenhez.

ABSTRACT

COSTA, Mateus Gonçalves. **Effect of Buserelin Acetate Administered at the Time of Insemination on the Conception Rate of Dairy Cows Inseminated with Sexed Semen.** 2024. 33p Dissertation (Master Science in Animal Science). Instituto de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

The lower fertility of sexed semen has been attributed to factors such as sperm concentration and damage caused during the sexing process, reducing its viability in the female reproductive system. Therefore, the timing of insemination in relation to ovulation is of fundamental importance to improve the fertility of the technique. Therefore, the administration of GnRH analogues, such as buserelin acetate (BA), at the time of insemination may become an interesting strategy to anticipate ovulation. Thus, the hypothesis of the present study is that the application of BA at the time of insemination increases the conception rate of dairy cows inseminated with sexed semen. In this context, the general objective of the present study was to compare the conception rates of dairy cows inseminated with sexed semen after the application or not of BA. Additionally, the effects of female cyclicity at the beginning of synchronization and preovulatory follicle diameter (POF) on conception rates were evaluated. For this purpose, 116 crossbred female cattle (Girolando) from commercial dairy farms were subjected to an ovulation synchronization protocol. The females were randomly divided into two groups: Buserelin acetate group (GB; n=58), which received 10µg of AB at the time of insemination, and Control group (CG; n=58), which did not receive any hormone at the time of insemination. The synchronization protocol used included the insertion of an intravaginal progesterone device associated with 2mg of estradiol benzoate on a random day of the estrous cycle (D0). Nine days later (D9), the device was removed and 300IU of equine chorionic gonadotropin + 1mg of estradiol cypionate + 500µg of sodium cloprostenol (prostaglandin) were applied. Insemination was performed with sexed semen and occurred 48 hours after removal of the progesterone device (D11). On D0 and D11, the females underwent ultrasonographic evaluation to determine cyclicity and measure the diameter of the POF. Pregnancy diagnosis was performed between 30 and 40 days after insemination. The variables conception, treatments, cyclicity, BCS (Body Condition Score), category, farm, bull and interactions were evaluated by multivariate logistic regression using the Bioestat 5.3 program. The variable POF diameter was first analyzed for heterogeneity of variance and normality and subsequently compared by ANOVA. No significant difference ($P = 0.13$) was observed between the conception rates of the GB and GC groups (22.4% and 13.8%, respectively). However, when comparing the conception rates of animals that were in anestrus at the beginning of treatment, there was a tendency ($P=0.07$) for the conception rate to be higher in GB animals. When the conception rates were compared according to the POF diameter, it was observed that GB animals with POF <13 mm had higher conception rates compared to those with POF $\geq$ 13 mm ($P=0.01$). Therefore, it is concluded that buserelin acetate administered at the time of insemination in female cattle inseminated with sexed semen does not improve the conception rate, except when these animals have POF <13 mm.

Keywords: Dairy cattle farming, Artificial Insemination, Pregnancy Rate.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	2
	2.1 Histórico da Sexagem Espermática.....	2
	2.2 Vantagens e Desvantagens do Emprego do Sêmen Sexado nos Sistemas de Produção de Bovinos	2
	2.3 Métodos de Sexagem Espermática	3
	2.4 Efeitos do Processo de Sexagem nos Espermatozoides.....	4
	2.5 Eficiência da Técnica de Sexagem Espermática e do Emprego do Sêmen Sexado ...	5
	2.6 Estratégias para Melhorar a Eficiência no Emprego de Sêmen Sexado em Sistemas de Produção de Bovinos	5
	2.7 Acetato de Buserelina	7
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	9
	3.1 Animais, Local e Período.....	9
	3.2 Avaliação ultrassonográfica, Protocolo de Sincronização da Ovulação, Inseminação Artificial	9
	3.3 Análise Estatística	10
4	RESULTADOS.....	11
5	DISCUSSÃO.....	13
6	CONCLUSÃO	15
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	16
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
	ANEXOS	23

1 INTRODUÇÃO

O sexo do bezerro contribui na melhoria da eficiência produtiva do sistema de produção, seja na pecuária de corte ou de leite. Sendo assim, a adoção de alternativas que possibilitem direcionar o sexo dos bezerros torna-se fundamental. Neste sentido, a utilização do sêmen sexado mostra ser uma alternativa interessante, por permitir direcionar o sexo do bezerro antes mesmo de ser concebido, beneficiando a produção de bovinos. O uso do sêmen sexado otimiza a utilização de diferentes linhas genéticas, direcionando diferentes estratégias de manejo como a produção de fêmeas para reposição de matrizes leiteiras ou a produção de machos para engorda.

Nesse sentido, além de direcionar o sexo dos descendentes, o sêmen sexado possibilita direcionar o melhoramento genético do rebanho com a produção de animais geneticamente superiores, por meio da seleção de reprodutores melhoradores para características desejadas, como ganho de peso, produção leiteira, precocidade sexual, eficiência alimentar, conformação de úbere, entre outras. Contudo, é necessário levar em consideração alguns fatores referentes a sua utilização, como acurácia da sexagem que varia conforme o método utilizado, podendo ocorrer uma pequena porcentagem de erro, resultando em bezerros com o sexo diferente do esperado. O processo de sexagem pode comprometer a fertilidade do espermatozoide, embora os métodos tenham avançado nos últimos tempos. Deste modo, danos causados aos espermatozoides durante o procedimento de sexagem espermática, resulta no comprometimento do período de sobrevivência dos espermatozoides no sistema genital das fêmeas, consequentemente, comprometendo a fertilidade seminal (VILLADIEGO et al., 2018; YOTOV et al., 2023). Portanto, o momento da inseminação em relação à ovulação é fundamental para o incremento da fertilidade (SCHENK et al., 2009). Neste sentido, a utilização de análogos do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no momento da inseminação tem promovido o aumento da prenhez/inseminação (P/IA) de bovinos submetidos a protocolos de sincronização da ovulação com o uso do sêmen convencional, principalmente nos animais que não expressam sinais de estro, resultado no aumento da amplitude do pico pré-ovulatório de LH e, aumento da ocorrência e antecipação da ovulação (HILL et al., 2016; RODRIGUES et al., 2019; BURNETT et al., 2022; BEREAN et al., 2023). Sendo assim, busca-se com a administração do análogo do GnRH antecipar a ovulação, a fim de contornar a baixa viabilidade presente no sêmen sexado. Portanto, a hipótese desse estudo é que aplicação do acetato de buserelina (análogo do GnRH) no momento da inseminação artificial de fêmeas leiteiras aumenta a taxa de concepção com a utilização do sêmen sexado. O objetivo do presente estudo foi comparar as taxas de concepção de fêmeas leiteiras inseminadas com sêmen sexado após a aplicação ou não de acetato de buserelina no momento da inseminação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Histórico da Sexagem Espermática

A possibilidade de predeterminar o sexo do conceito tem sido objeto de estudos por gerações. Porém, a falta de conhecimentos relacionados aos princípios que estão envolvidos na determinação do sexo em mamíferos resultou em várias decepções. A primeira hipótese surgiu quando Demócrito (470-402 a.C) propôs que os machos eram originados do testículo direito, enquanto as fêmeas surgiam a partir do testículo esquerdo (GARNER e SEIDEL, 2008). Posteriormente, diante da descoberta e avaliação dos cromossomos que determinam o sexo, foi observada uma pequena diferença de aproximadamente 4% na quantidade de cromatina entre os espermatozoides portadores dos cromossomos X (fêmea) e Y (macho) (MORUZZI, 1979).

As primeiras espécies estudadas com o objetivo de pré-seleção sexual por meio da separação de espermatozoides foram os coelhos e suínos, utilizando-se o método de centrifugação por gradiente de densidade. Porém, esse procedimento não demonstrou ser um método prático para controlar a proporção de sexo entre os descendentes dos animais em estudo (LUSH, 1925). Entretanto, durante anos foram desenvolvidos outros processos de sexagem espermática, mas mostraram ser ineficientes, devido a ineficácia e danos gerados aos espermatozoides (SEIDEL, 2013).

Somente na década de 1980, com o advento da citometria de fluxo, tornou-se possível a seleção do sexo do conceito com base nas diferenças na quantidade de DNA entre os espermatozoides X e Y. Populações de espermatozoides de coelhos viáveis foram separados, garantindo um percentual 86% e 81% de pureza para populações de espermatozoides portadores dos cromossomos X e Y, respectivamente (JOHNSON et al., 1989). Atualmente, a citometria de fluxo é o único método comercialmente disponível para separação de espermatozoides (QUELHAS et al., 2021).

2.2 Vantagens e Desvantagens do Emprego do Sêmen Sexado nos Sistemas de Produção de Bovinos

A possibilidade de direcionar o nascimento dos descendentes com o sexo desejado contribui para a aumento da lucratividade em sistemas de produção de gado leiteiro ou de corte. Neste contexto, a utilização do sêmen sexado mostra ser uma ferramenta interessante para incremento do agronegócio. O seu uso possibilita que produtores de leite produzam um maior número de bezerras para reposição, permitindo direcionar o melhoramento genético do rebanho com a produção de bezerras geneticamente superiores por meio da seleção de touros e matrizes de alto potencial genético para características desejadas (VRIES et al., 2008).

