

BIOTÉCNICAS REPRODUTIVAS PARA ACELERAÇÃO DO MELHORAMENTO GENÉTICO

Ériklis Nogueira
Gisele Zocal Mingoti
Alessandra Corallo Nicacio

INTRODUÇÃO

A pecuária de corte brasileira vem ganhando destaque tanto no cenário econômico nacional quanto internacional graças às melhoras nos índices de produção alcançados nos últimos anos. Em 2011, o efetivo bovino alcançou 212,8 milhões de cabeças, sendo que o Brasil tornou-se, em 2012, o segundo produtor mundial e maior exportador mundial de carne bovina (IBGE, 2011; USDA, 2013).

Grande parte do sucesso no aumento do abate e níveis de produtividade devem-se às melhorias nos sistemas de produção, salientando o surgimento e crescimento das biotécnicas de reprodução. Atualmente, a indústria da reprodução animal movimenta no mundo valores em torno de 5 bilhões de dólares.

A utilização de touros avaliados (com DEPs positivas para características de interesse econômico) se mostrou um importante instrumento para a melhoria do patrimônio genético, mas a inseminação artificial (IA) aliada ao uso de protocolos que permitem a inseminação artificial em tempo fixo, ou em momento pré-determinado, (IATF) permitem o melhor aproveitamento do potencial genético dos machos. Já a transferência de embriões por superovulação (SOV) e a produção *in vitro* (PIV) de embriões são ferra-

mentas que possibilitam utilizar melhor o potencial reprodutivo de fêmeas e machos de qualidade superior, acelerando o melhoramento genético e favorecendo programas de seleção animal.

Neste capítulo serão abordadas as principais biotécnicas de reprodução que estão disponíveis aos criadores para implementação de programas de melhoramento genético.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL (IA)

Biotécnicas reprodutivas como a inseminação artificial têm proporcionado avanços significativos no melhoramento do rebanho bovino mundial, além de permitir o controle de doenças venéreas e diminuição de custos com reposição. São também vantagens: a redução na frequência de genes recessivos indesejáveis e a difusão do sêmen de touros superiores em regiões do mundo onde sua criação não seria possível.

Apesar dos seus benefícios, a IA é usada em um baixo percentual das fêmeas de corte nos países do Mercosul. Dentre as causas que limitam a expansão da técnica em bovinos de corte destaca-se a falta de profissionais capacitados para sua aplicação, o anestro pós-parto das vacas, as falhas na detecção do cio e a estrutura deficiente das propriedades, dentre outras. O Brasil possui cerca de 60 milhões de vacas em reprodução com prevalência de cerca de 80% de sangue zebu (*Bos indicus*) criadas, na sua grande maioria, a pasto, o que dificulta a detecção de cio e eficiência dos programas de IA.

Os sistemas tradicionais de detecção de cio (buçal marcador e observação visual) são eficazes em apenas 55-60% dos animais em cio, o que limita a eficiência do programa de IA. As perdas de cios aumentam o número de dias improdutivos dos animais e o intervalo entre partos, diminuindo o número de bezerros nascidos. Desta forma, programas de inseminação em tempo fixo, sem a necessidade de detecção de cio, colaboram para o aumento da eficiência e emprego da técnica.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)

Na pecuária moderna, é primordial desenvolver formas de conhecer, controlar e melhorar os índices reprodutivos (taxa de prenhez, índice de serviço, intervalo entre partos, taxa de natalidade). Neste sentido, a IATF promoveu um avanço na utilização da inseminação artificial tradicional, sendo responsável pelo aumento de mais de 5% do rebanho bovino brasileiro inseminado nos últimos 10 anos. No ano 2000, foram comercializadas 5.769.348 doses de sêmen e, no ano de 2011, o número de doses de sêmen comercializadas no Brasil alcançou 11.906.763.

Os primeiros trabalhos de sincronização de cio preconizavam a indução do estro para posteriormente realizar a IA. Já os protocolos mais modernos objetivam sincronizar a ovulação, mesmo sem as manifestações de cio. Assim, é possível inseminar um grande número de animais em dias pré-determinados, sem a necessidade de detecção de cio.

As vantagens da utilização da IATF baseiam-se em: 1) eliminar a necessidade de observação de cio; 2) evitar a inseminação de vacas em momento errado; 3) induzir a ciclicidade em vacas em anestro pós-parto; 4) concentrar as atividades e diminuir a mão-

-de-obra; 5) diminuir investimentos com touros; e 6) diminuir o intervalo entre partos e encurtar a estação de monta, entre outras.

A prostaglandina (PGF) é um dos medicamentos mais utilizados em programas de sincronização deaios, agindo apenas sobre corpos lúteos (CL) maduros, geralmente presentes entre 5 a 6 dias após os sinais de cio. Os análogos sintéticos (cloprostenol, dinoprost, entre outros) são mais potentes que as prostaglandinas naturais. Atuam como agentes luteolíticos e determinam a queda dos níveis de progesterona, o que estimula o desenvolvimento folicular e pico do hormônio luteinizante (LH) dentro de três dias. Desta forma, a manifestação do estro pode ocorrer entre o primeiro e oitavo dias consecutivos após a administração de PGF.

Outro agente utilizado é o estradiol, um inibidor da secreção do hormônio folículo estimulante (FSH), potencializado pela inibina. A administração de estradiol durante a emergência de uma onda folicular interrompe o crescimento dos folículos, incluindo o dominante, nas primeiras 24 horas. Normalmente, cerca de 2 a 4 dias depois, ocorre a liberação de FSH, seguida da emergência de uma nova onda folicular.

Quando existe a presença de um corpo lúteo funcional, sensível à ação da prostaglandina (PGF 2α), o estradiol interage com receptores endometriais, o que estimula a liberação de PGF 2α e desencadeia a luteólise. Portanto, com o emprego do estradiol é possível sincronizar a emergência de uma onda folicular e promover lise do corpo lúteo.

Existem diferentes fórmulas de estradiol disponíveis, com diferentes períodos de permanência na corrente sanguínea dos animais. As principais apresentações são: 17- β , que permanece 1-2 dias na corrente sanguínea; Benzoato de Estradiol (BE), que permanece 2-3 dias na corrente sanguínea; Valerato de Estradiol, que permanece 8 dias na corrente sanguínea e o Cipionato de Estradiol, que permanece por 9 dias na corrente sanguínea.

Outro importante grupo de fármacos utilizados são os progestágenos, compostos que são similares à progesterona e podem ser de uso oral, como o acetato de melengestrol (MGA[®], Pfizer), implantes subcutâneos (CRESTAR[®], MSD) e dispositivos intravaginais (DIB[®], MSD; CIDR[®], Zoetis; PRID[®], Bayer; PRIMER[®], Tecno-Agener União; CRO-NIPRESS[®], Biogenesis; SINCROGEST[®], Ouro Fino; PROCICLAR[®], HertapeCalier).

