

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Veterinária

Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal

Juliana Horta Wilke Diniz

**SÊMEN CONVENCIONAL E SEXADO: CARACTERÍSTICAS *IN VITRO* E
FERTILIDADE DE VACAS NELORE COM OU SEM APLICAÇÃO DE
PROTAGLANDINA NO MOMENTO DA IATF**

Belo Horizonte

2021

Juliana Horta Wilke Diniz

Juliana Horta Wilke Diniz

**SÊMEN CONVENCIONAL E SEXADO: CARACTERÍSTICAS *IN VITRO* E
FERTILIDADE DE VACAS NELORE COM OU SEM APLICAÇÃO DE
PROTAGLANDINA NO MOMENTO DA IATF**

Versão Final

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Medicina Veterinária/Ciência Animal em Belo Horizonte, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Reprodução Animal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Letícia Zoccolaro Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. Gabriel Augusto Monteiro

Coorientador: Prof. Dr. Guilherme Pugliesi

Belo Horizonte

2021

D585s Diniz, Juliana Horta Wilke, 1994 -
Sêmen convencional e sexado: características in vitro e fertilidade de vacas Nelore com ou sem aplicação de prostaglandina no momento da IATF/ Juliana Horta Wilke Diniz. -2021.

131 f.:il

Orientadora: Leticia Zoccolaro Oliveira
Dissertação (Mestrado) apresentado à Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Reprodução Animal.

Bibliografias: f. 98 a 128.

Anexo: f. 129.

1. Vaca – Inseminação artificial - Teses - 2. Nelore- Teses - 3. Prostaglandina – Teses -
4. Reprodução animal - Tese - I. Oliveira, Leticia Zoccolaro – II. Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária – III. Título.

CDD – 636.089 26

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569
Biblioteca da Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

JULIANA HORTA WILKE DINIZ

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração Reprodução Animal.

Aprovado(a) em 26 de março de 2021, pela banca constituída pelos membros:

Dr.(a). Leticia Zoccolaro Oliveira - Presidente - Orientador(a)

Dr. Gabriel Augusto Monteiro

Dr. Rogério Fonseca Guimarães Peres

Dr.(a). Janaina Torres Carreira

Dr. Antonio de Pinho Marques Junior



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Zoccolaro Oliveira**, Professora do Magistério Superior, em 26/03/2021, às 14:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rogério Fonseca Guimaraes Peres**, Usuário Externo, em 26/03/2021, às 14:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gabriel Augusto Monteiro**, Professor do Magistério Superior, em 26/03/2021, às 16:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Antonio de Pinho Marques Junior**, Professor do Magistério Superior, em 29/03/2021, às 09:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Janaina Torres Carreira**, Usuário Externo, em 31/03/2021, às 15:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_consultar&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0620705 e o código CRC 9CC59025.

**SÊMEN CONVENCIONAL E SEXADO: CARACTERÍSTICAS *IN VITRO* E
FERTILIDADE DE VACAS NELORE COM OU SEM APLICAÇÃO DE
PROTAGLANDINA NO MOMENTO DA IATF**

Dissertação de mestrado apresentada ao Curso de Medicina Veterinária/Ciência Animal em Belo Horizonte, da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Reprodução Animal.

Prof^a Dr^a Janaína Torres Carreira

Dr Rogério Fonseca Guimarães Peres

Belo Horizonte, março de 2021.

AGRADECIMENTOS

“A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor”, Chico Xavier. E com esta frase, que me acompanha desde muito tempo, hoje consigo ver como é essencial sonharmos e colocarmos amor em tudo que realizamos. O mestrado se tornou um sonho no meio da graduação, e, meu amor pela veterinária, pelos animais e pela ciência, me ajudaram a seguir em frente, aproveitar a jornada e concluí-lo com um saldo enorme de boas amizades, ótimas recordações e muito crescimento pessoal e profissional.

Agradeço a Deus por meu guiar durante toda minha vida, por me dar forças durante momentos difíceis em que a fé era meu único combustível, e por me dar uma família maravilhosa. Agradeço a Nossa Senhora Aparecida, por me acompanhar e resolver tudo o que foge do meu alcance.

À minha querida orientadora, Letícia Zoccolaro, por acreditar no meu potencial e me propor desafios que mudaram minha vida. Por tanta dedicação e amor à pesquisa, é inspirador ver seu compromisso e empenho em cada detalhe dos nossos experimentos. Obrigada por ser muito mais que orientadora durante o mestrado, por ser literalmente minha mãe científica, que sabe ser rigorosa nos momentos necessários, mas tem uma sensibilidade ímpar que consegue nos entender além das palavras e expressões, e oferece tanto carinho, aconchego e coragem.

À minha mãe, Ana Paula, por ser fonte inesgotável de amor, carinho e companheirismo. Por acreditar em mim quando eu mesma não acreditei, por todas as etapas que vencemos juntas e todas aquelas que ainda estão por vir. Você é meu alicerce, quem me deu coragem para ir para as fazendas realizar os experimentos, me ajudou em todos os momentos de apuros, mesmo tão distante fisicamente. Por me ajudar a criar raízes sólidas e asas para voar, para que eu nunca me esqueça da minha essência.

Agradeço à minha avó, Marinha, por ser minha inspiração de fortaleza, desde quando nasci. Por me ensinar tudo que sei sobre persistência, por me encorajar a

seguir meus sonhos e mostrar como a vida é bela, mesmo nas dificuldades. Por ficar acordada tantas noites me esperando acabar de estudar, por cuidar tão bem de mim e sempre se preocupar se estou me alimentando bem nas fazendas, isso é o amor nas suas mais diversas formas.

Ao meu pai, Francisco, por escolher caminhar comigo na estrada da vida, pelo amor na sua forma simples e pura, que nasceu em nossos corações e só nos fortalece a cada dia. Obrigada por me acolher e sonhar junto comigo.

Ao meu irmão, Henrique, pelo seu companheirismo, por me mostrar que cada coisa tem seu tempo, por vibrar comigo a cada conquista, e por me divertir tanto. Sou sua fã.

Às minhas afilhadas, Lara e Ana Beatriz, por serem tão carinhosas e bagunceiras, por encherem a casa de alegria e me proporcionar os melhores momentos de distração ao longo das semanas, vocês são fundamentais na minha vida.

À tia Andreia e tio Cristiano, por todo apoio e companheirismo, por me acolher tão bem, e por estarem presentes em todas as etapas dessa conquista. Vocês fazem parte da minha história. Ao tio André, por vibrar comigo a cada conquista e multiplicar a felicidade da realização deste sonho.

À minha madrinha, Lívia, por cuidar de mim desde quando éramos crianças, por termos uma conexão linda e inexplicável, e por se fazer tão presente.

Ao meu padrinho, Sérgio, meu avô, Chico, e minha bisa, Dona Hilda, por cuidarem de mim aonde quer que estejam, por me fazerem sentir segura e ter certeza que sempre estaremos conectados, é amor além da vida.

À toda minha família, que sempre me apoiou e torceu por mim a cada etapa, cada viagem. Por sempre me receberem de volta com muita festa e alegria. Amo cada um de vocês.

Às minhas filhas de quatro patas, Amora e Nutella, por todos os lambibeijos, arranhões e pulos de felicidade a cada vez que eu voltava pra casa. Por transmitirem amor puro sem precisar de palavras, por serem especialistas em encher meu dia de alegria.

À Camilla, por sua amizade de 26 anos, por estar comigo em todos momentos da minha vida, e por todo amor e carinho! Ao Joubert por todos nossos encontros, conversas e amizade. Vocês fazem parte da minha história.

Ao Eduardo, por ter me ajudado sem medir esforços desde o primeiro experimento no Pará. Por ser grande amigo, confidente, por ser abrigo, meu grande incentivador e companheiro de vida e profissão. Obrigada pelos meses que trabalhamos juntos, por tudo que pude aprender com você, sai muito melhor do que entrei. Obrigada por acreditar no meu potencial e abrir caminhos para que mais dados à campo fossem coletados, enriquecendo nossa pesquisa. Amo você!

À Virgínia, por ser amiga, conselheira e companheira. Por tudo que aprendo com você, por ter se tornado parte da minha história. Obrigada por ser exemplo de força e perseverança, você me inspira a seguir em frente, a lutar pelos meus sonhos. Obrigada por tantas conversas e me ajudar a ressignificar diversas situações de dificuldade. Você foi essencial durante esta etapa maravilhosa da minha vida.

Às minhas companheiras de mestrado, Déborah e Alinne, por todos os momentos vividos dentro e fora de UFMG. Pela amizade linda que construímos e nutrimos, mesmo durante todas as minhas viagens de experimento e, infelizmente, durante a pandemia. Obrigada pela ajuda durante as aulas, artigos, experimentos e toda a nossa rotina dentro do departamento de reprodução animal. Foram dois anos que guardarei com muito carinho em minha memória, e que lembrar deles me traz muita saudade do nosso dia a dia, nossos cafés e conversas. Vocês tornaram a jornada mais leve e alegre!

À Laurinha por toda lealdade e confidencialidade. Obrigada por tanto incentivo, por acreditar no meu potencial e sonhar junto comigo. Por me mostrar um pouco mais do mundo da gestão de dados e da fotografia, por me incentivar a descansar a mente e voltar para o trabalho com toda força.

Aos meus irmãos científicos, Ana e José, por acreditarem tanto na minha pesquisa, por sempre me ajudarem a desenvolver os experimentos, mesmo que fosse necessário ficar sem almoçar, voltar tarde para casa e chegar cedinho na faculdade em pelo final de semana. Obrigada por se empenharem na realização das análises laboratoriais das amostras de sêmen em Uberlândia. Construímos uma linda família científica!

Aos professores da Universidade Federal de Minas Gerais: Dr. Álan Borges, Dr. Antônio de Pinho e Dr. Marc Henry (in memoriam), por estarem presentes durante minha formação transmitindo conhecimentos profissionais e de vida. É uma honra poder aprender com vocês.

Aos meus coorientadores, Dr. Gabriel Augusto Monteiro e Dr. Guilherme Pugliesi, por todo apoio durante minha graduação e mestrado. Obrigada por todas as oportunidades de aprendizado que me proporcionaram, foram fundamentais para o desenvolvimento do projeto.

Ao Dário por me acompanhar desde o primeiro dia da graduação, por entender minha ansiedade e sede de conhecimento nos primeiros semestres da faculdade. Por todas as conversas que tivemos durante os nossos cafés. Por ser um pai dentro da UFMG, me guiando e aconselhando durante os oito anos dentro da instituição.

Aos “amigos veterinários” que me acompanham desde o início da faculdade, a amizade de vocês tornou o caminho muito mais divertido.

Aos professores e funcionários da Escola de Veterinária da UFMG que de alguma forma contribuíram para a realização deste projeto.

Ao Daniel Fonseca, o “Tché”, por me receber de braços abertos durante os experimentos, por compartilhar seus conhecimentos técnicos e científicos com o único propósito de me ajudar na minha formação profissional. Por ter se tornado grande amigo e conselheiro, te admiro muito!

Ao Otacílio, meu primeiro estagiário que se tornou amigo para a vida. Te agradeço por toda ajuda nos experimentos e andrológicos, por ter proporcionado momentos tão divertidos durante nossa estadia na fazenda. Obrigada por torcer tanto por mim e vibrar a cada vitória comigo, sou muito grata por ter te reencontrado.

Ao Rogério Peres, por todo incentivo, pela oportunidade de vivenciar o dia a dia de grandes fazendas de gado de corte, e por ter intermediado a realização de grande parte do experimento.

À Prof^a Dr^a Janaína Torres e Dr. Rogério Peres, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora de defesa, é uma honra tê-los presentes neste momento.

Aos funcionários e amigos que fiz na Agropecuária Fazenda Brasil e AgroSB, vocês foram essenciais para a realização deste projeto, muito obrigada por me receberem tão bem e terem tornado minha família durante os experimentos.

Agradeço especialmente à coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (capes), pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de mestrado.

Agradeço a todos animais que fizeram parte do projeto, por todas informações disponibilizadas.

Obrigada a todos que estiveram de alguma forma envolvidos na realização deste sonho.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina

Resumo

O presente estudo teve por objetivo avaliar a fertilidade do sêmen convencional e sexado utilizado em vacas Nelore multíparas que receberam tratamento com PGF₂ α no momento da inseminação artificial (IA) e expressaram diferentes intensidades de comportamento de estro (com ou sem expressão de estro) em um protocolo de IATF. Adicionalmente o estudo avaliou laboratorialmente as amostras de sêmen sexado e convencional a fim de comparar as características seminais *in vitro* com os resultados de fertilidade obtidos a campo. No experimento a campo, foram avaliadas as taxas de concepção (TC) de vacas multíparas lactantes da raça Nelore locadas em duas fazendas comerciais de gado de corte (fazenda 1: n=348 e fazenda 2: n=355). Em ambas as fazendas, as vacas foram submetidas ao mesmo protocolo de IATF. Quarenta e oito hs após a remoção do dispositivo de Progesterona (dia 11; D11), a IA foi realizada com sêmen convencional ou sexado de dois touros diferentes, de forma aleatória. Adicionalmente, no momento da IA, as vacas receberam, aleatoriamente, 12,5 mg im de dinoprost trometamina (Dinoprost; Lutalyse®; tratamento PGF) ou 2,5 mL im de soro fisiológico estéril (Controle). O comportamento estral foi aferido no D11 (momento da IATF) pela ativação do dispositivo estroTECT®. Os dados foram analisados por regressão logística a um grau de significância de 5%. No experimento laboratorial, foram avaliadas amostras de sêmen sexado e convencional dos dois touros (touros 1 e 2), utilizados na fazenda 1 deste estudo. Foram analisados parâmetros convencionais de qualidade espermática, avaliação da integridade de membrana plasmática (pelo teste hiposmótico), análise computadorizada do sêmen (CASA) e avaliação de morfometria e parâmetros da cromatina espermática pelo Azul de Toluidina. Os dados laboratoriais foram analisados por ANOVA considerando 5% de significância. De acordo com os resultados do estudo a campo, a TC geral foi de 32,8% na Fazenda 1 e 42,3% na Fazenda 2 (P = 0,01). Escore de condição corporal (P = 0,02), comportamento estral (P=0,01) e tipo de sêmen (P <0,001) foram fatores que afetaram a TC. Vacas inseminadas com sêmen convencional tiveram 2,73 vezes mais probabilidade de tornar-se gestantes do que vacas inseminadas com sêmen sexado e vacas exibindo estro tiveram 2,5 vezes mais chance de gestação do que

vacas que não exibiram estro. Nenhum efeito do tratamento com PGF2 α (P=0,67) foi detectado em vacas que receberam sêmen convencional ou sexado. Ainda assim, foi detectada tendência estatística de interação (P=0,08) entre o tratamento (PGF ou controle) e o comportamento estral (estro ou não). O tratamento com PGF2 α no momento da IA aumentou em 70% a TC das vacas que não expressaram estro. Nas análises laboratoriais, o sêmen convencional de ambos os touros apresentou maior (P<0,05) motilidade visual, concentração espermática, espermatozoides móveis na palheta e integridade de membrana plasmática em relação ao sêmen sexado. Nas avaliações pelo sistema CASA, motilidade total (MT) e progressiva (MP) foram significativamente menores nas amostras de sêmen sexado em relação ao convencional no touro 1 (P<0,05). A amplitude de deslocamento lateral de cabeça (ALH) foi maior (P<0,05) no sêmen sexado comparado ao sêmen convencional nos dois animais avaliados. Os resultados de análise morfométrica demonstraram que o touro 2 apresentou menor elipsidade nos espermatozoides sexados em relação ao sêmen convencional (P<0,05), enquanto no touro 1 foi observado menor Fourier1 no sêmen sexado em relação ao convencional. Não foram observadas diferenças na descompactação e heterogeneidade do DNA, quando comparados sêmen convencional e sexado em ambos os touros. Concluiu-se que a fertilidade do sêmen sexado foi menor do que o sêmen convencional, independente do tratamento com PGF2 α . Porém, vacas que não apresentaram estro e receberam o tratamento com PGF2 α no momento da IA demonstraram TC semelhante às vacas em estro, independentemente do tipo de sêmen. Além disso, o processo de sexagem prejudicou diversas características de viabilidade espermática, bem como parâmetros cinéticos e morfométricos dos espermatozoides que estão relacionados com menor capacidade de fertilização deste tipo de sêmen.

Palavras-chave: fertilidade, prostaglandina F2 α , sêmen sexado, morfometria, DNA.

Abstract

The present study aimed to evaluate the fertility of conventional and sexed semen used in multiparous Nelore cows that received PGF₂α treatment at the moment of AI and expressed different intensities of estrus behavior (estrus or no estrus expression) in timed-AI protocol. Additionally, laboratory assessment of sexed and conventional semen was performed in order to compare *in vitro* sperm characteristics with field fertility results. In the field experiment, conception rates (CR) of lactating multiparous Nelore cows from two commercial beef farms (farm 1: n=348 and farm 2: n=355) were evaluated. The animals were submitted to the same timed-AI protocol and 48 hs after the progesterone device removal (day 11; D11), AI was randomly performed with conventional or sexed semen from two different bulls. Additionally, at the time of AI, cows randomly received 12.5 mg im of dinoprost tromethamine (Dinoprost; Lutalyse®; PGF treatment) or 2.5 mL im of sterile saline (Control). Estrus behavior was measured at D11 (moment of timed-AI) by estroprotect® device. The data were analyzed by logistic regression at 5% of significance level. In the laboratory experiment, sexed and conventional semen samples from the bulls (bulls 1 and 2) used in farm 1 were evaluated. Conventional sperm quality parameters, plasma membrane integrity (hyposmotic test), computerized semen analysis (CASA) and sperm morphometry and chromatin (Toluidine Blue) assessment were analyzed. The laboratory data were analyzed by ANOVA at 5% of significance. The overall CR was 32.8% in Farm 1 and 42.3% in Farm 2 (P = 0.01). Body condition score (P = 0.02), estrous behavior (P = 0.01) and semen type (P <0.001) were factors affecting CR. Cows inseminated with conventional semen were 2.73 times more likely to become pregnant than cows inseminated with sexed semen and cows exhibiting estrus were 2.5 times more likely to become pregnant than cows not exhibiting estrus. No effect of PGF₂α treatment (P=0.67) was detected in cows that received conventional or sexed semen. Still, a statistical tendency of interaction (P=0.08) was detected between treatment (PGF or control) and estrous behavior (estrus or no estrus). Treatment with PGF₂α at the time of AI increased by 82% the CR of cows with no estrus behavior. In laboratory analyses, conventional semen from both bulls demonstrated higher (P<0.05) visual motility, sperm concentration, number of motile sperm in the straw and plasma membrane integrity compared to sexed semen. In the CASA assessment, total

(TM) and progressive motility (PM) were significantly lower in sexed semen compared to conventional semen from bull 1 ($P < 0.05$), while from bull 2 a tendency to lower TM and PM ($P = 0.098$ and $P = 0.065$, respectively) were observed for sexed compared to conventional semen. The amplitude of lateral head (ALH) was higher ($P < 0.05$) in sexed semen compared to conventional semen in both animals. The morphometric analysis demonstrated lower ellipsity ($P < 0.05$) in sexed compared to conventional semen for bull 2, while in bull 1, sexed semen presented lower Fourier 1 ($P < 0.05$) compared to conventional semen. No differences were observed in chromatin condensation and heterogeneity comparing conventional and sexed semen in both bulls. It was concluded that the fertility of sexed semen was lower than conventional semen, regardless of PGF 2α treatment. However, cows that were not expressing estrus and received PGF 2α treatment at the time of AI demonstrated similar CR than cows expressing estrus, regardless of semen type. In addition, the sexing process impaired several characteristics of sperm viability, as well as kinetic and morphometric parameters of sperm cells that are related to lower fertilization capacity of this type of semen.

Keywords: fertility, prostaglandin F 2α , sexed semen, morphometry, DNA.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de concepção de vacas multíparas da raça Nelore inseminadas na Fazenda 1, de acordo com o touro (1 ou 2) e tipo de sêmen (convencional ou sexado) utilizado.	63
Tabela 2. Taxa de concepção de vacas multíparas da raça Nelore inseminadas na Fazenda 2, de acordo com o touro (3 ou 4) e tipo de sêmen (convencional ou sexado) utilizado.	63
Tabela 3. Taxa de concepção de vacas multíparas da raça Nelore inseminadas, em duas fazendas comerciais, de acordo com escore de condição corporal (ECC) ($\leq 2,75$ e $> 2,75$).	64
Tabela 4. Taxa de concepção de vacas multíparas da raça Nelore inseminadas, em duas fazendas comerciais, de acordo com expressão de cio (cio ou sem expressão de cio), que, no momento da IA, receberam ou não tratamento com PGF.	65
Tabela 5. Taxa de concepção de vacas multíparas da Nelore inseminadas, em duas fazendas comerciais, de acordo com tipo de sêmen (convencional ou sexado), que, no momento da IA, receberam ou não tratamento com PGF.	65
Tabela 6. Taxa de concepção (%) de vacas Nelore, de acordo com expressão de cio, que receberam ou não tratamento com PGF no momento da IA, e foram inseminadas com sêmen convencional ou sexado.	66
Tabela 7. Taxa de concepção (%) da Fazenda 1, de acordo com o tipo de sêmen (convencional ou sexado) utilizado na IATF de vacas multíparas da raça Nelore	67
Tabela 8. Motilidade visual (%), vigor e integridade de membrana (teste hiposmótico) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento, dos touros 1 e 2.	68
Tabela 9. Concentração espermática e espermatozoides móveis por palheta (SMP) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	69
Tabela 10. Morfologia espermática: defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais, de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	71
Tabela 11. Motilidade total (MT; %), Motilidade progressiva (MP; %) e Espermatozoides rápidos (RAPID; %) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento, dos touros 1 e 2	72

Tabela 12. Parâmetros de cinética espermática obtidos pela análise computadorizada (CASA) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento, dos touros 1 e 2.	74
Tabela 13. Elipsidade, razão entre largura e comprimento da análise morfométrica e fator de forma dos espermatozoides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento, dos touros 1 e 2.	77
Tabela 14. Fourier 1 e Simetria antero-posterior (SAP) da análise morfométrica dos espermatozoides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento, dos touros 1 e 2.	79
Tabela 15. Descompactação do DNA e heterogeneidade cromatínica dos espermatozoides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento, dos touros 1 e 2	80
Tabela 16. Área, perímetro, largura, comprimento, Fourier 0, Fourier 2 e simetria lateral dos espermatozoides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo da biossíntese da Prostaglandina F2 α .	26
Figura 2. Esquema ilustrativo das funções da PGF2 α no sistema neuroendócrino e reprodutivo feminino.	33
Figura 3.- Fatores de crescimento e suas principais funções, expressos em explants de endométrio após o tratamento com Fluprostenol (Adaptado de Zhang et al., 2017).	34
Figura 4. Fases de atuação da PGF2 α durante o ciclo celular e os complexos proteicos regulados por ela (Adaptado de Fu et al., 2020)	35
Figura 5– Ações da alta concentração de estrógeno durante período peri e pós ovolatório	44
Figura 6 – Remoção do dispositivo Estroject® no D11 do protocolo. 1- Animal com expressão de cio, com remoção de tinta >25%. 2- Animal sem expressão de cio, com <25% de remoção de tinta.	56
Figura 7 – Esquema ilustrativo do delineamento experimental	57
Figura 8. Esquema de distribuição de análises laboratoriais para amostras de sêmen congelado dos animais 1 e 2, e sêmen convencional e sexado.	58
Figura 9. Frequência relativa de gestação na IATF (sucesso de gestação %) de acordo com expressão de cio (com cio ou sem cio) de vacas Nelore múltíparas em lactação que receberam ou não tratamento com PGF no momento da inseminação artificial (IA) com sêmen sexado ou convencional; barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si (P<0,05).	67
Figura 10. Teste hipo-osmótico (%) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	69
Figura 11. Concentração espermática (x10 ⁶ /mL) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	70
Figura 12. Espermatozoides viáveis na palheta (x10 ⁶ /0,25mL) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	70
Figura 13. Motilidade espermática total (MT) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	72

Figura 14. Motilidade espermática progressiva (MP) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	73
Figura 15. Espermatozoides com velocidade rápida (RAPID) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	73
Figura 16. Velocidade do trajeto (VAP) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	75
Figura 17. Linearidade (LIN) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	75
Figura 18. Amplitude lateral da cabeça (ALH) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	76
Figura 19. Elipsidade dos espermatozóides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	77
Figura 20. Fator de forma dos espermatozóides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	78
Figura 21. Fourier 1 dos espermatozóides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2	79
Figura 22. Simetria antero posterior dos espermatozóides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALH	Amplitude Lateral da Cabeça
BCF	Frequência de Batimentos
BE	Benzoato de estradiol
CA2+	Cálcio
CE	Cipionato de estradiol
CL	Corpo lúteo
COX1	Ciclooxigenase 1
COX2	Ciclooxigenase 2
DF	Folículo dominante
E2	Estrógeno
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
ESR1	Receptor α de estrógeno
ET1	Endotelina 1
FLA2	Fosfolipase A2
FSH	Hormônio folículo estimulante
h	hora
HIPO	Hipo-osmótico
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IFNu	Interferon tau
INDO	Indometina
IP	Iodeto de propídio
LH	Hormônio luteinizante
LIN	Linearidade
LT	Leucotrienos
MMP	Metaloproteinases
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
OXT	Ocitocina

OXTR	Receptor de ocitocina
P4	Progesterona
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2α	Prostaglandina F2 α
PGH2	Endoperóxido sintetase
PGHS	Endoperóxido cíclico
PGI2	Prota-ciclina
PGs	Prostaglandinas
PKC	Proteína kinase C
PTGFR	Receptores de PGF2 α
RAPID	Células com Velocidade Rápida
SMP	Espermatozoides móveis por palheta
STR	Retilinearidade
TIMP-4	Inibidor de metaloproteinase
tPA	Plasminagênio
TC	Taxa de concepção
TX	Troboxenos
VAP	Velocidade de Trajeto
VCL	Velocidade Curvilinear
VSL	Velocidade Progressiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. Prostaglandina na reprodução bovina	24
2.2. Luteólise	27
2.3. Outras funções da PGF2 α	29
2.4. Inseminação artificial em tempo fixo	36
2.5. Expressão de cio	42
2.6. Sêmen sexado comercialmente utilizado em bovinos	44
3. HIPÓTESES	52
4. OBJETIVOS	53
4.1. Objetivo geral	53
4.2. Objetivos específicos	53
5. MATERIAL E MÉTODOS	54
5.1. Experimento a campo	54
5.1.1. <i>Local e animais</i>	54
5.1.2. <i>Manejo reprodutivo</i>	54
5.1.3. <i>Detecção de cio e escore de condição corporal</i>	55
5.1.4. <i>Diagnóstico de gestação</i>	56
5.2. Análise laboratorial de sêmen congelado	58
5.2.1. <i>Amostras de sêmen congelado</i>	58
5.2.2. <i>Análise laboratorial</i>	58

5.2.3. <i>Análise convencional de sêmen</i>	59
5.2.4. <i>Teste Hipo-osmótico</i>	59
5.2.5. <i>Análise computadorizada de cinética espermática</i>	59
5.2.6. <i>Análise computadorizada de morfometria e estrutura cromatínica</i>	60
5.3. Análises estatísticas	61
5.3.1. <i>Experimento a campo</i>	61
5.3.2. <i>Experimento laboratorial</i>	62
6. RESULTADOS	62
6.1. Experimento a campo	62
6.2. Experimento laboratorial	67
7. DISCUSSÃO	81
7.1. Experimento a campo	81
7.2. Experimento laboratorial	88
7.3. Considerações finais	96
8. CONCLUSÃO	97
9. REFERÊNCIAS	98

1. INTRODUÇÃO

A utilização de sêmen sexado não tem sido aplicada em larga escala na bovinocultura de corte devido aos baixos índices de gestação encontrados com este tipo de sêmen (Seidel e Garner, 2002; Seidel e Schenk, 2002; Sá Filho et al., 2011). Embora o atraso do momento da inseminação melhore a fertilidade de vacas que recebem sêmen sexado (Thomas et al., 2004; Sales et al., 2011a), cabe destacar que manejos adicionais necessários para melhores índices de gestação com o uso desta biotecnologia podem dificultar a rotina de trabalho de muitas propriedades, tornando-a menos viável neste cenário.

A taxa de concepção (TC) com a utilização de espermatozoides sexados é geralmente menor do que com sêmen convencional (Thomas et al., 2004; Sá Filho et al., 2011; Sá Filho 2012; Sales et al., 2011a). Carvalho et al. (2018) demonstraram que a sexagem por citometria de fluxo afeta a longevidade e as características estruturais das células espermáticas. Além disso, foi demonstrado que a alta porcentagem de membranas plasmáticas desestabilizadas pode ser uma indicação de que o procedimento de sexagem induz mudanças que se assemelham à capacitação espermática (Carvalho et al., 2013)

Os espermatozoides que sofrem processo de sexagem podem ser afetados de diversas formas, tanto na cinética espermática quanto em sua morfometria e compactação de DNA. Alterações na cinética espermática podem reduzir a probabilidade de fecundação do oócito, pois os espermatozoides enfrentam dificuldades para chegar até o sítio de fertilização e/ou em transpor barreiras físicas presentes ao longo do útero (Wrobel e al., 1993; Kunz et al., 1996; Kolle et al., 2009; Okabe, 2018).

A morfometria e a cromatina espermática também podem ser afetadas diretamente pela sexagem, a partir de danos subclínicos que o DNA sofre durante processo de sexagem. Danos estes que são exibidos ao longo do tempo, como descrito por Gonsálvez et al. (2011a). A cabeça espermática pode apresentar alterações de forma e dimensões de acordo com o estado do seu conteúdo. Assim, uma vez que grande porcentagem da cabeça espermática é formada por DNA e que a integridade do mesmo é fundamental para o sucesso da fecundação e do desenvolvimento embrionário, análises de cromatina e

morfometria espermática podem fornecer informações importantes sobre a capacidade de fertilização do espermatozoide analisado (Beletti e Costa, 2003; Beletti et al., 2005; Ostermeier et al., 2001).

Avanços nos procedimentos de seleção do sexo dos espermatozoides durante a citometria de fluxo aumentaram a probabilidade de prenhez em vacas inseminadas com sêmen sexado (Schenk et al., 2009; Thomas et al., 2017), principalmente quando intervalos mais longos da indução da ovulação até o momento da IA são aplicados (Thomas et al., 2004; Sá Filho et al., 2011; Sá Filho 2012; Sales et al., 2011a). No entanto, atrasar o tempo para a realização da IA a fim de realizar a inseminação mais próxima ao momento de ovulação pode interferir em algumas programações de fazendas para o manejo do gado, o que pode dificultar sua incorporação em programas reprodutivos de fazendas comerciais de gado de corte. Assim, estudos que pretendem aumentar a fertilidade do sêmen sexado em programas de IA sem que sejam necessárias a realização de mudanças abruptas no manejo durante a estação de monta parecem ser fundamentais para uma aplicabilidade em larga escala de espermatozoides sexados na bovinocultura de corte.

A eficácia do tratamento com prostaglandina F₂α (PGF₂α) como estímulo ovulatório por um mecanismo independente da lutólise foi demonstrada em vários estudos. De acordo com Leonardi et al (2012), o tratamento com PGF₂α induziu ovulação em novilhas pré-púberes, independentemente do pré-tratamento com progesterona (P₄) exógena. Da mesma forma, Pfeifer et al (2014) demonstraram a eficácia da PGF₂α como estímulo ovulatório em substituição ao estrógeno (E₂) em protocolos de inseminação artificial (IA), tanto em vacas em lactação quanto em novilhas. Além disso, estudos realizados com diversas espécies demonstraram que a administração de inibidores de síntese de prostaglandinas antes do pico de LH endógeno inibiu a ovulação (Armstrong e Grinwich, 1972; Sirois et al., 2000), e que as prostaglandinas induzem aumento de expressão de metaloproteinases (enzimas proteolíticas) durante o período periovulatório, podendo ser um potencial mecanismo para regular a ovulação (Li et al., 2006; Fortune et al., 2009).

Um fator importante para altas taxas de ovulação e gestação em protocolos de IA em tempo fixo (IATF) é o tamanho do folículo dominante (DF) e/ou a intensidade do comportamento estral (Perry et al., 2007; Sá Filho et al., 2011; Sá

Filho et al., 2012; Pugliesi et al., 2016), uma vez que a expressão do estro durante a IATF tem sido positivamente associada ao aumento da fertilidade em vacas leiteiras (Pereira et al., 2015) e de corte (Pohler et al., 2016; Rodrigues et al., 2018).

Assim sendo, formulamos a hipótese de que a administração de PGF2 α no momento da IA, por auxiliar e/ou acelerar a ovulação de animais tratados, pode melhorar a fertilidade de vacas que recebem sêmen sexado, excluindo a necessidade de atrasar o momento da inseminação.

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de concepção de vacas múltiparas lactantes da raça Nelore que receberam o tratamento de PGF2 α no momento da IATF e comparar os efeitos da PGF2 α no momento da IA em vacas inseminadas com sêmen sexado ou convencional, expressando diferentes intensidades de comportamento estral (com ou sem expressão estro). Adicionalmente, considerando que o processo de sexagem do sêmen pode causar alterações de cinética, morfometria e DNA espermático, que, em conjunto, afetam negativamente a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides, o presente estudo objetivou avaliar *in vitro* as amostras de sêmen convencional e sexado utilizados no estudo a campo, a fim de melhor compreender os resultados de fertilidade obtidos *in vivo*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. PROSTAGLANDINA NA REPRODUÇÃO BOVINA

As prostaglandinas (PGs) são um conjunto de substâncias produzidas em grande variedade de células do organismo, fazem parte da classe dos eicosanóides, do grego eicosi (“vinte”), por terem 20 carbonos em sua composição. Esta classe é composta por leucotrienos (LT), prosta-ciclinas (PGI₂), tromboxanos (TX) e prostaglandinas. São hidróxidos de ácidos graxos insaturados cíclicos sintetizados na membrana celular a partir de cadeias de ácidos graxos, fosfolipídeos ou triglicerídeos, que darão origem ao ácido araquidônico, principal precursor. (Norman, 1997)

Os eicosanoides são moléculas sinalizadoras que possuem ação local, sintetizados pela maioria das células nucleadas, quando existe, principalmente, estímulo de infecção, lesão, ação hormonal e estresse (Funk, 2001; Buczynski et al., 2009). exercem seus efeitos localmente através de mecanismos de receptores específicos de membrana (Wada et al., 2007; Dennis e Norris, 2015). Atuam nos tecidos alvo dos hormônios produzidos pela hipófise como a tireoide, adrenal, ovários e testículos. Atuam também no músculo liso dos sistemas reprodutivo, gástrico, respiratório e cardiovascular. Suas ações são múltiplas e em diversos locais, como descrito acima, participam de processos fisiológicos diversos como regulação da pressão arterial, dilatação dos brônquios, contração uterina; processos inflamatórios desencadeados por lesões ou infecções; coagulação sanguínea; dor; febre; secreção de suco gástrico, entre diversas outras atividades (Harizi et al., 2008; Tarnawski et al., 2013; Ricciotti e FitzGerald, 2011; Dennis e Norris, 2015; Seo e Oh, 2017)

Dentre as prostaglandinas existem diferentes variações, sendo que as do tipo E e F são as mais abundantes e exercem papel importante no organismo. Elas são divididas de acordo com a quantidade de duplas ligações, uma, duas ou três, em suas cadeias laterais, formando os subgrupos: PGE₁, PGE₂ ou PGE₃; PGF₁, PGF₂ ou PGF₃. (Norman, 1997)

As PGs, consideradas sinalizadores semelhantes a hormônios (Smith et al., 1996; Wiktorowska-Owczarek et al., 2015), diferem de hormônios verdadeiros por serem formadas em grande quantidade e variedade de tecidos no organismo.