Neste caso, a diminuição na quantidade de nascimentos de bezerros machos leiteiros contribui para o bem-estar animal, uma vez que a maioria desses animais é descartada após o nascimento. Além disso, a utilização do sêmen sexado possibilita o aceleração do melhoramento das características dos descendentes conforme a eficiência alimentar, reduzindo a emissão de gases de efeito estufa que são gerados pelos sistemas de produção (HOLDEN e BUTLER, 2018).

A utilização do sêmen sexado combinada a outras biotécnicas como a produção in vitro de embriões (PIVE), possibilita a produção de um maior número de embriões e gestações em menor tempo, permite a utilização de um maior número de doadoras com alto potencial genético

(incluindo animais gestantes), reduz a quantidade de espermatozoides necessários para produção de embriões, além da obtenção do sexo desejado (FERRÉ et al., 2020).

Contudo, o sêmen sexado apresenta uma menor fertilidade em comparação ao sêmen convencional. Essa baixa fertilidade está relacionada aos danos sofridos durante o processo de sexagem espermática, além da concentração de espermatozoides por dose ser inferior ao sêmen convencional (BARUSELLI et al., 2006; PIREZ et al., 2020). Ainda, apesar dos avanços, a sexagem espermática por meio do citômetro de fluxo necessita de um maior tempo para o processamento, elevando o custo da operação, resultando na comercialização de doses de maior valor quando comparadas ao sêmen convencional (HEALY et al., 2013; YADAV et al., 2017).

2.3 Métodos de Sexagem Espermática

De modo geral, os métodos de determinação do sexo antes do nascimento consistem na manipulação da célula espermática, promovendo a separação conforme as diversas características existentes nos espermatozoides. Assim, a classificação baseia-se na utilização das diferenças na quantidade de DNA, morfologia do núcleo e cabeça, antígenos de superfície, velocidade de migração, densidade, entre outras (JOHNSON et al., 1989; VOLPES et al., 2016; CHOWDHURY et al., 2019; MELES et al., 2022). Apesar do desenvolvimento de vários procedimentos de sexagem no decorrer dos anos, a citometria de fluxo permanece sendo o único método comercialmente utilizado e, consiste na separação por meio da divergência no conteúdo de DNA presente em maior quantidade nos espermatozoides portadores do cromossomo X do que naqueles que carregam o cromossomo Y (JOHNSON et al., 1989; QUELHAS et al., 2021).

Durante o processo de separação por citometria de fluxo, os espermatozoides são expostos ao corante Hoechst 33342 que se liga ao DNA e, posteriormente, são bombeados em um fluxo na frente de um feixe de laser com comprimentos de ondas específicas. Assim, os espermatozoides corados emitem uma fluorescência azul brilhante, que é medida por um tubo fotomultiplicador (SEIDEL, 2012). Ocorre a formação de gotículas individuais nos espermatozoides, sendo aplicadas cargas opostas nestas gotículas conforme o cromossomo que os espermatozoides contêm, permitindo a seleção em fluxos para coleta (REESE et al., 2021). Desse modo, o processo de seleção resulta em populações compostas por espermatozoides provavelmente X ou Y e indeterminado, à medida que fluem por meio do instrumento em um fluxo fluídico (SEIDEL, 2012).

Uma alternativa ao método de sexagem por citometria é o processo de sexagem por imunologia, que se baseia nos sinais imunogênicos na superfície celular. Contudo, a imunosexagem pode apresentar danos à membrana celular, resultando em espermatozoides subférteis (SEIDEL, 2012). Um anticorpo específico a partir de antissoro de coelhos foi desenvolvido, porém, houve um número considerável nas populações de espermatozoides com identificação indeterminada (YANG et al., 2014). Chowdhury et al. (2019) produziram um anticorpo (WholeMon) que atua especificamente na membrana plasmática da cabeça das células portadoras do cromossomo masculino. Por meio deste, a seleção ocorre em um menor tempo gerando menos danos aos espermatozoides, além de um menor custo em comparação aos demais métodos.

A sexagem espermática utilizando gradiente Percoll consiste na separação dos espermatozoides por meio da desigualdade entre os cromossomos sexuais que resulta em uma diferença de peso (densidade). É um processo de sexagem mais simples, econômico e menos nocivo ao sêmen, além de processar vários espermatozoides ao mesmo tempo (WOLF et al., 2008; MACHADO et al., 2009). No entanto, o procedimento resulta em algumas alterações nas características celulares, como redução da motilidade e viabilidade, além de aumentar as anormalidades espermáticas (MELES et al., 2022).

O procedimento denominado *swim-up* permite a seleção dos espermatozoides conforme a sua motilidade, considerando a sua capacidade de se mover no meio de cultura. O método pode ser utilizado separadamente ou associado com a centrifugação por gradiente de densidade, resultando na separação de várias células morfológicamente viáveis (VOLPES et al., 2016).

Uma outra metodologia está sendo utilizada em protocolos de reprodução assistida e consiste na separação magnética de células (*Magnetic Activated Cell sorting* - MACS). Por meio dela, é possível separar espermatozoides móveis, viáveis e morfológicamente normais, apresentando uma maior resistência a criopreservação e com um melhor potencial de fertilização (CASTEX e LOSINHO, 2018).

Novas técnicas de edição de genoma surgiram e oferecem grande potencial na determinação do sexo no nível genômico. Estas técnicas consistem no direcionamento dos genes que estão envolvidos no desenvolvimento do sexo, como a identificação da região do cromossomo Y (SRY) que está relacionada ao desenvolvimento dos machos. Com isso, pretende-se gerar animais que produzam apenas indivíduos do sexo desejado. Porém, a atuação do gene SRY como o único responsável no desenvolvimento do sexo em mamíferos ainda não está completamente esclarecido (KURTZ e PETERSEN, 2019).

Apesar dos avanços alcançados nos últimos anos em relação aos procedimentos de separação espermática, o sêmen sexado ainda tem uma menor taxa de fertilidade em comparação ao sêmen convencional. Portanto, a redução na fertilidade do sêmen sexado é relacionada aos danos causados aos espermatozoides durante os procedimentos de sexagem, além da concentração de espermatozoides por dose ser inferior ao sêmen convencional (BARUSELLI et al., 2006; PIREZ et al., 2020).

2.4 Efeitos do Processo de Sexagem nos Espermatozoides

Durante o procedimento de seleção espermática por citometria de fluxo ocorre a capacitação prematura dos espermatozoides, consequentemente o ejaculado resiste por um menor tempo em ambiente uterino, em torno de 12 a 16 horas para o sêmen sexado e 24 a 36 horas para sêmen convencional, resultando em uma menor fertilidade (VILLADIEGO et al., 2018; YOTOV et al., 2023). A redução da fertilidade também tem relação com os danos ocorridos durante os processos de separação que são associados ao estresse mecânico, químico e tempo do processamento (LU et al., 2010; PIREZ et al., 2020), resultando no comprometimento da viabilidade e motilidade espermática (SCHENK et al., 2006).

Adicionalmente, são observadas alterações na membrana espermática influenciando a fertilização e desenvolvimento embrionário (MOCE et al., 2006). Com isso, os espermatozoides podem apresentar padrões de movimento anormais, em decorrência de deformações de cabeça, curvas acentuadas na cauda e um número significativo de mitocôndrias danificadas, interferindo na ligação dos espermatozoides ao oviduto e a integridade mitocondrial (PIREZ et al., 2020). Como forma de aumentar a qualidade espermática, garantir maiores motilidade e fertilidade, a sexagem pode ser realizada a uma pressão mais baixa na citometria de fluxo, mas verifica-se que há uma redução na taxa de classificação em 2-3% (SUH et al., 2005).

Segundo Baruselli et al. (2006), o comprometimento na fertilidade com o uso do sêmen sexado em bovinos é resultado do menor número de espermatozoides por dose ($1,5-2,0 \times 10^6$ spz/dose) em comparação à quantidade de espermatozoides no sêmen convencional ($\sim 10 \times 10^6$ spz/dose). Além disso, outros fatores também estão associados a redução da fertilidade, como o momento da inseminação, manipulação ou baixa viabilidade do sistema reprodutivo da fêmea (MAXWELL et al., 2004).

2.5 Eficiência da Técnica de Sexagem Espermática e do Emprego do Sêmen Sexado

Apesar do sêmen sexado apresentar uma menor fertilidade, a precisão no processo de seleção sexual por citometria ultrapassa os 90% de populações de espermatozoides contendo o cromossomo pretendido (NANIWA et al., 2018). Desta forma, foram produzidos vários descendentes de mamíferos com o sexo desejado confirmado (JOHNSON, 1995). Em um estudo onde foi avaliada a proporção sexual de bezerros nascidos oriundos de inseminações com o sêmen sexado (X) por citometria, foi observado aproximadamente 93% (755/804) de animais nascidos com o sexo pretendido (NANIWA et al., 2018). Assim sendo, bovinos leiteiros submetidos ao protocolo de duplo ovsynch e inseminados com o sêmen sexado, apresentaram taxa de concepção de aproximadamente 47% sendo que 90% dos indivíduos foram do sexo desejado (LAUBER et al., 2020).

