

OK! CV Latkes

Aspecto Comercial de Embriões Bovinos Produzidos *In Vitro*

Yeda Fumie Watanabe • Mônica Ferreira Accorsi •
Michele Rodrigues Watanabe • André Dayan • Flávio Vieira Meirelles

INTRODUÇÃO

A atual e crescente necessidade de incremento na produtividade pecuária leva ao desenvolvimento de várias biotécnicas, principalmente quanto à espécie bovina, que tem baixo número de descendentes e um intervalo de gerações longo. No início, a inseminação artificial (IA) teve importante papel na disseminação do material genético do macho e, posteriormente, técnicas como o controle do ciclo estral, a superovulação (SOV) e a transferência de embriões (TE) proporcionaram um aumento na possibilidade da multiplicação do material genético oriundo da fêmea. Essas técnicas, difundidas em vários países, contribuíram de forma decisiva para melhorar a qualidade e a quantidade do produto final, seja carne ou leite. Em um segundo momento, a ultrasonografia somou-se às técnicas existentes como importante recurso para a monitoração da atividade ovariana.

Inicialmente, a recuperação de oócitos provenientes de fêmeas abatidas permitiu o desenvolvimento de laboratórios especializados na produção em massa de embriões produzidos *in vitro*, mediante as técnicas de maturação oocitária, fecundação e cultivo embrionário *in vitro* (MIV, FIV e CIV). Em especial na década de 1990, com o aperfeiçoamento da técnica de aspiração folicular (OPU) de vacas vivas, foi possível produzir embriões de alto valor genético. A punção pode ser realizada em doadoras do tipo leiteiro e de corte, novilhas ou vacas, as quais podem estar vazias ou gestantes (até o terceiro ou quarto mês), e principalmente aquelas com infertilidade adquirida, inviáveis para programas de IA e TE, como as portadoras de obstrução e de aderência tubária e as que não respondem mais à superovulação.

A aplicação prática da produção *in vitro* (PIV) de embriões depende, principalmente, da quantidade e da qualidade dos oócitos que podem ser colhidos das vacas geneticamente superiores. Tendo em vista que oócitos imaturos podem ser colhidos *in vivo* repetidas vezes de um mesmo animal por vários meses, associação OPU e FIV tem grande potencial de aplicação.

Vários pesquisadores estudaram a eficácia da aspiração transvaginal orientada por ultra-som, com intervalo regular de três a quatro dias. Com base no número médio de oócitos colhidos por sessão é possível transferir dois a três embriões/semana/vaca, resultando em um bezerro. Comparada com a produção *in vivo* de embriões mediante indução de múltiplas ovulações e TE, a FIV por aspiração folicular de vacas vivas é capaz de produzir pelo menos três vezes mais embriões.

Outra aplicação dessa biotécnica é usar a FIV como critério de seleção de reprodutores jovens mediante sua PIV, pois se sabe que ela apresenta correlação favorável com a fertilidade a campo.

Há também a possibilidade de aplicação comercial de embriões produzidos a partir de oócitos recuperados de ovários de matadouro (em regiões onde há abate de animais especializados e selecionados, como gado holandês, por exemplo), mas o risco sanitário de tal manipulação em abatedouros tem que ser muito bem avaliado para evitar a disseminação de agentes patogênicos. A demanda desses embriões para a Ásia é muito atrativa e exportações desse produto de países como o Canadá têm ocorrido com certa frequência, principalmente pelo custo de produção ser muito baixo.

Finalmente, a PIV permite associação com outras biotécnicas, em particular o diagnóstico pré-natal, como a sexagem dos embriões, a bissecção, a transferência nuclear e a transgenia.

No entanto, o fator limitante da aplicação comercial dessa técnica é o custo alto de montagem e manutenção do laboratório, assim como a mão-de-obra utilizada, além da variação na taxa de gestação e o custo de sincronizar receptoras para a transferência a fresco dos embriões produzidos em larga escala.

O objetivo principal deste capítulo é apresentar alguns aspectos que influenciam os resultados na rotina comercial da PIV, assim como os dados de produção nos últimos seis anos e seis meses da Vitrogen (2000 a 2007) e discutir alguns pontos que podem incrementar a produção de prenhez de embriões produzidos *in vitro*.