Em razão de sua meia vida muito curta, as PGs atuam de forma parácrina, em células a curta distância, em células vizinhas, ou de forma autócrina, nas células que a produzem, através da íntima interação com receptores presentes no núcleo ou membrana celulares (Narumiya e FitzGerald, 2001; Harizi et al., 2008), no entanto, em alguns casos atuam em tecidos distantes de maneira endócrina (Champe, 1996; Randall, 2011). Segundo Norman et al. (1997), hormônios são moléculas secretadas ou produzidas por glândulas ou células específicas, e atuam como mensageiros químicos ou sinalizadores, e estão presentes em pequenas quantidades na circulação sanguínea para serem transportadas até o sítio de ação.

Os eicosanóides são derivados de ácidos graxos eicosanoicos (com 20 carbonos) que são sintetizados a partir de ácidos graxos essenciais. Esses compostos são adquiridos através da alimentação e os principais são: ácido linoleico (18:2), que possui a primeira insaturação no carbono seis desde o carbono Ômega (terminal metila), sendo denominado de Ômega 6; e o ácido linolênico (18:3), que é chamado de Ômega 3, por possuir sua primeira insaturação no carbono três, desde a terminal metila (Wathes et al., 2007). O ácido linoleico dá origem às prostaglandinas mais abundantes, PGE e PGF das classes 1 e 2, além das outras substâncias eicosanoídes, PGI₂, LT e TX, o ácido linolênico é responsável por originar as prostaglandinas do subgrupo 3, presentes em menor quantidade (Norman, 1997).

Os ácidos graxos poliinsaturados, adquiridos através da alimentação, são armazenados nos fosfolípidios de membrana celular de forma esterificada, são incorporados através de ligação éster, e podem estar presentes nos triglicerídeos (Wathes et al., 2007). A primeira etapa da cascata de formação das prostaglandinas é a quebra dos fosfolípidios através da fosfolipase A₂ (FLA₂), essa enzima tem sua ativação dependente da liberação de cálcio (Ca⁺) estocado intracelular, no retículo endoplasmático, através da ativação da proteína quinase C (PKC) (Poyser, 2005). O ácido araquidônico, liberado na reação anterior, sofre ação das cicloxigenases 1 ou 2 (COX1 ou COX2) formando PGG₂, que é o produto imediato da reação. A PGG₂ sofre ação de prostaglandina endoperóxido sintetase (PGHS) que incorpora oxigênio à molécula, oxidando-a e formando o endoperóxido cíclico (PGH₂) (Chan et al., 2002; Schuster et al., 2015), como demonstrado na figura 1. Este último pode dar origem aos diferentes subgrupos

de prostaglandinas PGD₂, PGE₂ e PGF₂α, após sofrer processo de isomerização (Norman, 1997; Watanabe, 2011; Schuster et al., 2015).

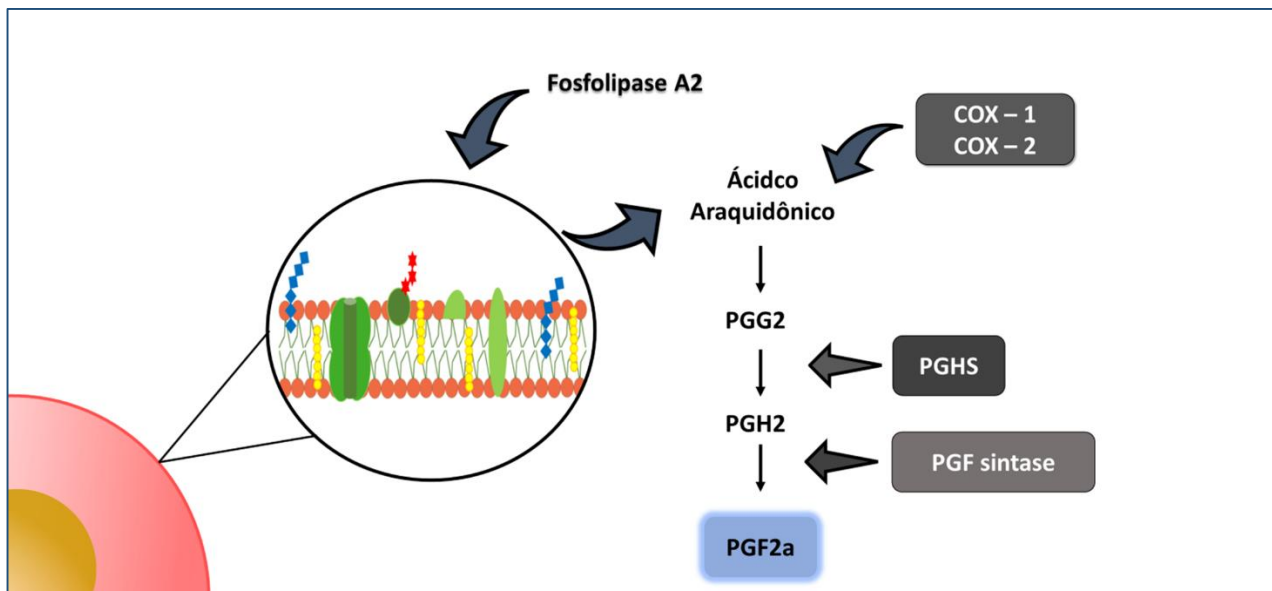


Figura 1. Esquema ilustrativo da biossíntese da Prostaglandina F₂α.

As prostaglandinas são inativadas por enzimas presentes nos pulmões, fígado, rins, baço e placenta. A principal enzima envolvida no processo, e a que exerce papel clínico importante, é a 15-hidroxi-prostaglandina dehidrogenase (15-PGDH), que oxida o grupo hidroxila 15, posteriormente ocorre remoção de dupla ligação entre os carbonos C13-14e conversão em PMGs através da enzima 13,14-prostaglandina redutase. Os metabolitos PGFM e PGEM são derivados de PGF₂α e PGE₂, respectivamente, e possuem meia-vida mais longa do que seus precursores, podendo ser usados para monitorar níveis de prostaglandinas a circulação (Behrman e Cadwell, 1986; Basu et al., 1984).

A PG₂α está envolvida na regulação de importantes funções fisiológicas no organismo (Basu 2007). Tem seus efeitos principalmente na musculatura lisa, trato respiratório, gastrointestinal e reprodutivo. Na musculatura lisa vascular a PGF₂α tem função vasoconstritora, ao contrário da PGE₂, que atua como vasodilatadora (Cheng e Harris, 2004). No trato gastrointestinal a PGF₂α atua tanto na musculatura longitudinal quanto na circular, em ambas exerce função de ativar a contração, porém, na última, a contração é mais forte (Wang et al.

2005). No sistema respiratório, da mesma forma que nos demais citados acima, a PGF2 α exerce função de estimular a contração da musculatura lisa local (Steiropoulos et al., 2008).

No trato reprodutivo masculino, a PGF2 α exerce algumas funções, ainda que pouco elucidadas, parece estar ligada a indução do pico de LH, que antecede o pico de testosterona (Kiser et al., 1976). Durante o processo da ejaculação a molécula favorece o aumento da contratilidade do músculo liso presente na região testicular e de glândulas acessórias, influenciando a liberação de espermatozoides (Berndtson et al., 1979).

2.2. LUTEÓLISE

A luteólise consiste no processo de mudança estrutural do corpo lúteo (CL), com sua gradual involução e perda de função glandular. Nas vacas, a PGF2 α , considerada o principal agente luteolítico, durante a fase de luteólise, é produzida em dois momentos durante a fase luteal do ciclo estral (Sirois, 1994; Tsai e Wiltbank, 1997; Meidan et al., 2005). O primeiro ocorre na fase inicial do desenvolvimento do CL, durante altas concentrações de LH no organismo, o que estimula a produção de COX-2 intraluteal e posterior produção de PGF2 α -luteal (Sirois, 1994; Tsai et al., 1996; Kawaguchi et al., 2013) O segundo pico ocorre durante a fase luteal final, onde há intensa produção de PGF2 α pelo útero. Aparentemente, por mecanismo de contracorrente existente entre útero e ovários, a PGF2 α produzida na fase de luteólise é transportada pela artéria ovariana e não entra na circulação pulmonar evitando sua inativação (Hixon e Hansel, 1974).

A PGF2 α parece exercer papéis antagônicos no CL dependendo do tipo celular predominante e, conseqüentemente, na fase que a estrutura se encontra (Braden et al., 1988; Niswender, 2002). A PGF2 α , produzida localmente no CL, tem ação luteotrófica, juntamente com o LH, afetando a proliferação celular, e atua estimulando a produção de P4 pelas células luteias pequenas, presentes em maior quantidade durante a fase luteal inicial (Hansel e Blair; 1996; Schams e Berisha, 2004; Meidan et al., 2005). Com o desenvolvimento do CL, as células luteais grandes aumentam em relação às pequenas, concomitantemente aumenta a sensibilidade da estrutura aos efeitos luteolíticos da PGF2 α durante a

segunda metade da fase luteal, promovendo a cascata de eventos da luteólise (Alila et al., 1988; Hansel et al., 1991; Schams e Berisha, 2004; Meidan et al., 2005).

A refratariedade do CL à ação luteolítica da $PGF2\alpha$ na fase inicial de seu desenvolvimento parece estar ligada ao tipo celular que compõe o CL e a fase luteal, como descrito acima (Hansel et al., 1991; Girsh et al., 1995; Grazul-Bilska et al., 1997). Além disso, a $PGF2\alpha$ estimula a comunicação intercelular através de junções tipo GAP nas células luteias pequenas, ação importante para que o crescimento celular e metabolismo ocorra de maneira coordenada (Grazul-Bilska et al., 1996; Grazul-Bilska et al., 1997). A comunicação intercelular exerce papel importante na produção de P4 pelo CL, demonstrando que a $PGF2\alpha$ parece ter forte ação positiva na produção esteroidogênica luteal inicial (Grazul-Bilska et al., 1996; Meidan et al., 2005).

Pesquisadores observaram que um peptídeo, denominado endotelina 1 (ET-1), expresso nos ovários, está diretamente ligada ao processo de luteólise. O ET-1, ao se ligar ao receptor específico, ETa, inibe a produção de P4 nas células luteais (Hinckley e Milvae, 2001; Anderson et al., 2001; Shirasuna et al., 2004). A $PGF2\alpha$ regula positivamente a expressão e produção do peptídeo citado. Em experimento com aplicação de $PGF2\alpha$ em CL com até 5 dias ou mais, observou-se que as glândulas mais novas não apresentaram expressão de ET-1 mRNA, produção do peptídeo e luteólise após o tratamento. Em contrapartida, o tratamento provocou rápido aumento na expressão de ET-1 mRNA e produção de ET-1 no CL mais velho, com mais de 5 dias, coincidindo com o momento em que o CL se torna responsivo à ação luteolítica da $PGF2\alpha$, o que sugere que a habilidade em produzir o peptídeo em questão é um pré-requisito para início da luteólise (Levy et al., 2000; Levy et al., 2001; Wright et al., 2001; Shirasuna et al., 2004).

Durante os dias 5 e 11 da fase luteal, a alta concentração de P4 produzida pelo CL é capaz de inibir diretamente a expressão receptores α de estrógeno, ESR1, e indiretamente os receptores de ocitocina, OXTR, no endométrio (Fleming et al., 2006). A longa e continua secreção de P4 durante a fase luteal resulta em regulação negativa de receptores específicos presentes no tanto no endométrio, quanto no hipotálamo (Monguilewsky e Renaud, 1979), permitindo que ocorra rápido aumento de expressão de ESR1 (Spencer e Bazer, 2004). O

E2, sendo capaz de atuar nos seus receptores, estimula a expressão de receptores de ocitocina, OXTR, entre os dias 12 e 14 (Fleming et al., 2006). Sua ação no hipotálamo estimula liberação de ocitocina (OXT) em alta frequência com baixas concentrações. Ao se ligar em seus receptores uterinos, a OXT promove produção de IP3 que estimula o retículo endoplasmático rugoso a liberar Ca^{2+} intracelular armazenado. O Ca^{2+} ativa a PKC que, posteriormente, ativa a FLA2, enzima que quebra a cadeia de fosfolipídios da membrana celular e libera o ácido araquidônico, promovendo a produção de $\text{PGF}2\alpha$ pelo útero (Poyser, 2005, Blanks et al., 2007).

A $\text{PGF}2\alpha$ uterina, mesmo em baixa concentração inicialmente, se liga aos seus receptores de alta afinidade presentes no CL, dando início à produção de OXT luteal. A produção suplementar de OXT volta para o útero e amplifica a produção de $\text{PGF}2\alpha$ no mesmo. A $\text{PGF}2\alpha$ em altas concentrações, irá atuar no CL dando início à cascata de eventos da luteólise, inibindo produção de $\text{P}4$, e estimulando ainda mais a produção de OXT, que reforçará a liberação de $\text{PGF}2\alpha$ pelo útero (McCracken et al., 1999; Hayashi et al., 2003). A partir daí, ocorrerá a luteólise estrutural, relacionada com a morte celular do CL, e luteólise funcional, relacionada com a perda da capacidade de produção de $\text{P}4$ (Rueda et al., 1997).

2.3. OUTRAS FUNÇÕES DA $\text{PGF}2\alpha$

Além da comprovada ação luteolítica, a $\text{PGF}2\alpha$ parece atuar no eixo hipotalâmico-hipofisário, estimulando secreção de LH e posterior ciclicidade ovariana (Warberg et al., 1976; Randel et al., 1996).

Warberg et al. (1976) demonstraram que a infusão de $\text{PGF}2\alpha$ intracerebral em ratos estimulou aumento expressivo na liberação de LH, observando aumento do mesmo no plasma arterial. Randel et al. (1996), desenvolveram experimento com vacas de corte, primípara e múltiparas, com 30 dias pós-parto. Os pesquisadores, de forma aleatória, trataram os animais com diferentes concentrações de $\text{PGF}2\alpha$ sintético, 0,1,2 ou 3 mg/100kg i.m, adicionalmente, também de forma aleatória, os animais receberam 0 ou 100 ug de GnRH. Foram coletadas amostras de sangue durante 6 hs após o tratamento para a análise de concentrações séricas de $\text{P}4$ e LH. Os resultados do estudo demonstram que o

tratamento com GnRH não influenciou na liberação de LH, sendo similar entre os grupos. Por outro lado, os animais que receberam PGF2 α + 100 ug de GnRH apresentaram maior concentração sérica de LH (ng/mL) após o tratamento, em relação ao grupo que recebeu não recebeu PGF2 α , indicando que a PGF2 α facilita a ação do GnRH em estimular a liberação de LH pela pituitária. Adicionalmente, outros trabalhos demonstraram que animais com baixa concentração de E2 circulante, característico de período de anestro pós-parto e pré puberdade, tem aumento de responsividade da hipófise ao GnRH quando previamente expostas à PGF2 α (Randel et al., 1996).

Pfeifer et al. (2009), ao trabalharem com indução de puberdade em novilhas, observaram que animais que receberam implante de P4 por 5 dias e PGF2 α , no dia da retirada do implante, apresentaram tendência de maior taxa ovulação em comparação com aquelas que receberam apenas implante P4 (P=0,09). A P4 provavelmente reduz o número de receptores de estradiol presentes no hipotálamo, assim, o efeito de feedback negativo que o E2 exercia no eixo hipotalâmico-hipofisário diminui, pois, sua ação se torna limitada pela menor quantidade de receptores para E2. Além disso, os resultados tendem a melhorar com a associação de PGF2 α , que estimula a responsividade da hipófise ao GnRH (Day et al., 1987; Randel et al., 1996).

No ovário, a PGF2 α está presente não somente no período de luteólise como também parece estar diretamente relacionada às funções foliculares. Trabalhos realizados inicialmente com coelhos e camundongos (Armstrong e Grinwich, 1972; Orczyk e Behrman, 1972) e, posteriormente com diversas espécies, como suínos, vacas e ovelhas (Sirois et al., 2000), demonstraram que, quando administrado indometina (INDO) ou aspirina (inibidores de síntese de prostaglandina), um pouco antes do pico de LH, os animais apresentaram bloqueio de ovulação. Outro resultado foi a queda da concentração de PGF2 α no plasma, pituitária e hipotálamo após o tratamento com inibidores de COX em comparação com animais controle (Lau et al., 1974; Grinwich et al, 1972; Ainsworth et al., 1979).

Logo antes da ovulação, durante o pico de LH, ocorre significativo aumento de concentração de PGF2 α e PGE2 no fluido intrafolicular e, a administração de INDO foi capaz de inibir esse aumento, reforçando o papel da prostaglandina nos folículos (Yang et al, 1974; Armstrong et al., 1974; Tsang et

al., 1979). Esse aumento de concentração de PGs provavelmente ocorre pela síntese de COX-2, na camada de células da granulosa, induzido pelo aumento de repentino de LH, e pela regulação positiva de PG sintase nos folículos pré-ovulatórios, que são enzimas chave no processo de síntese de PGs (Curry et al., 1987; Hedin et al., 1987; Huslig et al., 1978; Sirois, 1994). Nos bovinos, observou-se aumento de COX-2 18 hs e ovulação 28 hs após administração de hCG, GnRH ou onda natural de LH (Liu et al., 1997; Sirois, 1994; Tsai et al., 1996).

O aumento de PGF₂ α , local no momento periovulatório, como descrito acima, é importante por promover a contração do musculo liso presente nos ovários. A contratilidade ovariana de vacas não prenhes ocorre de forma rítmica, lenta e forte, e a sensibilidade dos ovários à PGF₂ α diminui durante a gestação. Isto promove aumento da pressão local e força a protusão do estigma ovulatório (Senger, 2003; Singh et al., 1979).

O pico de LH inicia cascata de atividades proteolíticas que são capazes de remodelar o tecido folicular durante a ovulação (Robker et al., 2000). Os grupos de enzimas proteolíticas envolvidos no processo são as metaloproteinases (MMP), que atuam na degradação de matriz extracelular e membranas basais, e as ativadoras de plasminogênio (tPA), que tem ação fibrinolítica (Smith et al., 2002). Li et al. (2006) testaram o efeito de injeção intrafolicular de INDO, em vacas holandesas, sobre a produção de enzimas proteolíticas envolvidas na ovulação. O estudo mostra que o fármaco foi capaz de aumentar a quantidade de RNAm para TIMP-4 (inibidor de metaloproteinase 4) nas células da teca, e de proteína TIMP-4 no ápice do folículo. Além disso, ocorreu supressão de RNAm e atividade de tPA nas células da granulosa e fluido folicular, além da atenuação de tPA no ápice do folículo. Com os dados do estudo, sugere-se que as prostaglandinas exercem papel chave na expressão de metaloproteinases e tPA, podendo ser um potencial mecanismo de regulação da ovulação.

Uma nova família de metaloproteinases, as ADAMTS, foi descrita e seus subtipos foram mensurados nas células da teca e granulosa de folículos pré e periovulatórios (0 e 24 hs após GnRH) (Medan et al., 2003). As ADAMTS, principalmente 1 e 9, degradam proteoglicanos, como o versicano, que é componente da membrana basal folicular. É possível que essas proteases

ajudem na quebra da membrana que separa teca e granulosa, auxiliando na formação do CL (McArthur et al., 2000; Somerville et al., 2003) O RNAm dos subtipos ADAMTS 1 e 9 foram regulados positivamente após onda de LH/FSH em culturas de células da granulosa e teca. Ao testar os efeitos de LH, PGE2 ou PGF2 α na produção das ADAMTS, observaram que as PGs aumentaram a produção de RNAm da ADAMTS1, semelhante ao LH, e, apenas a PGE2 apresentou efeito positivo no RNAm de ADAMTS9, mimetizando a ação de LH. Sabendo que a produção de PGs é induzida nas células da granulosa pela onda de gonadotropina, foi testado a produção de metaloproteinases em culturas celulares com adição de LH e inibidor de COX-2. A produção de PGs foi diminuída, em comparação com o grupo controle, e o incremento na produção de RNAm de ADAMTS1 foi diminuído, o que não foi observado para ADAMTS9, sugerindo importância da PGF2 α na regulação de metaloproteinases no folículo pre ovulatório (Fortune et al., 2009).

Recentemente, Willis et al. (2017), estudaram efeitos das PGs e P4 na produção de RNAm de ADAMTS em folículos periovulatórios de vacas. A P4 associada a PGE2 favoreceu a produção de RNAm de ADAMTS1 e 9, enquanto a associação com PGF2 α favoreceu ADAMTS1, corroborando os resultados obtidos por Fortune et al. (2009). O aumento de ADAMTS1, em culturas com PGF2 α , ocorreu após 12 hs e o aumento mais robusto ocorreu 24 hs após o início do cultivo. A PGE2 apresentou perfil temporal diferente, sendo que o aumento de ADAMTS1 e 9 ocorreu entre 24 e 36 hs. O aumento de P4 e seus receptores na granulosa, durante a segunda metade do período periovulatório, parecem ajudar a manter a abundância de ADAMTS.

Na Figura 2 é possível visualizar um resumo das ações não luteolíticas da PGF2 α (ou seja, efeitos da PGF2 α além da luteólise).

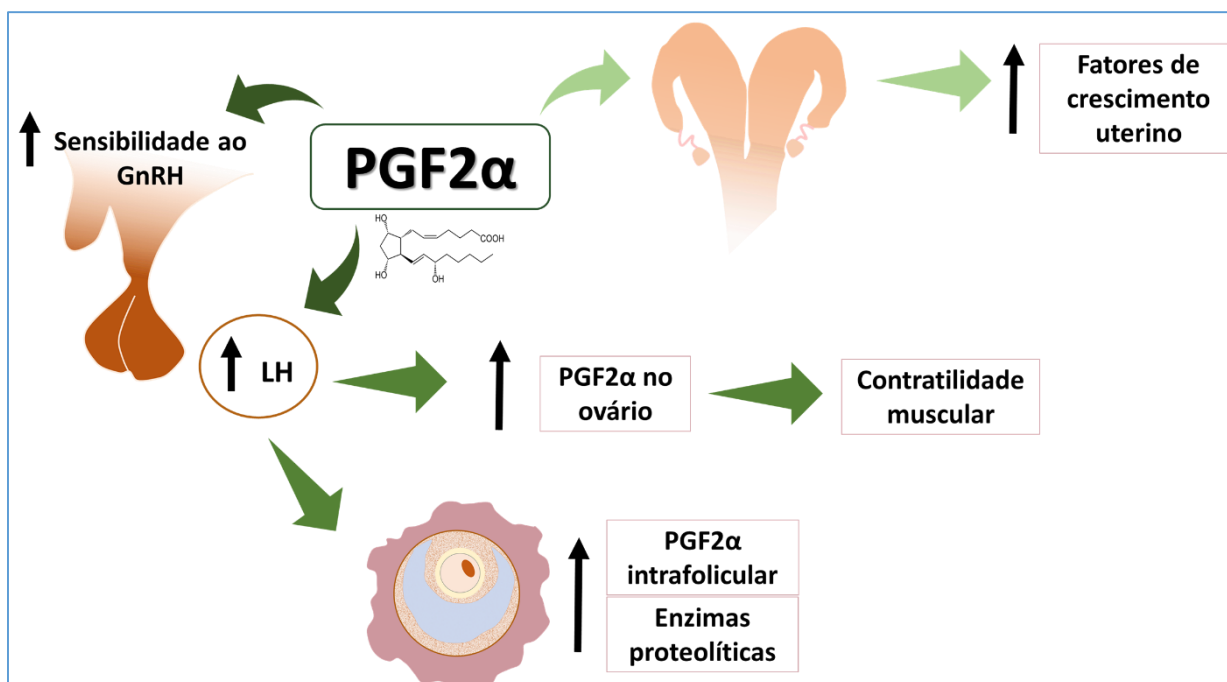


Figura 2. Esquema ilustrativo das funções da PGF2α no sistema neuroendócrino e reprodutivo feminino.

No endométrio da vaca, a concentração de PGF2α, entre os dias 15-17 e 20-0 do ciclo estral, foi maior quando comparado com os dias 1-5 e 10-14 ($P > 0,001$) (Shemesh e Hansel, 1975) e há expressão de receptores para PGF2α no endométrio durante a fase de estro do ciclo (Arosh et al., 2014). Além disso, a expressão de COX-2 no útero aumenta com o aumento da concentração de E2 circulante, podendo ser mais uma explicação para a maior concentração de PGF2α durante as fases do ciclo em que o E2 também aumenta (St-Louis et al., 2010). O E2 também pode promover a expressão de PTGS-2, que é uma enzima limitante no processo de biossíntese das prostaglandinas (Shoda et al., 1995). Li et al. (2020), observaram que explants de endométrio, originados de vacas no proestro, quando tratados com E2, tem aumento de expressão de receptores para PGF2α. Os mesmos resultados foram encontrados por Huang et al. (2015), quando trabalharam com explants de oviduto de vacas.

Com a finalidade de compreender o papel da PGF2α no endométrio na fase periovulatória, Zhang et al. (2017) realizaram estudo com cultivo de

fragmentos de endométrio coletados de vacas no período de proestro e adição de agonista de receptor de $\text{PGF2}\alpha$ (PTGFR), o Fluprostenol, em crescente concentração. O tratamento induziu aumento de expressão de fatores de crescimento localizados no endométrio como o CTGF, FGF2, MMP2, TGF β 1, VEGF (figura 3), além do aumento de marcadores de crescimento epitelial, CK-18, e de fibroblastos, FSP-1 e o PCNA, antígeno nuclear de proliferação celular. Observou-se também a redução de expressão da caspase-3, fator apoptótico. Os resultados mostram que existe relação entre $\text{PGF2}\alpha$ e crescimento uterino, a ativação do receptor para $\text{PGF2}\alpha$ no endométrio favorece proliferação celular, ajudando na criação de ambiente uterino saudável e receptivo para o embrião.

Em 2018, Gao et al., demonstraram que explants de endométrio tratados com agonista de PTGFR tiveram aumento de RNAm e proteínas de PTGRF, indicando que, além do E2, a $\text{PGF2}\alpha$ também pode regular positivamente a expressão de seus próprios receptores. Eles também observaram incremento na expressão gênica de fatores de crescimento, como Zhang et al. (2017), e confirmaram que a ativação de receptores para $\text{PGF2}\alpha$ aumenta a expressão de gene para PTGS-2, que é uma enzima importante na cadeia de biossíntese das PGs.

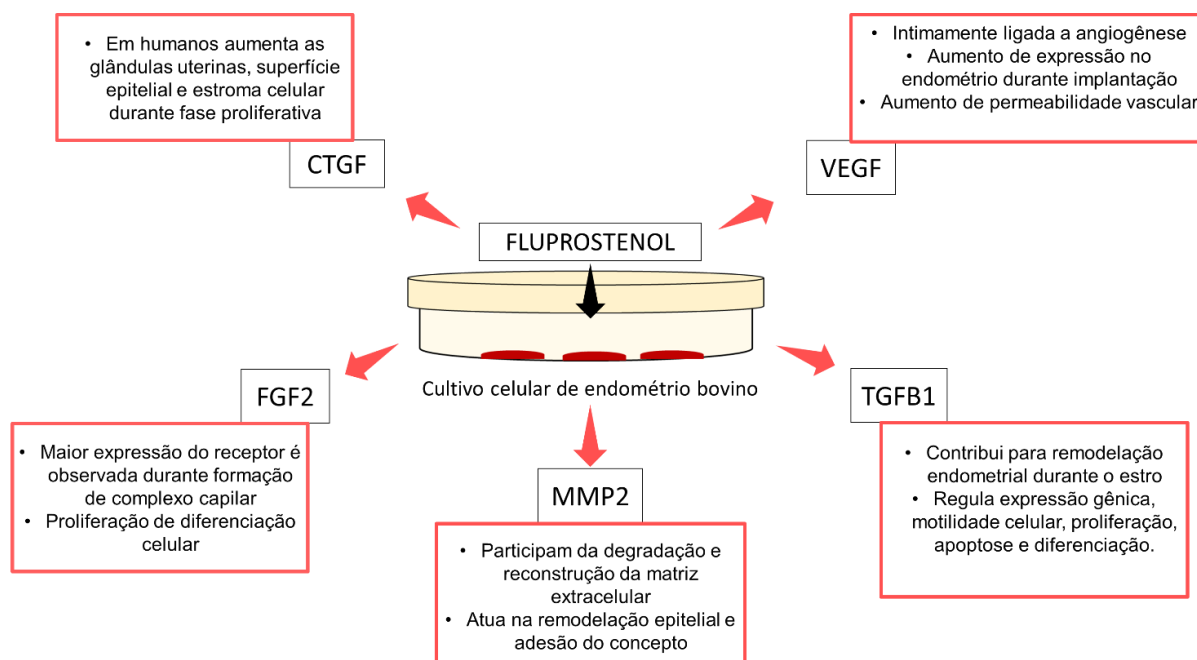


Figura 3.- Fatores de crescimento e suas principais funções, expressos em explants de endométrio após o tratamento com Fluprostenol (Adaptado de Zhang et al., 2017).

Fu et al. (2020) descreveram a ação da PGF2 α nas células do endométrio bovino, indicando que ela ocorre a partir da sinalização na regulação de complexos de fatores que participam do ciclo celular. Há aumento dos seguintes complexos proteicos: CDK4/6/ciclina D, envolvidos na fase G1 do ciclo celular; CDK2/ciclina E2, necessário para transição da fase G1 para fase S; CDK2/Ciclina A, essencial para a progressão na síntese de DNA, fase S; CDK1/ciclina A-B1, necessária para mudança da fase G2 para M (Johnson e Walker, 1999; Malumbres e Barbacid, 2005) (Figura 4). Além do incremento desses complexos, os autores observaram que ocorre redução de p15 e p 21, considerados inibidores de atividade de CDK (quinases dependentes de ciclina).

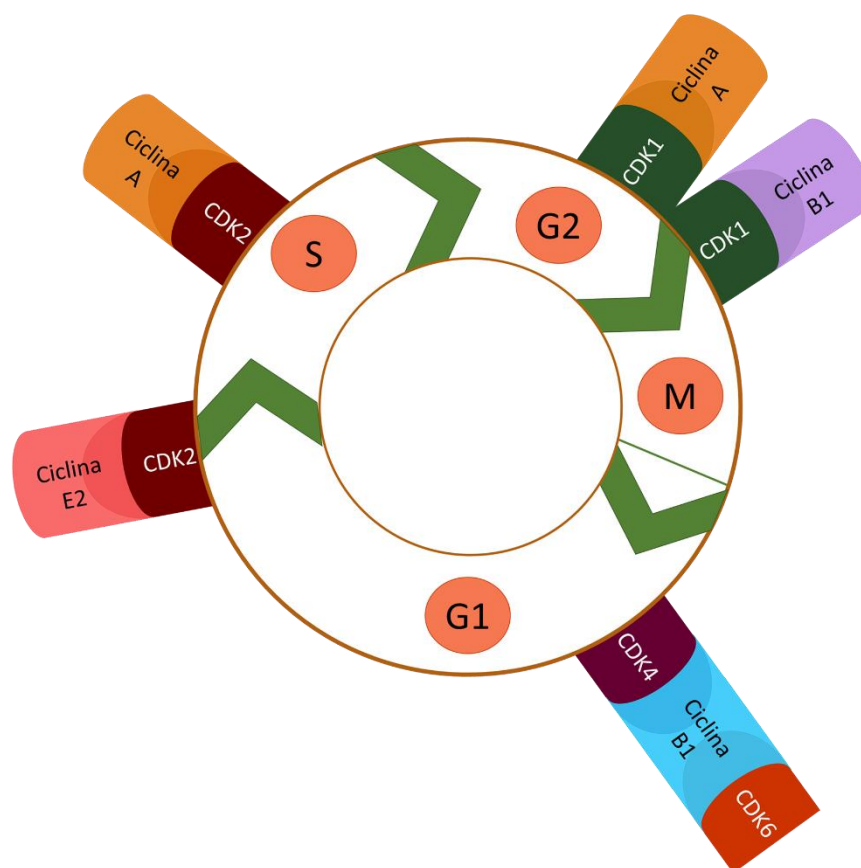


Figura 4. Fases de atuação da PGF2 α durante o ciclo celular e os complexos proteicos regulados por ela (Adaptado de Fu et al., 2020)

2.4. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO

Atualmente diversos protocolos hormonais têm sido utilizados para sincronizar a ovulação e permitir a prática da inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Além de representar uma importante ferramenta de manejo dos rebanhos bovinos por excluir a necessidade da observação de estro, a IATF diminui o impacto do anestro pós-parto e aumenta a taxa de serviço das propriedades, contribuindo efetivamente para maior ganho econômico e genético (Pursley et al., 1995; Bó et al., 2003; Baruselli et al., 2004; Meneghetti et al., 2009; Vasconcelos et al., 2011).

Para que os protocolos de IATF desenvolvidos tenham sucesso em seu objetivo, três etapas são essenciais (Sá Filho et al., 2011): a) recrutamento de nova onda folicular; b) diminuição da concentração de P4 circulante para iniciar a fase de proestro e desenvolvimento final do folículo dominante; c) indução da ovulação.

Pursley et al. (1995) desenvolveram protocolo de sincronização denominado Ovsynch, com o objetivo de sincronizar o estro com a inseminação artificial (IA) de vacas tratadas, a fim de eliminar a necessidade de observação de cio e melhorar as taxas de concepção do rebanho. O protocolo consiste em uma primeira aplicação de GnRH no D0, 35 mg im. de PGF2 α no D7 e uma segunda aplicação de GnRH 48 hs após (D9). A primeira aplicação de GnRH tem o objetivo de promover ovulação de folículos dominantes presentes nos ovários dos animais tratados, e, posteriormente, induzir o início de nova onda folicular, em $2,1 \pm 0,31$ dias após tratamento. Sete dias após a ovulação, no dia a aplicação de PGF2 α , um CL formado e sensível às ações luteolíticas da PGF2 α já se encontra no ovário e sofre regressão e diminuição na concentração de P4. A segunda dose de GnRH é realizada com o intuito de promover a ovulação do folículo dominante que se desenvolveu durante a nova onda folicular, estimulada pela primeira dose de GnRH. Neste protocolo, as vacas sincronizadas ovulam entre 24 e 36 hs após a última aplicação de GnRH.