As associações hormonais utilizadas atualmente para a sincronização de estro têm o objetivo de induzir a luteólise, sincronizar as ondas foliculares e a ovulação, a fim de realizar a inseminação artificial em horário pré-fixado. Trata-se de importante ferramenta de manejo, pois possibilita a inseminação de muitos animais em um único dia. Os melhores resultados têm sido obtidos com associação de progesterona, estrógenos e prostaglandina, com porcentagem de prenhez de aproximadamente 40-60%. Nesses protocolos, o dispositivo de progesterona é geralmente mantido por 8 dias, sendo realizada uma aplicação de BE no momento da colocação do dispositivo de progesterona (P4). Quando o mesmo é retirado, é aplicada uma dose de PGF 2α , segundo da aplicação de BE (no momento da retirada ou 24 horas após) ou cipionato de estradiol (CE) (no momento da retirada do implante). A IATF deve ser realizada 48-54 horas depois da retirada do implante.

Dentre os fatores que interferem nas taxas de prenhez de IATF em vacas de corte, a aplicação de 300 a 400 UI de eCG (Gonadotrofina coriônica equina), no momento da retirada do dispositivo de P4, provoca aumento do diâmetro do folículo pré-ovulatório, com conseqüente melhoria das taxas de prenhez, sobretudo em vacas com Escore de Condição Corporal (ECC) moderado a baixo (<3, em escala de 1-5).

Outros indutores de crescimento folicular têm sido testados a fim de substituir o eCG. Por exemplo, já foi anteriormente avaliada a utilização de FSH e de FSH/LH no dia da retirada do implante de P4 em vacas Nelore paridas e os resultados demonstraram (Tabela 16.1) que os indutores não provocaram diferenças na taxa de prenhez, embora os animais apresentassem ECC acima de 3 (1-5) e boa parte dos animais estivesse ciclando. Assim, novos estudos estão sendo conduzidos para avaliar os efeitos dos indutores de crescimento folicular em vacas de menor ECC ou em anestro.

Outro fator que afeta as taxas de prenhez após IATF pode ser a qualidade do sêmen, tal como pode ser inferido pelas diferentes taxas de prenhez devidas aos touros (Tabela 16.1). Em outro trabalho onde foram avaliadas 5.249 inseminações em tempo fixo, foi observado que a maior taxa de prenhez foi de 61,9% e a menor foi de 40,9% (Figura 16.1), com uma variação de 21 pontos percentuais na taxa de prenhez, dependendo do sêmen utilizado.

Existem vários fatores que influenciam negativamente a fertilidade do sêmen bovino congelado, destacando-se o manuseio inadequado, o processamento para envase, a qualidade do ejaculado etc. Os parâmetros recomendados pelo CBRA (Colégio Brasi-

TABELA 16.1. Efeito dos tratamentos à remoção dos implantes de progesterona (P4), fazenda, ordem de parição e touro utilizado sobre o diâmetro do foliculo pré-ovulatório (FD) e taxa de prenhez (TP) em vacas Nelore submetidas à IATF.

| FONTES DE VARIAÇÃO | FD ± DP (MM) | P | TAXA DE PRENHEZ (%) | P |
|--------------------|--------------|-------|---------------------|-------|
| Tratamento | | | | |
| Controle | 12.40 ± 2.97 | | 41.2 ^a | |
| eCG | 14.31 ± 2.90 | 0,33 | 46.4 ^a | 0.155 |
| Folltropin® (FSH) | 13.84 ± 2.64 | | 46.3 ^a | |
| Pluset® (FSH/LH) | 13.54 ± 3.44 | | 48.2 ^a | |
| Fazenda | | | | |
| 1 | 13.82 ± 3.01 | 0,37 | 53.9 ^a | 0.001 |
| 2 | 12.28 ± 2.62 | | 40.3 ^b | |
| Ordem de parição | | | | |
| Primíparas | 12.19 ± 3.18 | 0,003 | 38.8 ^a | 0.004 |
| Múltiparas | 14.38 ± 2.70 | | 49.3 ^b | |
| Touro | | | | |
| 1 | | | 57.8 ^a | |
| 2 | | | 31.8 ^b | 0.05 |
| 3 | | | 47.3 ^a | |

Fonte: Nogueira et al. (2013).

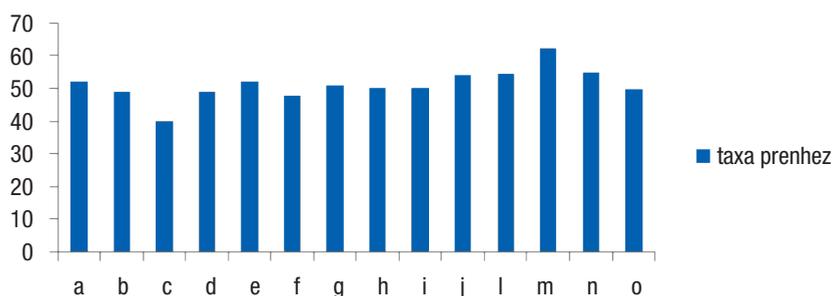


FIGURA 16.1. Taxa de prenhez (%) de acordo com o sêmen de diferentes touros (a, ...o) utilizados na IATF. Fonte: Nogueira et al. (2011).

leiro de Reprodução Animal) e utilizados rotineiramente para avaliação da qualidade de amostras de sêmen congelado incluem volume, concentração espermática, número de espermatozoides viáveis na dose, motilidade progressiva ao descongelamento, motilidade após o teste de termorresistência, além da avaliação de morfologia espermática. Embora estes testes produzam uma série de informações, suas correlações com a fertilidade são, na maioria das vezes, conflitantes ou mesmo inexistentes. É esperado que a predição da fertilidade do sêmen seja melhorada se parâmetros adicionais baseados nas características funcionais do espermatozoide forem utilizados, como por exemplo o uso de sondas fluorescentes para avaliação da integridade da membrana espermática, testes de fertilização, teste hiposmótico, avaliação da integridade da cromatina ou a associação entre eles. Na Tabela 16.2, são sugeridos alguns parâmetros para utilização de sêmen bovino criopreservado a ser utilizado em IATF.