Histórico da Fecundação *In Vitro* Comercial

No Exterior

A FIV é considerada a terceira geração de biotecnologia da reprodução, após a IA e a TE. Desde o nascimento do primeiro bezerro oriundo da FIV, os processos de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* foram melhorados de modo considerável e atualmente a técnica é tida como viável em programas de melhoramento¹.

Inicialmente, os estudos de fecundação em mamíferos tiveram como referência básica os trabalhos desenvolvidos em ouriço-do-mar na década de 1940. Mas foram os estudos feitos em 1951 sobre a capacitação espermática que permitiram um grande avanço no entendimento dos mecanismos básicos da fecundação. Outro trabalho de igual importância foi desenvolvido em 1968, em que o autor obteve nascimento realizando experimentos com FIV em coelhos²⁻⁴.

Em bovinos, foi no Japão que os pesquisadores alcançaram o primeiro sucesso com a FIV de oócitos maturados também *in vitro*, no ano de 1977⁵. No entanto, o primeiro nascimento de FIV, a partir de oócitos ovulados, aconteceu em 1981 nos Estados Unidos¹. Em 1983, pesquisadores canadenses, usando a técnica de laparoscopia para recuperar oócitos na PIV bovinos, obtiveram nascimento de seis bezerros⁶. Nesse caso, os autores aspiraram oócitos perto do período de ovulação, fecundaram-nos *in vitro* e utilizaram oviduto de coelha como sistema de cultivo *in vivo* do zigoto até o estágio de blastocisto.

Em 1986, pesquisadores japoneses obtiveram nascimento em bovinos a partir de oócitos maturados e fecundados *in vitro*⁷. Nesse trabalho, os autores utilizaram a coelha como receptora intermediária. Os

primeiros nascimentos obtidos de embriões bovinos produzidos totalmente *in vitro* (maturação, fecundação e cultivo) foram observados em Dublin em 1987⁸. Foi em 1988 que nasceu o primeiro bezerro produzido *in vitro* por aspiração folicular⁹.

A aplicação comercial da OPU-FIV foi desenvolvida em vários países por cooperativas de IA e várias empresas. Em 2002, cerca de 200.000 embriões foram produzidos *in vitro* no mundo e somente dois países, Brasil e Japão, contribuíram com a metade dessas transferências embrionárias.

978-85-7241-744

No Brasil

Atualmente, além da IA e da TE, novas técnicas estão sendo aplicadas de forma comercial na pecuária nacional, como a PIV, que no início atuou junto à universidade por meio de um Programa de Melhoramento Genético, aceito pelos criadores de modo gradativo. Hoje, a técnica é aplicada em grande escala e por laboratórios de várias companhias particulares.

No Brasil, vários laboratórios iniciaram as pesquisas com FIV no final da década de 1980. No entanto, foi em 1993 que a equipe da UNESP de Jaboticabal, liderada pelo Prof. Enoch Borges de Oliveira, obteve as primeiras prenhez de embriões bovinos produzidos totalmente *in vitro*^{10,11}. Em 1994, a equipe liderada pelo pesquisador Dr. Roberto de Bem, do Cenargen – Embrapa, obteve duas prenhez de embriões zebuínos¹².

O nascimento de bezerros Nelore PO (pura origem) mediante maturação, fecundação e cultivo *in vitro* foi conseguido pela equipe da USP de Ribeirão Preto em 1996¹³. Nesse mesmo ano, foram realizadas as primeiras prenhez de embriões produzidos *in vitro* e criopreservados pelas técnicas de vitrificação e congelamento clássica¹⁴⁻¹⁶.

Desde então, vários pesquisadores no Brasil e no exterior têm desenvolvido diversos protocolos de produção de embriões *in vitro*, estudando desde sistemas de aspiração folicular em doadoras de variadas idades reprodutivas e diferentes frequências de aspiração até os protocolos de produção *in vitro*¹⁷⁻²⁸.

Hoje, o Brasil conta com os maiores números de embriões produzidos *in vitro* no mundo pelos diversos laboratórios distribuídos em todo o país.