Os protocolos de IATF a base de E2 e P4, desenvolvidos posteriormente, são eficientes em promover as três etapas acima citadas, apresentando bons resultados para sincronização de vacas de corte em período de anestro ou ciclando (Rhodes et al., 2002; Kim et al., 2005). Em vacas de corte criadas em ambientes de clima tropical, os protocolos a base de E2/P4 apresentam

melhores resultados na sincronização de onda folicular quando comparada com a utilização de GnRH (Baruselli et al., 2004).

Nestes protocolos, a sincronização da emergência de uma nova onda folicular é induzida através do tratamento com P4 e E2. O E2, quando aplicado em associação com a P4, promove a supressão da liberação de FSH, causando regressão de folículos FSH dependentes, e a P4, ao prevenir o pico de LH, promove regressão daqueles que eram LH dependentes (Bó et al., 1994; Martinez et al., 2004). A nova onda folicular inicia-se uma vez que a concentração de E2 diminui e a liberação de FSH é retomada de forma sincrônica (Bó et al., 1994).

Diferentes ésteres de estradiol estão disponíveis no mercado, e podem ser usados na sincronização de onda folicular. O 17B estradiol e o benzoato de estradiol (BE), em conjunto com P4, promovem emergência sincronizada de nova onda folicular, em média 3 a 4 dias após o início do protocolo (Sá Filho et al., 2004; Bó et al., 1995). O cipionato de estradiol (CE) e o valerato de estradiol (VE), por terem meia-vida mais longa, em comparação com BE e 17B, promovem emergência de nova onda folicular de forma inconstante e muito variável (Bó et al., 1995; Colazo et al., 2003).

A permanência do dispositivo de P4 fornece a concentração hormonal circulante necessária para suprimir liberação endógena de LH, >1,0 ng/mL, simulando fase lútea do ciclo estral, que permite desenvolvimento folicular normal (Long et al., 2009). Posteriormente, para proporcionar ambiente favorável ao folículo dominante, retira-se o implante de P4 e aplica-se PGF2 α com o objetivo de diminuir a concentração de P4 no organismo do animal (Binelli et al., 2014).

Outra função do implante de P4 é a prevenção de luteólise prematura da primeira ovulação pós-parto, provavelmente por maior inibição de receptores de ocitocina no útero, impedindo a produção precoce de PGF2 α pelo endométrio, e assim, proporcionando maior TC na primeira IA (Vasconcelos et al., 2004; Perez, 2005; Sá Filho et al., 2006). Meneghetti et al. (2009) trabalharam com vacas nelore pós-parto e avaliaram o efeito do uso de implante vaginal novo, com concentração de 1,9g de P4, ou usado 2, 3 ou 4 vezes. A concentração sérica de P4, no dia da retirada do dispositivo de P4 foi maior que 1,0 ng/mL em todos os grupos do experimento, mesmo naquele que recebeu implante de 4^o uso,

sendo eficientes em criar ambiente com concentração ideal de P4 para desenvolvimento folicular, e em evitar a luteólise prematura.

Atualmente, alguns ajustes têm sido realizados nos protocolos de IATF, a fim de melhorar os resultados dos programas reprodutivos, com base no melhor entendimento da fisiologia reprodutiva bovina.

O desenvolvimento final do folículo pré-ovulatório deve ser em ambiente com baixa concentração de P4, permitindo que o mesmo cresça e produza E2 pré-ovulatório adequado para estimular pico de LH e induzir comportamento de cio (Net et al., 2002; Baratta et al., 2001). A baixa concentração de P4 durante esta fase de crescimento folicular de vacas *Bos indicus* é essencial para melhor desenvolvimento do mesmo, uma vez que a P4 em altas concentrações reduz a frequência de liberação de LH, o que interfere negativamente no diâmetro folicular, detecção de estro, taxa de sincronização e gestação (Kinder et al., 1996; Peres et al., 2009).

Folículos dominantes pequenos apresentam baixa habilidade em secretar estradiol, não promovendo adequada responsividade da pituitária ao GnRH e pico de LH, tendo como consequência baixa taxa de ovulação. Folículos ovulatórios que se desenvolveram em ambiente ideal, com baixa concentração de P4, originarão CL maiores, com maior capacidade de produzir P4 durante diestro o que favorece o processo de alongamento do concepto e reconhecimento materno (Roberts et al., 1996; Forde et al., 2009).

As concentrações de E2 e P4 circulantes pré-ovulatórias controlam vários processos fisiológicos que contribuem para o estabelecimento e a manutenção da gestação (Pohler et al., 2012; Binelli et al., 2014). O aumento da circulação de E2 durante o proestro estimula a expressão de receptores de P4 no útero, importantes para a manutenção da gestação, prevenindo a produção precoce de PGF2 α uterina (Zelinski et al., 1982, Inskeep et al., 2004). O sucesso de gestação está diretamente relacionado com a capacidade do folículo pré-ovulatório e do CL formado posteriormente, em produzir E2 e P4, e essa capacidade está ligada ao nível de maturidade em que o folículo se encontrava no momento do pico de LH folículos imaturos tem menor capacidade esteroidogênica e, conseqüentemente, menor capacidade em criar ambiente uterino propício para manutenção da gestação (Vasconcelos et al., 2001; Perry et al., 2007).

Animais com folículos dominantes maiores, em comparação com folículos pequenos, além de apresentarem melhores concentrações de E2 (2.94 ± 0.28 pg/mL vs. 1.27 ± 0.20 pg/mL), maior tamanho de CL (2.72 ± 0.32 vs 1.89 ± 0.16 cm³) e maior concentração de P4 após ovulação (3.71 ± 0.25 ng/ml vs. 2.62 ± 0.26 ng/ml), apresentam melhor receptividade uterina e capacidade de suporte para o desenvolvimento embrionário inicial (Mesquita et al., 2014). O E2 produzido pelos folículos ovulatórios estimula o crescimento endometrial e desenvolvimento das glândulas uterinas, que interfere positivamente na fertilização e desenvolvimento do embrião (Murray, 1992; Johnson et al., 1997). O histotrófo é importante para o desenvolvimento embrionário pré-implantação pois é a única fonte de nutriente nos momentos iniciais da gestação até o desenvolvimento placentário, e a sua produção é influenciada positivamente pela concentração de P4, que também tem ação positiva no crescimento embrionário e produção de interferon tau (IFNu) (Geisert et al., 1992; Geisert et al., 1988; Bazer e Slayden, 2008; Bazer et al. 2010).

A resposta ao estresse oxidativo é outro fator influenciado pelo tamanho do folículo pré-ovulatório, e consequente concentração de esteroides. Vacas com folículos maiores apresentam maior capacidade de resposta uterina ao estresse oxidativo, importante fator que interfere na pré-implantação do concepto (Binelli et al., 2014). A expressão gênica do útero, 7 dias após a ovulação, de vacas que ovularam folículos maiores apresenta-se com pouca proliferação, indicando que o útero já passou da fase proliferativa e está preparado para receber o concepto e manter gestação (Cerri et al., 2012; Denicol et al., 2014).

Para promover a luteólise do CL nos protocolos de IATF, utiliza-se a aplicação exógena de PGF₂α (Rathbone et al., 2001). Este fármaco está disponível comercialmente de duas formas, um análogo natural, o dinoprost trometamina, e análogo sintético, o cloprostenol. Os análogos se diferenciam quanto a sua meia vida. Por apresentarem diferenças na sua estrutura. O cloprostenol, por possuir um anel de cloro benzílico a mais, em relação ao dinoprost trometamina, é mais resistente ao metabolismo enzimático natural, que degrada a molécula de dinoprost rapidamente, semelhante ao que ocorre com a PGF₂α natural (Reeves et al., 1978; Bourne et al., 1980). O primeiro possui uma meia vida curta, de aproximadamente 6 a 8 minutos, enquanto o segundo tem meia vida de 3 hs em média (Kindahl et al., 1976; Reeves et al., 1978).

O proestro é um importante período do ciclo estral do animal, onde irá ocorrer o crescimento final e maturação do folículo ovulatório, condição que se inicia quando as concentrações plasmáticas de P4 são menores que 1,0 ng/ml, nível subluteal (Sotck e Fortue, 1993). Durante esse período as baixas concentrações de P4 estimulam a liberação de LH de forma pulsátil, importante para o folículo dominante crescer e aumentar sua capacidade esteroidogênica (Rahe et al., 1980; Sotck e Fortue, 1993; Taft et al., 1996). Estudos mostram que o aumento da duração do proestro, ou seja, aumentar o período de tempo que a concentração de P4 se encontram subluteias, durante a IATF resulta em maior fertilidade, pois favorece o crescimento final folicular, tendo como consequência melhores níveis de estradiol circulante, o que é necessário para adequada resposta da pituitária ao GnRH, secreção de LH, ovulação e formação de CL e preparação do útero para futura gestação (Baratta et al., 2001; Vasconcelos et al., 2001; Sá Filho et al., 2009).

Meneghetti et al. (2009), ao estudarem melhor momento de aplicação da PGF2 α , concluíram que a aplicação no dia 7 do protocolo reduziu a concentração de P4 em vacas que apresentavam CL quando comparada com aplicação no dia 9, além de aumentar a TC nas mesmas, e não houve diferença nas vacas sem CL. Peres et al. (2009), observaram que a antecipação da aplicação de PGF2 α do D9 para D7, em vacas não lactantes, teve efeito de redução de P4 sérica, maior tamanho folicular na IATF e melhor taxa de prenhez.

Recentemente, um efeito benéfico de dupla aplicação de PGF2 α durante o protocolo de IATF foi observado em animais que não possuíam CL. Ao trabalharem com vacas de leite, Pereira et al. (2015) observaram que a aplicação de duas doses de PGF2 α , em vacas que não apresentaram CL, aumentou a fertilidade em comparação com aquelas que receberam apenas uma dose. Lopes Jr (2017) também observou efeitos positivos de uma segunda dose de PGF2 α em vacas holandesas em anestro, e que receberam protocolo de IATF P4/E2. O pesquisador observou que vacas com duas doses de PGF2 α apresentaram maior duração do pico de LH ($13,1 \pm 0,8$ h vs. $15,5 \pm 0,8$ h; $P=0,04$), maior proporção de pulsos de LH ($0,75 \pm 0,04$ vs. $0,65 \pm 0,04$ pulso/hora; $P=0,05$), e aumento na concentração de estradiol no fluido intrafolicular ($262,3 \pm 55,8$ vs. $115,4 \pm 22,9$ ng/ml $P=0,02$), que pode ter aumentado devido a exposição prolongada ao LH, melhorando o desenvolvimento folicular. Noronha

et al. (2020) observaram que a aplicação de 2 doses de PGF2 α durante a presença do implante de P4 aumentou o diâmetro folicular no dia da IATF e melhorou a TC de vacas de corte em anestro e com baixa condição corporal. Os resultados acima reforçam a hipótese de que a PGF2 α pode estar intimamente ligada a outros processos, além da luteólise.

Outro fármaco comumente utilizado em protocolos de IATF é a gonadotrofina coriônica equina (eCG). O eCG atua tanto em receptores de LH quanto de FSH, tem ação tanto de folículo estimulante quanto de luteinizante. Este fato possibilita, quando ligado aos receptores foliculares, o crescimento, maturação folicular e ovulação (Mruphy et al., 1991). Assim, a aplicação de eCG no momento da remoção de um progestágeno tem efeito de estimular o crescimento do folículo dominante (Sá Filho et al., 2011), especialmente em vacas em anestro pós-parto e/ou em baixo escore de condição corporal (ECC) (Bó et al., 2007, Sales et al., 2011b). Além disso, o tratamento com eCG aumenta as concentrações de P4 circulante no ciclo estral subsequente (Baruselli et al., 2004; Sá Filho et al., 2011), que está associado a um aumento do diâmetro do CL (Bó et al., 2003) e à estimulação da produção de P4 pelo próprio CL. Adicionalmente, o tratamento com eCG aumenta a expressão de enzimas esteroidogênicas (P450scc, 3 β -HSD e StAR) no CL (Bó e Baruselli, 2014).

A indução da ovulação do folículo que se desenvolveu durante o protocolo é a etapa final da IATF e ocorre com a aplicação de hormônios que induzem a onda pré-ovulatória de LH, como os ésteres de estradiol (Meneghetti et al., 2009). Ao comparar o resultado do uso de CE, no dia da retirada do implante, ou BE, 24 hs após a retirada, Meneghetti et al. (2009), observaram que não houve diferença no diâmetro do folículo no dia da IA, taxa de ovulação e gestação. Da mesma forma, Sales et al. (2011b) compararam o uso destes dois ésteres de estradiol com indutores de ovulação, e não houve diferenças nas taxas de ovulação e gestação. Portanto, o uso de CE pode ser adotado sem causar nenhum efeito negativo na fertilidade dos animais, o que facilita o manejo dos animais durante o protocolo de IATF.

2.5. EXPRESSÃO CIO NA IATF

A expressão de cio ao final do protocolo de IATF, no momento da IA, promove inúmeras vantagens ao animal, como melhoria nas funções ovarianas e desenvolvimento inicial da gestação (Cooke et al., 2019). Fêmeas que demonstram estro e/ou apresentam maior diâmetro do folículo ovulatório apresentam maior fertilidade na IATF, tanto em vacas de leite (Pereira et al., 2015) quanto em vacas de corte (Lopes et al., 2007; Bridges et al., 2012). Além disso, autores observaram relação positiva direta entre a expressão de cio e o escore de condição corporal (ECC) dos animais, sendo que aqueles com maior intensidade de expressão de cio tinham melhor ECC (Madureira et al., 2015; Richadson et al., 2016; Rodrigues et al., 2018).

A concentração circulante de estradiol está diretamente ligada ao evento de expressão de estro dos animais (Allrich, 1994). A presença de folículo dominante, desenvolvido ao longo do protocolo de indução, de maior diâmetro e maduro, no dia da IA, está relacionado com melhores concentrações de estradiol durante o período periovulatório, em comparação com folículos menores e/ou imaturos (Rodrigues et al., 2018). Vacas que expressaram cio no momento da IA apresentaram folículos dominantes com maior diâmetro em relação aquelas que não expressaram, além de formarem maiores CLs e produzindo maiores melhores concentrações de P4, 7 dias após a ovulação (Rodrigues et al., 2018; Cooke et al., 2019). A expressão de cio é considerada um indicador de que o animal tem altas concentrações de estradiol no organismo, o que está relacionado com sucesso de gestação em vacas de corte (Perry et al., 2005; Pohler et al., 2012; Rodrigues et al., 2018).

O E2 liberado por um folículo pré-ovulatório está relacionado com a proliferação das células da granulosa do mesmo, que vão originar células luteias posteriormente, responsáveis pela produção de P4 (Murdoch e Van; 1998). O hormônio -E2- é determinante e para a liberação de GnRH pelo hipotálamo, ele é diretamente proporcional ao estímulo causado no hipotálamo, quanto mais E2 presente na circulação, maior é a liberação GnRH e conseqüentemente maior liberação de LH pela hipófise, promovendo a ovulação (Taft et al., 1996, Kinder et al., 1996; Inskeep et al., 2002). Segundo Perry et al. (2014) vacas que apresentaram cio após protocolo Ovsynch tiveram maior concentração de E2 circulante em comparação com aquelas que não apresentaram cio. A alta circulação de E2, que favorece o comportamento e sinais de cio do animal

(Allrich, 1994), muda o ambiente e composição do muco uterino, promovendo a proliferação e crescimento de glândula endometriais que são responsáveis pela secreção do histotrofo, composto por glicoproteínas, nutrientes enzimas e fatores de crescimento necessários para o desenvolvimento inicial do concepto (Gray et al., 2001; Bui et al, 2002; Forde et al., 2014). O transporte espermático também é influenciado através da contratilidade da musculatura lisa local (Hawk, 1983), e pela mudança das características do muco presente no trato reprodutivo, que se torna mais hidratado pela ação do E2, que passa a ter maior concentração de sialomucinas, tornando-o menos viscoso, facilitando o transporte espermático ao longo do útero (Suarez e Pacey, 2006).

Davoodi et al. (2016) demonstraram que a expressão do estro no momento da IA alterou favoravelmente o perfil de expressão gênica nos tecidos reprodutivos durante a fase de pré-implantação, gerando um estado uterino mais receptivo para o alongamento do concepto, contribuindo para melhores taxas de fertilidade em animais com alta expressão de estro. Rodrigues et al. (2018), ao trabalharem com vacas de corte e avaliarem os efeitos da intensidade de expressão de cio, observaram que vacas que demonstraram cio, aos 20 dias de gestação tiveram maior expressão de mRNA de genes relacionados à produção de interferon, o que contribui positivamente para a manutenção da gestação. Conceptos provenientes de vacas que expressaram tem maior capacidade em produzir INF α e prostaglandina e2 (PGE2), importantes para reconhecimento materno da gestação e manter ambiente uterino receptivo ao desenvolvimento embrionário (Cooke et al., 2019).

Na Figura 5 é possível visualizar um resumo dos benefícios da alta concentração de E2 durante período peri e pós ovulatório

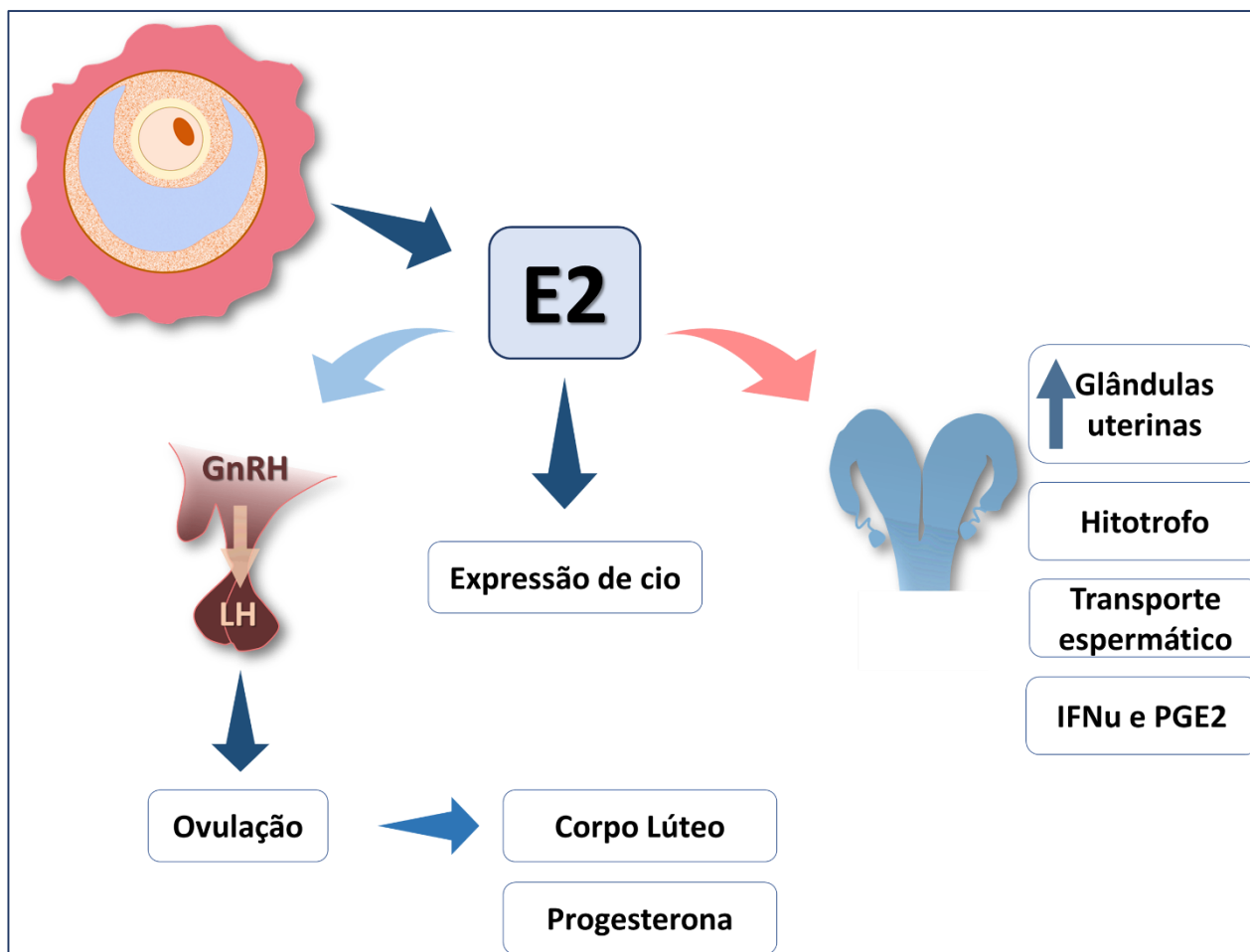


Figura 5. Ações da alta concentração de estrógeno durante período peri e pós-ovulatório.

2.6. SÊMEN SEXADO COMERCIALMENTE UTILIZADO EM BOVINOS

A técnica de citometria de fluxo é utilizada para separar espermatozoides contendo cromossomo X de outros contendo cromossomo Y, e foi descrita e patenteada no ano de 1991 por Lawrence A. Johnson. O método mensura a luz fluorescente emitida pelos espermatozoides, previamente tratados com corante específico que possui alta afinidade pelo DNA da célula, quando passam por feixe de raio laser (JOHNSON, 1992). Diversos estudos na área usaram como modelo o método patenteado por Johnson e desenvolveram mais de 200 patentes com atualizações da técnica, registradas pela XY Inc. e Sexing Technologies (Navasota, TX), segundo Moore e Hasler (2017).

A população de células X se diferencia da Y pela quantidade de DNA de modo que o cromossomo X contém maior quantidade de material genético em

relação ao Y, em diversas espécies (Garner et al., 1983; Johnson, 2000; Seidel e Garner, 2002; O'Brien et al., 2002; Garner e Seidel, 2003; Maxwell et al., 2004). Em espermatozoides bovinos, a diferença de quantidade de conteúdo de DNA entre as células X e Y distingue entre raças, Jersey (4,22%), Angus (4,07%), Holandês (4,01%), Hereford (3,98%) e Brahman (3,7%) (Garner 2006).

A sexagem de sêmen pela citometria de fluxo inicia-se pela incubação do ejaculado em meio de cultura, durante uma hora a 32 – 35°C, contendo corante Hoechst 33342, específico para DNA, e com corante alimentício de cor vermelha (substituto do Iodeto de propídio; IP), que é absorvido por células com membrana danificada (Johnson, 1992; Johnson et al., 1999; Sharpe e Evans, 2009). O procedimento facilita a triagem de espermatozoides mortos/danificados e vivos, onde os gametas identificados pelo corante vermelho (que tem capacidade de extinguir a fluorescência emitida pelo Hoechst 33342), são descartados (Garner, 2006; Sharpe e Evans, 2009).

O corante Hoechst, ao se ligar a dupla hélice do DNA da célula, forma um complexo corante-DNA que é excitado pela luz ultravioleta e emite luz azul, resultando em uma mensuração acurada do conteúdo celular dos espermatozoides X ou Y, uma vez que a quantidade de material genético é diferente entre eles, assim a quantidade de luz emitida também será diferente (Seidel e Garner, 2002). Essa luz é captada por lentes perpendiculares, uma em ângulo de 0° e outra 90° (Sharpe e Evans, 2009).

A amostra de espermatozoides, já previamente incubada com os corantes, é depositada no aparelho e passa, em fila única, através de um feixe de laser que emite luz ultravioleta, capaz de excitar o complexo corante-DNA. O sinal luminoso emitido pelas células com DNA corado é captado pelas lentes, a informação passa por um software que detecta a quantidade de luz emitida e identifica a natureza do cromossomo, se é X ou Y. O feixe de espermatozoides é fracionado em gota contendo apenas uma célula/gota, as quais são carregadas com cargas elétricas negativa ou positiva, dependendo do conteúdo de DNA (X-carga positiva e Y carga negativa). Estas gotas carregadas são separadas em tubos distintos e as gotas sem carga (que estão vazias ou com células fora do padrão de emissão de fluorescência) são descartadas. Os espermatozoides são assim separados de acordo com a quantidade de fluorescência emitida correspondente à composição do DNA (Johnson, 1992; 1994).

A acurácia do processamento do sêmen é de 90% e está intimamente ligada à velocidade de sexagem, quanto mais lento o processo maior é a taxa. São produzidas em média 10^7 espermatozoides sexados por hora (Geroge e Seidel, 2010), sendo necessário uso simultâneo de vários equipamentos para acelerar a sexagem de cada ejaculado. Desta forma, tradicionalmente são envasados aproximadamente 2 milhões de espermatozoides por palheta, enquanto a palheta de sêmen convencional possui de 10 a 20 milhões de células espermáticas (Moore e Hasler, 2017). A dose de 2×10^6 fornece equilíbrio entre taxas de comercialização aceitáveis do sêmen sexado e preço de mercado do produto, de acordo com Seidel (2008).

A sexagem de espermatozoides pelo método convencional de citometria de fluxo apresenta pontos limitantes. As células que passam pelo processo estão em meio com alta diluição, sofrem ação de alta pressão e estão expostas ao raio laser, o que pode causar danos celulares e diminuir o tempo de vida e/ou capacidade de fertilização das mesmas (Maxwell et al., 1998). Em estudo, Garner (2001) realizou exames de integridade de DNA dos espermatozoides que estavam passando pelo processo de sexagem e observou que não só a exposição ao corante Hoechst e ao laser (150 mW) eram lesivos, mas também havia lesão mecânica às células, como a alta pressão a que elas são expostas (40 – 50psi), gerando efeitos negativos na motilidade e fertilidade pós-descongelamento. Grande parte da lesão mecânica pode ser diminuída com configuração de menor pressão durante a sexagem (Suh et al., 2005). Espermatozoides que foram sexados sem corante e sem raio laser apresentaram dano à integridade de DNA de apenas 1,8% a mais em comparação com células que não foram sexadas (Everson et al., 2002). A porcentagem de células mortas ou danificadas foi acrescida em 18,6% em função do estresse mecânico e químico associado à centrifugação (Garner e Johnson, 1995).

Carvalho et al. (2013) ao utilizarem a microscópio de força atômica para avaliar espermatozoides que sofreram processo de sexagem por citometria de fluxo, não observaram diferenças entre os grupos sexado para X ou Y, para as 23 características estruturais testadas. Porém, quando avaliaram o grupo não sexado com o grupo sexado XY (pool de sexado X com sexado Y), observaram que existem diferenças na forma da cabeça dos espermatozoides dos grupos. O

estudo demonstrou que há diferenças na membrana plasmática de espermatozoides, de modo que a sexagem modifica a forma da cabeça, e algumas características da superfície. Essas modificações na membrana plasmática se assemelham com alterações naturais do processo fisiológico da capacitação e, portanto, podem estar relacionadas com o processo de capacitação precoce que a sexagem pode provocar (Bucci et al., 2012).

Em 2018, Carvalho et al., trabalharam com explantes de células ovidutais bovina para observar a capacidade de interação e o comportamento de espermatozoides, sexados ou não, nesse ambiente. O grupo de espermatozoides sexados iniciou a incubação com maior desestabilização de membrana plasmática, indicando que a sexagem induz o início do processo de capacitação. Quando avaliaram a capacidade de ligação espermática aos explantes ovidutais, observaram que não houve diferença entre grupos (controle e sexado) após 30 min de incubação. Entretanto, após 24 hs, o grupo controle (sêmen descongelado não sexado) apresentava maior quantidade de espermatozoides ligados às células de oviduto em comparação com o grupo sexado. Os autores propõem que o processo de sexagem pode ter interferido negativamente na habilidade dos espermatozoides de manterem a ligação às células ovidutais, pois, como mostrado em trabalhos anteriores, a técnica de sexagem pode causar lesões ao espermatozoide, gerando considerável quantidade de células com desestabilização de membrana, iniciando processo de reação acrossômica, prejudicando a formação de reservatórios espermáticos, essenciais para evento da fertilização (Gwathmey et al., 2003; Foye-Jackson et al., 2011; Carvalho et al., 2018).

Gosalvez et al. (2011a), avaliaram amostras descongeladas de sêmen sexado ou não de diferentes touros, com o objetivo de aferir a intensidade de fragmentação do DNA nos espermatozoides avaliados. Os autores observaram que amostras de sêmen sexado apresentavam menor fragmentação de DNA em relação aqueles não sexados, uma vez que espermatozoides não viáveis detectados pelo citômetro são descartados, o que inclui grande porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado, justificando o resultado acima. Quando os touros foram avaliados individualmente, a fragmentação de DNA após a sexagem foi diferente entre eles, de modo que alguns animais produziram mais espermatozoides com injúrias que outros. Essa observação mostra que a

resistência ao processo de sexagem é uma característica individual do animal, e que nem todos os touros são igualmente eficientes em reduzir a porcentagem de espermatozoides com DNA fragmentado.

O mesmo grupo de pesquisa (Gosalvez et al., 2011b), em um segundo experimento, observou dano de DNA de espermatozoides sexados ou não, em diferentes tempos de incubação (0; 4; 24; 48 e 72 hs após descongelamento). No início da incubação, as amostras de sêmen sexado apresentaram menor porcentagem de fragmentação em comparação com o sêmen convencional, como observado em Gosalvez et al. (2011 a). O sêmen convencional manteve nível baixo constante de fragmentação durante as primeiras 48 hs de incubação, com pequeno aumento entre 48 e 72 hs. Por outro lado, os espermatozoides sexados começaram a expressar fragmentação de DNA 24 hs após incubação, e o nível de dano ao final da observação era seis vezes maior em relação ao tempo 0. Quando a análise foi feita individualmente, observou-se que as amostras de sêmen sexado apresentavam diferentes porcentagens de fragmentação durante a incubação, mesmo apresentando características muito semelhantes no início do experimento. Situação que reafirma a diferença individual quanto à sensibilidade ao processo de sexagem, alguns animais são mais resistentes que outros e apresentam menor porcentagem de fragmentação no DNA. Os autores sugerem que a cromatina espermática sofre danos subclínicos durante a sexagem, que vão se expressar ao longo do tempo, e promover diminuição na longevidade do DNA.

A fim de melhorar a taxa de gestação de vacas que receberam sêmen sexado, pesquisadores propõem que a IA seja realizada mais próxima à ovulação, realizando um atraso no manejo de inseminação dos animais protocolados. Em experimento com novilhas da raça Jersey, Sá Filho et al. (2011) selecionaram os animais que apresentaram cio e realizaram a IA nos intervalos de 12-16h, 16-20h, 20-24h e > 24h após a expressão de cio. Novilhas inseminadas nos intervalos de 16-20 e 20-24 hs tiveram mais chances de se tornarem gestantes (51,8% e 55,6%, respectivamente) em comparação com aquelas que foram inseminadas no tempo convencional de 12 a 16 hs após o cio (37,7%).

Sales et al (2011a) trabalharam com novilhas ciclando onde os animais receberam protocolo de IATF a base de E2 e P4 e foram inseminadas com sêmen convencional ou sexado, com a diferença de 60 ou 54 hs após a retirada do implante de P4. Os pesquisadores observaram que animais inseminados com sêmen sexado 60 hs após remoção do implante apresentaram melhor TC (31,4%) em relação aquelas inseminadas 54 hs após (16,2%), entretanto, as TC dos animais inseminados com sêmen convencional foram maiores que o grupo anterior, independente do momento de inseminação (60 hs:51,8%; 54hs: 50,5%). Os mesmos autores (Sales et al., 2011b) trabalharam com vacas Nelore em lactação, onde todas receberam protocolo de IATF a base de E2 e P4. A inseminação desses animais foi realizada com sêmen sexado e em grupos de 36, 48 e 60 hs após a retirada do dispositivo de P4. Os resultados mostraram aumento significativo da TC dos animais inseminados no tempo 60 h (30,9%) em relação a 48 h (20,8%) e 36 h (5,8%).

Outros pesquisadores demonstraram a importância da associação da detecção de expressão de cio com o uso de sêmen sexado. A expressão de cio pelo animal fornece a informação de que o trato reprodutivo está preparado para receber uma nova gestação, diante de todas as vantagens reprodutivas relacionadas com a alta concentração de E2 pré-ovulação e posterior produção de P4 (pós-ovulação), conforme descrito por inúmeros trabalhos (Hawk, 1983; Murdoch e Van; 1998; Allrich, 1994; Davoodi et al., 2016; Rodrigues et al., 2018; Cooke et al., 2019). Adicionalmente, altas concentrações de E2 no momento peri-ovulatório facilitam o transporte espermático pelo trato reprodutivo feminino, através da contração da musculatura lisa local e produção de muco com natureza menos viscosa, mais hidratada (ou seja, com menor quantidade de sulfomucinas e maior quantidade de sialomucinas, que facilita a locomoção do espermatozoide ao longo do útero; Hawk, 1983; Suarez e Pacey, 2006).

Sá Filho et al. (2012) demonstraram menores TC utilizando sêmen sexado comparado ao convencional em vacas de corte lactantes, e observaram que animais expressando estro (bem como animais com maior folículo pré-ovulatório) no momento da IA apresentaram melhores TC quando inseminadas tanto com sêmen convencional como com sêmen sexado. Os autores concluíram que a simples identificação de exibição de estro no momento da IATF identifica animais com maiores chances de prenhez podendo, portanto, serem designadas

para receber espermatozoides sexados. Assim, os autores salientam a importância de utilizar sêmen sexado apenas nos animais que expressam estro, uma vez que a baixa fertilidade deste tipo de sêmen fica ainda mais prejudicada nos animais com menores concentrações de E2 no momento da IA. Thomas et al. (2004) desenvolveram experimento com vacas de corte com o objetivo de melhorar o uso estratégico de sêmen sexado nesses animais. Os autores observaram que vacas que expressaram cio antes da IA tiveram maior TC, independentemente do tipo de sêmen usado. Ainda, o atraso na inseminação com sêmen sexado de vacas que não expressaram cio provocou resultados significativamente melhores em relação aquelas que foram inseminadas sem expressão de cio e sem atraso de IA.

Como anteriormente descrito, inúmeros trabalhos apontaram que a fertilidade do sêmen sexado por citometria de fluxo é reduzida em relação ao sêmen convencional (Seidel et al., 1999; Seidel e Gerner, 2002; Seidel e Schenk, 2002). Porém, recentemente melhorias têm sido desenvolvidas na tecnologia de classificação de espermatozoides por conteúdo cromossômico, X ou Y. O sêmen sexado por técnicas aperfeiçoadas da citometria de fluxo tem sido amplamente utilizado tanto para touros de raças leiteiras quanto para raças de corte (Thomas et al, 2019).