De acordo Seidel (2014), as taxas de concepção observadas no sêmen sexado são de aproximadamente 80% das observadas com a utilização do sêmen convencional. No entanto, ao comparar a taxa de concepção do sêmen sexado em relação ao sêmen convencional conforme a manifestação do estro em animais submetidos ao protocolo de sincronização da ovulação, foi observada uma menor concepção no grupo que recebeu o sêmen sexado, tanto nos indivíduos que expressaram sinais de estro, quanto nos que não manifestaram, sendo aproximadamente 82% e 59% das observadas no sêmen convencional, respectivamente. Quando foi comparada a concepção, independentemente da manifestação do estro, o sêmen sexado resultou em 78% de concepção em relação ao observado no sêmen convencional (PERRY et al., 2020).

Ao realizarem uma meta-análise, Resse et al. (2021) observaram que o aumento na quantidade de espermatozoides por dose promove um aumento de aproximadamente 14% na concepção de animais inseminados com o sêmen sexado. Neste contexto, novilhas e vacas lactantes da raça Jersey foram inseminadas com sêmen sexado contendo $2,1 \times 10^6$ espermatozoides selecionados em 90% de pureza ou receberam doses de sêmen contendo 10×10^6 espermatozoides selecionados com 75% de pureza, embora tenha resultado em uma maior taxa prenhes (47% vs. 40 %) com a utilização do sêmen de maior concentração, a proporção de indivíduos nascidos com o sexado foi inferior ao sêmen de menor concentração (79 vs. 90%) (LUCENA et al., 2014). Dejarnette et al. (2010) não encontraram diferença significativa na taxa de concepção (23% vs. 25%) de bovinos da raça Holandesa inseminados com sêmen sexado com diferentes doses inseminantes de $2,1 \times 10^6$ e $3,5 \times 10^6$ sptz/dose, respectivamente.

2.6 Estratégias para Melhorar a Eficiência no Emprego de Sêmen Sexado em Sistemas de Produção de Bovinos

Embora a sexagem espermática tenha evoluído nos últimos tempos, a técnica ainda resulta em uma menor taxa de concepção quando comparada ao sêmen convencional. Contudo, vários estudos foram idealizados buscando estratégias que possibilitassem diminuir essa condição (BODMER et al., 2005; KURYKIN et al., 2007; DEJARNETTE et al., 2010; CREPALDI et al., 2023; YOTOV et al., 2023).

Em um estudo com vacas da raça Holandesa, não foi observado efeito entre diferentes doses inseminantes de sêmen sexado ($2,1 \times 10^6$ e $3,5 \times 10^6$ sptz/dose) na taxa de concepção. Sendo que, no mesmo estudo, para ambas as concentrações espermáticas do sêmen sexado, a P/IA foi inferior ao sêmen convencional (DEJARNETTE et al., 2010). Entretanto, em outro estudo onde a inseminação foi realizada 12 horas após a detecção do estro, não houve diferença na taxa de concepção entre os grupos de animais inseminados com o sêmen sexado (27,6%, n=105) e convencional (28,1%, n=64) com as mesmas concentrações espermáticas (BODMER et al., 2005).

Ao considerar o local de deposição do sêmen, não foi observada diferença nas taxas de concepção de novilhas leiteiras inseminadas com o sêmen sexado ($2,2 \times 10^6$ sptz/dose). Para isso, os pesquisadores dividiram os animais em três grupos conforme o local de deposição do sêmen, sendo no corpo uterino, parte central do corno uterino e próximo à junção útero-tubária, resultando nas taxas de concepção de 41,8% (38/91), 49,1% (28/57) e 39,3% (24/61), respectivamente. Ao avaliar a manifestação do estro, os animais que apresentaram fortes sinais de estro tiveram uma melhor fertilidade 45,9% (85/185) quando comparado aos animais com fracos sinais 20,8% (5/34) independentemente do local de deposição do sêmen (KURYKIN et al., 2007). Portanto, o aumento da fertilidade e redução nas perdas gestacionais estão correlacionadas a expressão do estro. Isso sugere que a atuação hormonal que caracteriza a falta de expressão de estro também causa alterações uterinas que diminuem a probabilidade de manutenção da gestação durante o período crítico entre o primeiro e o segundo mês de gestação (PEREIRA et al., 2016).

Novilhas Jersey foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação e a taxa de concepção foi avaliada conforme o horário da inseminação artificial, sendo 54 e 60 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona, utilizando sêmen convencional e sêmen sexado em ambos os tratamentos. Contudo, não houve diferença entre a P/IA nos animais inseminados com o sêmen convencional (54h = 50,5% vs 60h = 51,8%; $P=0,95$). Entretanto, as novilhas inseminadas com o sêmen sexado apresentaram uma maior P/IA, 60 horas após remoção do dispositivo de progesterona (54h = 16,2% vs 60h = 31,4%; $P<0,01$) (SALES et al., 2011). Sá Filho et al. (2013) compararam P/IA de bovinos leiteiros inseminados com o sêmen sexado na inseminação convencional após a observação do estro com animais inseminados pelo protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Observaram uma maior P/IA no grupo inseminados após a observação do cio, porém, os indivíduos após a IATF apresentaram maior proporção de animais gestantes ao término do manejo reprodutivo, em decorrência do maior número de serviços.

Neste contexto, resultados semelhantes foram encontrados por Schenk et al. (2009) que observaram maior P/IA com o sêmen sexado quando realizada mais próxima ao momento da ovulação. O processo de sexagem não comprometeu a P/IA comparado ao sêmen convencional, com a inseminação realizada 48 horas após a remoção do dispositivo em vacas de corte inseminadas com o sêmen sexado refrigerado (CREPALDI et al., 2023). Porém, mesmo com o aumento de P/IA com sêmen sexado em inseminações realizadas mais próximas da ovulação, esta prática é considerada inviável em programas de sincronização da ovulação em grande escala, em decorrência do aumento de manejos com os animais (DINIZ et al., 2021).

Diniz et al. (2021) avaliaram o efeito da aplicação de $\text{PGF2}\alpha$ no momento da inseminação em bovinos de corte submetidos ao protocolo IATF com o sêmen sexado e convencional. Sendo assim, observaram que vacas inseminadas com o sêmen sexado apresentaram menor taxa de concepção em comparação as vacas que receberam o sêmen convencional, independentemente da aplicação da $\text{PGF2}\alpha$. Entretanto, os animais com o comportamento do estro reduzido aumentaram a taxa de prenhez independentemente do sêmen utilizado quando administrada a $\text{PGF2}\alpha$ [35,9% (33/92) vs 21,2% (21/99)].

Deste modo, bovinos da raça Holandesa foram submetidos ao protocolo duplo ovsynch com IATF realizada 48 horas após a aplicação da segunda dose de $\text{PGF2}\alpha$. Nesse espaço, consideraram dois intervalos (24 e 16 horas) entre a indução de ovulação e inseminação com sêmen sexado. Com isso, foi observado que os animais que receberam o indutor de ovulação 24 horas antes da IATF, apresentaram uma menor P/IA em comparação com os que receberam o análogo de GnRH (acetato de gonadorelina) 16 horas antes da inseminação aos 34 ± 3 dias (44 vs. 50%) e 80 ± 17 dias (41 vs. 48%) após a IATF (LAUBER et al., 2020).

Contudo, alguns estudos reportam que a aplicação do acetato de gonadorelina no momento da inseminação resultou no incremento da P/IA em animais submetidos à protocolos

de sincronização da ovulação e inseminados com sêmen convencional, principalmente nos grupos de animais sem ou com expressão reduzida do estro (HILL et al., 2016; RODRIGUES et al., 2019; BURNETT et al., 2022; BEREAN et al., 2023). No entanto, a utilização do acetato de gonadorelina concomitante a inseminação artificial, 72 e 80 horas após a remoção do dispositivo de progesterona, não influenciou na taxa de concepção dos animais inseminados com o sêmen sexado (HALL et al., 2017). Todavia, segundo os mesmos autores, os animais que manifestaram estro antes na inseminação resultaram em maior P/IA. Nesse sentido, uma alternativa nos protocolos de sincronização da ovulação com utilização do sêmen sexado, seria a realização da inseminação apenas nos animais que demonstraram sinais de cio antes da IA possibilitando o incremento da taxa de concepção (HALL et al., 2017). No entanto, a administração de acetato de gonadorelina aumentou a amplitude da secreção de LH, antecipando a ovulação e elevando sua ocorrência (BURNETT et al., 2022).