Importância da Biotécnica e Contextualização no Cenário Nacional e América Latina

A técnica de PIV é de suma importância para criadores que participam de programas de melhoramento

Tabela 15.1 – Produção *in vitro* de embriões bovinos nos diferentes laboratórios de aspiração folicular e fecundação *in vitro* da empresa Vitrogen distribuídos em oito estados do país

Laboratórios	Oócitos viáveis	Blastocistos	Blastocistos (%)	Total de TE	TE palpadas	P30	P30 (%)	Machos	Fêmeas	Fêmeas (%)
SP1	512.938	153.177	30	135.230	95.444	34.199	36	4.181	3.547	46
MT	267.538	94.359	35	75.538	66.820	28.393	42	7.977	6.641	45
GO	164.752	51.603	31	42.115	25.366	9.259	37	2.708	2.349	46
MG	198.683	68.428	34	60.543	34.411	12.901	37	4.537	3.730	45
SP2	61.554	18.538	30	15.773	12.720	4.289	34	431	321	43
SP3	33.784	10.141	30	8.675	7.738	2.925	38	695	425	38
MO*	21.507	6.451	30	4.771	3.099	1.208	39	135	138	51
TO	3.485	1.324	38	1.080	598	248	41	78	70	47
Total	1.264.241	404.021	32	343.725	246.196	93.422	38	20.742	17.221	45

* Laboratório móvel (MO): estados do PA, RJ e ES. TE = transferência de embriões.

genético animal. É uma biotecnologia que proporciona, entre outras vantagens, a multiplicação rápida do rebanho e a conseqüente maior intensidade de seleção, diminuindo o intervalo entre gerações em razão da possibilidade de recuperação de oócitos de novilhas pré-púberes, apesar dessa opção não ser explorada em larga escala^{19,29,30}.

Para exemplificar o ganho genético, alguns autores citam que o método de SOV-TE proporciona um ganho entre 1,4 e 2,6% para a eficiência de crescimento em gado de corte; quando comparado à técnica de OPU-FIV em novilhas pré-púberes, o índice pode se elevar para até 22%¹⁹.

Além de contribuir de maneira decisiva para o avanço da biotecnologia reprodutiva, essa técnica vem apresentando crescente aceitação dentro da realidade do rebanho bovino brasileiro, mas possui um futuro ainda mais promissor.

A seguir, apresentaremos a produção comercial do primeiro laboratório de FIV comercial no Brasil (Vitrogen), que iniciou suas atividades em 1999 em diferentes regiões do país.

Na Tabela 15.1 pode-se observar a quantidade de oócitos aspirada em cada laboratório (separados por estado), a taxa de blastocisto produzida após a fecundação com diferentes reprodutores e o número total de embriões transferidos para receptoras sincronizadas em diferentes centrais de receptoras. A taxa de gestação foi avaliada aos 30 dias da transferência e a sexagem fetal aos 60 dias de gestação, em que se pode observar uma menor proporção de fetos do sexo feminino.

Na Tabela 15.2, pode-se visualizar a produção anual da empresa Vitrogen agrupando-se os dados dos diferentes laboratórios, que foram estabelecidos em épocas diferentes no período de janeiro de 2000 a junho de 2007. Observa-se o incremento da utilização da técnica de OPU-FIV no rebanho brasileiro.

Além desse incremento na produção de embriões bovinos em território nacional, a empresa expandiu sua ação em outros países da América do Sul desde o ano de 2003. Iniciou-se primeiramente na Colômbia, seguindo pelo Uruguai e pela Venezuela. Os dados de produção de embriões que seguem o mesmo padrão

Tabela 15.2 – Produção anual de embriões bovinos após aspiração folicular e fecundação *in vitro* nos diferentes laboratórios da empresa Vitrogen

Ano	Oócitos viáveis	Blastocistos	Blastocistos (%)	Total de TE	TE palpadas	P30	P30 (%)
2000	18.246	5.814	32	4.601	4.303	1.205	28
2001	45.575	14.354	31	10.198	9.179	2.927	32
2002	133.134	38.796	29	32.538	29.903	10.961	37
2003	282.634	85.863	30	73.173	49.336	17.578	36
2004	341.737	106.932	31	88.579	65.474	25.238	39
2005	281.415	98.029	35	80.992	64.403	24.883	39
2006	269.169	87.375	32	71.372	48.735	18.059	37
2007	129.621	44.490	34	35.286	19.824	7.862	40
Total	1.501.531	481.653	32	396.739	291.157	108.713	37

TE = transferência de embriões.