Um dos pontos de melhoria em relação à técnica de citometria de fluxo desenvolvida por Johnson (1992), é a maior concentração espermática por dose produzida, de modo que 4×10^6 espermatozoides são envazados por palheta de 0,25 mL (ou seja, o dobro de células, quando comparada à concentração de 2×10^6 células, dose padrão de sêmen sexado vendido comercialmente) (Marin et al, 2018). O método também propõe mudanças no pH do meio em que as amostras de sêmen são acondicionadas durante a sexagem, temperatura do aparelho e pressão que o sêmen sofre durante a passagem pelo citômetro, para realizar a separação das amostras em gotas com uma única célula, garantindo melhor manutenção da integridade de membrana da célula espermática (Marin et al, 2018).

Em um grande experimento, envolvendo 41 fazendas, Lenz et al. (2016) avaliou a taxa de gestação de 6.000 inseminações artificiais em novilhas de leite. Foram utilizadas doses de sêmen sexado de oito touros holandeses cujas doses foram sexadas pelo método SexedULTRA™ (técnica de citometria de fluxo com

modificações) ou pelo método tradicional de citometria de fluxo. A taxa de gestação foi 4,5% maior (45.7 ± 1.7 x $41.2 \pm 1.6\%$; $P < 0,01$) em novilhas que receberam sêmen sexado pelo novo método em relação àquelas que foram inseminadas com sêmen processado pelo método descrito por Johnson (1991).

Thomas et al. (2017) realizaram experimento com novilhas de corte, utilizando IA com detecção de estro, e doses de sêmen sexado SexedULTRA e sêmen convencional. A TC de animais inseminados com sêmen convencional (60%) foi superior em relação aos animais que receberam sêmen sexado (52%) (Thomas et al., 2017). Novilhas que expressaram cio antes da IA tiveram maior TC em relação as que não expressaram estro antes da IA. Contudo, ao final de 60 dias de estação de monta, as taxas totais de prenhez não diferiram entre animais que receberam sêmen convencional ou sexado. A taxa de produção de bezerras do sêmen sexado foi de 96% e o sêmen convencional de 49%. Os resultados do trabalho sugerem que o processamento de sêmen pelo método de SexedULTRA promove melhor fertilidade em relação a tecnologia de sexagem descrita em 1992, além de demonstrar uso efetivo de IATF com sêmen sexado na indústria da pecuária de corte.

Resultados similares foram encontrados por Baruselli et al. (2017) quando avaliaram a TC de vacas nelore em lactação, que receberam protocolo de IATF a base de P4 e E2, e foram inseminadas 60 h após retirada do implante de P4, com sêmen de touro Nelore convencional, sexado pelo método tradicional ou sexado pelo SexedULTRA. Os autores observaram que não houve diferença estatística entre touros. Entretanto, vacas inseminadas com sêmen convencional tiveram melhores taxas de gestação (52%) em relação ao SexedULTRA (43%) e sexado tradicional (28,2%).

Assim, os resultados de estudos mais atualizados indicam que as inseminações com sêmen sexado por citometria de fluxo atualmente realizadas devem proporcionar melhores taxas de prenhez do que as inseminações utilizando a tecnologia de sexagem por citometria inicialmente desenvolvida.

3. HIPÓTESES

a) A administração de 12,5 mg i.m. de PGF₂ α no momento da IA, melhora a fertilidade de vacas que recebem sêmen sexado.

b) O sêmen sexado possui parâmetros de cinética, morfometria e compactação de DNA espermático alterados, que, em conjunto, afetam negativamente a viabilidade e fertilidade dos espermatozoides.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem por objetivo avaliar a taxa de concepção (TC) de vacas multíparas lactantes da raça Nelore recebendo tratamento com PGF2 α no momento da IATF e comparar os efeitos da PGF2 α no momento da IA em vacas inseminadas com sêmen convencional ou sexado, expressando diferentes intensidades de comportamento estral.

Adicionalmente, o presente estudo teve por objetivo avaliar laboratorialmente amostras do sêmen convencional e sexado utilizados a campo e comparar os resultados de fertilidade obtidos *in vivo* com as características espermáticas *in vitro*, a fim de identificar características seminais que esclareçam os resultados de campo.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar a taxa de concepção (aos 30 dias de gestação), de vacas Nelore submetidas a um protocolo de IATF com aplicação adicional (grupo PGF) ou não (grupo controle) de PGF2 α no momento da IA, por ultrassonografia transretal (modo-B);
- Comparar fertilidade de cada grupo experimental (grupos controle e PGF) e avaliar se houve influência do tratamento no tipo de sêmen utilizado (convencional e sexado);
- Correlacionar o grau de demonstração de cio, avaliado no momento da IA, com a fertilidade de cada grupo experimental (controle e PGF) e tipo de sêmen utilizado (convencional e sexado);
- Avaliar características do sêmen sexado comercialmente nos parâmetros de integridade de membrana plasmática, cinética, morfometria e descompactação de DNA espermático;

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. EXPERIMENTO A CAMPO

Todos os procedimentos envolvendo animais neste experimento foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), número do protocolo CEUA UFMG 348/2018.

5.1.1. Local e Animais

Este estudo foi conduzido em uma fazenda comercial de gado de corte, da raça Nelore, localizada no município de Araguaiana/MT, durante a estação de monta 2018/2019 (fazenda 1). O mesmo delineamento foi realizado para inseminação das vacas de outra fazenda comercial de gado de corte (durante a estação de monta 2018/2019), localizada no município de São Félix do Xingu/PA (fazenda 2).

Na fazenda 1 o experimento foi realizado em 348 animais, e na fazenda 2, foram utilizados dados de campo de 355 animais inseminados com o mesmo delineamento experimental.

Os animais eram alocados em pastos compostos por *Brachiaria decumbens* e *Brachiaria brizantha*, com acesso ad libitum a água e suplemento mineral.

5.1.2. Manejo reprodutivo

O protocolo de IATF se iniciou (D0) com as vacas recebendo um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (P4), de 2º uso (CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brasil) e uma injeção intramuscular (i.m.) de 2,0 mg de Benzoato de Estradiol (BE; Gonadiol®, Zoetis, São Paulo, Brasil). No dia 7 (D7) todos os animais recebem 12,5 mg de Dinoprost Trometamina i.m. (PGF2α; Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil). O dispositivo de P4 foi removido no dia 9 (D9), quando os animais receberam injeções i.m. de 0,5 mg de Cipionato de estradiol (ECP®, Zoetis, São Paulo, Brasil), de 12,5 mg de Dinoprost Trometamina i.m. (PGF2α;

Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil) e 300 UI de eCG (Novormon 5000®; Zoetis, São Paulo, Brasil), conforme descrito por Noronha (2020)

Também no D9, os animais receberam dispositivo de avaliação de estro, o Estrotect ®. O dispositivo contém cola na parte inferior para ser fixado transversalmente à coluna vertebral próxima à região de transição das vértebras lombo sacrais. Na parte superior, que fica exposta, a cor do dispositivo é coberta por tinta cinza que sai com fricção no local, expondo a cor do dispositivo

Quarenta e oito horas após remoção do dispositivo de P4 (D11), foi realizada a inseminação dos animais.

Para as inseminações foram utilizados dois tipos de sêmen (sêmen convencional e sêmen sexado para fêmea) de dois touros Angus, na fazenda 1 (touros 1 e 2), e dois touros Nelore, na fazenda 2 (touros 3 e 4).

Ao entrar no brete para a realização da IA, os animais foram intercalados aleatoriamente para receber uma dose i.m. de 12,5 mg de Dinoprost Trometamina i.m. (PGF2 α ; Lutalyse®, Zoetis, São Paulo, Brasil; protocolo PGF) ou solução salina (2,5 mL de solução salina fisiológica; protocolo controle).

Em cada fazenda foram escalados dois inseminadores experientes por lote, que se intercalaram a cada 20 inseminações realizadas. A cada 5 animais inseminados, o tipo de sêmen foi alterado (convencional ou sexado) e a cada 10 animais, o touro foi alterado, de modo que foram obtidos quatro grupos experimentais, em cada fazenda, distribuídos de forma aleatória e equiparada entre as vacas do experimento:

- 1) Grupo controle: protocolo controle/sêmen convencional;
- 2) Grupo 2: protocolo controle/sêmen sexado;
- 3) Grupo 3: protocolo PGF/sêmen convencional;
- 4) Grupo 4: protocolo PGF/sêmen sexado.

5.1.3. Detecção de cio e avaliação do escore de condição corporal (ECC)

No D11 (momento da IATF) foi feita a classificação da expressão do cio através de escores de remoção da tinta do dispositivo Estrotect® (Pohler et al., 2016). No presente trabalho, os animais foram classificados como animais expressando cio ou não, de acordo com o grau de remoção da tinta (Figura 6):

- remoção de tinta <25% = sem expressão de cio;
- remoção de tinta > 25% = expressão de cio;

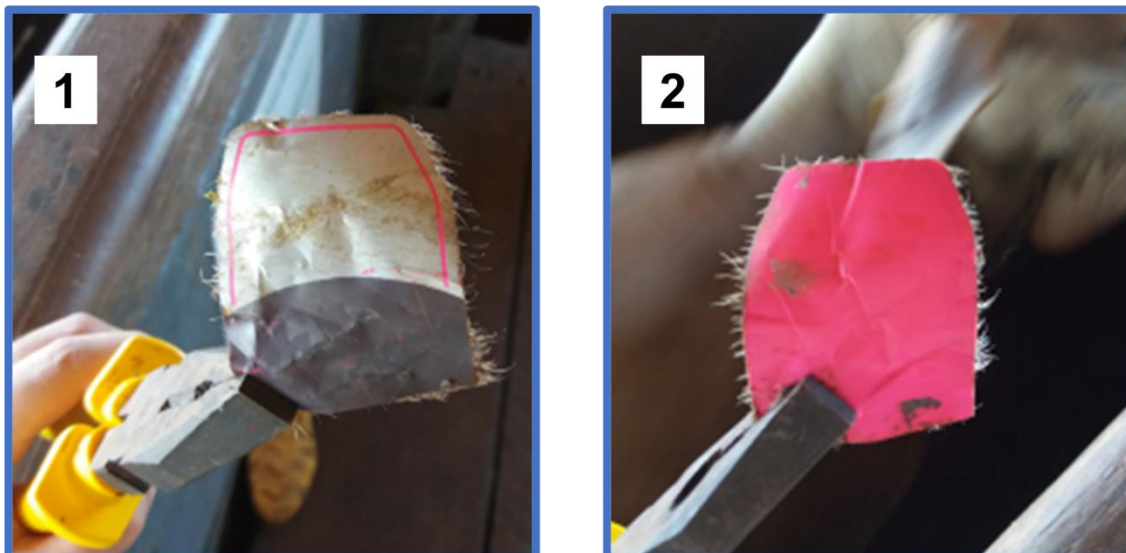


Figura 6 – Remoção do dispositivo Estroject® no D11 do protocolo. 1- Animal sem expressão de cio, com remoção de tinta <25%. 2- Animal com expressão de cio, com >25% de remoção de tinta.

Adicionalmente, no dia 11 (dia da IATF), foi avaliada de forma visual o escore de condição corporal (ECC) de cada vaca manejada. O ECC foi avaliado variando de 1 a 5, sendo 1 a nota aferida a animais muito magros e 5 para animais obesos (HOUGHTON et al., 1990).

Na figura 7 observa-se o esquema do delineamento experimental proposto.

5.1.4. Diagnóstico de gestação

Aos 30 dias após a IATF, foi realizado diagnóstico de gestação por ultrassonografia para avaliação da taxa de concepção. O procedimento foi realizado por ultrassonografia transretal, com transdutor linear (5.0 MHz; aparelho ALOKA, 500V). A observação de uma vesícula embrionária com embrião viável (presença de batimento cardíaco) foi utilizada como indicativo de gestação.

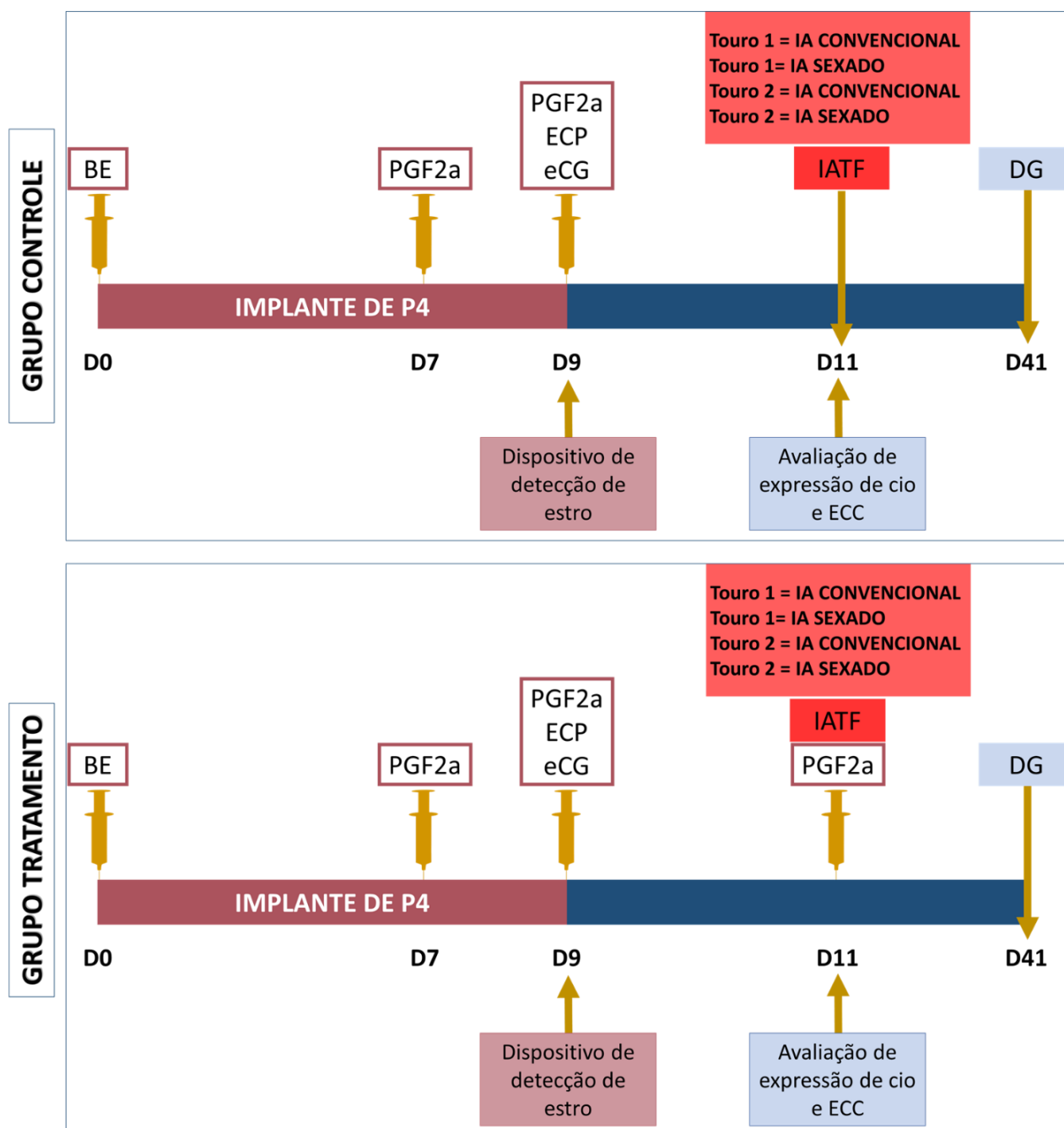


Figura 7 – Esquema ilustrativo do delineamento experimental; Legenda: BE-Benzoato de Estradiol (2,0 mg, im.); PGF- prostaglandina F2a (12,5 mg, im.); ECP- Cipionato de Estradiol (0,5 mg,im.); eCG- Gonadotrofina Coriônica Equina (300 UI, im.); IATF- Inseminação Artificial em Tempo Fixo; DG- Diagnóstico de Gestação; D0 – dia 0, início do protocolo; D7- dia 7 de manejo; D9- dia 9 de manejo; D11 – dia 11, inseminação artificial com aplicação ou não de prostaglandina F2a (12,5 mg, im.); D41- dia 41 (30 dias após inseminação artificial).

5.2. ANÁLISE LABORATORIAL DO SÊMEN DESCONGELADO

5.2.1. Amostras de sêmen congelado

Para este estudo foram avaliadas as amostras de sêmen congelado, da mesma partida, (tanto o sêmen convencional quanto o sêmen sexado), provenientes dos touros Angus (touro 1 e touro 2) utilizados nas inseminações artificiais das vacas da fazenda 1.

Para cada touro e tipo de sêmen foram realizadas 3 repetições das análises laboratoriais (Figura 8):

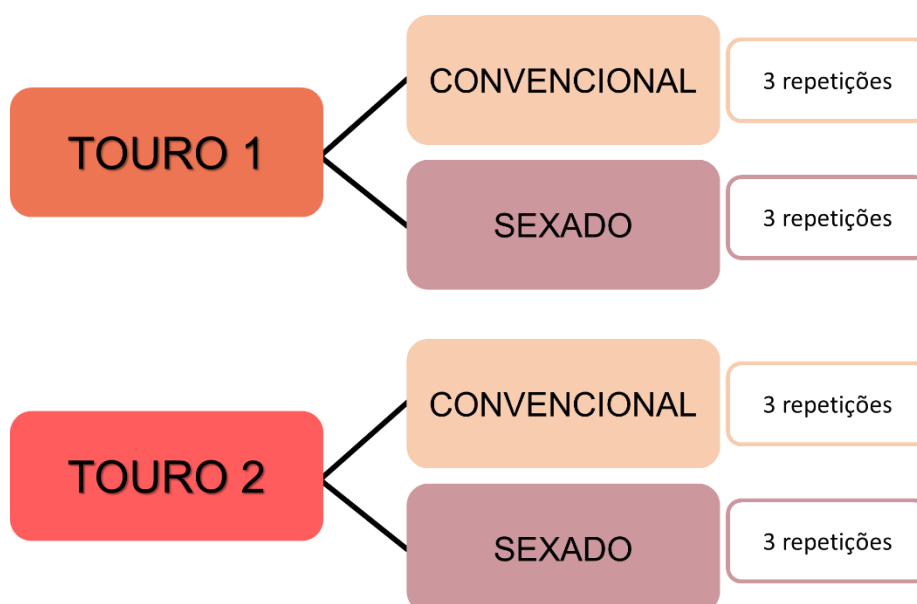


Figura 8. Esquema de distribuição de análises laboratoriais para amostras de sêmen congelado dos animais 1 e 2, e sêmen convencional e sexado.

5.2.2. Análise laboratorial

Cada palheta de sêmen foi descongelada à 37°C por 20 segundos. Após o descongelamento foram separadas as seguintes alíquotas para as análises laboratoriais:

- 20 µL para avaliação de motilidade e vigor;
- 10 µL para análise computadorizada pelo sistema CASA;
- 20 µL para avaliação de morfologia espermática;

- 10 µL para concentração espermática;
- 20 µL para teste hipo-osmótico;
- 10 µL para confecção de esfregaços para análise de compactação e heterogeneidade de DNA e morfometria espermática por coloração com azul de toluidina.

5.2.3. *Análise convencional do sêmen*

A avaliação convencional de motilidade, vigor, patologia e concentração espermática foram realizadas por microscopia de contraste de fase. A avaliação visual de motilidade e vigor foram realizadas no aumento de 100x. A concentração espermática foi realizada com câmara de Neubauer, no aumento de 400x. Avaliação morfológica foi feita no aumento de 1000x, contando-se 200 espermatozoides, considerando as alterações de acordo com Blom (1973).

5.2.4. *Teste Hipo-osmótico*

O teste hipomótico foi realizado utilizando-se 1,0 mL de uma solução com frutose na concentração de 100 mOsm/Kg, previamente aquecida a 37°C, acrescida de 20µL de sêmen. Essa solução foi incubada por 60 minutos a mesma temperatura. Após esse período, foi realizada a contagem de 200 espermatozoides, em microscopia de contraste de fase, em aumento de 400X. O resultado foi determinado em porcentagem, sendo o cálculo realizado pela seguinte fórmula:

$$HIPO (\%) = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HIPO}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda dos espermatozoides antes do teste HIPO})$$

(RevelL e Mrode, 1994).

5.2.5. *Análise computadorizada de cinética espermática*

A motilidade espermática foi analisada pelo sistema CASA (Sperm Class Analyzer v.4.0.0, Microptic, Barcelona, Espanha) de acordo com as configurações observadas no anexo 1.

Para as análises do sistema CASA foi utilizada a câmara de Makler (Makler counting chamber, SEFI Medical Instruments LTD, Haifa, Israel), previamente aquecida, onde 5µL de sêmen foram depositados. Foram selecionados 5 campos aleatórios para cada análise, e o sistema fornece a avaliação das seguintes variáveis espermáticas: Motilidade Total (MT; %), Motilidade Progressiva (MP; %), Velocidade de Trajeto (VAP; µm/s), Velocidade Progressiva (VSL; µm/s), Velocidade Curvilínea (VCL; µm/s), Amplitude Lateral da Cabeça (ALH; µm), Frequência de Batimentos (BCF; Hz), Retilinearidade (STR; %), Linearidade (LIN; %) e Células com Velocidade Rápida (RAPID; %).

5.2.6. Análise computadorizada da morfometria e estrutura cromatínica

Para a caracterização de espermatozoides corados com azul de toluidina, foram utilizadas amostras do sêmen após descongelamento.

A utilização de análises de imagem computadorizada garante menor subjetividade nas avaliações e permite que a análise morfométrica seja realizada concomitantemente com a avaliação da cromatina (Beletti et al., 2004). Nesta técnica, após a coloração do esfregaço, imagens digitais de pelo menos 100 espermatozoides foram obtidas para cada amostra, por meio de microscópio óptico acoplado a uma câmera digital, e conectado a um microcomputador com um software especializado. As imagens foram capturadas digitalmente em tons de cinza (Beletti & Costa, 2003).

Posteriormente, as imagens dos espermatozoides foram avaliadas por algoritmos desenvolvidos em ambiente de programação matemática (ambiente SCILAB; SIP toolbox: "Scilab Image Processing toolbox"), pela quantificação dos pixels de cada imagem. As seis cabeças espermáticas com menor valor de pixel são consideradas o padrão da amostra. Essas células que são as menos coradas são, teoricamente, as células com cromatina mais compactada (Beletti et al., 2005a; 2005b). Assim, a diferença entre o valor padrão da amostra e a média dos valores de pixel de cada cabeça analisada é transformada em porcentagem (Dif%), indicando o percentual de espermatozoides com cromatina considerada descompactada na amostra. Adicionalmente, calcula-se o coeficiente de variação (CV) da intensidade de tons de cinza de cada cabeça, o qual representa quantitativamente a heterogeneidade da compactação da

cromatina na cabeça espermática (Beletti et al., 2005a; 2005b; Kanayama & Beletti, 2011). Ainda nesta técnica, a área, o perímetro, a largura, o comprimento, a relação comprimento:largura, a elipsidade e o fator forma de todas as cabeças são também determinados por cálculos matemáticos, realizados com algoritmos desenvolvidos em ambiente SCILAB. Da mesma forma, a simetria lateral e a simetria antero-posterior da cabeça espermática foram mensuradas para identificação de assimetrias ao longo dos eixos principais do espermatozoide (Beletti et al., 2005a; 2005b). Assimetrias desta natureza podem implicar em alterações nas propriedades hidrodinâmicas da célula (Beletti et al., 2004).

5.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

5.3.1. *Experimento a campo*

Para avaliar o efeito das variáveis preditoras na TC das vacas ajustaram-se modelos lineares generalizados mistos com a distribuição binomial (regressão logística), que é apropriada para respostas dicotômicas (gestação positiva ou negativa). As variáveis PGF, Sêmen, Cio, Fazenda e ECC foram utilizadas como fatores fixos e as variáveis Lote x Inseminador (agrupado em fazenda) e Touro (agrupado em Fazenda) foram utilizadas como fatores aleatórios. Inicialmente ajustou-se um modelo completo com todos os fatores fixos, incluindo as interações e o fatores aleatórios. Foi realizado uma seleção backward, os fatores não significativos foram retirados um a um, até se chegar a um modelo mais parcimonioso, onde todas as variáveis são significativas. Destaca-se que apesar da interação entre PGF e CIO ter sido marginalmente significativa, foi decidido mantê-la no modelo final, já que o efeito da PGF é o foco deste trabalho

A significância das variáveis preditoras foi acessada através do teste da razão de verossimilhança. Para variáveis que possuíam mais de dois níveis, foi aplicado um teste de comparações múltiplas (pairwise) utilizando-se a correção de Tukey. Em todos os testes assumiu-se um nível de significância de 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

5.3.2. Experimento laboratorial

Para avaliar os efeitos de touro (Touro 1 ou Touro 2) e tipo (convencional ou sexado), aplicou-se testes ANOVA para dois fatores. Foram aplicados testes separados para cada variável resposta mensurada. Testou-se os efeitos principais de cada fator de forma global (overall), assim como o efeito da interação entre esses fatores (Touro X Tipo de sêmen). Em seguida, calculou-se os valores médios e seus respectivos intervalos de 95% de confiança para cada grupo.

Testes de comparações múltiplas (pairwise) foram aplicados utilizando-se a correção de Tukey, para identificar possíveis diferenças entre os tipos de sêmen (convencional ou sexado) separadamente para cada touro (Touro 1 ou Touro 2). Todas as análises estatísticas foram realizadas através do software R versão 3.6.1 (R Core Team, 2019).

6. RESULTADOS

6.1. EXPERIMENTO A CAMPO

A TC geral foi 37,6% (n=703), sendo 32,8% (n=348) na fazenda 1 e 42,3% (n= 355) da fazenda 2 (P=0,002). Desta forma, a segunda propriedade apresentou 28% mais probabilidade de prenhez do que a primeira.

Embora os resultados da regressão logística demonstraram que houve diferença na TC entre fazendas, o comportamento das outras variáveis analisadas no modelo estatístico foi o mesmo dentro de cada uma delas.

Inseminador (P=0,199) e touro (P=0,832) são fatores que não influenciaram a TC, em nenhuma das fazendas avaliadas.

De forma contrária, tipo de sêmen (sexado ou convencional) foi um fator que afetou a TC em ambas as fazendas (P<0,001). A TC das vacas inseminadas com sêmen convencional foi maior quando comparada com aquelas inseminadas com sêmen sexado, apresentando 1,9 vezes mais chances de

gestação. Os resultados obtidos para cada touro nas fazendas 1 e 2, encontram-se descritos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Taxa de concepção (TC) de vacas múltíparas da raça Nelore inseminadas na Fazenda 1, de acordo com o touro (1 ou 2) e tipo de sêmen (convencional ou sexado) utilizado

Fazenda 1	Tipo de sêmen	TC	Total
Touro 1	convencional	47,9% (35/73) a	32,3% (50/155) a
	sexado	18,2% (15/82) b	
Touro 2	convencional	40,8% (42/103) a	33,2% (64/193) a
	sexado	24,4% (22/90) b	

a,b: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam $P < 0,05$.

Tabela 2. Taxa de concepção (TC) de vacas múltíparas da raça Nelore inseminadas na Fazenda 2, de acordo com o touro (3 ou 4) e tipo de sêmen (convencional ou sexado) utilizado

Fazenda 2	Tipo de sêmen	TC	Total
Touro 3	Convencional	51,0% (48/94) a	40,4% (74/183) a
	Sexado	29,2% (26/89) b	
Touro 4	Convencional	57,0% (49/86) a	44,1% (76/172) a
	Sexado	31,4% (27/86) b	

a,b: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam $P < 0,05$.

Assim como tipo de sêmen, o ECC no momento da IA atuou de forma significativa nos resultados ($P=0,018$) de modo que vacas com melhor ECC apresentaram maior TC, em ambas as fazendas.

Na Fazenda 1, vacas com $ECC \leq 2,75$ apresentaram TC de 26,0% ($n=100$), enquanto vacas com $ECC > 2,75$ apresentaram 35,5% ($n=248$). Da mesma forma, na fazenda 2, vacas com $ECC \leq 2,75$ tiveram menor TC que aquelas com $ECC \geq 2,75$ (38,9%, $n=210$ vs 47,2%, $n= 145$). Ao avaliar as duas fazendas de forma conjunta, a TC de animais com $ECC \leq 2,75$ foi de 34,7% ($n=340$) e com $ECC \geq 2,75$ foi de 39,8% ($n=391$) conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Taxa de concepção (TC) de vacas múltiparas da raça Nelore inseminadas, em duas fazendas comerciais, de acordo com escore de condição corporal (ECC) ($\leq 2,75$ e $> 2,75$)

	Fazenda 1	Fazenda 2	Total
ECC $\leq 2,75$	26,0% (26/100) a	38,9% (82/210) a	34,7% (108/310) a
ECC $> 2,75$	35,5% (88/248) b	47,2% (68/145) b	39,8% (156/393) b
Total	32,7% (114/348)	42,3% (150/355)	

a,b: letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam $P < 0,05$.

A demonstração de cio no momento da IA apresentou-se como efeito positivo ($P=0,005$) na TC em comparação com os animais que não apresentaram cio. Ao avaliar o efeito da interação do tratamento e demonstração de cio (tratamento x CIO), observou-se tendência estatística ($P=0,077$), constatando que o tratamento com PGF no momento da IA pode ter influência positiva na TC de vacas que não apresentaram cio (tabela 4). Assim, observou-se que o tratamento com PGF no momento da IA aumentou em torno de 70% a TC dos animais sem expressão de estro.

Conforme anteriormente mencionado, o tipo de sêmen utilizado na IA dos animais (sexado ou convencional), apresentou efeito significativo na TC. Porém, o tratamento com PGF no momento da IA não teve efeito significativo na TC dos animais em função do tipo de sêmen recebido ($P=0,67$). Deste modo, a aplicação de PGF não interferiu na fertilidade das vacas que receberam sêmen convencional ou sexado, como demonstrado na tabela 5. O efeito do tratamento no momento da IA em vacas inseminadas com ambos os tipos de sêmen manteve o mesmo padrão para vacas com ou sem expressão de cio, já que não foi observada interação tripla entre tipo de sêmen, expressão de cio e tratamento ($P=0,897$).

Tabela 4. Taxa de concepção de vacas múltiparas da raça Nelore inseminadas, em duas fazendas comerciais, de acordo com expressão de cio (cio ou sem expressão de cio), que, no momento da IA, receberam ou não tratamento com PGF

	Fazenda 1		Fazenda 2		Total	
	Cio	Sem cio	Cio	Sem cio	Cio	Sem cio
Controle	37,7% (43/114)	16,4% (10/61)	43,7% (59/135)	28,9% (11/38)	41,0% A (102/249)	21,2% B (21/99)
PGF	36,4% (43/118)	32,7% (18/55)	44,8% (65/145)	40,5% (15/37)	41,1% A (108/263)	35,9% AB (33/92)
Total	37,1 a (86/232)	24,1 b (28/116)	44,3 a (124/280)	34,7 b (26/75)	41,0 % a (210/512)	28,3% b (54/191)
Total geral	32,8% (114/348) a		42,3% (150/355) b		37,6% (264/703)	

a,b: letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam $P < 0,05$; A,B: letras maiúsculas diferentes entre linhas e/ou colunas indicam $P < 0,10$

Tabela 5. Taxa de concepção de vacas múltiparas da Nelore inseminadas, em duas fazendas comerciais, de acordo com tipo de sêmen (convencional ou sexado), que, no momento da IA, receberam ou não tratamento com PGF.

Sêmen	Fazenda 1		Fazenda 2		Total	
	Convencional	Sexado	Convencional	Sexado	Convencional	Sexado
Controle	41,7% (33/79)	20,8% (20/96)	54,8% (40/73)	30,6% (30/98)	48,0% a (73/152)	25,5% b (50/196)
PGF	45,4% (44/97)	22,4% (17/76)	53,3% (57/107)	29,9% (23/77)	49,5% a (101/204)	26,5% b (40/151)
Total	43,8% a (77/176)	21,5% b (37/172)	53,9% a (97/180)	30,3% b (53/175)	48,9% a (174/356)	25,9% b (90/347)
Total Geral	32,8% (114/348) a		42,3% (150/355) b		37,6% (264/703)	

a,b – letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam $P < 0,05$

Considerando todos os animais do presente estudo, observa-se que a influência do tratamento com PGF em vacas apresentando ou não comportamento de cio, foi semelhante para animais que receberam sêmen convencional ou sexado no momento da IA (Tabela 6), de acordo com a análise de contraste ANOVA entre os quatro grupos experimentais (tratamento controle/cio; tratamento PGF/cio; tratamento controle/sem expressão de cio; tratamento PGF/sem expressão de cio).

Assim, na tabela 6 é possível observar que a aplicação de PGF no momento da IA beneficiou a fertilidade de vacas que não expressaram cio, independentemente do tipo de sêmen utilizado.

Tabela 6. Taxa de concepção (%) de vacas Nelore, de acordo com expressão de cio, que receberam ou não tratamento com PGF no momento da IA, e foram inseminadas com sêmen convencional ou sexado.

Grupo	Convencional		Sexado		Valor P
	Cio	Sem cio	Cio	Sem Cio	
Controle	53,2 (59/111) a	34,1 (14/41) b	31,2 (43/138) a	12,1 (7/58) b	0,007
PGF	51,0 (76/149) a	45,5 (25/55) ab	28,1 (32/112) a	21,6 (8/37) ab	0,018
Total	51,9 (135/260) a	40,6 (39/96) b	29,8 (75/250) a	15,8 (15/95) b	P<0,001

a,b – para cada tipo de sêmen, letras minúsculas diferentes na mesma linha e/ou coluna indicam $P < 0,05$

A figura 9 mostra a frequência relativa do sucesso de gestação da IATF em relação ao tratamento ou não com PGF, e expressão de cio no momento da IA, em vacas inseminadas com sêmen sexado ou convencional. Observa-se que animais que não demonstraram cio e receberam PGF apresentaram sucesso de gestação similar das vacas que apresentaram cio no momento da IA.