Outro ponto que influencia os resultados da IATF é a categoria animal. Trabalhos realizados por Nogueira et al. (2011) indicam que vacas solteiras apresentam melhores taxas de prenhez quando comparadas com vacas paridas, enquanto que novilhas apresentam o pior desempenho (Tabela 16.3). Tal resultado encontra-se de acordo com vários autores, que têm demonstrado que novilhas Nelore, mesmo ciclando normalmente, apresentam resultados variáveis e geralmente inferiores quando são submetidas a protocolos de IATF. Mesmo com resultados inferiores às outras categorias, o resultado de 48%

TABELA 16.2. Parâmetros recomendados para sêmen bovino criopreservado para utilização em IATF.

| PARÂMETRO | MÍNIMO RECOMENDADO | IDEAL |
|----------------------------------|--------------------|--------------------|
| Motilidade ao descongelamento | 40% | ≥50% |
| Vigor ao descongelamento | 3 | ≥4 |
| Concentração de células viáveis | 10×10^6 | ≥ 15×10^6 |
| Defeitos totais | Máximo 20% | Máximo 15% |
| TTR (Teste de Termo Resistência) | 15% | ≥ 20% |

TABELA 16.3. Taxa de prenhez de vacas submetidas à IATF, de acordo com a categoria animal.

| CATEGORIA | TOTAL | % DE PRENHEZ | % DE VAZIAS |
|-----------|-------|-------------------|-------------|
| Novilha | 2558 | 48.5 ^c | 51.5 |
| Parida | 2328 | 53.7 ^b | 46.3 |
| Solteira | 363 | 64.7 ^a | 35.5 |
| Total | 5249 | 51.8 | 47.2 |

Letras iguais na mesma coluna, não diferem ($P > 0,001$).

Fonte: Nogueira et al. (2011).

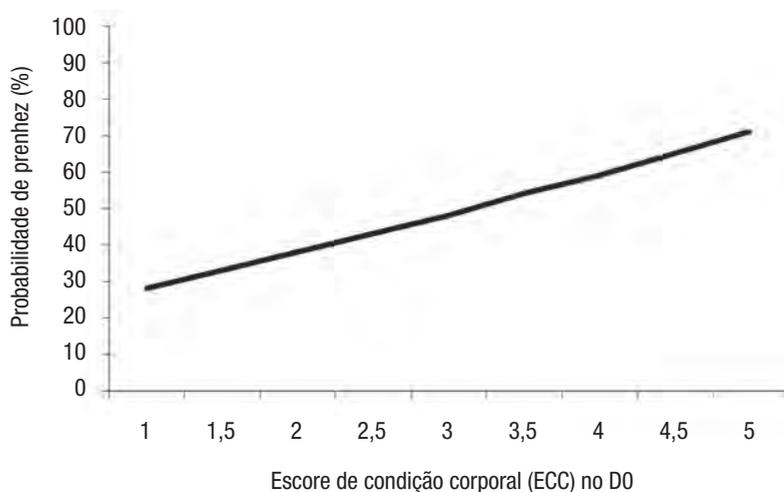


FIGURA 16.2. Efeito do ECC no dia do implante de P4 (D0) sobre a probabilidade de prenhez em vacas Nelore em pós-parto submetidas à IATF (N=329; $P < 0,05$). Fonte: Nogueira, E. (dados não publicados).

de prenhez é considerado satisfatório e demonstra que a técnica pode ser utilizada em qualquer uma destas categorias animais, desde que atendidas às recomendações técnicas para cada uma delas.

Também deve ser considerado o ECC dos animais utilizados em IATF, pois quanto maior o ECC, maior será a probabilidade de prenhez em vacas submetidas à IATF (Figura 16.2).

TRANSFERÊNCIA (TE) E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIV)

O número de embriões bovinos produzidos *in vivo* como resultado de Superovulação (SOV) e coletados por lavagem uterina, em todo o mundo no ano de 2009, foi de 704.000. Em contrapartida, foram 746.000 embriões em 2008, observando-se, portanto, uma queda de 5,6%. Já o número total de embriões bovinos transferíveis produzidos

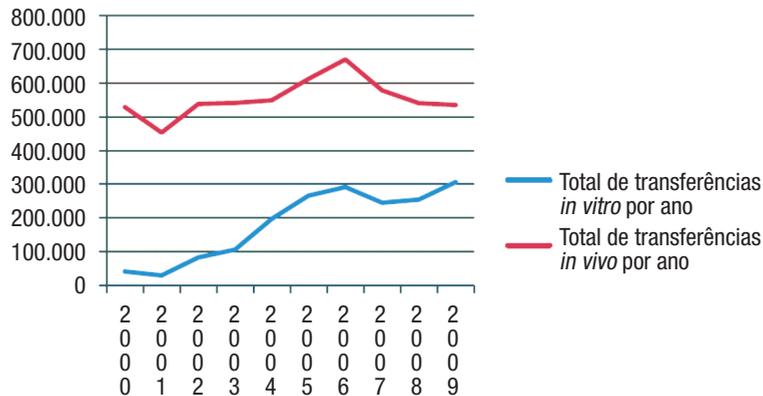


FIGURA 16.3. Número de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* e transferidos ao longo da década passada. Fonte: Adaptado de Stroud (2010).

in vitro (PIV) em todo o mundo foi de 379.000 em 2009, comparado com 331.000 em 2008. Isso representa um aumento de 12,7% na produção. O Brasil lidera a produção e transferência de embriões *in vitro*, respondendo por 68% desse mercado. A baixa eficiência da criopreservação de embriões PIV certamente compromete a expansão da técnica em outros países (apenas 7% dos embriões PIV transferidos em 2009 eram congelados). Embora, no Brasil, a utilização de embriões PIV tenha superado a utilização de embriões coletados *in vivo* (TE), observa-se que, no mundo, a produção *in vivo* supera em mais de 90% a produção *in vitro* (Figura 16.3).

Transferência de embriões obtidos por superovulação (SOV)

Desde a introdução da TE na atividade comercial, a partir da década de 1970 e após o desenvolvimento dos métodos não cirúrgicos simples, houve poucas alterações técnicas nos procedimentos de coleta e transferência de embriões produzidos por SOV. Porém, o material utilizado (cateteres e filtros, dentre outros) tem sido continuamente aprimorado e seu custo foi reduzido, o que possibilitou um aumento da eficiência da TE e, além disso, tornou-a mais acessível.

Infelizmente, a grande variação na resposta ao tratamento superovulatório continua limitando a aplicação comercial mais ampla da TE. Geralmente, 20-30% dos animais não respondem à SOV, enquanto outros 20-30% respondem apenas modestamente e com baixas taxas de fertilização (<6 embriões viáveis por coleta). Uma resposta aceitável de no mínimo 6 embriões viáveis por coleta têm sido obtida em apenas um terço das doadoras. Inúmeros fatores podem influenciar essa resposta, dentre os quais se destacam fatores relacionados ao embrião, meio ambiente (nutrição, estabulação, eficiência e exatidão da observação de cios, etc.), organismo materno e sua predisposição individual (idade, sensibilidade ao estresse, níveis de produção leiteira, genética), bem como a interação destes fatores.