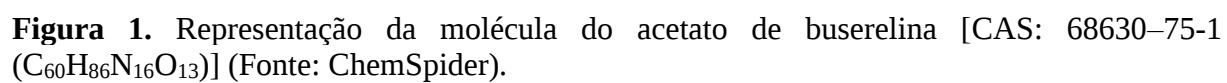
Chenault (1990) avaliou a influência de outros agonistas do GnRH (acetato de buserelina e fertirelina) sobre a taxa de concepção e observou um aumento no percentual de animais gestantes quando os agonistas de GnRH foram aplicados no momento da inseminação artificial de bovinos leiteiros lactantes. Sendo que, a administração do acetato de buserelina ou gonadorelina no início do estro promoveu aumento na P/IA em animais de baixo escore, além de aumentar o pico de LH, antecipando a ovulação e incrementando as concentrações de progesterona, posteriormente (KAIM et al., 2003). Entretanto, Hubner et al. (2022) não observaram efeito da gonadorelina aplicada no momento da inseminação artificial com observação de cio sobre a taxa de concepção de indivíduos inseminados com sêmen convencional.

O desempenho reprodutivo de vacas leiteiras submetidas ao protocolo de IATF com sêmen sexado, foi afetado conforme a condição ovariana e concentração de hormônios esteroides no dia da IATF. Sendo que a presença de um maior folículo dominante, maior concentração de estrógeno, ausência do corpo lúteo e baixa concentração de progesterona no momento da inseminação, possibilitaram a ocorrência de melhores taxas de concepção (YOTOV et al., 2023). Estratégias de manejo como direcionar os animais conforme o número de partos, escore de condição corporal, histórico de fertilidade e dias em lactação, podem ser adotadas ao usar o sêmen sexado em bovinos leiteiros lactantes com o intuito de incrementar a P/IA (MAICAS et al., 2019).

2.7 Acetato de Buserelina

O GnRH é um peptídeo sintetizado por neurônios especializados presentes no hipotálamo, atuando nas células gonadotrópicas da adenohipófise, resultando na liberação dos hormônios LH e FSH. A utilização de seus análogos sintéticos em programas reprodutivos no gado leiteiro, são componentes essenciais, que quando administrados podem aumentar a ocorrência da ovulação (CHENAULT et al., 1990). Conforme Cedeño et al. (2021), a administração desses análogos resulta no aumento da amplitude do pico pré-ovulatório de LH, promovendo um aumento na ocorrência e antecipação da ovulação.

O acetato de buserelina é um análogo sintético do hormônio liberador de gonadotrofina (Figura 1), usado no tratamento de disfunções hormonais. O acetato de buserelina é mais potente na estimulação da liberação hipofisária dos hormônios luteinizante e folículo-estimulante. Por essa razão, tem sido empregado para induzir a ovulação e melhorar as taxas de concepção em protocolos reprodutivos (KONG et al., 2022). O acetato de buserelina é utilizado no estímulo da ovulação em bovinos, equinos e coelhos, bem como no tratamento de patologias ovarianas e incremento da concepção. Nesse sentido, a administração deste análogo dias após a inseminação, resulta na formação de corpo lúteo acessório, melhorando o perfil lúteo e aumentando a taxa de concepção (PANDEY et al., 2013)



3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais, Local e Período

Para a realização deste estudo, 116 fêmeas bovinas mestiças Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*), não gestantes, clinicamente saudáveis quanto a patologias uterinas e ovarianas e criadas em fazendas leiteiras comerciais no município de Malhada-BA foram selecionadas. As 116 fêmeas utilizadas neste estudo apresentavam escore de condição corporal $\geq 3,0$ (escala de 1 a 5, considerado o um caquético e o cinco obeso) e eram criadas em sistema de semi-confinamento, com alimentação composta por mistura comercial de concentrados, suplemento mineral e silagem de milho fornecida no cocho. As áreas destinadas ao pastejo eram compostas predominantemente por capim buffel (*Cenchrus ciliaris*) e a ingestão de água era *ad libitum*. O experimento foi realizado nos meses de janeiro e fevereiro de 2022 e 2023.

Todos os procedimentos deste estudo foram executados de acordo com os princípios éticos na experimentação animal e aprovados pela Comissão de Ética na Utilização de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA – IZ – UFRRJ) sob processo número 0200-07-2023 (Anexo A).

3.2 Avaliação ultrassonográfica, Protocolo de Sincronização da Ovulação, Inseminação Artificial

Os animais selecionados foram submetidos ao exame ultrassonográfico (DP-10 Vet Power Mindray®, transdutor linear transretal; 7,5MHz) dos órgãos reprodutivos em três momentos: Primeiro momento: no início do protocolo de sincronização da ovulação para caracterização da condição ovariana (anestro ou ciclicidade). Os animais que apresentavam corpo lúteo (CL) em um dos ovários foram considerados cíclicos e as fêmeas que não apresentavam CL, em anestro; Segundo momento: no dia da inseminação artificial as fêmeas foram novamente avaliadas pela ultrassonografia para mensuração do folículo pré-ovulatório (FPO). A imagem do folículo foi realizada em modo B para mensuração de seu diâmetro médio, calculado pela média das duas maiores medidas transversais e perpendiculares entre si; Terceiro momento: para realização do diagnóstico de gestação, realizado entre 30 e 40 dias após a inseminação artificial.

Posteriormente a primeira avaliação ultrassonográfica, as fêmeas foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação, conforme descrito a seguir. Em dia aleatório do ciclo estral (denominado D0), foi inserido um dispositivo intravaginal de progesterona (Primer Monodose®, Agener União Saúde Animal, Embu-Guaçu - SP, Brasil) associado a 2mg de benzoato de estradiol (Gonadiol®, Zoetis, Buenos Aires, Argentina), aplicado por via intramuscular. No nono dia após a inserção do dispositivo (D9), o dispositivo de progesterona foi removido e foram administradas 300UI de gonadotrofina coriônica equina – eCG - im (Ecegon®, Biogenesis Bagó, Curitiba – PR, Brasil) + 500µg de cloprostenol sódico i.m. (Estron®, Agener União Saúde Animal, Embu-Guaçu - SP, Brasil) + 1mg de cipionato de estradiol (Fertilcare ovulação® – MSD Saúde Animal Brasil, Ji-Paraná – RO, Brasil). A inseminação artificial ocorreu 48 horas após a remoção do dispositivo de progesterona, utilizando sêmen sexado (Sexecel®, ABS Global Brasil, Delta – MG, Brasil) proveniente de oito touros diferentes. Neste momento, os animais foram divididos aleatoriamente em dois grupos: Grupo Buserelina (GB; n=58) no qual as fêmeas receberam 10µg de acetato de buserelina (Sincroforte®, Ourofino Saúde Animal, Cravinhos – SP, Brasil) concomitante a

inseminação artificial com sêmen sexado; Grupo Controle (GC; n=58) no qual as fêmeas foram inseminadas com sêmen sexado, porém não houve a administração agonista de GnRH.

O diagnóstico de gestação foi realizado entre 30 e 40 dias após a inseminação artificial, utilizando ultrassonografia transretal (DP-10 Vet Power Mindray®, transdutor linear transretal; 7,5MHz). A confirmação da prenhez foi baseada na visualização da vesícula embrionária com a presença de embrião viável apresentando batimento cardíaco.

3.3 Análise Estatística

As variáveis taxa de concepção, tratamentos (GB e GC), ciclicidade, ECC (Escore de Condição Corporal), categoria, fazenda, touro e interações foram avaliadas por regressão logística multivariada utilizando o programa Bioestat 5.3. Quando não detectados efeitos significativos, a variável foi removida do modelo com base no critério da estatística de Wald quando $p > 0,20$. Para análise, os tratamentos (GB e GC) e taxa de concepção foram incluídas no modelo.

A variável contínua diâmetro do folículo pré-ovulatório foi utilizada para separar as fêmeas em dois grupos de análise, determinada conforme a média geral dos FPO: aquelas que apresentavam $FPO \geq 13\text{mm}$ no dia da IATF e aquelas com $FPO < 13\text{mm}$ no dia da inseminação. Esta variável foi primeiro analisada para heterogeneidade de variância e normalidade e posteriormente comparada por ANOVA. As taxas de concepção em função dos tratamentos foram testadas pelo teste binomial não paramétrico utilizando o programa Bioestat 5.3. O teste binomial tem como objetivo testar a diferença entre duas proporções de amostras independentes, a fim de determinar se a diferença ($p_1 - p_2$) é de tal magnitude que permite rejeitar a hipótese de nulidade. O tamanho de cada amostra foi suficiente para a aproximação da curva normal à distribuição binomial, ou seja, as duas condições foram atendidas: $n_1 p_1 q_1 \geq 5$ e $n_2 p_2 q_2 \geq 5$. Diferenças significativas foram consideradas para $p < 0,05$ (5% significância), enquanto as diferenças entre $p > 0,05$ e $p < 0,10$ foram consideradas como uma tendência. Os dados estão apresentados como médias $\pm$ erro padrão e como porcentagens para resultados contínuos e binários, respectivamente.