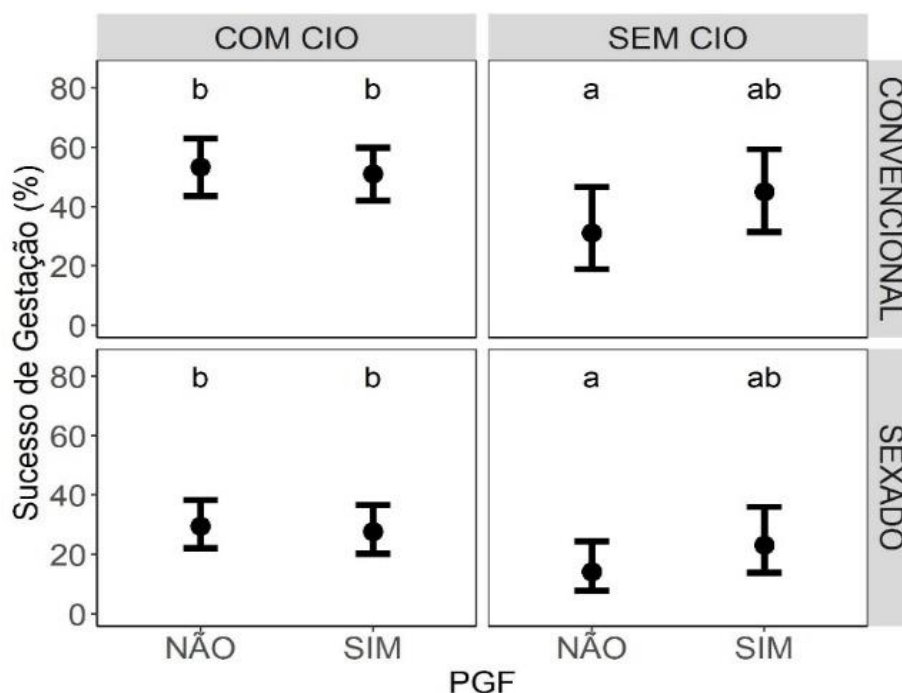


Figura 9. Frequência relativa de gestação na IATF (sucesso de gestação %) de acordo com expressão de cio (com cio ou sem cio) de vacas Nelore multíparas em lactação que receberam ou não tratamento com PGF no momento da inseminação artificial (IA) com sêmen sexado ou convencional; barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si ($P < 0,05$).

6.2. EXPERIMENTO LABORATORIAL

Os resultados laboratoriais se referem as amostras de sêmen das partidas utilizadas na fazenda 1 (tabela 7).

Tabela 7. Taxa de concepção (%) da Fazenda 1, de acordo com o tipo de sêmen (convencional ou sexado) utilizado na IATF de vacas multíparas da raça Nelore.

	Taxa de concepção	
	Convencional	Sexado
Touro 1	47,9 (35/73) a	18,2 (15/82) b
Touro 2	40,8 (42/103) a	24,4 (22/90) b

a,b – letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam $P < 0,001$

Os resultados das análises convencionais de sêmen descongelado demonstram que houve diferença ($P = 0,011$) entre tipo de sêmen para o

parâmetro de motilidade visual, tanto para touro 1, quanto para touro 2, como exposto na tabela 8, sendo o sêmen convencional com maior porcentagem de espermatozoides móveis em comparação com sexado. O vigor espermático não apresentou diferença estatística entre touros ($P=1,000$) e tipo de sêmen ($P=0,282$), como demonstrado na tabela 8.

Ao avaliar os resultados do teste hipo-osmótico (HIPO) observou-se diferença entre tipos de sêmen para ambos os touros avaliados (touro 1: $P=0,006$; touro 2: $P=0,005$). Portanto, o sêmen sexado apresenta menor valor de HIPO em relação ao convencional, indicando que possui maior quantidade de espermatozoides com membrana plasmática lesionada (tabela 8 e Figura 10).

Tabela 8. Motilidade visual (%), vigor e integridade de membrana (teste hiposmótico) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento, dos touros 1 e 2.

	Touro 1		Touro 2	
	Convencional	Sexado	Convencional	Sexado
Motilidade visual (%)	63,33±11,54 a	40,00±5,53 b	63,33±5,77 a	36,66±11,54 b
Vigor espermático	3,00±0,55 a	2,33±0,57 a	2,66±0,57 a	2,66±0,57 a
Hiposmótico (%)	52,33±12,41a	30,33±9,60 b	48,66±1,60 a	24,50±3,04 b

a,b – para cada touro, letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam $P<0,05$

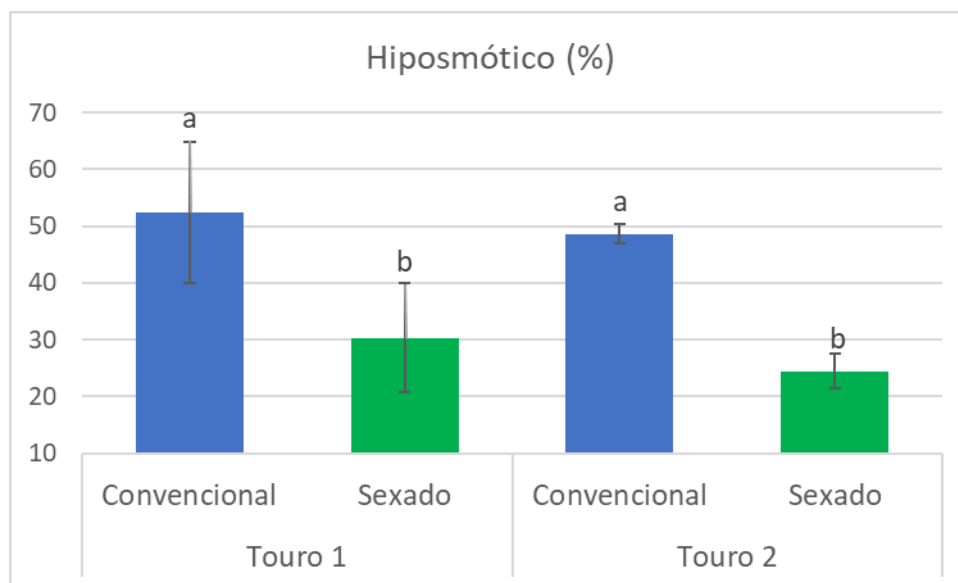


Figura 10. Teste hipo-osmótico (%) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2. Barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si dentro de cada touro (Touro 1: $P=0,008$; Touro 2: $P=0,005$).

A concentração espermática das amostras diferenciou significativamente entre touros ($P<0,001$) e tipo de sêmen para ambos os animais avaliados (Touro 1: $P<0,001$; Touro 2: $P<0,001$) (tabela 9 e Figura 11).

A quantidade de espermatozoides móveis por palheta (SMP) de 0,25 mL, calculada a partir da motilidade espermática total (MT), não apresentou diferença estatística quando comparada entre touros, porém, quando comparado o tipo de sêmen dentro de cada touro, observou-se que o sêmen sexado do touro 1 apresenta valores significativamente menores ($P<0,001$) que o convencional. No touro 2, não observou-se diferença estatística entre os tipos de sêmen ($P=0,056$), como apresentado na tabela 9 e figura 12.

Tabela 9. Concentração espermática e espermatozoides móveis por palheta (SMP) do sêmen convencional ou sexado, pós descongelamento, dos touros 1 e 2.

	Touro 1		Touro 2	
	Convencional	Sexado	Convencional	Sexado
Concentração ($\times 10^6/\text{mL}$)	58,75 \pm 0,66 a	43,00 \pm 0,66 b	58,41 \pm 0,28 a	54,66 \pm 0,76 b
SMP($\times 10^6/0,25\text{mL}$)	13,93 \pm 0,42 a	5,35 \pm 1,74 b	9,96 \pm 2,81 A	6,16 \pm 2,48 B

a,b: para cada touro, letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam $P<0,05$

A,B: para cada touro, letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam $P<0,10$ e $>0,05$.

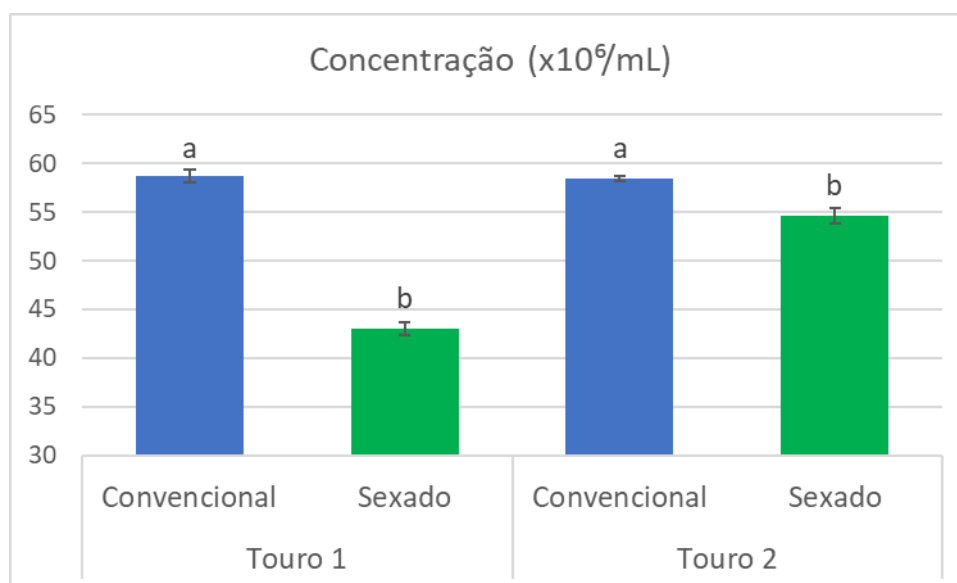


Figura 11. Concentração espermática (x10⁶/mL) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2. Barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si dentro de cada touro (Touro 1 e touro 2: P<0,001).

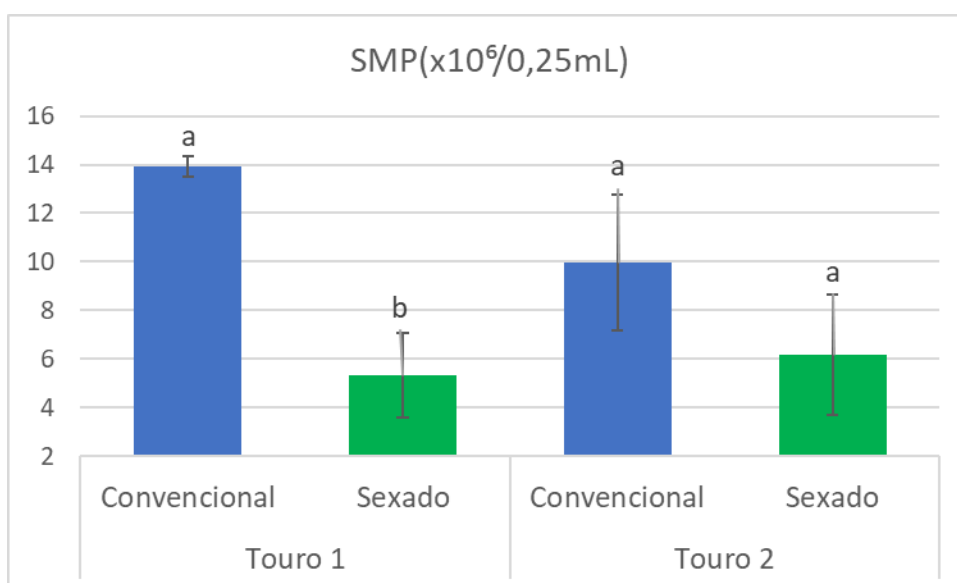


Figura 12. Espermatozoides viáveis na palheta (x10⁶/0,25mL) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2. Barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si dentro de cada touro (Touro 1: P<0,001).

A morfologia espermática, avaliada através dos defeitos espermáticos menores (DefMe), defeitos maiores (DefMA) e defeitos totais (DT), não

apresentou resultado diferente estatisticamente entre touros (DefMe: $P=0,206$; DefMA: $P=0,392$; DT: $P=0,324$) e tipo de sêmen dentro de cada touro (Touro 1: DefMe $P=0,143$, DefMai $P=0,681$, DT $P=0,263$; Touro 2: DefMe $P=0,053$, DefMai $P=0,419$, DT $P=0,143$), como observado na tabela 10.

Tabela 10. Morfologia espermática: defeitos maiores, defeitos menores e defeitos totais, de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.

	Touro 1		Touro 2	
	Convencional	Sexado	Convencional	Sexado
Defeitos maiores (%)	1,33 ± 1,15	1,00 ± 1,00	1,33 ± 0,58	2,00 ± 1,00
Defeitos menores (%)	5,33 ± 0,58	3,67 ± 1,53	6,67 ± 1,15	4,33 ± 1,53
Defeitos totais (%)	7,00±1,53	5,00±2,08	8,00±1,00	6,00±2,08

Os resultados obtidos pela análise computadorizada de cinética espermática (CASA) demonstram que a MT e a MP das amostras de sêmen sexado do touro 1 foi significativamente menor em comparação com o sêmen convencional (MT: $P=0,007$; MP: $P=0,009$). O touro 2 apresentou tendência de menor MT e MP ($P=0,098$ e $P=0,065$, respectivamente) do sêmen sexado em relação ao convencional (figura 13 e 14; tabela 11).

Adicionalmente, o sêmen convencional do touro 1 apresentou porcentagem significativamente maior de células com velocidade rápida em relação sêmen sexado do mesmo touro ($P=0,003$). No touro 2 não foi observada diferenças entre os tipos de sêmen ($P=0,132$), como também demonstrado na tabela 11 e representado na figura 15.

Tabela 11. Motilidade total (MT; %), Motilidade progressiva (MP; %) e Espermatozoides rápidos (RAPID; %) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento, dos touros 1 e 2.

	Touro 1		Touro 2	
	Convencional	Sexado	Convencional	Sexado
MT (%)	94,87±1,86 a	49,73±15,86 b	68,17±19,05 A	44,97±17,49 B
MP (%)	44,07±13,16 a	16,67±3,41 b	30,00±13,00 A	12,77±4,70 B
RAPID (%)	55,90±14,58 a	17,17±4,29 b	28,57±15,54 a	13,23±5,36 a

a,b: para cada touro, letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam $P < 0,05$.

A,B: para cada touro, letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam $P < 0,10$ e $> 0,05$.

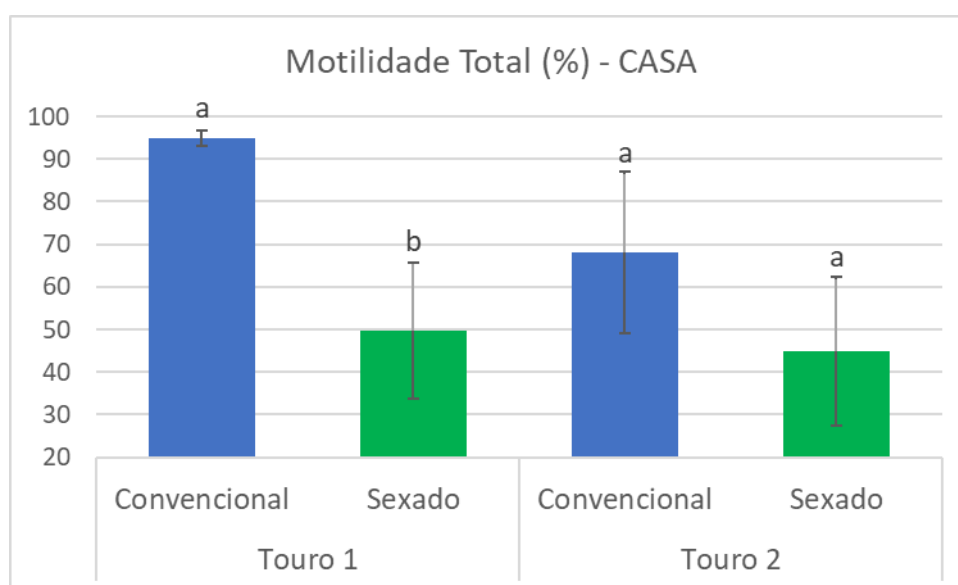


Figura 13. Motilidade espermática total (MT) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.

Barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si dentro de cada touro ($P < 0,05$).

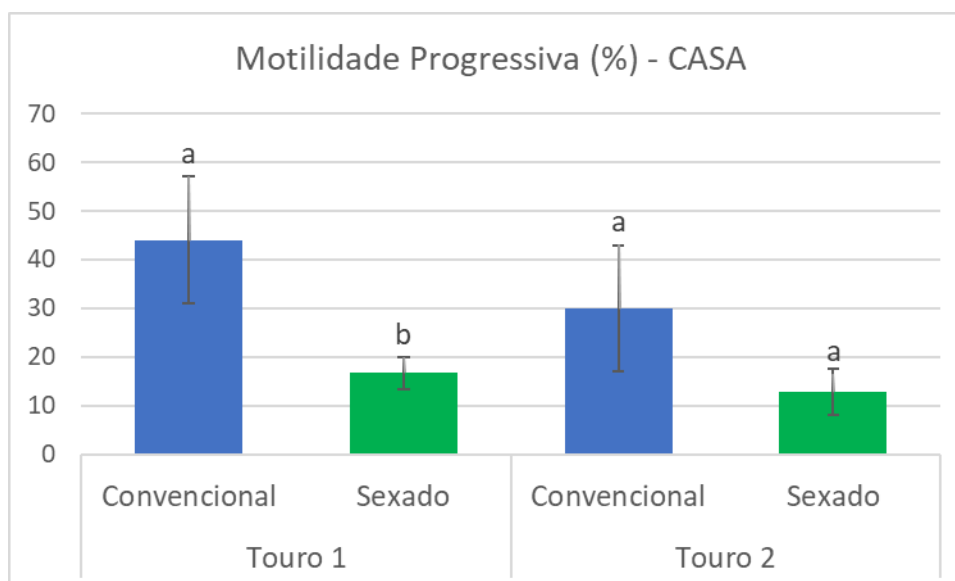


Figura 14. Motilidade espermática progressiva (MP) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2. Barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si dentro de cada touro ($P < 0,05$).

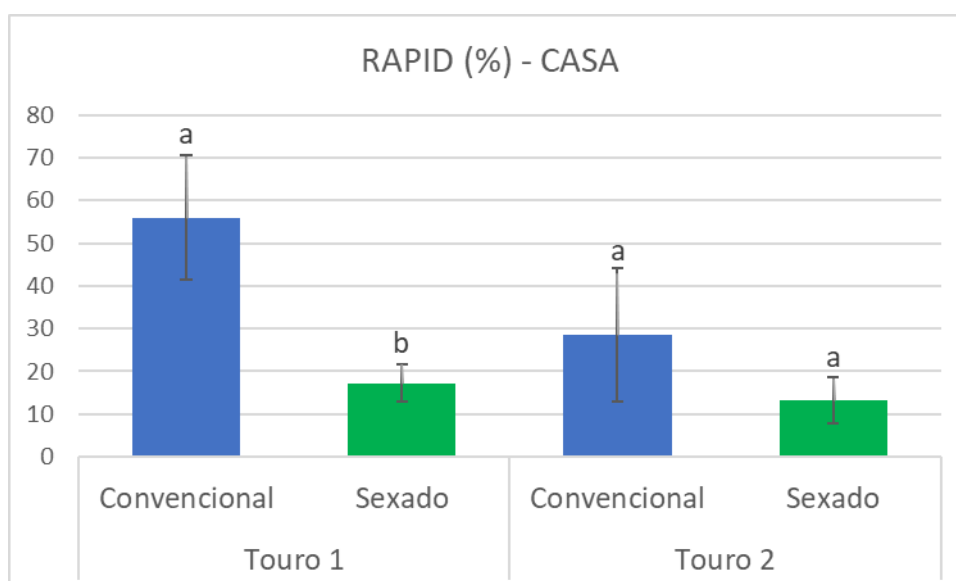


Figura 15. Espermatozoides com velocidade rápida (RAPID) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2. Barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si dentro de cada touro ($P < 0,05$).

Os parâmetros de VCL, VSL, BCF e STR, não foram diferentes estatisticamente quando comparados entre touros (VCL: $P = 0,111$; VSL: $P =$

0,250; BCF: P=0,593; STR: P=0,899) e dentro de touros (VCL: P=0,095; VSL: P=0,089; BCF: P=0,083; STR: P=1,000), por tipo de sêmen, conforme demonstrado na tabela 12. Apesar dos valores de VCL não serem diferentes quando comparados, ao avaliar o touro 1 é possível observar tendência estatística (P=0,052) de menor VCL para o sêmen sexado em comparação com o convencional.

Com relação ao VAP, o sêmen convencional do touro 1 foi estatisticamente maior em comparação com o sexado (P=0,043), e no touro 2 não se observou diferença (P=0,337) (tabela 12 e figura 16).

A linearidade dos espermatozoides do touro 1 foi semelhante estatisticamente, quando comparados sêmen convencional e sexado (P=0,764). O touro 2, por sua vez, apresentou menor porcentagem de linearidade do movimento espermático do sêmen sexado em relação ao convencional (P=0,05), conforme apresentados na tabela 12 e na figura 17.

Por fim, o ALH do sêmen sexado de ambos os touros foi significativamente maior quando comparado com o sêmen convencional (Touro 1: P=0,039; Touro 2: P= 0,004), como demonstrado na tabela 12 e figura 18.

Tabela 12. Parâmetros de cinética espermática obtidos pela análise computadorizada do sêmen (CASA), convencional ou sexado, pós descongelamento, dos touros 1 e 2.

	Touro 1		Touro 2	
	Convencional	Sexado	Convencional	Sexado
VAP ($\mu\text{m/s}$)	40,56 \pm 9,06 a	29,00 \pm 3,46 b	31,80 \pm 5,46 a	26,86 \pm 0,80 a
VCL ($\mu\text{m/s}$)	59,16 \pm 9,93 A	45,90 \pm 3,90 B	46,33 \pm 9,40	44,03 \pm 0,41
VSL ($\mu\text{m/s}$)	30,03 \pm 8,77	22,53 \pm 3,95	24,80 \pm 5,72	19,73 \pm 0,70
BCF (Hz)	9,63 \pm 1,28	11,06 \pm 1,10	9,70 \pm 0,69	10,40 \pm 0,36
STR (%)	73,20 \pm 6,00	77,4 \pm 4,32	77,7 \pm 2,28	73,5 \pm 1,86
LIN (%)	50,00 \pm 7,10 a	48,86 \pm 4,27 a	53,23 \pm 3,00 a	44,80 \pm 1,47 b
ALH (μm)	2,63 \pm 0,05 a	2,90 \pm 0,10 b	2,43 \pm 0,23 a	2,86 \pm 0,05 b

a,b – para cada touro, letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam P<0,05; A,B – para cada touro, letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam P<0,10 e >0,05. VAP: velocidade do trajeto ; VCL: Velocidade Curvilinear; VSL: Velocidade Progressiva, BCF: Freqüência de Batimentos, STR: Retilinearidade, LIN: Linearidade; ALH Amplitude Lateral da Cabeça.

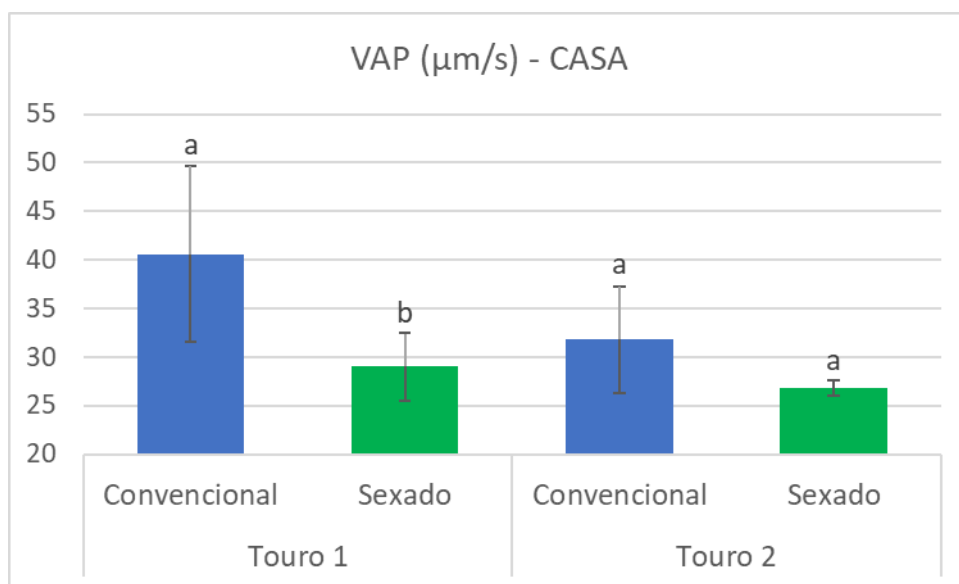


Figura 16. Velocidade do trajeto (VAP) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2. Barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si dentro de cada touro ($P < 0,05$).

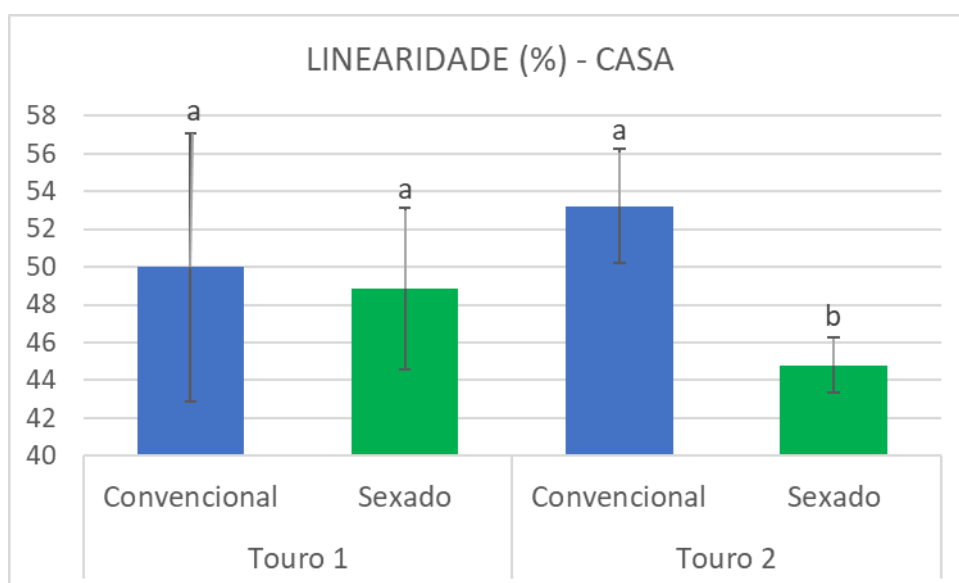


Figura 17. Linearidade (LIN) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2. Barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si dentro de cada touro ($P < 0,05$).

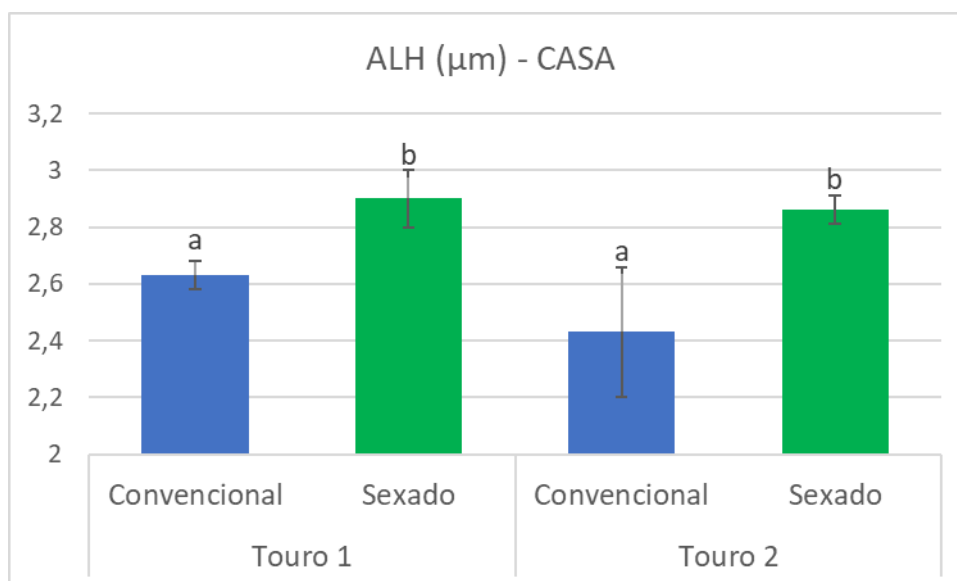


Figura 18. Amplitude lateral da cabeça (ALH) de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2. Barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si dentro de cada touro ($P < 0,05$).

A análise computadorizada da morfometria e estrutura cromatínica das amostras de sêmen resultou em elipsidade significativamente menor no sêmen sexado do touro 2 em relação ao sêmen convencional ($P=0,020$), enquanto nos espermatozoides do touro 1 não se observou diferenças na elipsidade em relação ao tipo de sêmen ($P=0,552$) (tabela 13 e figura 19 e tabela 21).

A medida morfométrica largura/comprimento não foi diferente estatisticamente entre touros ($P=0,184$), como também observado na tabela 13

Adicionalmente, o touro 2 apresenta o fator de forma significativamente maior no sêmen convencional em comparação com o sêmen sexado ($P=0,028$), enquanto o touro 1 não apresenta diferença estatística entre o tipo de sêmen para o parâmetro em questão ($P=0,249$) (tabela 13 e figura 20).

Tabela 13. Elipsidade, razão entre largura e comprimento da análise morfométrica e fator de forma dos espermatozoides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento, dos touros 1 e 2.

	Touro 1		Touro 2	
	Convencional	Sexado	Convencional	Sexado
Elipsidade	0,330±0,010a	0,332±0,010a	0,342±0,024a	0,306±0,011 b
Largura/comprimento	0,503±0,011a	0,513±0,012a	0,528±0,044A	0,531±0,013 B
Fator de forma	0,886±0,003a	0,883±0,003a	0,917±0,062a	0,889±0,002 b

a,b – para cada touro, letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam $P < 0,05$.

A,B – para cada touro, letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam $P < 0,10$ e $> 0,05$.

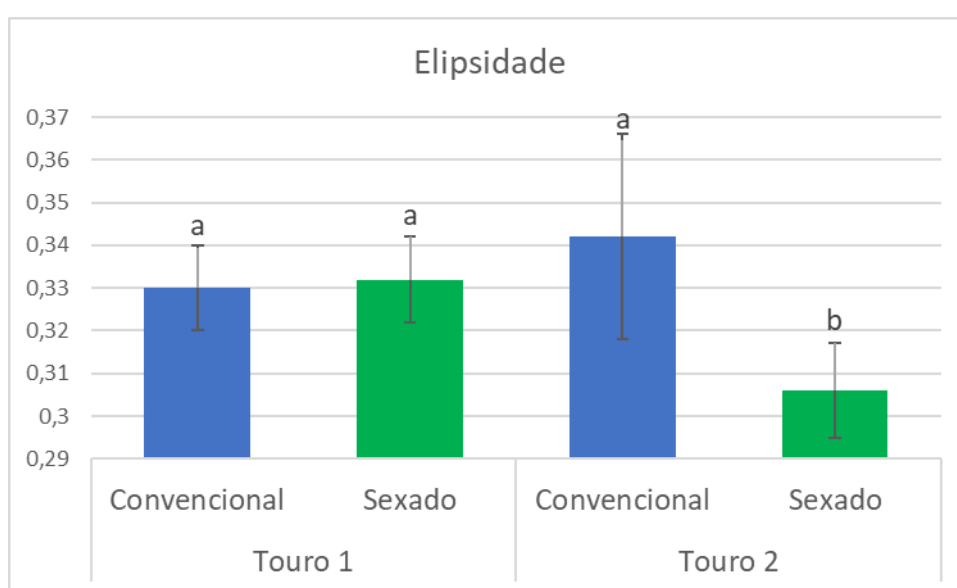


Figura 19. Elipsidade dos espermatozoides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.

Barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si dentro de cada touro ($P < 0,05$).

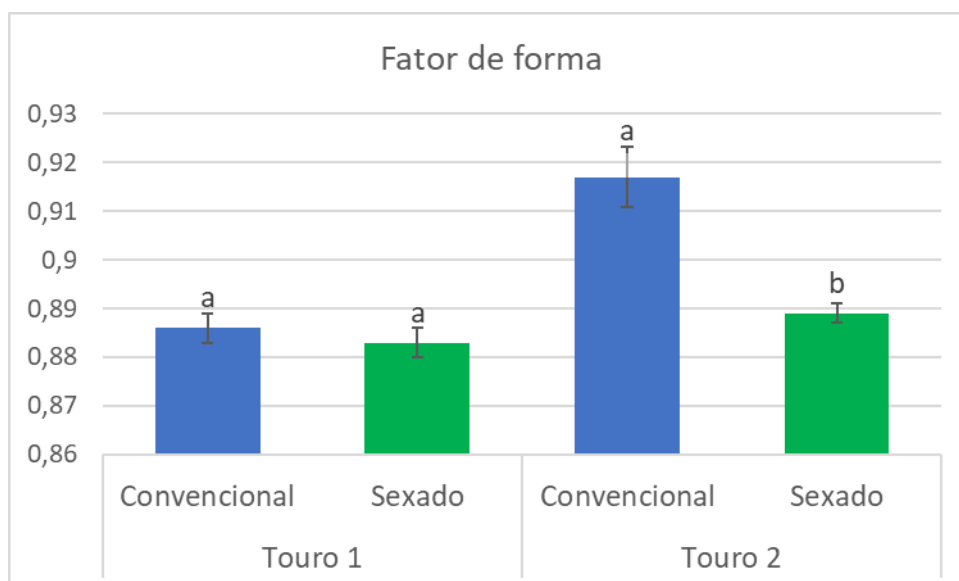


Figura 20. Fator de forma dos espermatozóides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2. Barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si dentro de cada touro ($P < 0,05$).

Para o Fourier 1, os valores são significativamente maiores no sêmen convencional do touro 1, em relação ao sêmen sexado do mesmo animal ($P = 0,026$), como observado na tabela 14 e figura 21.

A simetria antero-posterior foi significativamente diferente entre tipo de sêmen dentro de ambos os touros. O sêmen convencional do touro 1 apresentou menor simetria em relação ao sêmen sexado ($P < 0,001$) e no touro 2 o sêmen convencional apresentou maior simetria em comparação ao sexado ($P = 0,004$), como também demonstrado na tabela 14 e representado na figura 22.

Tabela 14. Fourier 1 e Simetria antero-posterior (SAP) da análise morfométrica dos espermatozoides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento, dos touros 1 e 2.

	Touro 1		Touro 2	
	Convencional	Sexado	Convencional	Sexado
Fourier 1	119,925±11,565a	103,777±1,568b	107,787±7,091A	94,513±5,009B
SAP	0,920±0,001 a	0,930±0,003 b	0,966±0,072 a	0,933±0,002 b

a,b – para cada touro, letras minúsculas diferentes na mesma linha indicam $P < 0,05$;

A,B – para cada touro, letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam $P < 0,10$ e $> 0,05$.