Outros fatores, como o tipo e o grau de pureza dos fármacos, protocolo e dose utilizada, condição fisiológica no momento do início da SOV (presença de folículo dominante) e a nutrição das doadoras, também podem afetar grandemente a resposta aos tratamentos.

TABELA 16.4. Efeito da dose do hormônio folículo estimulante (FSH) sobre a produção de embriões *in vivo*.

| DOSE (UI) | EMBRIÕES TOTAIS (N) | EMBRIÕES TRANSFERÍVEIS (N) | EMBRIÕES DEGENERADOS (N) | EMBRIÕES NÃO FECUNDADOS (N) |
|-----------|---------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| 166 | 5,25b | 2,75 b | 2,50ab | 0 |
| 200 | 5,33 b | 4,66ab | 0,66b | 0 |
| 250 | 11,70a | 7,13a | 3,25a | 1,31a |
| 300 | 10,50a | 7,25a | 1,75b | 1,5a |
| 333 | 8,14 a | 5,60b | 1,80a | 0,74a |

Médias na mesma coluna seguidas de letras iguais, não diferem pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

Fonte: Nogueira et al., (2009).

Em trabalho realizado em Campo Grande (MS), foi observado efeito da dose de hormônio aplicado para SOV na produção de embriões em doadoras Nelore, no qual doses mais baixas (166 e 200 UI) de Pluset[®] produziram um menor número de embriões totais e transferíveis que doses intermediárias (250 e 300UI, Tabela 16.4). Já doses mais elevadas (333 UI) apresentaram quantidades semelhantes de embriões totais em relação às doses intermediárias, porém com menor quantidade de embriões transferíveis.

Dentre algumas estratégias que podem ser aplicadas para aumentar a eficiência nos protocolos de SOV, pode-se destacar: 1) seleção mais eficiente dos animais por meio de exames clínicos e ginecológicos regulares e controle reprodutivo no rebanho, a fim de detectar alterações no trato reprodutivo; 2) redução dos intervalos para tratamentos superovulatórios em um mesmo animal, para otimização das coletas (geralmente se tenta obter intervalos curtos de 45-60 dias quando as doadoras são submetidas a ciclos repetidos de SOV); 3) bipartição embrionária: esta técnica, quando conduzida com equipamento adequado, equipe treinada e embriões de boa qualidade, permite o aumento de até 50% dos bezerros produzidos por TE. Neste caso, o cultivo destes embriões de baixa qualidade por 24 h antes da TE é recomendável.

Resultados de prenhez obtidos com embriões de baixa qualidade (graus II e III), submetidos ou não a cultivo por 24 horas após a coleta, e embriões de qualidade excelente (grau I), sem cultivo são apresentados na Tabela 16.5. Os embriões de grau II e III em cultivo proporcionaram uma percentagem maior de prenhez, em comparação aos embriões grau II e III transferidos imediatamente pós-coleta, demonstrando os benefícios da técnica.

Também deve ser considerado o rebanho de receptoras disponível, pois a variação na qualidade dos animais é um dos principais fatores que influencia as taxas de prenhez. Normalmente a utilização de novilhas permite maiores taxas de gestação do que vacas, pois são animais que não sofrem os efeitos da amamentação, o que pode contribuir negativamente com as taxas de gestação.

Ainda em relação às receptoras, não foram observadas diferenças entre o diâmetro de corpo lúteo (CL) e concentração plasmática de progesterona, avaliadas em cinco diferen-

TABELA 16.5. Comparação de prenhez de embriões de graus I, II e III, sem cultivo, e de graus II e III, com cultivo.

| GRAU DE DESENVOLVIMENTO E CULTIVO DO EMBRIÃO | EMBRIÕES TRANSFERIDOS | PRENHEZES CONFIRMADAS | % DE PRENHEZ |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------|
| Grau I sem cultivo | 276 | 152 | 55 ^a |
| Grau II sem cultivo | 370 | 118 | 32 ^b |
| Grau III sem cultivo | 340 | 58 | 17 ^c |
| Embriões cultivados (graus II e III) | 111 | 50 | 45 ^a |

a≠b (P<0,05), pelo teste de Qui-quadrado.

Fonte: Nogueira et al., (2010).

TABELA 16.6. Número de receptoras (N), concentração plasmática de progesterona (P4, ng/mL), diâmetro do corpo lúteo (CL, cm) e porcentagem de prenhez de acordo com o grupo racial

| OBSERVAÇÃO | GRUPO RACIAL ¹ | | | | |
|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | ½NM | ½NC | NELORE | ½NPS | ½NA |
| Receptoras (N) | 27 | 32 | 34 | 29 | 30 |
| P4 (ng/mL) ² | 1,58 ± 1,30 ^a | 1,50 ± 1,11 ^a | 1,48 ± 1,05 ^a | 1,41 ± 0,89 ^a | 1,07 ± 0,40 ^a |
| CL (cm) ² | 2,10 ± 0,29 ^a | 1,88 ± 0,39 ^a | 1,92 ± 0,44 ^a | 2,10 ± 0,42 ^a | 1,96 ± 0,33 ^a |
| Prenhez (%) ³ | 59,2 ^a | 40,6 ^{ab} | 41,1 ^{ab} | 48,3 ^{ab} | 33,3 ^b |

¹N: Nelore; M: Marchigiana; C: Caracu; P e S: Pardo Suiço e Simental; A: Angus.

²Médias seguidas pela mesma letra não diferem (P>0,05), pelo teste de Tukey.

³a≠b (P<0,05), pelo teste de Qui-quadrado.

Fonte: Nogueira et al. (2012).

tes grupos genéticos (Tabela 16.6). Receptoras ½Marchigiana x ½Nelore apresentaram taxa de prenhez superior a receptoras ½Angus x ½Nelore. As receptoras de outros grupos apresentaram resultados intermediários, mas sem diferenças entre si (Tabela 16.6).

Também foi verificado que, quanto maior o diâmetro do CL, maiores as taxas de concepção em receptoras de embrião bovino, avaliadas pela probabilidade de prenhez. Este resultado demonstra a importância da avaliação e utilização de receptoras com características ginecológicas adequadas (Figura 16.4).