4 RESULTADOS

O diâmetro médio do folículo pré-ovulatório no dia da IATF, a porcentagem de vacas cíclicas no início do protocolo de sincronização assim como as taxas de concepção dos grupos acetato de buserelina (GB) e do controle (GC) estão apresentadas na Tabela 1. Não foi observada diferença significativa entre os dois tratamentos para nenhuma das variáveis analisadas.

Tabela 1. Diâmetro médio do folículo pré-ovulatório (FPO) no dia da inseminação ($\pm$ erro padrão), porcentagem de vacas em anestro e cíclicas no início do protocolo de sincronização e, taxas de concepção de fêmeas leiteiras mestiças inseminadas em tempo fixo com o sêmen sexado após aplicação ou não de acetato de buserelina.

Parâmetro avaliado	Grupos experimentais		Valor de P
	GB	GC	
Diâmetro médio FPO (mm)	13,1 $\pm$ 0,06	12,9 $\pm$ 0,06	0,84
Anestro (%)	62,0	70,7	-
Cíclica (%)	38,0	29,3	-
Taxa de concepção (%)	22,4	12,8	0,11

Legenda: GB = Grupo acetato de buserelina. GC = Grupo controle. FPO = Folículo pré-ovulatório. mm = milímetro.

A condição ovariana (anestro ou cíclica) no início do protocolo de IATF não influenciou a taxa de concepção de fêmeas inseminadas com o sêmen sexado dentro de cada tratamento (GB e GC). Entretanto, quando avaliadas apenas as vacas em anestro, foi observada uma tendência ($P = 0,07$) das vacas do grupo buserelina apresentarem maior taxa de concepção em relação às vacas do grupo controle (Tabela 2). Por outro lado, avaliando-se apenas as vacas cíclicas, não foi observada diferença significativa entre as taxas de concepção dos dois tratamentos ($P = 0,48$).

Tabela 2. Efeito da condição ovariana (anestro ou cíclica) de fêmeas bovinas leiteiras no início do protocolo de sincronização sobre a taxa de concepção nos diferentes tratamentos (GB e GC).

Condição ovariana	Taxas de Concepção (%)		Valor de P
	GB	GC	
Anestro	25,0	12,2	0,07
Cíclica	18,2	17,6	0,48
Valor de P	0,29	0,27	-

GB = Grupo acetato de buserelina. GC = Grupo controle.

O diâmetro médio do folículo pré-ovulatório mensurado no dia da inseminação artificial foi de 13,0 mm $\pm$ 0,06. Nas fêmeas do grupo buserelina, foi observado efeito do diâmetro do FPO sobre a taxa de concepção, ou seja, os animais com FPO < 13mm apresentaram maior taxa

de concepção em relação às fêmeas com FPO $\geq 13\text{mm}$ ($P = 0,01$). Por outro lado, no grupo controle, as fêmeas com FPO $< 13\text{mm}$, no momento da inseminação, apresentaram uma tendência de ter maior taxa de concepção em relação aquelas com FPO $\geq 13\text{mm}$ ($P = 0,08$). Quando consideradas somente fêmeas com folículos pré-ovulatórios $\geq$ ou $< 13\text{mm}$, não foi observada diferença entre as taxas de concepção dos dois grupos estudados (GB e GC) conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Efeito do diâmetro do folículo pré-ovulatório (FPO) de fêmeas bovinas leiteiras no momento da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) sobre a taxa de concepção, nos diferentes tratamentos (GB e GC).

Diâmetro do folículo pré-ovulatório no dia da IATF	Taxas de Concepção (%)		Valor de P
	GB	GC	
FPO $\geq 13\text{mm}$	6,7	5,9	0,46
FPO $< 13\text{mm}$	39,1	21,7	0,10
Valor de P	0,01	0,08	-

GB = Grupo acetato de buserelina. GC = Grupo controle.

5 DISCUSSÃO

Estudos investigaram o impacto da administração de análogos ao GnRH no momento da inseminação artificial sobre a taxa de concepção em bovinos, porém, concentraram-se em protocolos com sêmen convencional (RODRIGUES et al., 2019; BURNETT et al., 2022; BEREAN et al., 2023). Desta forma, pesquisas que buscaram analisar a influência desses agonistas em programas com o emprego do sêmen sexado em bovinos leiteiros são limitados. Portanto, com base no conhecimento dos presentes autores, este é o primeiro estudo que investiga o impacto do acetato de buserelina administrado no momento da IA sobre a concepção de fêmeas bovinas mestiças Girolando (*Bos taurus* x *Bos indicus*) inseminadas com o sêmen sexado.

A utilização de agonistas do GnRH promove o aumento da amplitude do pico pré-ovulatório de LH, resultando no aumento da ocorrência e antecipação da ovulação (CEDEÑO et al., 2021; BURNETT et al., 2022). Sendo assim, cerca de 40 a 60% dos bovinos de corte submetidos a protocolos de sincronização da ovulação requerem a aplicação desses agonistas para indução do pico pré-ovulatório de gonadotrofinas próximo ao momento da inseminação, resultando no incremento da concepção (MOOREY et al., 2022). Entretanto, conforme os resultados observados nesse estudo, não houve diferença significativa na taxa de concepção, demonstrando que a administração do acetato de buserelina (AB) no momento da inseminação não influencia na concepção de vacas leiteiras inseminadas com o sêmen sexado. Por outro lado, resultados apresentados por Chenault (1990) apontam que o AB aumentou a taxa de concepção em bovinos submetidos a protocolos com a utilização do sêmen convencional. Deste modo, a hipótese do presente estudo de que a administração do acetato de buserelina aumenta a taxa de concepção foi rejeitada. Contudo são necessários mais estudos para investigar o impacto da administração do agonista simultaneamente à inseminação artificial. Hall et al. (2017) observaram que a concepção em bovinos leiteiros inseminados com o sêmen sexado, não foi influenciada mediante a aplicação de acetato de gonadorelina no momento da inseminação artificial realizada 72 ou 80 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona.

O status ovariano e o estágio do ciclo estral em que esses protocolos são iniciados, estão diretamente relacionados a sua eficiência, sendo assim, é importante considerar esses fatores para potencializar a eficiência reprodutiva do rebanho (BISINOTTO et al., 2010). No presente estudo, houve uma tendência na variável ciclicidade, indicando que as fêmeas em anestro no início do protocolo hormonal apresentaram um aumento na taxa de concepção ao receber o acetato de buserelina no momento da inseminação artificial. Sendo assim, especula-se que nas fêmeas em anestro, nas quais os oócitos se desenvolveram em ambientes com baixa concentração de progesterona, houve melhoria na competência oocitária e aumento na capacidade de fertilização ao receberem o acetato de buserelina. Entretanto, ao comparar o efeito da ciclicidade entre os grupos, não foi observada diferença significativa entre os animais que estavam em anestro e os que estavam cíclicos no início do protocolo hormonal.

A progesterona é fundamental durante o protocolo de sincronização da ovulação, contribuindo para o crescimento folicular e qualidade oocitária (REVAH e BUTLER, 1996). Madureira et al. (2021) e Denicol et al. (2012) relataram que fêmeas leiteiras que estavam cíclicas no início do protocolo tiveram uma maior P/IA em comparação aquelas que se encontravam em anestro, resultante da maior concentração de progesterona durante o protocolo. Entretanto, Pfeifer et al. (2009) verificaram que bovinos de corte (*Bos Taurus*) submetidos a protocolos com baixa progesterona durante o período de crescimento folicular, apresentaram

um folículo dominante de maior diâmetro no dia da inseminação e, uma maior concentração de progesterona no sétimo dia após a ovulação, contudo, não houve interferência na taxa de concepção. Neste contexto, a presença de grandes folículos nos ovários no início do protocolo também pode indicar uma importante característica ligada à fertilidade dos bovinos, resultando em um desenvolvimento folicular e um desempenho reprodutivo satisfatório (ZANGIROLAMO et al., 2018). Porém, a inclusão da gonadotrofina coriônica equina administrada no momento da retirada do dispositivo de progesterona, melhora a eficiência reprodutiva e a taxa de concepção em bovinos leiteiros em anestro (BRYAN et al., 2013; SHEPHARD, 2013). Portanto, a inclusão desse hormônio no protocolo hormonal pode ter interferido no efeito da ciclicidade nesse estudo, não resultando em diferença.

Todavia, os resultados sugerem que o tamanho do folículo pré-ovulatório influencia na concepção dos animais em estudo. O diâmetro do FPO pode ser considerado como uma importante característica ligada a fertilidade de bovinos em protocolos de sincronização da ovulação. Animais que possuem maiores folículos no momento da inseminação apresentam uma maior probabilidade de ovulação, maior diâmetro do corpo lúteo e maior concentração sérica de progesterona, assim como maior chance de prenhez (BONATO et al., 2022; MOROTTI et al., 2022; YOTOV et al., 2023). Entretanto, quando as taxas de concepção foram comparadas de acordo com o diâmetro do FPO, observou-se que animais do GB com FPO <13mm apresentaram maiores taxas de concepção em relação aqueles com FPO ≥13mm (P=0,01).