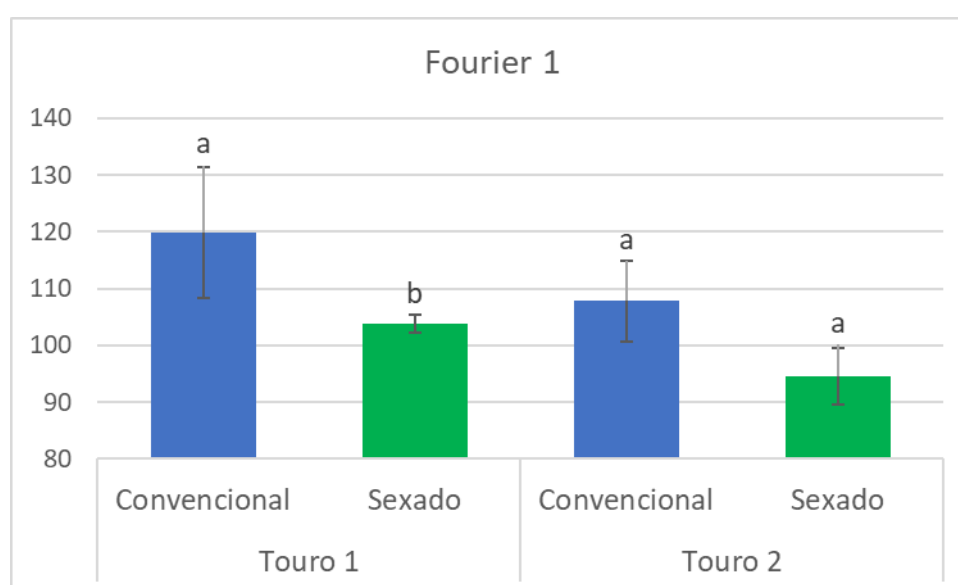


Figura 21. Fourier 1 dos espermatozóides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2.

Barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si dentro de cada touro ($P < 0,05$).

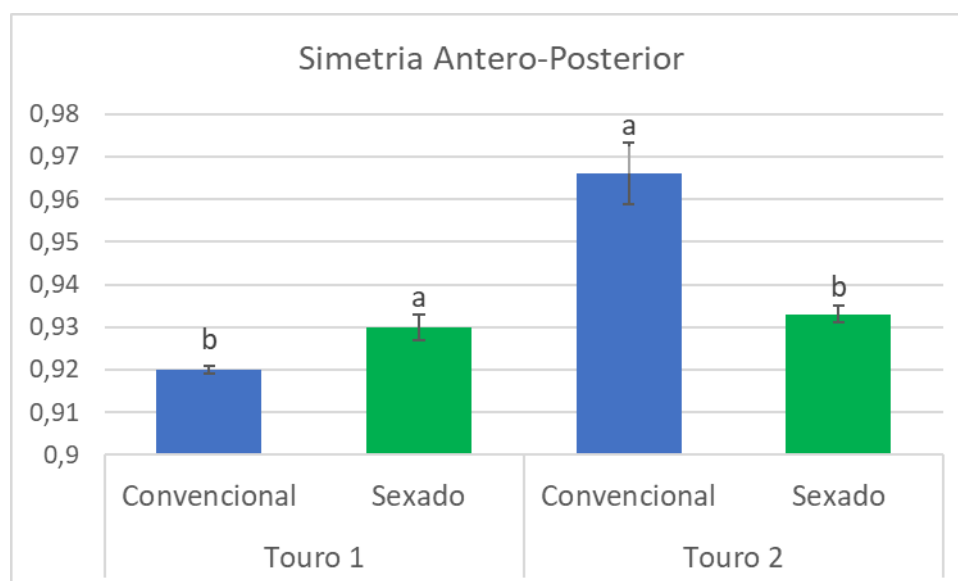


Figura 22. Simetria antero posterior dos espermatozoides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2. Barras com letras minúsculas diferentes (a,b) diferem entre si dentro de cada touro ($P < 0,05$).

Os resultados de descompactação de DNA (Touro 1: $P=0,798$; Touro 2: $P=0,492$) e heterogeneidade cromatínica (Touro 1: $P=0,186$; Touro 2: $P=0,912$) não foram significativamente diferentes entre tipo de sêmen para ambos os touros, conforme demonstrado na tabela 15.

Tabela 15. Descompactação do DNA e heterogeneidade cromatínica dos espermatozoides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento, dos touros 1 e 2

	Touro 1		Touro 2	
	Convencional	Sexado	Convencional	Sexado
Descompactação	11,3030±0,518	4,010±0,919	5,010±0,637	4,350±1,876
Heretogeneidade	3,910±0,705	4,661±0,444	4,040±0,355	4,100±0,892

Os demais valores avaliados pela análise computadorizada da morfometria e estrutura cromatínica não apresentaram diferenças significantes entre touro e tipo de sêmen [(Área: touro $P=0,679$; tipo de sêmen $P=0,887$), (Perímetro: touro

P=0,419; tipo de sêmen P=0,700), (Largura: touro P=0,996; tipo de sêmen P=0,517), (Comprimento: touro P=0,250; tipo de sêmen P=0,281), (Fourier 0: touro P=0,068; tipo de sêmen P=0,179), (Fourier 2: touro P= 0,941; tipo de sêmen P=0,131); (Simetria lateral: touro P=0,227, tipo de sêmen P=0,663)] e estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16. Área, perímetro, largura, comprimento, Fourier 0, Fourier 2 e simetria lateral dos espermatozoides de amostras de sêmen, convencional ou sexado, pós descongelamento dos touros 1 e 2

	Touro 1		Touro 2	
	Convencional	Sexado	Convencional	Sexado
Área	10,090±0,945	10,173±0,306	9,974± 0,145	9,992±0,655
Perímetro	10,334±0,476	10,314±0,130	10,240±0,024	10,130±0,277
Largura	2,007±0,100	2,022±0,047	1,993±0,035	2,035±0,089
Comprimento	3,981±0,186	3,951±0,042	3,946±0,035	3,834±0,084
Fourier 0	945,134±84,879	916,191±23,448	896,568±52,752	835,011±28,358
Fourier 2	81,77±7,798	87,313±9,855	80,995±4,533	88,694±2,629
Simetria lateral	0,958±0,001	0,960±0,002	1,002±0,070	0,960±0,002

7. DISCUSSÃO

7.1. EXPERIMENTO A CAMPO

Os resultados deste estudo demonstraram que a aplicação de PGF2 α , no momento da IA não melhorou a fertilidade de vacas Nelore multíparas em lactação que foram inseminadas com sêmen sexado. O tratamento, por sua vez, teve efeito benéfico em vacas que não apresentaram cio no momento da IA, independentemente do tipo de sêmen que receberam.

Independente do tratamento e/ou sêmen utilizado, animais com maior ECC apresentaram melhores TC do que animais mais magros. O ECC do rebanho no momento da IA é outro fator que tem grande contribuição para o sucesso da IATF (Sá Filho et al., 2012). Sá Filho et al. (2011), Sales et al. (2011a) e Nishmura

et al. (2018) demonstraram que vacas com $ECC \leq 2,75$ apresentam TC menor em comparação com aquelas com $ECC \geq 2,75$. Esses resultados reforçam a relação positiva entre o ECC e TC observadas no presente estudo.

Vacas com reduzido estado nutricional apresentam hipotálamo mais sensível ao feedback negativo promovido pelo E2 (Wiltbank et al., 2002), inibindo a liberação de GnRH, e retardando o retorno da ciclicidade (Hess et al., 2005). Adicionalmente, vacas com ECC reduzido apresentam menor concentração de leptina a qual estimula a atividade reprodutiva do animal. A leptina realiza um papel fundamental na atividade reprodutiva uma vez que sinaliza o estado nutricional ao eixo hipotalâmico-hipofisário (Barash et al., 1996; Hausman et al., 2012). De forma similar, o baixo ECC atua regulando negativamente os níveis de insulina e IGF1 circulantes (Vicini et al., 1991; Butler et al., 2003). Vacas com bom ECC apresentam concentrações adequadas de IGF1 capaz de promover diversos benefícios para a reprodução. Dentre as inúmeras ações positivas do IGF1 na reprodução, destacam-se que o IGF1 aumenta sítios de ligação de LH no folículo, aumentando a capacidade do mesmo em produzir E2. Assim, maiores concentrações de IGF1 circulantes são fundamentais para adequados crescimento e maturação folicular antes de ovulação (Ginther et al., 2002; Fortune et al., 2009; Ginther, 2016).

Outro fator presente em vacas com ECC baixo é o hormônio ghrelina, secretado pelo trato gastrointestinal, e está em altas quantidade no sangue durante fase de balanço energético negativo (BEN) (Wertz-Lutz et al., 2006; Ferrini et al., 2009). Autores sugerem que este hormônio atua no hipotálamo, pelo fato de que receptores para ghrelina foram encontrados nesse local, de forma que inibe a secreção de GnRH (Wertz-Lutz et al., 2006; Bradford e Allen, 2008; DiVall et al., 2010).

As vacas do experimento que apresentaram cio no dia da IA apresentaram TC significativamente maior que aquelas que não demonstraram cio, o que está de acordo com o relatado por estudos anteriores (Sá Filho et al., 2006; Sá Filho et al., 2011; Perry et al., 2014; Rodrigues et al., 2018). Animais que expressam cio apresentam maiores folículos dominantes, o que está diretamente relacionado com maior produção de E2 em comparação com vacas que não demonstraram cio (Rodrigues et al., 2018). Assim, quanto maior a quantidade deste hormônio durante o período de proestro, maior a capacidade ovulatória.

Adicionalmente, grandes folículos (com maior quantidade de células da granulosa), originarão CLs mais volumosos (Murdoch and Van Kirk, 1998), com maior capacidade de produção de P4 (Rodrigues et al., 2018; Cooke et al., 2019) e, portanto, maior probabilidade para a manutenção da prenhez, para a sobrevivência embrionária e para maiores taxas de gestação (Santos et al., 2010, Rodrigues et al., 2018). As altas concentrações de E2 também aumentam a sensibilidade do hipotálamo ao GnRH e a expressão de receptores de GnRH nas membranas dos gonadotrofos (Gregg et al., 1990; Turzillo et al., 1994; Nett et al., 2002).

O E2 é capaz de desencadear uma cascata de eventos que irão favorecer, posteriormente, a ovulação do folículo dominante presente no ovário da vaca. Durante o aumento nas concentrações de E2 aumenta-se o estímulo para maior liberação de GnRH, além de maior expressão de receptores de GnRH locais no hipotálamo. Conseqüentemente, a hipófise recebe grande estímulo para liberação de LH, favorecendo o pico hormonal, evento fundamental para a ovulação (Wise et al., 1984; Fortune et al., 2009)

O E2 também atua na modificação da natureza do muco do sistema genital feminino (Matnner, 1973). Em fase estrogênica o muco cervical está presente em maior quantidade e apresenta maior grau de hidratação, o que facilita a passagem dos espermatozoides pelo trato reprodutivo (Hawk, 1983). São sugeridas ainda outras formas de favorecimento do estrógeno sobre o transporte espermático. Após a cópula ou inseminação o E2 interfere na contração uterina, a qual ocorre de forma regular e tônica, com máximo tempo de duração, auxiliando o movimento espermático em direção à junção útero-tubárica e istmo (Hawk, 1983; Rodriguez et al., 1987), funções estas que auxiliam e fornecem suporte para a futura fertilização do oócito.

Descreve-se ainda uma melhor adaptação do útero para adequado acolhimento e desenvolvimento do concepto (Davooide et al., 2016), uma vez que o E2 está diretamente ligado à produção de glicoproteínas locais e nutrientes uterinos necessários para o desenvolvimento inicial fetal (Geisert et al., 1992; Gray et al., 2001). Neste sentido, Davooide et al (2016) demonstraram que animais com expressão de cio possuíam melhor expressão endometrial de genes relacionados com supressão do sistema imune local, criando ambiente propício para reconhecimento materno, e de genes relacionados com a adesão

do conceito. Sendo assim, vacas com expressão de cio tem diversos benefícios deste evento fisiológico, que aumenta a capacidade de tornar-se gestantes, aumentando a taxa de gestação do rebanho.

Além da demonstração de cio, o tipo de sêmen e/ou o touro utilizado têm sido constantemente descritos como importantes fatores que afetam o sucesso da gestação (Thomas et al.; 2004; Sales et al., 2011a). Embora no presente estudo não tenha sido observado efeito do touro, o tipo de sêmen influenciou significativamente a probabilidade de prenhez.

. Diversos autores demonstraram que a TC de vacas inseminadas com sêmen sexado é significativamente menor quando comparados com inseminações realizadas com sêmen convencional (Thomas et al., 2004; DeJarnette et al., 2008; Sá Filho et al., 2011; Sá Filho et al., 2012; Sales et al., 2011a), como constatado neste experimento.

Esta diferença de fertilidade pode ser explicada pelo processo que as células espermáticas sofrem durante a sexagem, o qual pode gerar modificações à sua estrutura, como observado por Carvalho et al (2013). Os autores concluíram que a citometria de fluxo causa modificações na membrana plasmática, alterando a forma da cabeça dos espermatozoides, as quais se assemelham com as modificações que ocorrem naturalmente durante o processo fisiológico de capacitação espermática (Bucci et al., 2012; Carvalho et al., 2013).

Em 2018, Carvalho et al., ao trabalharam com explantes de células do oviduto bovino incubadas com mostras de sêmen sexado ou convencional, a fim de avaliar a capacidade de ligação dos espermatozoides às células ovidutais, observaram que os espermatozoides sexados iniciaram a incubação com membrana plasmática mais desestabilizada, em relação ao sêmen convencional, e, 24 hs após a incubação, o grupo sexado tinha menor quantidade de espermatozoides ligados à membrana. Estes resultados reforçam a hipótese de que o processo de sexagem pode promover o início precoce de capacitação dos espermatozoides, o que provoca seu desacoplamento do reservatório criado no oviduto, diminuindo a longevidade celular.

O processo de sexagem também pode prejudicar os espermatozoides quando se trata do seu material genético. Golsalvez et al. (2011b) concluem que a citometria de fluxo pode causar danos subclínicos ao DNA espermático, e

esses danos começam a se expressar ao longo do tempo. Tal fato também contribui para menor fertilidade do sêmen sexado, visto que espermatozoides que apresentam menor integridade e/ou viabilidade de seu material genético com o passar do tempo, podem apresentar redução de sua capacidade de fertilização do oócito e/ou do desenvolvimento embrionário inicial.

Neste experimento, hipotetizou-se que a aplicação de PGF2 α no momento da IA melhoraria a fertilidade dos animais que receberam sêmen sexado. Porém, embora a TC das vacas inseminadas com sêmen sexado tenha sido menor quando comparada com sêmen convencional, não houve efeito da aplicação de PGF2 α nesses grupos.

A PGF2 α possui diversas ações além da tradicionalmente conhecida, a luteólise. Em protocolos de IATF, a segunda dose de PGF2 α mostrou-se benéfica em animais sem CL (Pereira et al., 2015; Lopes Jr et al., 2017; Noronha et al., 2020). Lopes Jr et al. (2017) observou que a segunda dose de PGF2 α foi capaz de promover pico de LH com maior duração, maior proporção de pulsos e folículos com maior concentração intrafolicular de E2, fatores que favoreceram o desenvolvimento dos folículos dos animais tratados. Da mesma forma, Noronha et al. (2020), ao avaliarem vacas de corte em anestro e com baixo ECC, perceberam efeito positivo da aplicação adicional de PGF2 α no diâmetro folicular das mesmas. Estes animais provavelmente tiveram aumento da responsividade da hipófise ao GnRH quando expostos à PGF2 α , retornando mais rapidamente à ciclicidade (Randel et al., 1996), e maior exposição ao LH, como proposto por Lopes Jr (2017), o que pode ter favorecido maior crescimento folicular, mesmo em animais em condições fisiológicas desvantajosas.

Diante dessas funções, acredita-se que a aplicação de PGF2 α no momento da IA pode favorecer o processo ovulatório já que essa substância atua aumentando a liberação de LH (Warber et al., 1976; Randel et al., 1996) e parece aumentar a responsividade da hipófise o GnRH em animais no anestro pós-parto (Randel et al., 1996).

De acordo Sirois et al. (2000) a PGF2 α está intimamente ligada à ovulação em vacas, uma vez que ao se bloquear sua produção ocorreu também o bloqueio da ovulação. Adicionalmente, em vacas, a administração de hCG ou GnRH promoveu aumento da concentração de COX-2 (Liu et al., 1997; Sirois, 1994; Tsai et al., 1996) e de PG sintase (Curry et al., 1987; Hedin et al., 1987; Huslig

et al., 1978; Sirois, 1994) nas células da granulosa 18 hs após o pico de LH. Desta forma, observa-se que o aumento local de PGF2 α favorece o evento da ovulação e aumenta a contratilidade da musculatura lisa local (Singh et al., 1979). Adicionalmente, o pico de LH, seguido do aumento de prostaglandinas locais tem ação nas expressões de metaloproteinases presentes no folículo pré-ovulatório (Li et al., 2006). Neste sentido, foi demonstrado que a PGF2 α estimula principalmente a ADMTS-1 (Fortune et al., 2009; Willis et al., 2017), que atua na degradação da parede folicular, auxiliando a ovulação e formação do CL (McArthur et al., 2000; Somerville et al., 2003).

Porém, contrariando a hipótese inicial do experimento, os resultados do presente estudo demonstraram que a aplicação da PGF2 α no momento da IA não melhorou a fertilidade de animais que foram inseminadas com sêmen sexado.

Estudos mostram que atrasar o momento da IA em vacas que vão receber sêmen sexado é uma boa estratégia para melhorar a TC (Thomas et al., 2004; Sales et al., 2011a). A inseminação próxima à ovulação tem como objetivo diminuir o tempo de permanência do sêmen no trato reprodutivo feminino, uma vez que espermatozoides sexados parecem ter o processo de capacitação precocemente iniciado, sendo necessário menor tempo de interação com o oviduto e reservatório espermático, em relação ao sêmen convencional (Hawk, 1987; Lu et al., 2004)

O presente estudo teve como objetivo acelerar a ovulação dos animais com a administração de PGF2 α , com base nas ações que o fármaco tem sobre os folículos pré-ovulatórios e sobre a cascata de eventos que envolve a ovulação.

Conforme anteriormente mencionado a PGF2 α favorece o aumento da responsividade da hipófise ao GnRH (Day et al., 1987; Randel et al., 1996), as concentrações de LH periovulatórias (Sirois et al., 2000), a contratilidade muscular dos ovários (Senger, 2003; Singh et al., 1979), as concentrações de enzimas proteolíticas no fluido folicular (Yang et al., 1974; Armstrong et al., 1974; Tsang et al., 1979), além dos benefícios ao ambiente uterino (Zhang et al., 2017; Gao et al., 2018; Li et al., 2020; Fu et al., 2020).

Assim, acreditou-se que, com essas ações da PGF2 α , os animais inseminados com sêmen sexado poderiam ter sido beneficiados, o que não ocorreu. Entretanto, não podemos descartar o fato de que espermatozoides sexados podem apresentar, além de capacitação precoce, danos de DNA ao

longo do tempo, o que poderia afetar inclusive o desenvolvimento embrionário inicial. Neste caso, alterações ovulatórias causadas pela PGF2 α no momento da IA poderiam não beneficiar a fertilidade deste tipo de sêmen.

Cabe, entretanto, destacar que os efeitos da PGF2 α foram evidenciados em animais que não expressaram estro, o que parece não ocorrer em animais que demonstraram cio evidente. Ou seja, a aplicação de PGF2 α no momento da IA apresentou resultado interessante quando se analisa a TC de vacas de acordo com a expressão de cio, independentemente do tipo de sêmen que receberam.

Observamos que nas vacas sem expressão de cio a aplicação de PGF2 α apresentou tendência em melhorar a fertilidade (35,9%) em comparação com aquelas que não receberam o tratamento (21,2%) ($P=0,077$). Já nos animais que expressaram cio, não foi observado efeito do tratamento (41% sem PGF2 α versus 41,1% com PGF2 α). Assim, animais sem expressão de cio não usufruem das vantagens das altas concentrações de E2, como citado anteriormente (Sá Filho et al., 2006; Sá Filho et al., 2011; Perry et al., 2014; Rodrigues et al., 2018). Portanto, o crescimento e desenvolvimento folicular, bem como a receptividade uterina podem se tornar prejudicadas.

Desta forma, visto que a PGF2 α atua aumentando a sensibilidade da hipófise ao GnRH e a liberação de LH (Warberg et al., 1976; Redel et al., 1996), o que aumenta a capacidade esteroidogênica do folículo dominante, sugerimos que os animais que não apresentaram cio e receberam a PGF2 α no momento da IA pode ter apresentado maior secreção de LH do que aquelas que não receberam o tratamento, embora nosso delineamento experimental permita essa confirmação.

Adicionalmente, além do efeito da PGF2 α a nível cerebral e esteroidogênico, o efeito positivo da aplicação de PGF2 α no momento da IA nas vacas sem expressão de estro pode ser também explicado pelas ações da PGF2 α a nível uterino.

Fisiologicamente, no endométrio da vaca, a PGF2 α encontra-se em maiores concentrações durante a fase de proestro e estro (Shemesh e Hansel, 1975), pois o E2 regula positivamente a expressão de COX-2 e PTGS-2, enzimas essenciais no processo de biossíntese da PGF2 α (Arosh et al., 2014; St-Louis et al., 2010; Shoda et al., 1995). O E2 também participa da regulação positiva da expressão de receptores endometriais para PGF2 α , como observado por Huang

et al. (2015) e Li et al. (2020) em cultivos de explantes ovidutais e endometriais tratados com E2. Gao et al. (2018), demonstraram ainda que a própria PGF2 α pode atuar regulando positivamente seus receptores (além de favorecer a expressão gênica para a enzima PTGS-2), mostrando que não esse processo não é exclusivamente dependente do E2.

Ainda, na fase periovulatória, a PGF2 α aumenta a expressão de fatores de crescimento uterino, como CTGF, VEGF, FGF2, MMP2, TGFB1 e de marcadores que indicam o crescimento epitelial (CK-18) e fibroblástico (FSP-1 e PCNA), além de reduzir fatores apoptóticos como a caspase-3 (Zhang et al., 2017). Ela também atua nas fases do ciclo celular e no processo de proliferação das células do endométrio, regulando a produção de complexos proteicos que participam das fases G1, S, G2 e M (Fu et al., 2020).

Por fim, foi também demonstrado que a PGF2 α exerce papel de grande importância na remodelação epitelial do útero, favorecendo expressão de fatores que regulam a angiogênese local (Ferrara, 2004; Kaczynski et al., 2016), proliferação e diferenciação celular (Moller et al. 2001; Okumu et al. 2014) e formação de glândulas uterinas (Forde et al. 2010).

Assim, considerando os trabalhos acima citados, os resultados do presente estudo sugerem que a injeção de PGF2 α no momento da AI pode ter apresentado um papel favorável na pulsatilidade de LH e/ou na funcionalidade das células da granulosa em vacas com expressão de estro reduzida. Além disso, a aplicação de PGF2 α pode ter contribuído positivamente para o melhor preparo uterino, melhorando a receptividade do endométrio para a futura gestação.

7.2. EXPERIMENTO LABORATORIAL

Os resultados da análise seminal dos touros 1 e 2, utilizados no protocolo de IATF da Fazenda 1 do experimento, demonstram que o processo de sexagem pode interferir na qualidade dos espermatozoides e ser um dos fatores que afetam negativamente a TC em relação ao sêmen convencional, que foi significativamente diferente no presente estudo e corrobora com em trabalhos desenvolvidos anteriormente (Seidel et al., 1999; Seidel e Gerner, 2002; Seidel e Schenk, 2002; Thomas et al., 2004; Sales et al., 2011a).

A fertilidade a campo de touros está altamente correlacionada com o parâmetro de porcentagem de espermatozoides móveis (Correa et al., 1997; Farrell et al., 1998). Ao avaliar touros considerados de alta e baixa fertilidade, Corea et al (1997) observaram maior motilidade total (MT) espermática em touros considerados mais férteis em comparação com aquele com fertilidade reduzida ($P < 0,001$). Oliveira et al (2012), em experimento desenvolvido a campo com IATF, utilizando diferente touros, observaram tendência de menor MT ($P = 0,07$) no touro que apresentou numericamente menor taxa de concepção. Assim como outros autores associaram positivamente a MT e motilidade progressiva (MP) com a fertilidade dos animais (Kathiravan et al., 2008; Guillan et al., 2008; Gliози et al., 2017).

A motilidade espermática está intimamente ligada à capacidade do espermatozoide em penetrar no muco presente no trato reprodutivo feminino (Aikten, 2006; Guillen et al., 2008). Touros com maior fertilidade são mais hábeis em penetrar e transpor barreiras físicas que mimetizam o muco, e essa capacidade parece estar correlacionada com a capacidade de fertilização do oócito (Aikten et al., 1992; Aikten, 2006; Phillips et al., 2004; Guillan et al., 2008).

A diferença estatística observada na concentração espermática das amostras de sêmen sexado em relação ao sêmen convencional, tanto para touro 1 quanto para touro 2 (tabela 11), já era esperada. Assim como a SMP, que apresenta menor valor nas amostras de sêmen sexado em comparação com convencional, de forma significativa para touro 1 ($P < 0,001$). A quantidade de espermatozoides sexados é normalmente menor em relação ao sêmen convencional (Moore e Hoster, 2017), devido ao processo ser lento e com alto custo (Seidel et al., 2008). Esta diferença ainda é observada mesmo quando utilizados novos ajustes na técnica tradicional de citometria de fluxo, sendo viável aumentar a quantidade de espermatozoides na palheta, aumentando de 2×10^6 para 4×10^6 , em média (Marin et al., 2018).

O teste hipo-osmótico tem a finalidade de avaliar a integridade funcional de membrana dos espermatozoides (Revell e Mrode, 1994; Correa et al., 1997; Siqueira et al., 2007), uma vez que um espermatozoide com membrana íntegra em um meio hipo-osmótico, sofre influxo de água e, conseqüentemente edema, sendo observado pela cauda enrolada.

No presente estudo, observa-se que o sêmen sexado apresenta menor porcentagem de espermatozoides com cauda enrolada ($P < 0,05$), em ambos os touros, demonstrando que as amostras possuíam maior número de células com membranas lesionadas e/ou afuncionais em relação ao sêmen convencional. Este resultado pode ser explicado por relatos de que o processo de sexagem causa danos causados à membrana plasmática. Neste sentido, os espermatozoides sexados, submetidos a processamentos em meio com alta pressão e exposição ao raio laser, podem sofrer danos celulares que favorecem a redução da integridade e desestabilização da membrana plasmática, que estimula o início precoce do processo de capacitação, fato que diminui o tempo de viabilidade espermática (Maxwell et al. 1998, Carvalho et al., 2013; Carvalho et al., 2018; Pierez et al., 2020),

Os espermatozoides com membrana danificada não sofrem com o influxo de água, pois perderam a capacidade de transporte seletivo de moléculas e de manutenção do equilíbrio osmótico com o meio (Jeyendran et al., 1984). A maior porcentagem de espermatozoides com menor integridade de membrana do sêmen sexado pode ser um dos fatores que afeta negativamente a TC de vacas inseminadas com esse tipo de sêmen.

De acordo com os resultados observados na fazenda 1 do experimento a campo deste estudo, observamos uma importante redução da fertilidade a campo dos touros inseminados com sêmen sexado (tabela 8), que pode estar relacionado à menor motilidade e integridade de membrana desse tipo de sêmen, uma vez que a integridade da membrana plasmática é essencial para a manutenção da viabilidade e capacidade de fecundação do espermatozoide (Õura e Toshimori, 1990). Outros estudos também observaram correlação positiva entre integridade de membrana plasmática e fertilidade a campo e in vitro (Januskauskas et al., 1999; Tartaglione e Ritta, 2004). Da mesma forma, Oliveira et al. (2013) identificaram a integridade de membrana analisada pelo teste Hiposmótico como um dos importantes preditores da fertilidade a campo.

Adicionalmente, cabe destacar que, nos resultados de fertilidade a campo, não foi observado o efeito de touro na TC dos animais, porém, quando avaliados separadamente em laboratórios é possível perceber que existem diferenças entre indivíduos que possam explicar de forma particular a baixa fertilidade do sêmen sexado, observado para os touros 1 e 2.

Com relação aos resultados obtidos pelo sistema CASA, foi observado que MT e MP são significativamente maiores quando o sêmen convencional do touro 1 é avaliado, em relação ao sexado, tendo o sêmen sexado menor porcentagem de células moveis, similares aos resultados encontrados por Pirez et al. (2020).

Conforme anteriormente mencionado, a menor motilidade do sêmen sexado pode estar relacionado com menor fertilidade do mesmo (Corrêa et al., 1997), uma vez que menor quantidade de espermatozoides móveis pode refletir em menor quantidade de células que chegarão até a ampola para a fertilização do oócito (Kunz et al., 1996; Kolle et al., 2009). A menor motilidade progressiva também implica em maior dificuldade em passar pela barreira útero-tubárica, pois os espermatozoides necessitam de movimento progressivo e retilíneo para atravessar a estrutura ramificada e complexa que o local possui (Wrobel e al., 1993; Yaniz et al., 2000). Entretanto, destaca-se que a seleção espermática que ocorre na junção útero tubárica não envolve apenas a necessidade de motilidade espermática satisfatória, mas também a interação entre proteínas de membrana espermática e epitélio local (Wrobel e al., 1993; Okabe, 2018)

Além da alta motilidade espermática, a quantidade de espermatozoides com velocidade rápida é essencial para que os mesmos consigam passar pelo trato reprodutivo feminino, rompendo barreira de muco e movimento ciliar contrário à sua trajetória, além contribuir para o transporte espermático prolongado até a junção útero-tubárica (Suarez e Pacey, 2006; Kolle et al., 2009, Pirez et al., 2020). Nos resultados do experimento observa-se que no touro 1 houve diferença significativa para RAP e VAP ($P < 0.05$), ambos parâmetros ligados à velocidade da célula espermática, onde o sêmen sexado apresentou menor velocidade em comparação com o convencional, podendo ser outros fatores que influenciam negativamente nos resultados de TC. Neste sentido, Oliveira et al. (2013) também observaram que RAP e VAP foram importantes preditores da fertilidade a campo, de acordo com os touros utilizados na IATF do estudo citado.

A amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) é citado como um dos indicadores de hiperativação espermática (quando associados com outros parâmetros cinéticos), caracterizado como movimento não progressivo e não

linear, com aumento da amplitude dos movimentos laterais de cabeça (Auger et al., 1989; Verstegen et al., 2002). Esse parâmetro foi estatisticamente maior nas amostras de sêmen sexado em relação com convencional, de ambos touros no presente estudo ($P < 0.05$), corroborando com resultados relatados por Gallego (2010). Aumento de ALH pode ser indicativo de pior qualidade espermática, uma vez que o deslocamento lateral da cabeça não é desejado por interferir na progressividade do espermatozoide (Arruda, 2000). Animais com alto ALH podem estar em processo de hiperativação celular, como citado acima, e conseqüentemente, espermatozoides hiperativados apresentam aumento da velocidade curvilínea (VCL), de acordo com Januskauskas et al. (1999), porém, não houve diferença estatística entre sêmen sexado e convencional dos touros 1 e 2 deste ($P > 0.05$).

A hiperativação espermática pode ocorrer em conseqüência do início da capacitação. Desta forma, espermatozoides passam a apresentar um padrão de motilidade não progressivo e com maior amplitude, o que não é interessante que ocorra logo após a IA. Assim, a hiperativação pode interferir negativamente na capacidade fecundante dos espermatozoides, sendo um indicador de baixa qualidade seminal (Arruda, 2000; Verstegen et al., 2002).

De acordo com os resultados aqui apresentados, embora não seja possível confirmar hiperativação nas amostras de sêmen sexado, cabe destacar o aumento de ALH para ambos os touros, como um parâmetro comumente relacionado a uma característica relacionada com menor capacidade fecundante, quando as amostras são utilizadas para IA.

A linearidade é outro fator que, quando diminuído e em conjunto com aumento de ALH e VCL aumentados, formam um conjunto de indicadores de hiperativação espermática, refletindo a mudança de padrão de deslocamento do espermatozoide (Verstegen et al., 2002; Marquez e Susan, 2007). A linearidade dos espermatozoides sexado não foi diferente dos espermatozoides convencionais das amostras do touro 1 ($P > 0,05$) porém, o touro 2 apresentou diminuição da linearidade dos espermatozoides sexados ($P < 0,05$), que em conjunto com o parâmetro de ALH aumentado pode indicar início de mudança de movimento, tornando-se menos progressivo e com maior amplitude.

Com relação às análises realizadas pelo Azul de Toluidina, alguns resultados se mostram intrigantes.

A cabeça do espermatozoide é composta em grande parte por cromatina, de modo que, quando ocorrem alterações no seu conteúdo (ou em sua estrutura), esperam-se anormalidades no local. Porém, estas alterações nem sempre refletem em alterações na morfologia espermática. Desta forma, é possível que a célula espermática tenha alterações no DNA sem que apresente defeitos morfológicos avaliados pela análise subjetiva de morfologia espermática (Ostermeier et al., 2001; Beletti e Mello, 2004; Enciso et al., 2011). Assim, considera-se importante a realização de avaliações complementares de análises que acessam o DNA espermático e a morfometria espermática, como a realizada através da coloração do azul de toluidina, cujos resultados são avaliados de forma computadorizada por programas desenvolvidos no SCILAB (Beletti e Costa, 2003).

Dentre os parâmetros avaliados por este teste, as amostras de sêmen sexado do touro 2 apresentam menor elipsidade e fator de forma ($P < 0,05$), em relação ao sêmen convencional. A elipsidade, descrita como a medida do alongamento da cabeça espermática, e largura/comprimento são correlacionados negativamente. Ou seja, quando o espermatozoide apresenta maior elipsidade, a razão da largura/comprimento é menor (Beletti e Costa, 2003; Beletti et al., 2005). Por outro lado, o fator de forma que é a medida de quanto o contorno da cabeça do espermatozoide desviou para a forma elíptica (Garrett e Baker, 1995), portanto essas três mensurações estão intimamente correlacionadas.

. Assim, estes resultados indicam que os espermatozoides sexados do touro 2 se apresentaram sendo menos elípticos, o que indica que a cromatina está menos condensada em comparação com espermatozoides que não sofreram sexagem (Beletti et al., 2005). Os espermatozoides considerados normais, com cromatina condensada, apresentam forma mais elíptica, com valores de elipsidade mais altos, em contrapartida, aqueles com menor condensação de cromatina são esféricos, com menores valores para elipsidade (Martins et al., 2021), como o touro 2 do estudo.

Oliveira et al (2012) encontraram menores valores de elipsidade para o touro que apresentou, numericamente, menor taxa de concepção no experimento, corroborando com os resultados encontrados neste estudo. Além disso, em 2013, Oliveira et al., concluíram que uma série de parâmetros de

análise in vitro de amostras seminais estão correlacionadas com a fertilidade a campo, dentre esses parâmetros está a elipsidade como um importante parâmetro preditor de taxa de concepção.