Produção *in vitro* de embriões – PIV

A produção *in vitro* de embriões (PIV), aliada à aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU), permitiu aumentar o uso do potencial genético de fêmeas de alto valor zootécnico, bem como de animais portadores de infertilidade adquirida e incapazes de produzir descendentes. No Brasil, existem várias empresas trabalhando com a PIV comercialmente, com resultados satisfatórios. Segundo o relatório da IETS (International Em-

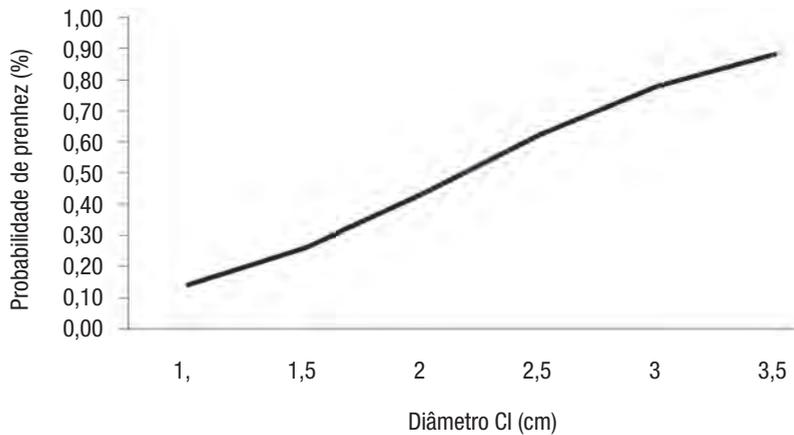


FIGURA 16.4. Probabilidade de prenhez em receptoras de embrião em função do diâmetro do CI (cm) ($P=0,006$).
Fonte: Nogueira et al. (2012).

bryo Transfer Society), um dos fatores responsáveis pela grande utilização desta técnica no Brasil é a grande disponibilidade de receptoras, o que não ocorre em outros países.

As oscilações nas taxas de sucesso estão ligadas ao uso da PIV em situações distintas, como diferentes categorias animais (bezerras, novilhas e vacas de corte ou leite), idade (pré-puberes ou senis), raças, estado reprodutivo (ciclicidade normal, gestantes, pós-parto), estado nutricional, frequência de aspiração (mensal, semanal, quinzenal) e administração de hormônios FSH e somatotropina recombinante bovina (BST). Também vale ressaltar que a utilização de animais zebuínos como doadores de ovócitos é um fator determinante para a rápida difusão da tecnologia, tendo em vista que o número de folículos/ovócitos encontrados nos ovários destes animais é superior ao encontrado em animais *Bos taurus taurus*, de modo que em apenas um procedimento de aspiração é possível a obtenção de dezenas de ovócitos. Há relatos na literatura de que vacas da raça Nelore produzem mais ovócitos, não sendo raro encontrar animais que produziram acima de 100 ovócitos em um único procedimento de OPU. Ainda não existe uma explicação para essa diferença entre fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*. Dentre as hipóteses, a de que a população de folículos pré-antrais é maior em animais Nelore, foi umas das primeiras levantadas, por constituir a reserva de gametas femininos a ser utilizada ao longo da vida reprodutiva. No entanto, existe similaridade entre a população de folículos pré-antrais de fetos e novilhas *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* e variação individual significativa na quantidade dos folículos das duas categorias estudadas.

Em trabalho publicado recentemente sobre OPU e produção *in vitro* de embriões em vacas Nelore, foi relatada uma média de 30,84 ovócitos por vaca aspirada, sendo 23,23 ovócitos viáveis; 8,13 embriões viáveis produzidos por sessão de aspiração e 3,03 prenhez, perfazendo um total de 37,26% de prenhez no dia 30 e 35,79% de prenhez no dia 60 pós-transferência. Os dados são de 656 procedimentos de aspiração folicular e dão uma boa dimensão de como estão os resultados da técnica no país (Tabela 16.7).

Muitos elementos influenciam os resultados dos procedimentos de PIV, como origem e qualidade dos ovócitos, acasalamento e sêmen escolhido, habilidade do técnico, entre

TABELA 16.7 Médias e erros-padrão do número de observações por variáveis de desempenho reprodutivo relativos a 656 procedimentos de aspiração folicular seguida por ultrassonografia (OPU/PIV), realizados em doadoras Nelore, de acordo com as classes de produção de oócitos (G1 a G4)¹.

| CLASSES DE PRODUÇÃO ¹ | N | NÚMERO DE OBSERVAÇÕES / VARIÁVEIS DE DESEMPENHO REPRODUTIVO | | | | | |
|----------------------------------|-----|---|-------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|-----------------------|
| | | TOTAL DE OÓCITOS | OÓCITOS VIÁVEIS | EMBRIÕES VIÁVEIS | GESTAÇÕES 30º. DIA | GESTANTES 60º. DIA | PERDA EMBRIONÁRIA |
| G1 | 78 | 58,94±2,04 ^a | 47,06±1,6 ^a | 15,06±0,86 ^a | 5,62±0,54 ^a | 5,52±0,81 ^a | 0,5±0,08 ^a |
| G2 | 80 | 32,61±0,50 ^b | 24,95±0,33 ^b | 9,17±0,63 ^b | 3,63±0,36 ^b | 3,32±0,33 ^b | 0,3±0,06 ^b |
| G3 | 79 | 22,13±0,50 ^c | 15,57±0,26 ^c | 6,00±0,39 ^c | 2,10±0,21 ^c | 1,92±0,20 ^b | 0,2±0,04 ^b |
| G4 | 80 | 10,26±0,57 ^d | 6,31±0,38 ^d | 2,42±0,25 ^d | 0,92±0,13 ^d | 0,85±0,13 ^b | 0,1±0,03 ^b |
| Total | 317 | 30,84±0,88 | 23,35±0,72 | 8,13±0,30 | 3,03±0,15 | 2,91±0,013 | 0,28±0,02 |

¹G1: maior produção de oócitos; G4: menor produção;

^{a-d}Médias na coluna, seguidas de letras diferentes, diferem (P<0,05).

Fonte: Pontes et al. (2011).

TABELA 16.8. Média de dados de desempenho reprodutivo após procedimentos de aspiração folicular por ultrassonografia (OPU/PIV) realizados em doadoras Nelore alimentadas com diferentes requerimentos de energia na dieta.

| NÚMERO (N) OU PERCENTAGEM (%) DE EVENTOS POR VARIÁVEIS DE DESEMPENHO REPRODUTIVO | DIETAS ¹ | |
|--|-------------------------|-------------------------|
| | CONTROLE | SUPERIOR |
| Folículos aspirados (N) | 15,3 ± 6,3 ^b | 26,6 ± 5,7 ^a |
| Oócitos recuperados (N) | 6,1 ± 2,9 ^b | 12,6 ± 5,8 ^a |
| Oócitos selecionados para PIV (N) | 5,7 ± 1,8 ^b | 9,2 ± 4,7 ^a |
| Blastocistos no dia 7 de CIV (N) | 1,8 ± 0,8 ^b | 4,6 ± 2,9 ^a |
| Blastocistos no dia 7 de CIV (%) | 31,6 ^b | 50,5 ^a |

¹Controle: 100% dos requerimentos de energia de manutenção (EM); Superior: 70% acima dos requerimentos de EM;

^{ab}Médias na linha, seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

Fonte: Nogueira (2008).

muitas outras variáveis, podendo originar embriões de diferentes qualidades e com diferentes perspectivas de uso. Mesmo o manejo nutricional das fêmeas doadoras de oócitos pode influenciar não apenas o desenvolvimento folicular e obtenção de maior número e qualidade de oócitos, mas também pode afetar os resultados da PIV (Tabela 16.8).