O período pré-ovulatório é fundamental para o desenvolvimento do folículo quanto do oócito, ocorrendo a progressão do folículo desde a fase de dominância até a fase pré-ovulatória, proporcionando um período significativo para os estágios finais da capacitação oocitária (MOOREY et al., 2022). No entanto, a menor taxa de concepção observada no grupo de animais que possuíam folículos de maior diâmetro, pode significar que são folículos que atingiram a dominância precocemente, assim sendo, folículos dominantes prolongados que sofreram maturação prematura, resultando em oócitos envelhecidos e de baixa fertilidade, comprometendo o desenvolvimento embrionário e o estabelecimento da prenhez (REVAH e BUTLER, 1996). Por outro lado, especula-se que aplicação do acetato de buserelina pode ter favorecido o desenvolvimento final dos folículos de menor diâmetro, induzindo a ovulação e, conseqüentemente, aumentando a taxa de concepção. A indução da ovulação de pequenos folículos por meio da aplicação de agonistas do GnRH em programas de transferência de embrião, está associada a redução dos níveis de estradiol, bem como à taxa de fertilização e ao estabelecimento da prenhez (JINKS et al., 2013). Porém, a interferência do diâmetro do folículo pré-ovulatório na taxa de prenhez ainda é discutível (YOTOV et al., 2023). Sendo assim, os presentes resultados norteiam novos estudos, que terão como objetivo compreender mais especificamente como a aplicação de acetato de buserelina influencia nas características reprodutivas de fêmeas bovinas inseminadas com o sêmen sexado.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que a aplicação de acetato de buserelina no momento da IATF não melhora a taxa de concepção de fêmeas leiteiras submetidas à protocolos de sincronização da ovulação e inseminadas com sêmen sexado.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa pesquisa possibilita a idealização de estudos futuros, buscando o incremento da fertilidade do sêmen sexado em protocolos de sincronização da ovulação. Conforme os resultados apresentados, folículos maiores resultaram em uma menor concepção, deste modo, um estudo com protocolo mais curto pode ser realizado, reduzindo o tempo de crescimento folicular. Experimentos com a administração de diferentes análogos de GnRH também podem ser testados, bem como, a administração de diferentes dosagens do acetato de buserelina.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARUSELLI, P. S.; AYRES, H.; SOUZA, A. H.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U.; TORRES-Jr, J. R. S. Impacto da IATF na eficiência reprodutiva em bovinos de corte. **In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, Londrina, PR. Anais São Paulo, SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.** v. 1, p. 113-132, 2006.
- BEREAN, D.; BOGDAN, L. M.; OPRIS, P.; CIMPEAN, R. Economical implications and the impact of gonadotropin-releasing hormone administration at the time of artificial insemination in cows raised in the extensive system in North Romania. **Frontiers in Veterinary Science**, vol. 10, 1167387, 2023.
- BISINOTTO, R. S.; CHEBEL, R. C.; SANTOS, J. E. Follicular wave of the ovulatory follicle and not cyclic status influences fertility of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, vol. 93, n. 8, p. 3578-3587, 2010.
- BODMER, M.; JANETT, F.; HÄSSIG, M.; DEN DAAS, N.; REICHERT, P.; THUN, R. Fertility in heifers and cows after low dose insemination with sex-sorted and non-sorted sperm under field conditions. **Theriogenology**, vol. 64, n. 7, p.1647-1655, 2005.
- BONATO, D. V.; FERREIRA, E. B.; GOMES, D. N.; BONATO, F. G. C.; DROHER, R. G.; MOROTTI, F.; SENEDA, M. M. Follicular dynamics, luteal characteristics, and progesterone concentrations in synchronized lactating Holstein cows with high and low antral follicle counts. **Theriogenology**, vol. 179, p. 223-229, 2022.
- BRYAN, M. A., BÓ, G.; MAPLETOFT, R. J.; EMSLIE, F. R. The use of equine chorionic gonadotropin in the treatment of anestrus dairy cows in gonadotropin-releasing hormone/progesterone protocols of 6 or 7 days. **Journal of dairy science**, vol. 96, n. 1, p. 122–131, 2013.
- BURNETT, T. A.; MADUREIRA, A. M. L.; BAUER, J. W.; CERRI, R. L. A. Impact of gonadotropin-releasing hormone administration at the time of artificial insemination on conception risk and its association with estrous expression. **Journal of Dairy Science**. 2022 vol. 105, n.2, p.1743-1753, 2022.
- CASTEX, H. R.; LOSINNO, L. Nanopartículas magnéticas para separación de espermatozoides x en semen equino. Resultados de campo y comerciales. **Medicina Veterinaria Y Zootecnia**, v.13, n.2, p.268-275, 2018.
- CEDEÑO, A. V.; CUERVO, R.; TRÍBULO, A.; TRÍBULO, R.; ANDRADA, S.; MAPLETOFT, R.; MENCHACA, A.; BÓ, G. A. Effect of expression of estrus and treatment with GnRH on pregnancies per AI in beef cattle synchronized with an estradiol/progesterone-based protocol. **Theriogenology**, vol 161, p. 294–300, 2021.
- CHENAULT, J. R. Effect of fertirelin acetate or buserelin on conception rate at first or second insemination in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 1990 vol. 73 (3), p. 633-638, 1990.

CHOWDHURY, M. M. R.; LIANGUANG, X.; KONG, R.; PARK, B. Y.; MESALAM, A.; JOO, M. D.; AFRIN, F.; JIN, J. I.; LIM, H. T.; KONG, I. K. In vitro production of sex preselected cattle embryos using a monoclonal antibody raised against bull sperm epitopes. **Animal Reproduction Science**, vol. 205, p. 156-164, 2019.

CREPALDI, G. A.; SALES, J. N. DE S.; NICHI, M.; CAMPOS FILHO, E. P. DE.; PANAZZOLO, S. G.; SPÉZIA, J. P. S.; SOUZA, S. D.; RODRIGUES, N. K. DA S.; MOREIRA, T. F. C.; BARUSELLI, P. S. Development of strategies to use of liquid sexed semen in TAI of beef cows. **Animal Reproduction**. v. 20, n. 2, 1 p., 2023.

DEJARNETTE, J. M.; MCCLEARY, C. R.; LEACH, M. A.; MORENO, J. F.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E. Effects of 2.1 and 3.5x10(6) sex-sorted sperm dosages on conception rates of Holstein cows and heifers. **Journal of Dairy Science**, vol. 93, n. 9, p. 4079-4085, 2010.

DENICOL, A. C.; LOPES, G., JR; MENDONÇA, L. G.; RIVERA, F. A.; GUAGNINI, F.; PEREZ, R. V.; LIMA, J. R.; BRUNO, R. G.; SANTOS, J. E.; CHEBEL, R. C. Low progesterone concentration during the development of the first follicular wave reduces pregnancy per insemination of lactating dairy cows. **Journal of dairy science**, vol. 95, n. 4, p. 1794–1806, 2012.

DINIZ, J. H. W.; PERES, R. F. G.; TEIXEIRA, A. C. B.; RIVEROS, J. A. N.; NORONHA, I. M.; MARTINS, C. F. G.; OLIVEIRA, C. S.; POHLER, K. G.; PUGLIESI, G.; OLIVEIRA, L. Z. Administration of PGF2 α at the moment of timed-AI using sex-sorted or conventional semen in suckled nelore cows with different intensity of estrus behavior. **Theriogenology**, vol. 174, p. 169-175, 2021.

FERRÉ, L. B.; KJELLAND, M. E.; STRØBECH, L. B.; HYTTEL, P.; MERMILLOD, P.; ROSS, P. J. Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, vol. 14, n. 5, p. 991-1004, 2020.

GARNER, D. L.; SEIDEL, G. E. JR. History of commercializing sexed semen for cattle. **Theriogenology**, vol. 69, n. 7, p. 886-895, 2008.

HALL, J. B.; KASIMANICKAM, R. K.; GLAZE, J. B. JR.; ROBERTS-LEW, M. C. Impact of delayed insemination on pregnancy rates to gender selected semen in a fixed-time AI system. **Theriogenology**, vol. 102, p. 154-161, 2017.

HEALY, A. A.; HOUSE, J. K.; THOMSON, P. C. Artificial insemination field data on the use of sexed and conventional semen in nulliparous Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, vol. 96, n. 3, p. 1905-1914, 2013.

HILL, S. L.; GRIEGER, D. M.; OLSON, K. C.; JAEGER, J. R.; DAHLEN, C. R.; CROSSWHITE, M. R.; PEREIRA, N. N.; UNDERDAHL, S. R.; NEVILLE, B. W.; AHOLA, J.; FISCHER, M. C.; SEIDEL, G. E.; STEVENSON, J. S. Gonadotropin-releasing hormone increased pregnancy risk in suckled beef cows not detected in estrus and subjected to a split-time artificial insemination program. **Journal of Dairy Science**, vol. 94, n. 9, p. 3722-3728, 2016.