O parâmetro de Fourier 1 foi estatisticamente diferente para o touro 1 ($P < 0,05$), tendo maiores valores para amostras de sêmen convencional. Esta mensuração avalia o perímetro da curvatura da cabeça do espermatozoide, gerando uma medida mais sensível de tamanho e forma. O parâmetro de Fourier caracteriza o perímetro curvilíneo da cabeça do espermatozoide que pode ser usado para melhor entendimento da distribuição da forma do núcleo dos espermatozoides (Ostermeier et al., 2001) Fourier 0 mede o perímetro total da cabeça espermática. Fourier 1 mede o quanto a porção anterior é curvilínea, por exemplo, cabeças piriformes possuem maior valor em comparação com cabeça normal. Fourier 2 mede o perímetro do comprimento, e é diferente para cabeças pequenas e gigantes, por exemplo (Ostermeier et al., 2001).

Os resultados acima mostram que os espermatozoides sexados do touro 1, apresentam menor curvatura da cabeça na porção anterior. Os parâmetros Fourier 0 e 1 estão intimamente ligados à alterações de cromatina do espermatozoide, aqueles que possuem alterações apresentam valores menores de Fourier 0 e 1 (Martins et al., 2019). Estudos anteriores também observaram que essa mensuração de Fourier 1 foi correlacionada com a fertilidade do touro. De acordo com Ostermeier et al. (2001) animais de alta fertilidade apresentaram maiores valores de Fourier 1 do que touros de baixa fertilidade. Oliveira et al (2012) observaram que o valor de Fourier 1 foi significativamente menor para o touro de menor fertilidade do experimento como observado neste estudo.

Por fim, a simetria antero-posterior tem correlação positiva com a descompactação e heterogeneidade da cromatina (Beletti et al., 2005). Este parâmetro foi significativamente diferente para ambos os touros, sendo estatisticamente maior no sêmen sexado do touro 1 ($P < 0,001$) e menor do touro 2 ($P < 0,005$), em relação ao sêmen convencional, apesar de não ter observado diferenças na descompactação e heterogeneidade entre touros e tipo de sêmen ($P > 0,05$). Assim, os resultados sugerem que o aumento na simetria antero-posterior do touro 1 após a sexagem pode indicar maior alterações cromatínicas (ou maior sensibilidade do DNA) dos espermatozoides deste touro após o processo de sexagem, embora os resultados de descompactação e

heterogeneidade cromatínica não tenham sido significativamente diferentes entre semen convencional e sexado deste touro.

Neste sentido, cabe destacar que outros testes laboratoriais podem apresentar maior sensibilidade para detectar alterações de DNA espermático. Como o método de CMA3, que avalia o nível de protaminação do DNA espermático (Bizarro et al., 1998; Rahman et al., 2011). Método de coloração com laranja de acridina, que é capaz de identificar desnaturação da cromatina (Agarwal et al., 2003; Hamid et al., 2015). Método de SCSA, capaz de identificar potenciais danos de cromatina (Evenson et al., 1986; Henkel et al., 2010;). E o ensaio de Cometa neutro, usado para identificar danos ao DNA causados por oxidação (Duty et al., 2002; Boe-Hansen et al., 2005)

Boe-Hansen et al. (2005) avaliaram o DNA de espermatozoides que passaram ou não pela sexagem, através dos testes de SCSA e de cometa neutro. Em ambos os testes foram encontradas diferenças entre os tipos de sêmen, o sêmen sexado apresentou menor distância entre centro de massa de DNA e final da cauda ($P < 0,05$), e menor índice de fragmentação de DNA ($P < 0,05$), sugerindo existir menos danos ao DNA de espermatozoides sexados em relação ao convencional. Da mesma forma, Gonsalvez et al. (2011 a) observaram que espermatozoides sexados apresentavam menor fragmentação de DNA em relação aos convencionais, e que a sensibilidade ao processo é diferente entre indivíduos. Porém, em um segundo experimento, Gonsalvez et al. (2011 b), ao avaliarem a fragmentação de DNA ao longo de 72 hs após descongelamento, notaram que sêmen sexado começou a apresentar danos de DNA após 24 hs de incubação, e a taxa final de fragmentação foi seis vezes maior que da hora 0. Estes resultados sugerem que o DNA espermático sofre danos subclínicos durante a sexagem, que irão se expressar ao longo do tempo.

Recentemente, Marin et al. (2018) utilizaram teste comercial (Halomax®) para avaliar a taxa de fragmentação de DNA de espermatozoides convencionais ou sexados pelo método SexedULTRA™. Diferentemente dos resultados citados anteriormente, os espermatozoides sexados não apresentaram aumento significativo de dano ao DNA ao longo de 72 hs de incubação ($P > 0,05$), mostrando que a técnica modificada de citometria de fluxo parece diminuir os danos causados aos espermatozoides. Portanto, os danos ao DNA espermático, quando houver, podem não ser observados logo após o descongelamento das

amostras, sendo necessárias análises durante maior tempo de incubação pós-sexagem e utilizando testes mais sensíveis para tal finalidade.

7.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo demonstram que o uso de sêmen sexado a campo em vacas Nelore em lactação, submetidas a protocolo de IATF baseado em P4/E2, resulta em taxas de concepção significativamente menores quando comparados com sêmen convencional.

A adição de PGF2 α no momento da IA, com o intuito de acelerar a oвуulação e permitir o uso do sêmen sexado sem o atraso na inseminação, não foi eficaz em melhorar a fertilidade de animais inseminados com esse tipo de sêmen em relação ao convencional, refutando a hipótese inicial do estudo. Os animais que demonstraram cio no dia da IA apresentaram melhores TC em relação aos que não demonstraram, confirmando as inúmeras vantagens que a alta concentração de E2 exerce no período peri-ovulatório e favorece a ocorrência da gestação.

Interessantemente, a aplicação de PGF2 α melhorou marginalmente a TC de animais que não demonstraram cio, quando comparados com animais que não demonstraram cio e não receberam tratamento. Este efeito positivo pode ser explicado pelas ações que a PGF2 α tem a nível cerebral e uterino em animais que não usufruem das vantagens fisiológicas da expressão de cio, possivelmente favorecendo a pulsatilidade de LH e também o preparo uterino para receber a gestação.

Com o intuito de compreender os resultados de fertilidade obtidos a campo, análises laboratoriais das amostras de sêmen utilizadas na fazenda 1 foram realizadas. Nos resultados é possível observar respostas individuais ao processo de sexagem, ou seja, cada touro apresentou alterações em parâmetros diferentes que podem explicar a menor fertilidade do sêmen sexado em relação ao convencional.

Ambos os animais apresentaram maior porcentagem de células com membrana lesionada em comparação com sêmen convencional. O sêmen sexado do touro 1 apresentou resultados inferiores para parâmetros de cinética

espermática, como MT, MP, Rápidos, VAP e VCL, porém a morfometria de seus espermatozoides também foi afetada pela sexagem, embora pouco expressiva em relação ao touro 2. O sêmen sexado do touro 2, por sua vez, além de espermatozoides com prejuízos sutis na cinética, apresentou características morfométricas que podem estar relacionados a danos no conteúdo de DNA celular, sendo também prejudicial para a fertilidade do mesmo. Assim, nossos resultados demonstraram particulares individuais na sensibilidade ao processo de sexagem, as quais podem contribuir de forma diferente para menor TC de vacas inseminadas com essas amostras de sêmen.

8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos no estudo de campo, conclui-se a taxa de concepção de animais inseminados com sêmen sexado é menor em relação ao convencional, e que a aplicação de PGF2 α no momento da IA não melhora a fertilidade de animais inseminados com sêmen sexado.

Conclui-se também que a expressão de cio é um evento fisiológico que favorece a gestação de animais, tendo eles maior taxa de concepção. O tratamento com PGF2 α no momento da IA tem efeito marginalmente positivo na taxa de concepção de animais que não expressaram cio no dia da IA, que se apresentou semelhante à taxa de concepção de animais que expressaram cio, independentemente do tipo de sêmen.

Os resultados das análises laboratoriais de sêmen permitem concluir que o processo de sexagem espermática afeta os espermatozoides tanto nos parâmetros cinéticos, quanto morfométricos, o que contribui para menor fertilidade do sêmen. Porém, a sensibilidade ao processamento de sexagem é individual, de modo que cada animal apresenta um padrão de modificações cinéticas e morfométricas, que em conjunto prejudicam a sobrevivência e fertilidade dos espermatozoides.

9. REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; SAID, T.M. Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. *Human Reproduction Update*, v. 9, p. 331-345; 2003.

AINSWORTH, L.; BAKER, R.D.; ARMSTRONG, D.T. Pre-ovulatory changes in follicular fluid prostaglandin F levels in swine. *Prostaglandins*, v.9, p. 915-925; 1975.

AITKEN, R. J.; BOWIE, H.; BUCKINGHAM, D.; HARKISS, D.; RICHARDSON, D. W.; WEST, K. M. Sperm penetration into a hyaluronic acid polymer as a means of monitoring functional competence. *Journal of Andrology*, v.13, p.44–54; 1992.

AITKEN, R.J. Sperm function tests and fertility. *International Journal of Andrology*, v.29, p.69-75, 2006.

ALILA, H.W.; DOWD, J.P.; CORRADINO, R.A.; HARRIS, W.V.; HANSEL, W. Control of progesterone production in small and large bovine luteal cells separated by flow cytometry. *Journal of reproduction and fertility*, v.82, p.645–655; 1988.

ALLRICH, R.D. Endocrine and neural control of estrus in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.77, p.2738-2744, 1994.

ANDERSON, L.E.; WU, Y.L.; TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Prostaglandin F(2alpha) receptor in the corpus luteum; recente information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. *Biology of Reproduction*, v.64, p.1041–1047, 2001.

ARMSTRONG, D.T., MOON, Y.S. & ZAMECNLK, J. Evidence for a role of prostaglandins in ovulation. In *Gonadotropins and Gonadal Function*, pp. 345-356. Ed. N. R. Moudgal. Academic Press, New York.

ARMSTRONG, D.T.; GRINWICH, D.L. Blockade of spontaneous and LH-induced ovulation in rats by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis. *Prostaglandins*, v.1, p.21-28; 1972.

AROSH, J. A.; BANU, S. K.; KIMMINS, S.; CHAPDELAINE, P.; MACLAREN, L. A.; FORTIER, M. A. Effect of interferon-pi on prostaglandina

biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle: evidence of polycrine actions of prostaglandin E2. *Endocrinology*, v.45, p.5280-5293;2004.

ARRUDA, R. P. *Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozóide eqüino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA)*. 2000.Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

BARATTA, M.; WEST, L.A.; TURZILLO, A.M.; NETT, T.M. Activin modulates differential effects of estradiol on synthesis and secretion of follicle-stimulating hormone in ovine pituitary cells. *Biology of Reproduction*, v.64, p.714–719; 2001.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BÓ, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. *Animal Reproduction Science*, v.82–83, p.479–486, 2004.

BASU, S. Novel cyclooxygenase-catalyzed bioactive prostaglandin F(2alpha) from physiology to new principles in inflammation. *Medicinal Research Reviews*, v.27, p.435-468; 2007.

BASU, S.; KINDAHL, H. Inhibitor of PG biosynthesis in the bovine endometrium during estrus cycle and early pregnancy. *Theriogenology* v.27,p.212;1987

BAZER, F.W.; SLAYDEN, O.D. Progesterone-induced gene expression in uterine epithelia: a myth perpetuated by conventional wisdom. *Biology of Reproduction*, v.79, p.1008-1009; 2008.

BAZER, F.W.; WU, G.; SPENCER, T.E.; JOHNSON, G.A.; BURGHARDT, R.C.; BAYLESS, K. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Molecular Human Reproduction*, v.16, p.135-152; 2010.

BEHRMAN, HAROLD R.; CALDWELL, BURTON V. Prostaglandins, thromboxanes, and leukotrienes. YEN, S.S.C.; JAFFE, R.B. *Reproductive Endocrinology. Physiology, Pathophysiology and Clinical Management*. Philadelphia, Saunders, p. 154-176, 1986.

BELETTI, M. E.; COSTA, L. F. A systematic approach to multi-species sperm morphometrical characterization. *Analytical & Quantitative Cytology & Histology*, v. 25, p. 97-107;2003.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; GUARDIEIRO, M.M. Morphometric features and chromatin condensation abnormalities evaluated by toluidine blue staining in bull spermatozoa. *Brazilian Journal of Morphological Sciences.*, v.22, p.85 90, 2005a.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A comparison of morphometric characteristics of sperm from fertile *Bos taurus* and *Bos indicus* bulls in Brazil. *Animal Reproduction Science*, v.85, p.105–116, 2005b.

BELETTI, M.E.; COSTA, L.F.; VIANA, M.P. A computational approach to characterization of bovine sperm chromatin alterations. *Biotechnic and Histochemistry.*, v.79, p.17-23, 2004.

BERNDTSON, W.E.; CHENOWETH, P.J.; SEIDEL, G.E.JR.; PICKETT, B.W.; OLAR, T.T. Influence of prostaglandin F2 alpha on spermatogenesis, spermatozoal output, seminal quality, testosterone levels and libido of yearling beef bulls. *Journal of Animal Science*, v.49, p.736-742; 1979.

BINELLI, M.; PUGLIESI, G.; HOECK, V.V. et al. The role of proestrus on fertility and postovulatory uterine function in the cow. *Animal Reproduction Science*, v.11, n.3, p.246-253, 2014

BIZZARO, D.; MANICARDI, G.C.; BIANCHI, P.G.; BIANCHI, U.; MARIETHOZ, E.; SAKKAS D. In situ competition between protamine and fluorochromes for sperm DNA. *Molecular Human Reproduction*. v.4, p.127–132; 1998.

BLANKS, A.M.; SHMYGOL, A.; THORNTON, S. Regulation of oxytocin receptors and oxytocinre ceptor signaling. *Seminars in Reproductive Medicine*, v.25, p.52–59; 2007.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk Veterinaermedicin.*, v.25 p.383-391, 1973.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. *Theriogenology*, v.43, p.31–40; 1995.

BÓ, G.A.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A.; TRIBULO, H.E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R.J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 treatment of heifers with or without a progestogen implant. *Theriogenology*, v.41, p.1555–1569; 1994.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S. Synchronization of ovulation and fixed-time artificial insemination in beef cattle. *Animal Reproduction Scienci*, v.8, p.144–150, 2014.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.307–326, 2003

BÓ, G.A.; CUTAIA, L.; PERES, L.C.; PINCINATO, D.; MARAÑA, D.; BARUSELLI, P.S. Technologies for fixedtime artificial insemination and their influence on reproductive performance of *Bos indicus* cattle. *Society of Reproduction and Fertility supplement*, v.64, p.223–236, 2007

BOE-HANSEN, G.B.; MORRIS, I.D.; ERSBØLL, A.K.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, P. DNA integrity in sexed bull sperm assessed by neutral Comet assay and sperm chromatin structure assay. *Theriogenology*, v.63, p.1789-1802; 2005.

BOURNE, G.R.; MOSS, S.R.; PHILLIPS, P.J.; SHUKER, B. The metabolic fate of the synthetic prostaglandin cloprostenol (“Estrumate”) in the cow: use of ion cluster techniques to facilitate metabolite identification. *Biomedical Mass Spectrometry*, v.7, p.226 –230; 1980.

BRADEN, T.D.; GAMBONI, F.; NISWENDER, G.D. Effects of prostaglandinF₂ -induced luteolysis on the populations of cells in the ovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, v.39, p.245–253;1998.

BRIDGES, G.A.; MUSSARD, M.L.; PATE, J.L. Impact of preovulatory estradiol concentrations on conceptus development and uterine gene expression. *Animal Reproduction Science.*, v.133, p.16–26, 2012

BUCCI, D.; GALEATI, G.; TAMANINI, C.; VALLORANI, C.; RODRIGUEZ-GIL, J.E.; SPINACI, M. Effect of sex sorting on CTC staining, actin cytoskeleton

and tyrosine phosphorylation in bull and boar spermatozoa. *Theriogenology*, v.77, p.1206–1216, 2012

BUCZYNSKI, M. W.; DUMLAO, D. S.; DENNIS, E. A. Thematic review series: proteomics. An integrated omics analysis of eicosanoid biology. *Journal of Lipid Research*, v.50, p.1015–1038; 2009.

CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.F.; RODELLO, L. Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity to bind to oviductal cells. *Livestock Science*, v. 207, p. 30-37, 2018.

CARVALHO, J.O.; SILVA, L.P.; SARTORI, R.; DODE, M.A. 2013. Nanoscale differences in the shape and size of x and y chromosome-bearing bovine sperm heads assessed by atomic force microscopy. *PLoS One*,v.8, e59387;2013.

CERRI, R.L.; THOMPSON, I.M.; KIM, I.H.; EALY, A.D.; HANSEN, P.J.; STAPLES, C.R.; LI, J.L.; SANTOS, J.E.; THATCHER, W.W.Effects of lactation and pregnancy on gene expression of endometrium of Holstein cows at day 17of the estrous cycle or pregnancy. *Journal of Dairy Science*, v.95, p.5657- 5675, 2012.

CERVANTES R. E.; IZQUIERDO A.C. Sexing sperm of domestic animals. *Trop Animal Health Production*, v.45, p.1-8; 2013.

CHAMPE, P.C. Bioquímica: ilustrada. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul (ARTMED), 1996, p. 191-192.

CHAN, B.S.; ENDO, S.; KANAI, N.; SCHUSTER, V.L. Identification of lactate as a driving force for prostanoid transport by prostaglandin transporter PGT. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, v.282, p.1097-1102,2002.

CHENG, H.F.; HARRIS, R.C. Cyclooxygenases, the kidney, and hypertension. *Hypertension*, v.43, p.525-530; 2004.

COLAZO, M.G.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effects of estradiol cypionate (ECP) on ovarian follicular dynamics, synchrony of ovulation, and fertility in CIDR-based, fixed-time AI programs in beef heifers. *Theriogenology*, v.60, p.855–865, 2003.

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen thawed sperm characteristics assessed via the routine sêmen analysis, sperm functional tests and the fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, v.48, p.721-731; 1997.

CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationships among frozen thawed sperm characteristics assessed via the routine sêmen analysis, sperm functional tests and the fertility of bulls in an artificial insemination program. *Theriogenology*, v.48, p.721-731; 1997.

CURRY, T.E.; MALIK, J.R.; CLARK, M.R. Ovarian prostaglandin synthase: immunohistochemical localization in the rat. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, v.157, p.537–543, 1987.

DAVOODI, A.S.; COOKE, B.R.F.; FERNANDES, A.C.C. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on Day 19 of gestation in beef cows. *Theriogenology*, v.85, p. 645–655, 2016.

DAY, M.L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P.L.; KITTOK, R.J.; KINDER, J.E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. *Biology of Reproduction*, v.37, p.1054–65; 1987.

DENICOL, A.C.; BLOCK, J.; KELLEY, D.E.; POHLER, K.G.; DOBBS, K.B.; MORTENSEN, C.J.; ORTEGA, M.S.; HANSEN, P.J. 2014. The WNT signaling antagonist Dickkopf-1 directs lineage commitment and promotes survival of the preimplantation embryo. *FASEB Journal*, v.28, p.3975-3986; 2014.

DENNIS, E.A.; NORRIS, P.C. Eicosanoid storm in infection and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, v.15, p.511-23; 2015.

DOMÍNGUEZ, E.; MORENO-IRUSTA, A.; RAMÍREZ, H. Sperm Sexing Mediated by Magnetic Nanoparticles in Donkeys, a Preliminary In Vitro Study. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 68, p. 123-127, 2018.

DUTY, S.M.; SINGH, N.P.; RYAN, L.; CHEN, Z.; LEWIS, C.; HUANG, T. Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Human Reproduction*, v.17, p.1274–1280; 2002.

ENCISO, M.; CISALE, H.; JOHNSTON, S. D.; SARASA, J.; FERNÁNDEZ, J. L.; GONSÁLVEZ, J. Major morphological abnormalities in the Bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology*, v. 26, p. 23-32; 2011.

EVENSON, D.; JOST, L.; JANCA, F.; BALLACHEY, B. Changes in accessibility of DNA to various fluorochromes during spermatogenesis. *Cytometry*, v.7, p.45-53; 1986.

EVENSON, D.P.; LARSON, K.; JOST, L.K. The sperm chromatin structure assay (SCSA TM): clinical use for detecting sperm DNA fragmentation related to male infertility and comparisons with other techniques. *Journal of Andrology*, v. 23, p. 25–43, 2002.

FAUST, M. A.; BETTHAUSER, J.; STORCH, A. Effects for fertility of processing steps of a new technology platform for producing sexed sperm. In: JOINT ANNUAL MEETING OF THE ADSA/ASAS, 2016, Salt Lake City, USA, p. 544 (Resumo).

FLEMING, J.G.; SPENCER, T.E.; SAFE, S.H.; BAZER, F.W. Estrogen regulates transcription of the ovine oxytocin receptor gene through GC-rich SP1 promoter elements. *Endocrinology*, v.147, p.899-911, 2006.

FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; CROWE, M.A.; EVANS, A.C.; SPENCER, T.E.; BAZER, F.W.; MCBRIDE, R.; BOLAND, M.P.; O'GAORAP.; LONERGAN, P.; ROCH, J.F. Progesterone-regulated changes in endometrial gene Expression. contribute to advanced conceptus development in cattle. *Biology of Reproduction*, v.81, p.784-794, 2009.

FORTUNE, J.E.; WILLIS, E.L.; BRIDGES, P.J.; YANG, C.S. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. *Animal Reproduction*. v.6, p.60-71, 2009.

FU, C.; MAO, W.; GAO, R. Prostaglandin F₂α-PTGFR signaling promotes proliferation of endometrial epithelial cells of cattle through cell cycle regulation. *Animal Reproduction Science*, v.213, p.1-14, 2020.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, v.294, p.1871–1875, 2001.

GAO, L.; GAO, R.; MAO, W.; LIU, B.; ZHANG, S.; TAHALA, D.; FU, C.; SHEN, Y.; WU, J.; DENG, Y.; LI, Q.; CAO, J.; PTGFR activation promotes the expression of PTGS-2 and growth factors via activation of the PKC signaling pathway in bovine endometrial epithelial cells. *Animal Reproduction Science*, v.199,p.30–39, 2018.

GARNER, D. L.; JOHNSON, L. A. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and Propidium Iodide. *Biology of Reproduction*, v.53, p.276–284; 1995.

GARNER, D.L. Flow cytometric sexing of mammalian sperm. *Theriogenology*, v. 65, p. 943–57,2006.

GARNER, D.L. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. *Journal of Andrology*, v. 22, p. 519–526,2001.

GARNER, D.L.; GLEDHILL, B.L.; PINKEL, D.; LAKE, S.; STEPHENSON, D.; VAN DILLA, M.A. Quantification of the X- and Y-chromosome-bearing spermatozoa of domestic animals by flow cytometry. *Biology of Reproduction*, v.28, p.312-321;1983.

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

GARNER, D.L.; SEIDEL, G.E.Jr. History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, v. 69, p. 886–95, 2008.

GARRETT, C.; BAKER, H.W. A new fully automated system for the morphometric analysis of human sperm heads. *Fertility and Sterility*, v.63, p.1306-1317; 1995.

GEISERT, R. D.; SHORT, E. C.; ZAVY, M. C. Maternal recognition of pregnancy. *Animal Reproduction Science*, v. 28, p. 287 – 298, 1992.

GEISERT, R. D.; ZAVY, M. T.; BIGGERS, B. G.; GARRETT, J. E.; WETTEMANN, R.P. Characterization of the uterine environment during early conceptus expansion in the bovine. *Animal Reproduction Science*, v. 16, p. 11 - 25, 1988.

GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Animal Reproduction Science*, v.130, p.201-214; 2008.

GIRSH, E.; GERBER, Y.; MEIDAN, R. Luteotropic and luteolytic interactions between bovine small and large luteal-like cells and endothelial cells. *Biology of Reproduction*, v;52, p.954–962; 1995.

GLIOZZI, T.M.; TURRI, F.; MANES, S.; CASSINELLI, C.; PIZZI, F. The combination of kinetic and flow cytometric semen parameters as a tool to predict fertility in cryopreserved bull semen. *Animal*, v.11, p.1975-1982; 2017.

GONZÁLEZ-MARÍN, C.; GÓNGORA, C.E.; GILLIGAN, T.B.; EVANS, K.M.; MORENO, J.F.; VISHWANATH, R. In vitro sperm quality and DNA integrity of SexedULTRA™ sex-sorted sperm compared to non-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, v.114, p.40-45; 2018.

GOSÁLVEZ, J.; RAMIREZ, M.A.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology*, v.75, p.197-205, 2011a.

GOSÁLVEZ, J.; RAMIREZ, M.A.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: II. Dynamic features. *Theriogenology*, v.75, p.206-211, 2011b.

GRAZUL-BILSKA, A.T.; REDMER, D.A.; REYNOLDS, L.P. Cellular interactions in the corpus luteum. *Seminars in Reproductive Medicine*, v.15, p.383–393; 1997.

GRAZUL-BILSKA, A.T.; REYNOLDS; L.P.; KIRSCH, J.D.; BILSKI, J.J.; REDMER, D.A. Gap junctional intercellular communication of bovine luteal cells from several stages of the estrous cycle: effects of prostaglandin F₂, protein kinase C and calcium. *Prostaglandins*, v.52, p.285–302,1996.,

GRINWICH, D.L.; KENNEDY, T.G.; ARMSTRONG, D.T. Dissociation of ovulatory and steroidogenic actions of luteinizing hormone in rabbits with ndomethacin, an inhibitor of prostaglandin biosynthesis. *Prostaglandins*, v.1, p.89-96,1972

HAMIDI, J.; FRANAIS, C.; AMAR, E.; BAILLY, E.; CLÉMENT, P.; MÉNÉZO, Y. A double-blinded comparison of in situ TUNEL and aniline blue versus flow cytometry acridine orange for the determination of sperm DNA fragmentation and nucleus decondensation state index. *Zygote*, v.23, p.556-562; 2015

HANSEL, W.; ALILA, H.W.; DOWD, J.P.; MILVAE, R.A. Differential origin and control mechanisms in small and large bovine luteal cells. *Journal of reproduction and fertility* , v.43, p.77–89, 1991.

HANSEL, W.; BLAIR, R.M. Bovine corpus luteum: a historic overview and implications for future research. *Theriogenology*, v.45,p.1267–1294;1996.

HARIZI, H.; CORCUFF, J.B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. *Trends in Molecular Medicine: Cell Press*, v.14, p.461-469;2008.

HAWK, H.W. Sperm survival and transport in the female reproductive tract. *Journal Dairy Science*, v. 66, p. 2645–2660, 1983.

HAYASHI, K.; ACOSTA, T.J.; BERISHA, B.; KOBAYASHI, S.; OHTANI, M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Changes in prostaglandin secretion by the regressing bovine corpus luteum. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, v.70, p.339–349, 2003.

HEDIN, L.; GADDY-KURTEN, D.; KURTEN, R.; DEWITT, D.L.; SMITH, W.L.; RICHARDS, J.S. Prostaglandin endoperoxide synthase in rat ovarian follicles: content, cellular distribution, and evidence for hormonal induction preceding ovulation. *Endocrinology*, v.121, p.722–731, 1987.

HENKEL, R.; HOOGENDIJK, C. F.; BOUIC, D.T.; KRUGER, F. TUNEL assay and SCSA determine different aspects of sperm DNA damage. *Andrologia*. v.42, p. 305-313; 2010.

HEUER, C.; KENDALL, D.; SUN, C. Evaluation of conception rates of sex-sorted semen in commercial dairy farms over the last five years. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p.198, 2017.

HINCKLEY, S.T.; MILVAE, R.A. Endothelin-1 mediates prostaglandin F(2alpha)-induced luteal regression in the ewe. *Biology of Reproduction*, v.64, p.1619–1623; 2001.

HIXON, J.; HANSEL, W. Preferential transfer of prostaglandin F2 to the ipsilateral ovarian artery following intrauterine administration in cattle. *Biology of Reproduction*, v.11, p.543–552, 1974.

HOHENBOKEN, W. D. Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology*, v. 52, p. 1421–1433, 1999

HOUGHTON, P.L.; LEMENAGER, R.P.; MOSS, G.E.; HENDRIX, K.S. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. *Journal Animal Science*, v.68, p.1428–1437, 1990.

HUANG, N.; LIU, B.; DONG, Z. Prostanoid receptors EP2, EP4, and FP are regulated by estradiol in bovine oviductal smooth muscle. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, v.121, v.170-175, 2015

HUSLIG, R.L.; MALIK, A.; CLARK, M.R. Human chorionic gonadotropin stimulation of immunoreactive prostaglandin synthase in the rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.50. p.237–246, 1987.

INSKEEP, E. K. 2002. Factors that affect embryonic survival in the cow: Application of technology to improve calf crop. Pages 255– 279 in Factors Affecting Calf Crop: Biotechnology of Reproduction. M. J. Fields, R. S. Sand, and J. V. Yelich, ed. CRC Press, Boca Raton, FL

INSKEEP, E.K. Preovulatory, postovulatory, and postmaternal recognition effects of concentrations of progesterone on embryonic survival in the cow. *Journal of Animal Science*, v.82, p.24-39; 2004.

ISHIJIMA, S.A.; OKUNO, M.; MOHRI, H. Zeta potential of human X- and Y-bearing sperm. *International Journal of Andrology*, v. 14, p. 340- 347, 1991.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; HÅÅRD, M.G.; HÅÅRD, M.C.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effect of cooling rates on post-thaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility

of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. *Theriogenology*, v.52, p.641-658; 1999.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VER, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M. Development of an assay functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *Journal of reproduction and fertility*, v.70, p.219-228; 1984.

JOHNSON, D.G.; WALKER, C.L. Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.39, p.295–312, 1999.

JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state of the art. *Animal Reproduction Science*, v.60, p.93–107, 2000.

JOHNSON, L.A. Method to preselect the sex of offspring. Depositante: Lawrence A. Johnson, United States Patent n. 5,135,759. Depósito: 26 abr. 1991. Concessão: 4 ago. 1992.

JOHNSON, L.A.; FLOOK, J, P.; LOOK, M.V. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst 33342. *Gamete Research*, v. 17, p.203–212, 1987.

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

JOHNSON, L.A.; WELCH, G.R.; GARNER, D.L. Improved flow sorting resolution of X- and Y-bearing viable sperm using dual staining and dead cell gating. *Cytometry*, v. 17, n. 7, p.83-90, 1994.

JOHNSON, L.A.; WELCH, G.R.; RENS, W. The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI. *Journal of Animal Science*, v.77, p.213–220; 1999.

JOHNSON, M. L.; REDMER, D. A.; REYNOLDS, L. P. Effects of ovarian steroids on uterine growth, morphology, and cell proliferation in ovariectomized, steroid-treated ewes. *Biology Reproduction*, v. 57, p. 588 - 596, 1997.

KANAYAMA, C.Y.; BELETTI, M.E. Computational evaluation of chromatin condensation and morphometric characteristics of rabbit (*Oryctolagus cuniculus*)

sperm head. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.63, p.94-99, 2011.

KANG, Y.J.; MBONYE, U.R.; DELONG, C.J.; WADA, M.; SMITH, W.L. Regulation of intracellular cyclooxygenase levels by gene transcription and protein degradation. *Progress in Lipid Research*, v.46, p.108–125, 2007.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; EDWIN, M.J.; VEERAPANDIAN, C. 2008. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Animal Reproduction Science*, v.104, p.9-17; 2008.

KAWAGUCHI, S.; BOWOLAKSONO, A.; YOSHIOKA, S.; SAKUMOTO, R.; OKUDA, K. 2013. Luteoprotective mechanisms of prostaglandin F2a stimulated by luteinizing hormone in the bovine corpus luteum. *Journal of Reproduction and Development*, v.59, p.225-230; 2013.

KIDDY, C. A.; HAFS, H. D. Sex Ratio at Birth—Prospects for Control *American Society of Animal Science*. Savoy, IL, 1971.

KIM, U.H.; SUH, G.H.; NAM, H.W.; KANG, H.G.; KIM, I.H. Follicular wave emergence, luteal function and nynchrony of ovulation following GnRH or estradiol benzoate in a CIDR-treated, lactating Holstein cows. *Theriogenology*, v.63, p. 260–268; 2005.

KINDAHL, H.; EDQUIST, L.E; BANE, A.; GRANSTROM, E. Blood levels of progesterone and 15-keto-13,14-dihydro-prostaglandin F2alpha during the normal oestrous cycle and early pregnancy in heifers. *Acta Endocrinologica*, v 82, p.134-149, 1976

KINDER, J. E.; KOJIMA, F.N.; BERGFELD, E.G.M.; WEHRMAN, M.E.; FIKE, K.E. Progestin and estrogen regulation of pulsatile LH release and development of persistent ovarian follicles in cattle. *Journal of Animal Science*, v.74, p.1424–1440; 1996

KISER, T.E.; HAFS, H.D.; OXENDER, W.D. Increased blood LH and testosterone after administration of prostaglandin F2alpha in bulls. *Prostaglandins*, v.11, p.545-553; 1976.

KOBAYASHI, S.; BERISHA, B.; AMSELGRUBER, W.M.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A.; Production and localisation of angiotensin II in the bovine early corpus luteum: a possible interaction with luteal angiogenic factors and prostaglandin F2. *Journal of Endocrinology*, v.170, p.369–80, 2001.

KÖLLE, S.; DUBIELZIG, S.; REESE, S.; WEHREND, A.; KÖNIG, P.; KUMMER, W. Ciliary transport, gamete interaction, and effects of the early embryo in the oviduct: ex vivo analyses using a new digital videomicroscopic system in the cow. *Biology of Reproduction*, v.81, p.267–274;2009.

KUNZ, G.; BEIL, D.; DEININGER, H.; WILDT, L.; LEYENDECKER, G. The dynamics of rapid sperm transport through the female genital tract: evidence from vaginal sonography of uterine peristalsis and hystersalpingoscintigraphy. *Human Reproduction*, v.11, p.627–632; 1996.

LENZ, R.W.; GÓNZALEZ-MARÍN, C.; GILLIGAN, T.B.; DEJARNETTE, J.M.; UTT, M.D.; HELSER, L.A.; HASENPUSCH, E.; EVANS, K.M.; MORENO, J.F.; VISHWANATH, R. SexedULTRA™, a new method of processing sex-sorted bovine sperm improves conception rates. *Reproduction, Fertility and Development*, v.29, p.203–204; 2016. (Resumo)

LEONARDI, C.E.P.; PFEIFER, L.F.M.; RUBIN, M.B.; SINGH, J.; MAPLETOFT, R.J.; PESSOA, G.A.; BAINY, A.M.; SILVA, C.A.M. Prostaglandin F2alpha promotes ovulation in prepubertal heifers. *Theriogenology*, v.78, p.1578–1582; 2012.

LEVY, N.; GORDIN, M.; MAMLUK, R.; YANAGISAWA, M.; SMITH, M.F.; HAMPTON, J.H. Distinct cellular localizatio and regulation of endothelin-1 and endothelin-converting enzyme-1 expression in the bovine corpus luteum; implications for luteolysis. *Endocrinology*, v.142, p.5254–60; 2001.