Um fator bastante relevante surge da comparação entre embriões produzidos *in vivo* com aqueles produzidos *in vitro*, pois apresentam características de desenvolvimento diferenciadas. As taxas de desenvolvimento dos embriões produzidos *in vitro* podem ser

atrasadas em relação aos primeiros e, além disso, os embriões machos tendem a se desenvolver mais rapidamente que as fêmeas. Alguns trabalhos mostram que embriões PIV cultivados em meios indefinidos ou semidefinidos, por períodos prolongados, podem resultar em pequenas diferenças nos índices de nascimento de bezerras machos, porém outros não demonstram essas diferenças.

Outro ponto importante a ser melhorado na PIV, é a mortalidade embrionária pós-transferência, pois na maioria dos casos, as taxas de gestação desses embriões têm sido menor do que daqueles produzidos *in vivo*. Assim como nos animais transferidos de embriões produzidos *in vivo*, a perda dos embriões produzidos *in vitro* e transferidos no dia 7 pós-cio aumenta no dia 21 de gestação, com a maioria das perdas ocorrendo nos dias 14-15, ou cerca de 1 semana após a transferência. Esses dados indicam que os embriões PIV apresentam comprometimento na habilidade de sobreviver e iniciar os mecanismos que são essenciais para o reconhecimento materno da gestação.

O próprio sistema de cultivo para PIV exerce influência sobre a produção de embriões (produção numérica ou percentual), tais como suplementos dos meios e tensão de oxigênio utilizada (Tabela 16.9).

A suplementação do meio de cultura com fontes proteicas de origem animal tem apresentado os melhores resultados na maturação ovocitária e no desenvolvimento *in vitro* de embriões, sendo o soro fetal bovino (SFB) e a albumina sérica bovina (BSA) as fontes proteicas mais usadas, além do soro de vaca em estro, soro de égua em estro e o cocultivo celular. No entanto, a principal desvantagem da inclusão destas fontes proteicas nos meios é o risco de transmissão de doenças, o que prejudica o mercado de embriões, principalmente internacional. Mesmo assim, procedimentos de cultivo embrionário em que o soro é introduzido em fases mais adiantadas do procedimento foram introduzidos na rotina da PIV comercial.

Como na maioria das espécies, o início do desenvolvimento de embriões fertilizados *in vivo* ocorre no lúmen do oviduto, onde a pressão de oxigênio (O_2) é mais baixa (3 a 9%) que da atmosfera (20%). Uma estratégia utilizada para melhoria do sistema de cultivo *in vitro* é a utilização de atmosfera controlada (mistura de gases: 5% de CO_2 , 5% de O_2 e 90% de N_2). Além disso, podem-se adicionar agentes antioxidantes aos meios de maturação *in vitro* (MIV) e/ou cultivo *in vitro* (CIV), visando à proteção contra o estresse oxidativo. Entende-se por estresse oxidativo o resultado do desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de O_2 (ROS) e os mecanismos celulares antioxidantes.

A menor criotolerância parece estar altamente relacionada com o conteúdo lipídico intracitoplasmático de embriões produzidos *in vitro*, havendo diferenças tanto na quantidade como na composição lipídica, em decorrência da inclusão de certos componentes no meio de cultivo, como por exemplo, o SFB, ou mesmo de modificações no metabolismo do ovócito e embrião. O aumento de lipídeos intracelulares compromete a qualidade dos embriões, aumentando a sua sensibilidade ao estresse oxidativo e à criopreservação. Evidências indicam que a quantidade de lipídeos em ovócitos e embriões, bem como o metabolismo dessas células, podem ser alterados por modificações na composição dos meios de cultivo, particularmente pela adição de moléculas como ácidos graxos poliinsaturados. Como consequência, podem ser observadas melhorias nas taxas de criopreservação desses embriões.

TABELA 16.9. Número de óocitos (N) e percentagem de blastocistos, de acordo com diferentes tratamentos durante os processos de maturação e cultivo embrionário *in vitro*

| TRATAMENTO | OÓCITOS (N) | BLASTOCISTOS (% ± EP) | REFERÊNCIA |
|---|-------------|--------------------------|----------------------|
| <i>Suplemento durante a maturação in vitro</i> | | | |
| SFB (soro fetal bovino) | 186 | 38,7 ± 5,9 ^a | Mingoti et al., 2009 |
| BSA (albumina sérica bovina) | 176 | 26,5 ± 4,7 ^a | |
| PVA (álcool polivinil) | 173 | 35,6 ± 6,0 ^a | |
| PVP (polivinilpirrolidona) | 209 | 32,0 ± 6,5 ^a | |
| <i>Atmosfera durante a maturação in vitro</i> | | | |
| 5% CO ₂ em ar atmosférico (~20% O ₂) | 581 | 40,8 ± 22,7 ^a | Mingoti et al., 2009 |
| 5% CO ₂ , 5% O ₂ , 90% N ₂ | 558 | 18,2 ± 2,5 ^a | |
| <i>Antioxidantes durante a maturação in vitro</i> | | | |
| Sem antioxidantes | 201 | 48,7 ± 3,4 ^a | Rocha et al., 2012 |
| Com antioxidantes | 565 | 55,4 ± 3,7 ^a | |
| <i>Suplemento durante o cultivo in vitro</i> | | | |
| SFB | 471 | 44,5 ± 3,3 ^a | Accorsi et al., 2012 |
| BSA | 471 | 12,0 ± 4,8 ^b | |
| <i>Atmosfera durante o cultivo in vitro</i> | | | |
| 5% CO ₂ em ar atmosférico (~20% O ₂) | 766 | 52,1 ± 1,5 ^a | Rocha et al., 2012 |
| 5% CO ₂ , 5% O ₂ , 90% N ₂ | 612 | 38,4 ± 1,5 ^b | |
| <i>Antioxidantes durante o cultivo in vitro</i> | | | |
| Sem antioxidantes | 201 | 48,7 ± 3,4 ^a | Rocha et al., 2013 |
| Com antioxidantes | 532 | 41,7 ± 4,5 ^a | |

^{ab}Médias na mesma coluna, para cada categoria avaliada, seguidas de letras iguais, não diferem pelo teste de Tukey (P>0,05).

Em conjunto, estas estratégias proporcionam melhorias tanto nas taxas de produção embrionária como também na sua qualidade e criotolerância. O sucesso da criopreservação de embriões bovinos PIV é fundamental para se estabelecer sua utilização em escala comercial em todo o mundo, pois possibilita o armazenamento por tempo indeterminado de embriões. Entre as vantagens da criopreservação de embriões salienta-se a preservação de material para o estabelecimento de bancos genéticos para uso futuro, armazenamento de embriões não transferidos, maior facilidade para o intercâmbio comercial de animais/

embriões entre diferentes regiões ou mesmo com outros países e, finalmente, proporcionar a otimização do aproveitamento de receptoras e de gametas femininos.