HOLDEN, S. A.; BUTLER, S. T. Review: Applications and benefits of sexed semen in dairy and beef herds. **Animal**, vol. 12, p. s97-s103, 2018.

HUBNER, A. M.; CANISSO, I. F.; PEIXOTO, P. M.; CONLEY, A. J.; LIMA, F. S. Effect of gonadotropin-releasing hormone administered at the time of artificial insemination for cows

detected in estrus by conventional estrus detection or an automated activity-monitoring system. **Journal of Dairy Science**, vol. 105, n. 1, p. 831-841, 2022.

JINKS, E. M.; SMITH, M. F.; ATKINS, J. A.; POHLER, K. G.; PERRY, G. A.; MACNEIL, M. D.; ROBERTS, A. J.; WATERMAN, R. C.; ALEXANDER, L. J.; GEARY, T. W. Preovulatory estradiol and the establishment and maintenance of pregnancy in suckled beef cows. **Journal of Dairy Science**, vol. 91, n. 3, p. 1176-1185, 2013.

JOHNSON, L. A. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. **Reproduction, Fertility and Development**, vol. 7, n. 4, p. 893-903, 1995.

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**, vol. 41, n. 2, p. 199-203, 1989.

KAIM, M.; BLOCH, A.; WOLFENSON, D.; BRAW-TAL, R.; ROSENBERG, M.; VOET, H.; FOLMAN, Y. Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses, and conception. **Journal of Dairy Science**, vol. 86, n. 6, p.2012-2021, 2003.

KONG, J.; SU, F.; LIU, Y.; YANG, Y.; CAO, Y.; QIU, J.; WANG, Y.; ZHANG, L.; WANG, J.; CAO, X. (2022). The pharmacokinetics of buserelin after intramuscular administration in pigs and cows. **BMC veterinary research**, vol. 18, n. 136, 2022.

KURTZ, S.; PETERSEN, B. Pre-determination of sex in pigs by application of CRISPR/Cas system for genome editing. **Theriogenology**, vol. 137, p. 67-74, 2019.

KURYKIN, J.; JAAKMA, U.; JALAKAS, M.; AIDNIK, M.; WALDMANN, A.; MAJAS, L. Pregnancy percentage following deposition of sex-sorted sperm at different sites within the uterus in estrus-synchronized heifers. **Theriogenology**, vol. 67, n. 4, p. 754-9, 2007.

LAUBER, M. R.; MCMULLEN, B.; PARRISH, J. J.; FRICKE, P. M. Short communication: Effect of timing of induction of ovulation relative to timed artificial insemination using sexed semen on pregnancy outcomes in primiparous Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, vol. 103, n. 11, p. 10856-10861, 2020.

LU, Y.; ZHANG, M.; LU, S.; XU, D.; HUANG, W.; MENG, B.; XU, H.; LU, K. Sex-preselected buffalo (*Bubalus bubalis*) calves derived from artificial insemination with sexed sperm. **Animal Reproduction Science**, vol. 119, n. 3-4, p. 169-171, 2010.

LUCENA, J. A.; KENYON, A. G.; REYNOLDS, J. P.; MORENO, J. F.; LENZ, R. W.; CARROLL, D.; LEHENBAUER, T. W.; CHAMPAGNE, J. D.; ALY, S. S. Comparison between low-dose, high-sort and high-dose, low-sort semen on conception and calf sex ratio in Jersey heifers and cows. **Journal of Dairy Science**, vol. 97, n. 3, p. 1782-1789, 2014.

LUSH, J. L. The possibility of sex control by artificial insemination with centrifuged spermatozoa. **Journal of Agricultural Research**, vol. 30, n. 10, p. 893-913, 1925.

- MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; FILHO, E. S.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, vol. 71, n. 8, p. 1289-1297, 2009.
- MADUREIRA, A. M. L.; BURNETT, T. A.; BORCHARDT, S.; HEUWIESER, W.; BAES, C. F.; VASCONCELOS, J. L. M.; CERRI, R. L. A. Plasma concentrations of progesterone in the preceding estrous cycle are associated with the intensity of estrus and fertility of Holstein cows. **PloS one**, vol. 16, n. 8, e0248453, 2021.
- MAICAS, C.; HUTCHINSON, I. A.; KENNEALLY, J.; GRANT, J.; CROMIE, A. R.; LONERGAN, P.; BUTLER, S. T. Fertility of fresh and frozen sex-sorted semen in dairy cows and heifers in seasonal-calving pasture-based herds. **Journal of Dairy Science**, vol. 102, n. 11, p. 10530-10542, 2019.
- MAXWELL, W. M.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F. K.; BATHGATE, R.; DE GRAAF, S. P.; ERIKSSON, B. M.; GILLAN, L.; MORTON, K. M.; O'BRIEN, J. K. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**, vol. 82-83, p. 79-95, 2004.
- MELES, D. K.; MUSTOFA, I.; HARIADI, M.; WURLINA, W.; SUSILOWATI, S.; AMALIYA, A.; SUPARTO, S.; RIMAYANTI, R. The enriched Y-bearing sperm combined with delayed fixed-time artificial insemination for obtaining male Simmental crossbred offspring. **Veterinary World**, vol. 15, n. 1, p. 102-109, 2022.
- MOCÉ, E.; GRAHAM, J. K.; SCHENK, J. L. Effect of sex-sorting on the ability of fresh and cryopreserved bull sperm to undergo an acrosome reaction. **Theriogenology**, vol. 66, n. 4, p. 929-36, 2006.
- MOOREY, S. E.; HESSOCK, E. A.; EDWARDS, J. L. Preovulatory follicle contributions to oocyte competence in cattle: importance of the ever-evolving intrafollicular environment leading up to the luteinizing hormone surge. **Journal of Dairy Science**, vol. 100, n. 7, p. 1-9, 2022.
- MOROTTI, F.; MIGUEZ-GONZALEZ, S.; CEREZETTI, M. B.; SENEDA, M. M. Evaluation of three classification methods of antral follicle count and fertility to the timed artificial insemination in cattle. **Animal Reproduction**, vol. 19, n. 1, p. 20210121, 2022.
- MORUZZI, J. F. Selecting a mammalian species for the separation of X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa. **Journal of reproduction and fertility**, vol. 57, n. 2, p. 319-23, 1979.
- NANIWA, Y.; SAKAMOTO, Y.; TODA, S.; UCHIYAMA, K. Bovine sperm sex-selection technology in Japan. **Reproductive Medicine and Biology**, vol. 18, n. 1, p. 17-26, 2018.
- PANDEY, A. K.; GHUMAN, S. P.; DHALIWAL, G. S.; KUMAR, A.; AGARWAL, S. K. Impact of buserelin acetate or hCG administration on day 12 post-ovulation on subsequent luteal profile and conception rate in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, n. 136, vol. 4, p. 260-267, 2013.
- PEREIRA, M. H. C.; WILTBANK, M. C.; VASCONCELOS, J. L. M. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. **Journal of Dairy Science**, vol. 99, n. 3, p. 2237-2247, 2016.

PERRY, G. A.; WALKER, J. A.; RICH, J. J. J.; NORTHROP, E. J.; PERKINS, S. D.; BECK, E. E.; SANDBULTE, M. D.; MOKRY, F. B. Influence of Sexcel™ (gender ablation technology) gender-ablated semen in fixed-time artificial insemination of beef cows and heifers. **Theriogenology**, vol. 146, p. 140-144, 2020.

PFEIFER, L. F.; MAPLETOFT, R. J.; KASTELIC, J. P.; SMALL, J. A.; ADAMS, G. P.; DIONELLO, N. J.; SINGH, J. Effects of low versus physiologic plasma progesterone concentrations on ovarian follicular development and fertility in beef cattle. **Theriogenology**, vol. 72, n. 9, p. 1237-1250, 2009.

PIREZ, M. C.; STEELE, H.; REESE, S.; KÖLLE, S. Bovine sperm-oviduct interactions are characterized by specific sperm behaviour, ultrastructure and tubal reactions which are impacted by sex sorting. **Scientific reports**, vol. 10, n. 1, p. 16522, 2020.

QUELHAS, J.; SANTIAGO, J.; MATOS, B.; ROCHA, A.; LOPES, G.; FARDILHA, M. Bovine semen sexing: Sperm membrane proteomics as candidates for immunological selection of X- and Y-chromosome-bearing sperm. **Veterinary Medicine and Science**, vol. 7, n. 5, p. 1633-1641, 2021.

REESE, S.; PIREZ, M. C.; STEELE, H.; KÖLLE, S. The reproductive success of bovine sperm after sex-sorting: a meta-analysis. **Scientific Reports**, vol. 11, n. 1, p.17366, 2021.