LEVY, N.; KOBAYASHI, S.; ROTH, Z.; WOLFENSON, D.; MIYAMOTO, A.; MEIDAN, R. F2a Administration of prostaglandina during the early bovine luteal phase does not alter the expression of ET-1 and of its type a receptor: a possible cause for corpus luteum refractoriness. *Biology of Reproduction*, v.63, p.377-82; 2000.

LI, Q.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; KOBAYASHI, Y.; IRELAND, J.J.; SMITH, G.W. Effect of intrafollicular indomethacin injection on gonadotropin surge-

induced expression of select extracellular matrix degrading enzymes and their inhibitors in bovine preovulatory follicle. *Reproduction*, v.131, p.533-543;2006.

LI, Q.; ZHANG, S.; MAO, W. 17β -estradiol regulates prostaglandin E₂ and F_{2 α} synthesis and function in endometrial explants of cattle. *Animal Reproduction Science*, v.216 -106466; 2020.

LINDSEY; A.C.; BRUEMMER, J.E.; SQUIRES, E.L. Low dose insemination of mares using non sorted and sex-sorted sperm. *Animal Reproduction Science*, v. 68, p. 279–89, 2001.

LIU, J.; CARRIERE, P.D.; DORE, M.; SIROIS, J. Prostaglandin G/H synthase-2 is expressed in bovine preovulatory follicles after the endogenous surge of luteinizing hormone. *Biology of Reproduction*, v.57, p.1524–1531; 1997.

LONG, S.T.; YOSHIDA, C.; NAKAO, T. Plasma progesterone profile in ovariectomized beef cows after intra-vaginal insertion of new, once-used or twice-used CIDR. *Reproduction in Domestic Animals*, v.44, p.80-82, 2009.

LOPES JR, F.R. Efeito do uso de uma dose adicional de prostaglandina F_{2 α} durante o protocolo de IATF à base de estradiol e progesterona na fertilidade de vacas holandesas em lactação em anestro. 88 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2017.

LOPES, A.S.; BUTLER, S.T.; GILBERT, R.O.; BUTLER, W.R. Relationship of preovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. *Animal Reproduction Science*, v.99, p.34–43,2007.

MADAN, P.; BRIDGES, P.J.; KOMAR, C.M.; BERISTAIN, A.G.; RAJAMAHENDRAN, R.; FORTUNE, J.E.; MACCALMAN, C.D. Expression of messenger ribonucleic acid for ADAMTS subtypes changes in the periovulatory follicle after the gonadotropin surge and during luteal development and regression in cattle. *Biology of Reproduction*, v.69, p.1506–1514, 2003.

MADUREIRA, A. M. L.; SILPER, B.F.; BURNETT, T.A.; POLSKY, L.B.; CRUPPE, L.H.; VASCONCELOS, J.L.M.; R. L. A. CERRI, R.L.A. Factors affecting expression of estrus measured by activity monitors and conception risk of lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.98, p.7003-7014; 2015.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical. Science*, v.30, p. 630–641, 2005.

MAMLUK, R., D.-B. CHEN, Y. GREBER, J. D. DAVIS, R. MEIDAN. Characterization of Messenger ribonucleic acid expression. for prostaglandin F2a and luteinizing hormone receptors in various bovine cell types. *Biology of Reproduction*, v.58, p.849–856, 1998.

MARÍN, C.G.; GONGORA, C.E.; GILLI, T.B. In vitro sperm quality and DNA integrity of SexedULTRA™ sex-sorted sperm compared to non-sorted bovine sperm. *Theriogenology.*, v. 114, p. 40-45, 2018.

MARIN, C.G.; LENZ, R.W.; GILLIGAN, T.B. et al.. SexedULTRA™, A new method of processing sex sorted bovine sperm improves post-thaw sperm quality and in vitro fertility. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 29, p. 204- 210, 2016.

MARQUEZ, B.; SUSAN, S.S. Bovine Sperm Hyperactivation Is Promoted by Alkaline-Stimulated Ca²⁺ Influx, *Biology of Reproduction*, v.76, p. 660–665; 2007.

MARTINEZ, M.F.; BÓ, G.A.; MAPLETOFT, R.J. Synchronization of follicular wave emergence and ovulation for reproductive biotechnologies. *In: Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada*, 1, 2004, Londrina,

MARTINS, M.C.; GONÇALVES, L.M.; NONATO, A.; NASSIF TRAVENÇOLO B.A.; ALVES, B.G.; BELETTI, M.E. Sperm head morphometry and chromatin condensation are in constant change at seminiferous tubules, epididymis, and ductus deferens in bulls. *Theriogenology*, v.161, p.200-209; 2021

MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G.; HOLLINSHEAD, F.K.; BATHGATE, R.; DEGRAAF, S.P.; ERIKSSON, B.M. Integration of sperm sexing technology into the art toolbox. *Animal Reproduction Science*, v.82, p.79–85, 2004.

MAXWELL, W.M.C.; LONG, C.R.; JOHNSON, L.A. The relationship between membrane status and fertility of boar spermatozoa after flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 10, p.433–40,1998.

MCARTHUR, M.E.; IRVING-RODGERS, H.F.; BYERS, S.; RODGERS, R.J. Identification and immunolocalization of decorin, versican, perlecan, nidogen, and chondroitin sulfate proteoglycans in bovine small-antral ovarian follicles. *Biology of Reproduction*, v.63, p.913–924, 2000.

McCracken JA, Custer EE, Lamsa JC: Luteolysis: a neuroendocrine-mediated event. *Physiological Reviews*, v.79, p. 263-323, 1999.

MEIDAN, R.; LEVY, N.; KISLIOUK, T.; PODLOVNY, L.; RUSIANSKY, M.; KLIPPER, E. The yin and yang of corpus luteum-derived endothelial cells: balancing life and death. *Domestic Animal Endocrinology*, v.29, p.318-28; 2005.

MEIDAN, R.; LEVY, N.; KISLIOUK, T.; PODLOVNY, L.; RUSIANSKY, M.; KLIPPER, E. The yin and yang of corpus luteum-derived endothelial cells: balancing life and death. *Domestic Animal Reproduction*, v.29, p.318–328, 2005.

MENEGHETTI, M; SÁ FILHO, O.G; PERES, R.F; LAMB, G.C; VASCONCELOS, J.L.M. Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows: basis for development of protocols. *Theriogenology*, v.72, p.179-189, 2009.

MESQUITA, F.S.; PUGLIESI, G.; SCOLARI, S.C.; FRANÇA, M.R.; RAMOS, R.S.; OLIVEIRA, M.; PAPA, P.C.; BRESSAN, F.F.; MEIRELLES, F.V.; SILVA, L.A.; NOGUEIRA, G.P.; MEMBRIVE, C.M.; BINELLI, M. 2014. Manipulation of the periovulatory sex steroidal milieu affects endometrial but not luteal gene expression in early diestrus Nelore cows. *Theriogenology*, v.81, p.861-869; 2014.

MOGUILLEWSKY, M.; RENAUD, J.P. The relevance of hypothalamic and hypophyseal progestin receptor regulation in the induction and inhibition of sexual behavior in the female rat. *Endocrinology*, v.105, p. 516–522, 1979.

MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy Science. *Journal of Dairy Science*, v. 100, p. 314-331, 2017

MURDOCH, W.J.; VAN KIRK, E.A. Luteal dysfunction in ewes induced to ovulate early in the follicular phase. *Endocrinology*, v.139, p.3480–3484, 1998.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S.D. Equine chorionic gonadotrophin. *Endocrine Reviews*, v.12, p.27-44, 1991.

MURRAY, M. K. The effect of estrogen and progesterone on structural changes in the uterine glandular epithelium of the ovariectomized sheep. *Biology Reproduction*, v.47, p. 408 - 417, 1992.

NARUMIYA, S.; FITZGERALD, G.A. Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function. *Journal of Clinical Investigation*, v.108, p.25–30; 2001.

NETT, T.M.; TURZILLO, A.M.; BARATTA, M.; RISPOLI, L.A. Pituitary effects of steroid hormones on secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Domestic Animal Endocrinology*, v.22, p.33–42, 2002.

NISWENDER, G.D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction*, v.123, p.333–339, 2002.

NISWENDER, G.D.; JUENGEL, L.J.; SILVA, P.J.; ROLLYSON, M.K.; MCINTUSH, E.W. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*, v.80, p.1-29; 2000.

NORMAN, A. W., Litwack, G. *Hormones*, 2^a Ed. Academic Press, California, EUA, 1997

NORONHA, I. M; R F.COOKE; C.F.G.MARTINS; R.V.OLIVEIRA FILHO;K. G.POHLER;J. L.M.VASCONCELOS.Administering an additional prostaglandin F_{2α} injection to Bos indicus beef cows during a treatment regimen for fixed-time artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.219, 2020

O'BRIEN, J.K.; CRICHTON, E.G.; EVANS, K.M.; EVANS, G.; SCHENK, J.L.; STOJANOV, T. Sex ratio modification using sperm sorting and assisted reproductive technology—a population management strategy. In: *Proceedings of the 2nd International Symposium on Assisted Reproductive Technology for the Conservation and Genetic Management of Wildlife*, p. 224–231; 2002.

OKABE M. Sperm-egg interaction and fertilization: past, present, and future. *Biology of Reproduction*. v.99, p.134-146; 2018.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.; DOS SANTOS, R. M.; BELETTI, M. E.; PERES, R.F.G.; OLIVEIRA, C.S.; DE LIMA, V. F. M. H. Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. *Livestock Science*, v.146, p.38-46; 2012.

OLIVEIRA, L.Z.; DE ARRUDA, R.P.; DE ANDRADE, A.F.; CELEGHINI, E.C.; REEB, P.D.; MARTINS, J.P.; DOS SANTOS, R.M.; BELETTI, M.E.; PERES, R.F.; MONTEIRO, F.M.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. *Animal Reproduction Science*, v.137, p.145-55; 2013.

ORCZYK, G.P.; BEHRMAN, H.R. Ovulation blockade by aspirin or indomethacin: in vivo evidence for a role of prostaglandin in gonadotropin secretion. *Prostaglandins*, v.1, p.3-21, 1972.

OSTERMEIER, G. C.; SARGEANT, G. A.; YANDELL, B. S.; EVENSON, D. P.; PARRISH, J. J. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. *Journal of Andrology*, v. 22, p. 595-603; 2001.

ÕURA, C.; TOSHIMORI, K. Ultrastructural studies on the fertilization of mammalian gametes. *International Review of Cytology.*, v.122, p.105–151; 1990.

PANARACE, M.; PELLEGRINI, R.O.; BASUALDO, M.O. First field results on the use of stallion sex-sorted semen in a large scale embryo transfer program. *Theriogenology*, v.81,2013.

PEREIRA, M. H. C.; WILTBANK, M.C.; BARBOSA, L.F.S; COSTA JR., W.M.; CARVALHO, M.A. P.; VASCONCELOS, J.L.M. Effect of adding a gonadotropin-releasing-hormone treatment at the beginning and second prostaglandin F2 α treatment at the end of an estradiol-based protocol for timed artificial insemination in lactating dairy cows during cool or hot seasons of the year. *Journal of Dairy Science*, v.98, p.947-959, 2015.

PERES, R.F.G.; CLARO JÚNIOR, I.; SÁ FILHO, O.G. et al. Strategies to improve fertility in *Bos indicus* postpubertal heifers and nonlactating cows submitted to fixed-time artificial insemination. *Theriogenology*, v.72, p. 681–689, 2009.

PEREZ, G.C. Uso do acetato de melengestrol (MGA), associado a PGF₂ α e a GnRH ou benzoato de estradiol em protocolos de inseminação artificial em tempo fixo para vacas nelores paridas. Botucatu, SP, 2005, 79p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista

PERRY, G. A.; SMITH, M. F.; ROBERTS, A. J.; MacNEIL, M. D.; GEARY, T. W. Relationship between size of the ovulatory follicle and pregnancy success in beef heifer. *Journal of Animal Science*, v.85, p. 684 - 689, 2007.

PERRY, G. A.; SWANSON, E. L.; LARIMORE, B. L. et al. Relationship of follicle size and concentrations of estradiol among cows exhibiting or not exhibiting estrus during a fixed-time AI protocol. *Domestic Animal Endocrinology*, v.48, p.15–20, 2014.

PFEIFER, L.F.M.; LEONARDI, C.E.P.; CASTRO, N.A.; VIANA, J.H.M.; SIQUEIRA, L.G.B.; CASTILHO, E.M.; SINGH, J.; KRUSSE, R.H.; RUBIN, M.I.B. The use of PGF₂a as ovulatory stimulus for timed artificial insemination in cattle. *Theriogenology*, v.81, p.689–695, 2014.

PFEIFER, L.F.M.; SIQUEIRA, L.G.; MAPLETOFT, R.J.; KASTELIC, L.P.; ADAMS, G.P.; COLAZO, M.G.; SINGH, J. Effects of exogenous progesterone and cloprostenol on ovarian follicular development and first ovulation in prepubertal heifers. *Theriogenology*, v.72, p.1054–1064, 2009.

PHILLIPS, N.J.; MCGOWAN, M.R.; JOHNSTON, S.D.; MAYER, D.G. Relationship between 30 post-thaw spermatozoal characteristics and the field fertility of 11 high-use Australian AI sires. *Animal Reproduction Science*, v.81, p.47–61; 2004.

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*, v.10, p.16522; 2020.

POHLER, K.G.; GEARY, T.W.; ATKINS, J.A. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. *Cell Tissue Research*, v.349, p.649-664, 2012.

POHLER, K.G.; PERES, R.F.G.; GREEN, J.A. Use of bovine pregnancy-associated glycoproteins to predict late embryonic mortality in postpartum Nelore beef cows. *Theriogenology*, v.85, p. 1652–1659, 2016

POYSER, N.L. Intracellular processes controlling prostaglandin production by the uterus in relation to luteolysis and menstruation. *Trends in Reproductive Biology*, v.1, p.15–28, 2005.

PRASAD, S.; RANGASAMY, S.; SATHESHKUMAR, S. Sex preselection in domestic animals-Current status and future prospects. *Veterinary World*, v. 3, p. 346–348, 2010

PUGLIESI, G.; SANTOS, F. B.; LOPES, E.; NOGUEIRA, É.; MAIO, J. R.; BINELLI, M. Improved fertility in suckled beef cows ovulating large follicles or supplemented with long-acting progesterone after timed-AI. *Theriogenology*, v.85, p.1239–1248; 2016.

PURSLEY, J.R.; MEE, M.O.; WILTBANK, M.C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. *Theriogenology*, v.44, p.915-923;1995.

RAHE, C.H.; OWENS, R.E.; FLEEGER, J.L.; NEWTON, H.J.; HARMS, P.G. Pattern of plasma luteinizing hormone in the cyclic cow: Dependence upon the period of the cycle. *Endocrinology*, v. 107, p. 498 – 503, 1980.

RAHMAN, M.B.; VANDAELE, L.; RIJSSELAERE, T.; MAES, D.; HOOGEWIJS, M.; FRIJTERS, A. Scrotal insulation and its relationship to abnormal morphology, chromatin protamination and nuclear shape of spermatozoa in Holstein-Friesian and Belgian Blue bulls. *Theriogenology*, v.76, p.1246-1257;2011.

RAMÍREZ C. H.; DOMÍNGUEZ, E.; MORENO IRUSTA, A. et al. Nanopartículas magnéticas para separación de espermatozoides X en semen equino: Resultados preliminares. In: I REPROD. ASISITDA EN EQUINOS, BOGOTA, p. 85–100, 2017.

RANDALL, D., BURGGREN, W., FRENCH, K. Fisiología Animal. 4.ed, Cap. 9, p. 279, 2011.

RANDEL, R.D., LAMMOGLIA, M.A., LEWIS, A.W., NEUENDORFF, D.A., GUTHRIE, M.J. Exogenous PGF₂ α enhanced GnRH-induced LH release in postpartum cows. *Theriogenology*, v.45, p.643–654, 1996.

RATHBONE, M.J.; KINDER, J.E.; FIKE, K.; KOJIMA, F.; CLOPTON, D.; OGLE, C.R.; BUNT, C.R. Recent advances in bovine reproductive endocrinology and physiology and their impact on drug delivery system design for the control of the estrous cycle in cattle. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.50, p.277–320, 2001.

REEVES, P. R. Distribution, elimination, and residue studies in the cow with the synthetic prostaglandin estrumate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.26, p.152-155, 1978.

REEVES, P.R. Distribution, elimination, and residue studies in the cow with the synthetic prostaglandin estrumate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.26, p.152–155; 1978.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine sperm. *Animal Reproduction Science*, v.36, p.77-86, 1994.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine s \hat{e} men. *Animal Reproduction Science*, v.36, p.77-86; 1994.

RHODES, F.M.; BURKE, C.R.; CLARK, B.A.; DAY, M.L.; MACMILLAN, K.L. Effect of treatment with progesterone and oestradiol benzoate on ovarian follicular turnover in postpartum anoestrous cows and cows which have resumed oestrous cycles. *Animal Reproduction Science*, v. 69, p. 139–150, 2002.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G.A.. Prostaglandins and inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v.31, p.986-1000; 2011.

RICHARDSON, B. N.; HILL, S.L.; STEVENSON, J.S.; GEMECHIS, G.D.; PERRY, G.A. 2016. Expression of estrus before fixed-time AI affects conception rates and factors that impact expression of estrus and the repeatability of expression of estrus in sequential breeding seasons. *Animal Reproduction Science*, v.166, p.133–140; 2016.

ROBERTS, R.M.; XIE, S.; MATHIALAGAN, N. Maternal recognition of pregnancy. *Biology of Reproduction*, v.54, p.294–302, 1996.

ROBKER, R.L.; RUSSELL, D.L.; YOSHIOKA, S.; SHARMA, S.C.; LYDON, J.P.; O'MALLEY, B.; ESPEY, L.L.; RICHARDS, J.S. Ovulation: a multi-gene, multistep process. *Steroids*, v.65, p.559–570, 2000.

RODRIGUES, A. D.; COOKE, R. F.; CIPRIANO, R. S.; SILVA, L.; CERRI, R.; CRUPPE, L. H.; MENEGHETTI, M.; POHLER, K. G.; VASCONCELOS, J. Impacts of estrus expression and intensity during a timed-AI protocol on variables associated with fertility and pregnancy success in *Bos indicus*-influenced beef cows. *Journal of animal science*, v.96, p.236–249; 2018.

RUEDA, B.R.; TILLY, K.I.; BOTROS, I.W.; JOLLY, P.D.; HANSEN, T.R.; HOYER, P.B.; TILLY, J.L. Increased bax and interleukin-1beta-converting enzyme messenger ribonucleic acid levels coincide with apoptosis in the bovine corpus luteum during structural regression. *Biology of Reproduction*, v.56, p.186-197; 1997.

SÁ FILHO, M.F.; BALDRIGHI, J.M.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; CARVALHO, J.B.P.; BO, G.A. Induction of ovarian follicular wave emergence and ovulation in progestin based timed artificial insemination protocols for *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, v.129, p.132-139, 2011.

SÁ FILHO, M.F.; GIROTTO, R.; ABE, E.K.; PENTEADO, L.; CAMPOS FILHO, E.P.; MORENO, J.F.; SALA, R.V.; NICH, M.; BARUSELLI, P.S. Optimizing the use of sex-sorted sperm in timed artificial insemination programs for suckled beef cows. *Journal of Animal Science*, v.90, p.1816-1823; 2012.

SÁ FILHO, M.F.; REIS, E.L.; VIEL, JR.J.O.; NICH, M.; MADUREIRA, E.H.; BARUSELLI, P.S. Dinâmica folicular de vacas Nelore em anestro tratadas com implante auricular, eCG e GnRH. *Acta Scientia Veterinariae*, v.32, p.235 (resumo), 2004.

SÁ FILHO, O.G.; DIAS, C.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Effect of progesterone and/or 17 β -estradiol treatment on subsequent luteal lifespan in anoestrous Nelore cows. *Journal Animal Science*, v.84 (Suppl. 1), p.207 (resumo), 2006.

SALES, J.N.; CARVALHO, J.B.; CREPALDI, G.A. Effects of two estradiol esters (benzoate and cypionate) on the induction of synchronized ovulations in *Bos indicus*

cows submitted to a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*, v.78,p.510-516, 2012.

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

SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; GIROTTO, R.W. Fixed-time AI protocols replacing eCG with a single dose of FSH were less effective in stimulating follicular growth, ovulation and fertility in suckled-anestrus Nelore beef cows. *Animal Reproduction Science*, v.124, p. 12–18, 2011b.

SANTOS., J.E.; NARCISO, C.D.; RIVERA, F.; THATCHER, W.W.; CHEBEL, R.C. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed artificial insemination protocol on reproduction of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, v.93, p.2976–88; 2010.

SCHAEFFER, L.R. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, v. 123, p. 218-23, 2006.

SCHAMS, D.; BERISHA, B. Regulation of corpus luteum function in cattle—an overview. *Reproduction of Domestic Animals*, v.39p.241–251; 2004.

SCHUSTER, V.L.; CHI, Y.; LU, R. The Prostaglandin Transporter: Eicosanoid Reuptake, Control of Signaling, and Development of High-Affinity Inhibitors as Drug Candidates. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, v.126, p.248-257;2015.

SEIDEL JR G.E.; GARNER, D.L. Sexing mammalian sperm by flow cytometry. *Reproduction*, v.124, p.733–743; 2002.

SEIDEL, G. E. Jr. Artificial insemination of cattle with sexed semen—Dealing with low numbers of slightly compromised sperm. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.36, p. 283–286, 2008.

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

SEIDEL, G. E. JR.; SCHENK, J. L. Field trials with sexed, frozen bovine semen. In: PROC. 19TH TECH. CONF. ON ARTIFICIAL INSEMINATION AND REPRODUCTION. NATL. ASSOC. ANIMAL BREEDERS, 2002, Columbia, MO, p. 64–69

SEIDEL, G. E., Jr.. Sexing sperm for beef and dairy cattle breeding. *Biotech of Rep.*, p. 281–286, 2002

SEIDEL, G.E. JR.; GARNER, D.L. Current status of sexing mammalian spermatozoa. *Animal Reproduction*, v.124, p. 733-743. 2002

SEIDEL, G.E. JR.; SCHENK, J.L.; HERICKHOFF, L.A. Insemination of heifers with sexed sperm. *Theriogenology.*, v. 52, p.1407–1420,1999.

SENGER, P.L. *Pathways to Pregnancy and Parturition*. 2nd Ed. Washington: Current Conceptions Inc., 2003. 368p.

SEO, M.J.; OH, D.K. Prostaglandin synthases: Molecular characterization and involvement in prostaglandin biosynthesis. *Progress in lipid research*, v.66, p.50-68; 2017.

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

SHEMESH, M.; HANSEL, W. Levels of prostaglandin F (PGF) in bovine endometrium uterine venous, ovarian arterial and jugular plasma during the estrous cycle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicin*, v.148, p.123–126, 1975.

SHIRASUNA, K.; ASAOKA, H.; ACOSTA, T.J.; WIJAYAGUNAWARDANE, M.P.; OHTANI, M.; HAYASHI, K.G.; MATSUI, M.; MIYAMOTO, A. Real-time dynamics of prostaglandin F_{2a} release from uterus and corpus luteum during spontaneous luteolysis in the cow. *Reproduction*, v.128, p.189-195, 2004.

SHODA, T.; HATANAKA, K; SAITO, M; OGINO, M.; HARADA, Y.; NISHIJIMA, M.; YAMAMOTO, S. Induction of cyclooxygenase type-2 (COX-2) in rat endometrium at the peak of serum estradiol during the estrus cycle. *The Japanese Journal of Pharmacology*, v.69, p.289-291, 1995

SINGH, L.P.; SADIKU, A.; VERMA, O.P. Prostaglandin F2 alpha-induced response of the bovine ovary, oviduct (uterine tube), and uterus. *American Journal of Veterinary Research*, v.12, p.1789-179, 1979

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B.; SILVEIRA, T.S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro*. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, p.387-395; 2007.

SIROIS, J. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic gonadotropin in bovine preovulatory follicles in vivo. *Endocrinology*, v.135, p. 841–848, 1994.

SIROIS, J.; LIU, J.; BOERBOOM, D.; ANTAYA, M. Prostaglandins and ovulation: from indomethacin to PGHS-2 knockout. In Adashi EY (ed) *Ovulation: Evolving their inhibitors. Molecular and Cellular Endocrinology* 191 45–56, 2000.

SKARZYNSKI, D.J.; PIOTROWSKA-TOMALA, K.K.; LUKASIK, K.; GALVAO, A.; FARBEROV, S.; ZALMAN, Y.; MEIDAN, R. Growth and regression in bovine corpora lutea: regulation by local survival and death pathways. *Reproduction in Domestic Animals*, v.48, p.25-37; 2013.

SMITH, M.F.; RICKE, W.A.; BAKKE, L.J.; DOW, M.P.; SMITH, G.W. 2002 Ovarian tissue remodeling: role of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.191, p.45-56, 2002.

SMITH, W.L.; GARAVITO, R.M.; DEWITT, D.L. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *Journal of Biological Chemistry*, v.271, p.33157-33160; 1996

SOMERVILLE, R.P.; LONGPRE, J.M.; JUNGERS, K.A.; ENGLE, J.M.; ROSS, M.; EVANKO, S.; WIGHT, T.N.; LEDUC, R.; APTE, S.S. Characterization of ADAMTS-9 and ADAMTS-20 as a distinct ADAMTS subfamily related to *Caenorhabditis elegans* GON-1. *Journal of Biological Chemistry*, v.278, p. 9503-9513, 2003.

SPENCER, T.E.; BAZER, F.W. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.5, p.2-49;2004.

STEIROPOULOS, P.; TRAKADA, G.; BOUROS, D. Current pharmacological treatment of pulmonary arterial hypertension. *Current Clinical Pharmacology*, v.3, p.11-19; 2008.

ST-LOUIS, I.; SINGH, M.; BRASSEUR, K.; LEBLANC, V.; PARENT, S.; ASSELIN, E. Expression of COX-1 and COX-2 in the endometrium of cyclic, pregnant and in a model of pseudopregnant rats and their regulation by sex steroids. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.8, p. 103, 2010.

STOCK, A.E.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dominance in cattle: relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology*, v. 132, p. 1108 – 1114, 1993.

SUAREZ, S.S.; PACEY, A.A. Sperm transport in the female reproductive tract. *Human Reproduction Update*, v.12, p.23-37; 2006.

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

TAFT R, AHMAD N, INSKEEP EK. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *Journal of Animal Science*, v. 74, p. 2985-2991; 1996.

TAFT, R.; AHMAD, N.; INSKEEP, E.K. Exogenous pulses of luteinizing hormone cause persistence of the largest bovine ovarian follicle. *Journal of Animal Science*, v.74, p.2985–2991; 1996.

TARNAWSKI, A.; AHLUWALIA, A.; JONES, M.K. Gastric cytoprotection beyond prostaglandins: cellular and molecular mechanisms of gastroprotective and ulcer healing actions of antacids. *Current Pharmaceutical Design*, v.19, p.126-32; 2013.

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull sêmen. *Theriogenology*, v.62, p.1245–1252; 2004.

THOMAS, J.M.; LOCK, S.L.; POOCK, S.E.; ELLERSIECK, M.R.; SMITH, M.F.; PATTERSON, D.J. Delayed insemination of nonestrous cows improves pregnancy rates when using sex-sorted semen in timed artificial insemination of suckled beef cows. *Journal of Animal Science*, v.92, p.1747-1752; 2004.

THOMAS, J.M.; LOCKE, J.W.C.; BONACKER, R.C. Evaluation of SexedULTRA 4M™ sex-sorted semen in timed artificial insemination programs for mature beef cows. *Theriogenology*, v. 123, p. 100-107, 2019.

THOMAS, J.M.; LOCKE, J.W.C.; VISHWANATH, R. Effective use of SexedULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers. *Theriogenology*, v. 98, p. 88-93, 2017.

TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Prostaglandin F2alpha induces expression of prostaglandin G/H synthase-2 in the ovine corpus luteum; a potential positive feedback loop during luteolysis. *Biology of Reproduction*, v.57, p.1016–1022; 1997

TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C. Prostaglandin Regulates distinct physiological changes in early and mid-cycle bovine corpora lutea. *Biology of Reproduction*, v.58,p.346–52, 1998.

TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C.; BODENSTEINER, K.J. Distinct mechanisms regulate induction of messenger ribonucleic acid for prostaglandin (PG) G/H synthase-2, PGE (EP3) receptor, and PGF2a receptor in bovine preovulatory follicles. *Endocrinology*, v.137, p.3348–3355, 1996.

TSAI, S.J.; WILTBANK, M.C.; BODENSTEINER, K.J. Distinct mechanisms regulate induction of messenger ribonucleic acid for prostaglandin (PG) G/H synthase-2, PGE (EP3) receptor, and PGF2 alpha receptor in bovine pre ovulatory follicles. *Endocrinology*, v.137, p.3348–3355; 1996

TSANG, B.K.; AINSWORTH, L.; DOWNEY, B.R.; ARMSTRONG, D.T. Preovulatory changes in cyclic AMP and prostaglandin concentrations in follicular fluid of gilts. *Prostaglandins*, v.17, p.141-148, 1979

VASCONCELOS, J. L. M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H. N.; GUENTHER, J. N.; WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces

subsequent luteal size and pregnancy rates. *Theriogenology*, v. 56, p. 307 - 314, 2001.

VASCONCELOS, J.L.M.; JARDINA, D.T.G.; SÁ FILHO, O.G. Comparison of progesterone-based protocols with gonadotropin releasing hormone or estradiol benzoate for timed artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology*, v.75, p.1153–1160, 2011.

VASCONCELOS, J.L.M.; PEREZ, G.C.; SANTOS, R.M.; SILVA, A.T.N.; MACIEL, A.B.B. Progesterone intravaginal device and/or calf removal on anestrus Angus crossbred cows during a 60-days breeding season. *Journal of Animal Science*, v. 82 (Suppl. 1), p.67 (Abstract), 2004.

VASCONCELOS, J.L.M.; SARTORI, R.; OLIVEIRA, H.N.; GUENTHER, J.N.; WILTBANK, M.C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rates. *Theriogenology*, v.56, p.307–14, 2001.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149–179; 2002.

VISHWANATH, R. Sexed sperm vs conventional sperm – a comparative discussion. Proceedings, *Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*, v. 17, p. 250-256. 2015

VYNCKIER, L.; DEBACKERE, M.; DE KRUIF, A.; CORYN, M. Plasma estradiol-17 concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 benzoate and estradiol-17 cypionate - a preliminary study Plasma estradiol-17 beta concentrations in the cow during induced estrus and after injection of estradiol-17 beta benzoate and estradiol-17 beta cypionate—a preliminary study. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, v.13, p.36–42, 1990.

WADA, M.; DELONG, C.J.; HONG, Y.H.; RIEKE, C.J.; SONG, I.; SIDHU, R.S.; YUAN, C.; WARNOCK, M.; SCHMAIER, A.H.; YOKOYAMA, C.; SMYTH, E.M.; WILSON, S.J.; FITZGERALD, G.A.; GARAVITO, R.M.; SUI, D.E.X.; REGAN, J.W.; SMITH, W.L. Enzymes and receptors of prostaglandin pathways

with arachidonic acid-derived versus eicosapentaenoic acid-derived substrates and products. *Journal of Biological Chemistry*, v.282, p.22254-66;2007.

WANG, D.; MANN, J.R.; DUBOIS, R.N. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, v.128, p.1445-1461; 2005.

WARBERG, J.; ESKAY, R.L.; PORTER, J.C. Prostaglandin-Induced Release of Anterior Pituitary Hormones: Structure-Activity Relationships. *Endocrinology*, v.98, p.1135–1141, 1976.

WATANABE, K. Recent reports about enzymes related to the synthesis of prostaglandin (PG) F(2) (PGF(2 α) and 9 α , 11 β -PGF(2)). *Journal of Biochemistry*, v.15, p.593-596; 2011.

WATHES ,D.C.; ROBERT, D.; ABAYASEKARA, E.; AITKEN, J.R. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biology of Reproduction*, v. 77, p. 190-201, 2007.

WIKTOROWSKA-OWCZAREK, A.; BEREZIŃSKA, M.; NOWAK, J. Z. PUFAs: Structures, Metabolism and Functions. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, v. 24, p. 931–941,2015.

WILLIS, E.L.; BRIDGES, P.J.; FORTUNE, J.E. Progesterone receptor and prostaglandins mediate luteinizing hormone-induced changes in messenger RNAs for ADAMTS proteases in theca cells of bovine periovulatory follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v.84, p.55–66, 2017.

WILTBANK, M. C., T. F. SHIAO, D. R. BERGFELT, AND O. J. GINTHER. Prostaglandin F2a receptors in the early bovine corpus luteum. *Biology of Reproduction*, v.52, p. 74–78, 1995.

WILTBANK, M.C.; GUMEN, A.; SARTORI, R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.21-52, 2002

WRIGHT, M.F.; SAYRE, B.; INSKEEP, E.K.; FLORES, J.A. Prostaglandin F(2 α) regulation of the bovine corpus luteum endothelin system during the early and midluteal phase. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1710–1717; 2001.

WROBEL, K. H.; KUJAT, R.; FEHLE, G. The bovine tubouterine junction: general organization and surface morphology. *Cell and Tissue Research*, v.271, p.227-239; 1993.

YANG, N.S.T.; MARSH, J.M.; LEMAIRE, W.J. Post-ovulatory changes in the concentrations of prostaglandins in rabbit graafian follicles. *Prostaglandins*, v.6, p.37-44, 1974.

YÁNIZ, J.L., LOPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; MULLINS, K.J. Study of the functional anatomy of bovine oviductal mucosa. *The Anatomical Record*, v.260, p.268-78; 2000.

ZELINSKI, M. B.; NOEL, P.; WEBER, D.W.; STORMSHAK, F. Characterization of cytoplasmic progesterone receptors in the bovine endometrium during proestrus and diestrus. *Journal of Animal Science*, v.55, p.376–383; 1982.

ZHANG, S.; LIU, B.; GAO, L.; MAO, W.; FU, C.; DURITAHALA, D.; ZHANG, N.; ZHANG, Y.; SHEN, Y.; CAO, J. Prostaglandin F2a-PTGFR signalling activation, growth factor expression and cell proliferation in bovine endometrial explants. *Reproduction, Fertility and Development*, v.29, p. 2195–2205, 2017.

10. ANEXOS

Anexo 1. Setup da análise computadorizada do sêmen (sistema CASA).

Característica	Ajuste
Nº imagens adquiridas	30
Taxa de aquisição de imagem	60 Hz
Contraste mínimo da célula	50
Tamanho mínimo da célula	6 pixels
Contraste da célula estática	30
Referência de retilinearidade	60%
Referência de velocidade de trajeto	30µm/s
Referência de velocidade retilinear	20µm/s
Tamanho estático da cabeça espermática	0,23 a 1,91
Limite de alongamento da célula	8 a 92%
Aumento	1,89X