Apesar das limitações acima apresentadas, é inegável o aumento da produção de bezerros a partir da técnica de PIV no Brasil, quer seja pela diminuição do intervalo entre coletas, pela maior produção de embriões, ou pela utilização de animais impossibilitados de produzir embriões por meio de outras técnicas (pós-parto, gestantes, animais velhos, ou com patologias adquiridas). Outra vantagem que tem despertado interesse de grande parte dos criadores é a melhor utilização do sêmen, sobretudo de doses de alto valor, pois enquanto na técnica de SOV são utilizadas duas doses por doadora coletada, na técnica de PIV uma única dose de sêmen pode ser utilizada em até 8-10 doadoras, dependendo do número de ovócitos coletados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As técnicas aqui apresentadas podem ser utilizadas concomitantemente na multiplicação de rebanhos de genética superior ou em rebanhos comerciais, favorecendo a aceleração do melhoramento genético. A IA e a IATF vêm aumentando sua participação na reprodução de bovinos e as melhorias no manejo animal e nas técnicas de suas aplicações proporcionarão ainda mais resultados. Na produção *in vivo* (PIV) de embriões, seriam necessárias melhorias nas respostas à superovulação, bem como nas taxas de concepção dos embriões transferidos. Em relação à PIV, os resultados de pesquisa indicam que a exposição do ovócito/embrião ao ambiente *in vitro* durante os 7 dias de cultivo pode influenciar a morfologia embrionária, expressão gênica fetal e desenvolvimento fetal e placentário. Os mecanismos biológicos que provocam estas condições permanecem ainda não totalmente compreendidos. As melhoras na PIV, com alterações nos sistemas de cultivo e criopreservação dos embriões podem aumentar ainda mais a utilização desta técnica com rápida multiplicação de animais de genética superior em programas de melhoramento animal.

FONTES DE REFERÊNCIA

- ABREU, U.G.P.; CÉZAR, I.M.; TORRES, R.A. Análise bioeconômica da introdução do período de monta em sistemas de produção de rebanhos de cria na região do Brasil Central. *Rev Bras Zootec*, v.32, p.1198-1206, 2003.
- ACCORSI, M.F.; ROCHA, N.A.S.; LEÃO, B.C.S.; MINGOTI, G.Z. In vitro production of bovine embryos in the absence of FBS under different oxygen tensions: implications in embryonic development and levels of intracellular reactive oxygen species - preliminary results. *Animal Reproduction*, v.9, p.624 (Abstract), 2012.
- AGCA, Y.; MONSON, R.L.; NORTHEY, D.L.; MAZNI, O.A. et al. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. *Theriogenology*, 10:147-62, 1998.
- AMARAL, T.B.; COSTA, F.P.; CORRÊA, E.S. Touros melhoradores ou inseminação artificial: um exercício de avaliação econômica. Campo Grande, MS: Embrapa/CNPGC, 2003. 15p. (Embrapa/CNPGC, Documentos, 140).
- ANDERSSON, M.; TAPONENA, J.; KOSKINENA, E.; DAHLBOMB, M. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa and semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology*, v. 61, p.1583-1588, 2004.

- ARRUDA, Z.J. Considerações econômicas sobre a produção de bezerros de corte. Campo Grande, MS: Embrapa-CNPGC, 1993. 4p. (Embrapa/CNPGC, Documentos, 47).
- ASBIA. Índice ASBIA- importação, exportação e comercialização de sêmen- 2011. ASBIA. São Paulo SP, 2011.
- BARUSELLI, P.S.; FERREIRA, R.M.; SALES, J.N.S.; GIMENES, L.U. et al. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. *Theriogenology*, 76:1583–1593, 2011.
- BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; O' CALLAGHAM, D. Effect of nutrition on endocrine parameters ovarian physiology and oocyte and embryo development. *Theriogenology*, 55:1323-1340, 2001.
- DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of in vitro maturation media: a review. *Reprod Domest Anim*. 45: 476-482, 2010.
- FARIN, P.W.; FARIN, C.E.; CROSIER, A.E.; BLONDIN, P.; ALEXANDER, J.E. Effect of in vitro culture and maternal insulin-like growth factor-I on development of bovine conceptuses. *Theriogenology*, v.51, p.238, 1999.
- GARCIA, J.M.; YAMAZAKI, W.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R.; SENEDA, M.M.; ÉSPER, C.R. Produção *in vitro* de embriões bovinos: aspectos técnicos e comerciais. *Rev. Bras. Reprod Anim*. 27:2, 2003.
- GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. 2.ed. Cambridge: University Press, 2003. 548p.
- GOTTARDI, F.P.; MINGOTI, G.Z. Maturação de óocitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. *Rev Bras Reprod Anim*, 33:82-94, 2009.
- HASLER, J.F. *In vitro* culture of bovine embryos in Menezes' B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Anim Reprod Sci* ;60:81-91, 2000.
- KRUIP, THAM DEN DASS, J.H.G. In vitro produced and cloned embryos: effects on pregnancy, parturition and offspring. *Theriogenology*.47:43-52, 1997.
- IBGE. Pesquisa da Pecuária Municipal 2010-2011. Efetivo dos rebanhos em 31.12, e variação anual, segundo as categorias - Brasil - 2010-2011. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Pecuaria/Producao_da_Pecuaria_Municipal/2011/tabelas_pdf/tab01.pdf
- LEÃO, B.C.S. Efeitos da suplementação lipídica sobre o desenvolvimento embrionário e criotolerância de embriões bovinos produzidos *in vitro*. 87p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2012.
- LEIBO, S.P.; RALL, W.F. Increase in production of pregnancies by bisection of bovine embryos. *Theriogenology*, 27:245, 1987.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. In vitro-produced bovine embryos- Dealing with the warts. *Theriogenology*, 69:17-22, 2008.
- MADUREIRA, E.H.; BARUFI, F.B.; BARBUIO, J.P.; MIZUTA, K.; ROSSA, L.A.F.; BINELLI, M.; BARUSELLI, P.S. Sincronização do estro com emprego do PRID em vacas de corte zebuínas amamentando. *Rev Bras Reprod Anim*, 26: 233-236, 2002.
- MANUAL para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2 ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998.
- MARDINI, F.B. Estudo comparativo dos protocolos utilizados na sincronização do cio de receptora para transferência de embriões. Campo Grande-MS: UNIDERP, 2000. 68p. (Monografia de graduação em Medicina Veterinária).
- MARTINEZ, M.L.; YAMAGUCHI, L.C.T.; VERNEQUE, R.S. Aplicativo para cálculo do custo da monta natural e da inseminação artificial em bovinos, Embrapa/CNPGL/ASBIA, 2004. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/custos/leite.asp>.
- MINGOTI, G.Z.; GARCIA, J.M.; ROSA-E-SILVA, A.A. The effect of serum on in vitro maturation, in vitro fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. *Braz J Med Res*, 28:213-217, 1995.
- MINGOTI, G.Z.; CAIADO CASTRO, V.S.; MÉO, S.C. et al. The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. *Zygote*, 17:321-328, 2009.
- NOGUEIRA, E. Efeitos da suplementação energética e lipídica no perfil metabólico, desenvolvimento folicular e produção *in vitro* de embriões em novilhas da raça nelore (*Bos taurus indicus*). 87 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2008.