REVAH, I. e BUTLER, W. R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal of reproduction and fertility**, vol. 106, n. 1, p. 39-47, 1996.

RODRIGUES, W. B.; SILVA, A. S.; SILVA, J. C. B.; ANACHE, N. A.; SILVA, K. C.; CARDOSO, C. J. T.; GARCIA, W. R.; SUTOVSKY, P.; NOGUEIRA E. Timed artificial insemination plus heat II: gonadorelin injection in cows with low estrus expression scores increased pregnancy in progesterone/estradiol-based protocol. **Animal**, vol. 13, n. 10, p. 2313-2318, 2019.

SÁ FILHO, M. F.; MENDANHA, M. F.; SALA, R. V.; CARVALHO, F. J.; GUIMARÃES, L. H.; BARUSELLI, P. S. Use of sex-sorted sperm in lactating dairy cows upon estrus detection or following timed artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, vol. 143, n. 1-4, p. 19-23, 2013.

SALES, J. N.; NEVES, K. A.; SOUZA, A. H.; CREPALDI, G. A.; SALA, R. V.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; FARIA, M DE.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, vol. 76, n. 3, p. 427-435, 2011.

SCHENK, J. L.; CRAN, D. G.; EVERETT, R. W.; SEIDEL, G. E. Jr. Pregnancy rates in heifers and cows with cryopreserved sexed sperm: effects of sperm numbers per inseminate, sorting pressure and sperm storage before sorting. **Theriogenology**, vol. 71, n. 5, p. 717-728, 2009.

SCHENK, J. L.; SUH, T. K.; SEIDEL, G. E. Jr. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. **Theriogenology**, vol. 65, n. 2, p. 299-307, 2006.

SEIDEL, G. E. Jr. Application of sex-selected semen in heifer development and breeding programs. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, vol. 29, n. 3, p. 619-625, 2013.

- SEIDEL, G. E. Jr. Sexing mammalian sperm - Where do we go from here? **The Journal of Reproduction and Development**, vol. 58, n. 5, p. 505-509, 2012.
- SEIDEL, G. E. Jr. Update on sexed semen technology in cattle. **Animal**, vol. 8, p. 160-164, 2014.
- SHEPHARD, R. W. Efficacy of inclusion of equine chorionic gonadotrophin into a treatment protocol for anoestrous dairy cows. **New Zealand veterinary journal**, vol. 61, n. 6, p. 330-336, 2013.
- SUH, T. K.; SCHENK, J. L.; SEIDEL, G. E. Jr. High pressure flow cytometric sorting damages sperm. **Theriogenology**, vol. 64, n. 5, p. 1035-1048, 2005.
- VILLADIEGO, F. A. C.; GUIMARÃES, J. D.; COSTA, E. P. da.; ÁLVAREZ, J. A. C.; LEÓN, V.H.G.; LÓPES, C. J. R. Sêmen sexado através de citometria de fluxo e centrifugação por gradiente de concentração. **Revista de Medicina Veterinária**, n. 36, p. 121-133, 2018.
- VOLPES, A.; SAMMARTANO, F.; RIZZARI, S.; GULLO, S.; MARINO, A.; ALLEGRA, A. The pellet swim-up is the best technique for sperm preparation during in vitro fertilization procedures. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, vol. 33, n. 6, p. 765-770, 2016.
- VRIES, A. de.; OVERTON, M.; FETROW, J.; LESLIE, K.; EICKER, S.; ROGERS, G. Exploring the impact of sexed semen on the structure of the dairy industry. **Journal of Dairy Science**, vol. 91, n. 2, p. 847-856, 2008.
- WOLF, C. A.; BRASS, K. E.; RUBIN, M. I. B.; POZZOBON, S. E.; MOZZAQUATRO, F. D.; DE LA CORTE, F. D. The effect of sperm selection by Percoll or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. **Animal Reproduction**, vol. 55, n. 55, p. 110– 115, 2008.
- YADAV, S. K.; GANGWAR, D. K.; SINGH, J.; TIKADAR, C. K.; KHANNA, V. V.; SAINI, S.; DHOLPURIA, S.; PALTA, P.; MANIK, R. S.; SINGH, M. K.; SINGLA, S. K. An immunological approach of sperm sexing and different methods for identification of X- and Y-chromosome bearing sperm. **Veterinary World**, vol. 10, n. 5, p. 498-504, 2017.
- YANG, W. C.; SANG, L.; XIAO, Y.; ZHANG, H. L.; TANG, K. Q.; YANG, L. G. Tentative identification of sex-specific antibodies and their application for screening bovine sperm proteins for sex-specificity. **Molecular Biology Reports**, vol. 41, n. 1, p. 217-223, 2014.
- YOTOV, S.; FASULKOV, I.; ATANASOV, A.; KISTANOVA, E.; SINAPOV, B.; IVANOVA, B.; YARKOV, D.; ZAIMOVA, D. Influence of Ovarian Status and Steroid Hormone Concentration on Day of Timed Artificial Insemination (TAI) on the Reproductive Performance of Dairy Cows Inseminated with Sexed Semen. **Animals (Basel)**, vol. 13, n. 5, p. 896, 2023.
- ZANGIROLAMO, A. F.; MOROTTI, F.; SILVA, N. C.; SANCHES, T. K.; SENEDA, M. M. Ovarian antral follicle populations and embryo production in cattle. **Animal Reproduction**, v.15, n.3, p.310-315, 2018.

ANEXOS

Anexo A



INSTITUTO DE ZOOTECNIA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA-IZ/UFRRJ

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta de pesquisa intitulada “**Efeito da aplicação de GnRH no momento da Inseminação Artificial sobre a Taxa de Concepção de Vacas Inseminadas com Sêmen Sexado.**” – processo nº 0200-07-2023 – de responsabilidade do Dr. Marco Roberto Bourg de Mello e equipe; que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/IZ/UFRRJ) na LXII Reunião em 01/12/2023.

Finalidade da Proposta: pesquisa

Vigência da Proposta: dezembro de 2025

Área: Ciências Agrárias; Reprodução Animal;

Origem: Fazenda São Pedro

Espécie (quantidade): Bovinos (100 fêmeas)

“**Resumo:** Na bovinocultura de corte e de leite, o sexo do bezerro é um dos fatores determinantes para o bom desempenho do agronegócio. Na pecuária leiteira, a bezerra contribui para o fornecimento de novilhas para reposição e venda de animais com um alto potencial genético. Nesse sentido, a busca por alternativas viáveis que tendem a diminuir o nascimento de machos é fundamental. A utilização do sêmen sexado mostra ser uma ferramenta interessante, porém, o emprego dessa biotécnica deve estar adequado às condições da propriedade, podendo interferir na eficiência reprodutiva do rebanho, principalmente os voltados à eficácia da detecção de cio. O uso da Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) dispensa a necessidade de detecção de cio, favorecendo no aumento da eficiência reprodutiva, em consequência, a produção de leite. Sendo assim, o objetivo do presente estudo será avaliar o efeito da aplicação do GnRH, no momento da inseminação, sobre a taxa de concepção de vacas leiteiras submetidas à IATF com o uso do sêmen sexado, em pequenas propriedades rurais localizadas no semiárido baiano. Para tanto, serão selecionadas 100 fêmeas (nulíparas e múltíparas) com base nas condições físicas e clínicas, considerando o escore de condição corporal, problema de casco, infecções uterinas, entre outros. Em um dia aleatório do ciclo estral (D0), todos os animais passarão pelo exame ginecológico com auxílio do aparelho de ultrassonografia (DP-10 Vet Power Mindray®, transdutor linear transretal; 7,5MHz) e os que estiverem aptos (vazias e sem problema reprodutivo) receberão um dispositivo intravaginal de liberação de progesterona associado a 2 mg de benzoato de estradiol por via intramuscular (im). No D9, ocorrerá a retirada da fonte de progesterona e aplicação de 300 UI de eCG im, 500 µg de Cloprostenol im e 1 mg de cipionato de estradiol. A IATF será realizada 48 horas (D11) após a retirada do dispositivo utilizando o sêmen sexado, simultâneo a avaliação ultrassonográfica para mensuração do diâmetro do folículo pré-ovulatório. No momento da IATF, as fêmeas serão divididas aleatoriamente em dois grupos: Grupo GnRH (GnRH; n = 50) no qual os animais receberão 10µg de acetato de buserelina concomitante a inseminação artificial com sêmen sexado; Grupo Controle (Contr.; n = 50) no qual as fêmeas serão inseminadas com sêmen sexado e não receberão GnRH. O diagnóstico gestacional será realizado 30 dias após a inseminação artificial utilizando ultrassonografia transretal. As taxas de concepção serão comparadas utilizando-se o programa GLIMMIX Procedure (GLIMMIX Procedure, ver. 9.4; SAS Inst., Inc., Cary, NC) com o nível de significância de 5%.”

Seropédica, 19 de dezembro de 2023

Prof. Dr. Rodrigo Vasconcelos de Oliveira
Coordenador da CEUA/IZ/UFRRJ