- NOGUEIRA, E.; MARQUES JUNIOR, H. R.; RODRIGUES, L.A.; ALMEIDA, H.L.; UNTEM, R.R.; SILVA, A.S.; ARAUJO, J.M. Efeito de diferentes doses de fsh (Pluset) sobre a produção de embriões em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). In: III CONGRESSO DE MEDICINA VETERINÁRIA NO MATO GROSSO DO SUL E SUAS FRONTEIRAS, 2009, campo grande. Anais do III Comvet, 2009.
- NOGUEIRA, É.; MARQUES JUNIOR, H.R.; DIAS, A.M.; ITAVO, L.C.V.; PAULA, M.R.L.; PAUPERIO JUNIOR, L.F. Avaliação da taxa de prenhez de embriões in vivo de baixa qualidade submetidos a cultivo por 24 horas. In: 47a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2010, Salvador. Anais da 47a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2010.
- NOGUEIRA, E.; SILVA, A.S.; DIAS, A.M. et al. Taxa de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF no Pantanal de MS. Corumbá: Embrapa Pantanal, 6 p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 97). Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/CT97.pdf>>. Acesso em: 10 maio 2011.
- NOGUEIRA, E.; SILVA, A.S., MARQUES JÚNIOR, H.R.; NOGUEIRA, R.J.; BORGES, J.C. Taxa de prenhez de vacas Nelore submetidas a protocolos de IATF no Planalto Boliviano Corumbá: Embrapa Pantanal, 2011. 5p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 101). Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/CT101.pdf>>. Acesso em: 31 dez. 2011.
- NOGUEIRA, E.; CARDOSO, G.S.; MARQUES JUNIOR, H.R.; DIAS, A.M.; ÍTAVO, L.C.V.; BORGES, J.C. Effect of breed and corpus luteum on pregnancy rate of bovine embryo recipients. R. Bras. Zootec., v.41, n.9, p.2129-2133, 2012.
- NOGUEIRA, E.; COSTA FILHO, L.C.C.; SILVA, A.S.; BORGES, J.C.; DIAS, A.M.; ÍTAVO, L.C.V. Taxa de prenhez em vacas Nelore submetidas a IATF e tratadas com diferentes indutores de crescimento folicular. Rev Bras Zootec, no prelo. 2013.
- OLSON, S.E.; SEIDEL JR, G.E. Reduced oxygen tension and EDTA improve bovine zygote development in a chemically defined medium. J Anim Sci ,78:152–157, 2000.
- PEREIRA, J.C.C. Melhoramento genético aplicado à produção animal. 2. ed. Belo Horizonte, MG: FEP/ MVZ, 1999. 480p.
- PONTES, J.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.; ERENO-JUNIOR, J.; UVO, S.; BARREIROS, T.; OLIVEIRA, J.; HASLER, J.; SENEDA, M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. Theriogenology, 71:690-697, 2009.
- PONTES, J.H.F.; MELO STERZA, F.A.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANCHES, B.V.; RUBIN, K.C.P.; SENEDA, M.M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. Theriogenology 75, 1640–1646, 2011.
- REICHENBACH, H.D. Transferência e congelamento de embriões bovinos: Considerações Práticas. Acta Scientiae Veterinariae. 31: 28-50 (suplemento), 2003.
- RIZOS, D.; WARD, F.; BOLAND, M.P. et al. Effect of culture on the yield and quality of bovine blastocysts as assessed by survival after vitrification. Theriogenology, 56:1-16, 2001.
- ROCHA, N.A.S. Efeitos de antioxidantes e da atmosfera gasosa em diferentes etapas da produção in vitro sobre o desenvolvimento e criotolerância de embriões bovinos. 109p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, 2012.
- ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; LEÃO, B.C.S.; NOGUEIRA, E.; ACCORSI, M.F.; MINGOTI, G.Z. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced in vitro in the presence of antioxidants. Reprod. Fertil. Dev., publicado online 06 Junho 2013, p.A-I (<http://dx.doi.org/10.1071/RD12354>)
- RODRIGUES, J.L. Transferência de embriões bovinos- histórico e perspectivas atuais, Rev. Bras. Reprod. Anim., 25:2, 2001.
- RUBIN, M.I.B.; PESSOA, G.A.; FRAGA, D.R.; VASCONCELOS, F.F.; SILVA, C.A.M. Produção in vitro de embriões e Clonagem: um caminho conhecido? Rev Bras Reprod Anim Supl, 6:77-85, 2009.
- SÁVIO, J.D.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle of heifers. J Rep And Fert, 83: 663-671, 1988.
- SEIDEL J.R.; G.E. Modifying oocytes and embryos to improve their cryopreservation. Theriogenology, 65:228–235, 2006.

- SILVA, K.C.F. Estudo comparativo da recuperação de complexo cumulusoócito e da população de folículos pré-antrais entre fêmeas *Bostaurus taurus* e *Bostaurus indicus*. 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, 2009.
- SILVA, A.S.; COSTA E SILVA, E.V.; NOGUEIRA, E.; ZÚCCARI, C.E.S.N. Avaliação do custo/benefício da inseminação artificial convencional e em tempo fixo de fêmeas bovinas pluríparas de corte. *Rev Bras Reprod Anim*, 31(4), p.443-455, 2007.
- STROUD, B. IETS Statistics and Data Retrieval Committee Report. The year 2009 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals, IETS Newsletter December 2010, International Embryo Transfer Society, 2441 Village Green Place, Champaign, IL 61822 USA. 28(4): 11-21. Available at: <http://www.iets.org>
- USDA-Livestock and Poultry. World Markets and trade: World Exports 2013 Revised: Broiler Meat Higher, Beef Lower and Pork Unchanged (http://www.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf).
- VAN SOON, A.; de KRUIF, A. A comparative study of in vitro and in vivo derived bovine embryos. *Proc 12th Int Congress Anim Reprod*. The Hague, Netherlands; 3:1363-1365, 1992.