Tabela 15.3 – Produção *in vitro* de embriões bovinos obtidos nos diferentes laboratórios da empresa Vitrogen na América do Sul (Colômbia, Venezuela e Uruguai)

Países	Oócitos viáveis	Blastocistos	Blastocistos (%)	Total de TE	TE Palpadas	P30	P30 (%)
Colômbia	147.833	50.639	35	34.265	28.978	8.824	30
Venezuela	6.309	1.888	30	1.257	900	271	30
Uruguai	2.516	867	34	867	611	244	40
Total	156.658	53.394	34	36.389	30.489	9.339	31

TE = transferência de embriões.

978-85-7241-744-0

estabelecido no Brasil, ou seja, com doadoras não estimuladas, estão apresentados na Tabela 15.3.

Implantação da Rotina Comercial

Para que a PIV seja aplicada de maneira padronizada, ou seja, a fim de que a rotina se estabeleça com os menores erros aceitáveis em uma produção comercial, é preciso estar atento a vários pontos importantes.

Primeiramente, podemos relatar a dificuldade em manter padronizado o volume da gota pela quantidade de oócitos (relação oócito/volume da gota), uma vez que a variação individual na recuperação de oócitos das diferentes doadoras é muito grande (média de 20 oócitos/doadora/OPU). Além disso, não podemos esquecer da qualidade dos oócitos, considerando-se viáveis aqueles de uma camada de células do *cumulus* (grau III) até aqueles com mais de três camadas compactas (grau I), que são colocados em uma mesma gota de MIV (Fig. 15.1). Desse modo, tenta-se estabelecer uma quantidade por gota em torno de 20 a 30 oócitos viáveis, como pode ser visualizado na gota após 24h de MIV (Fig. 15.2).

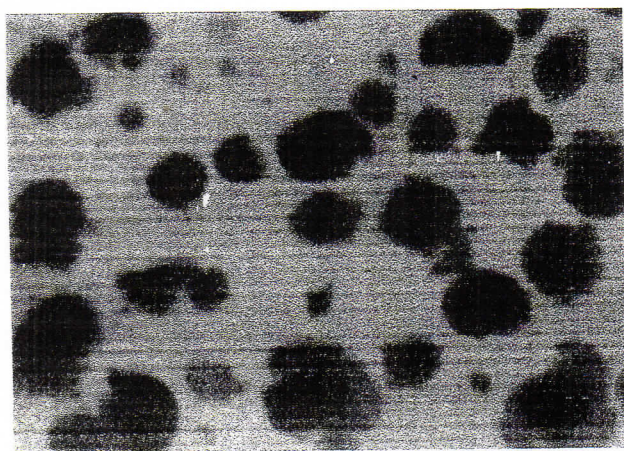


Figura 15.1 – Classificação morfológica de oócitos viáveis aspirados de uma mesma doadora.

Em uma única placa são colocadas até seis gotas, ou seja, até seis doadoras diferentes que podem ser acasaladas com um mesmo touro, ou com touros diferentes. Sendo assim, há necessidade de muita atenção para que não ocorra mistura do sêmen quando adicionado às gotas. É importante ressaltar que a produção de embriões é variável entre os touros, ou até mesmo entre e dentro da mesma partida.

Um dos maiores problemas que a produção comercial de embriões de FIV enfrentou foi a contaminação nas diferentes etapas (MIV-FIV-CIV), que poderia vir do campo durante a aspiração, assim como do sêmen, principalmente daquelas doses congeladas na fazenda, além da manipulação no laboratório. Desse modo, é necessária uma manipulação metódica de gametas e embriões (campo e laboratório), com o treinamento dos técnicos e o aperfeiçoamento nas diferentes etapas de produção.

Com referência ao sêmen, é importante ressaltar que distintos métodos de criopreservação são aplicados, envolvendo modificações nos diluidores utilizados, assim como no armazenamento (péletes, ampolas e palhetas). Há a necessidade de adaptação de cada uma dessas origens de sêmen para a produção comercial de embriões bovinos.

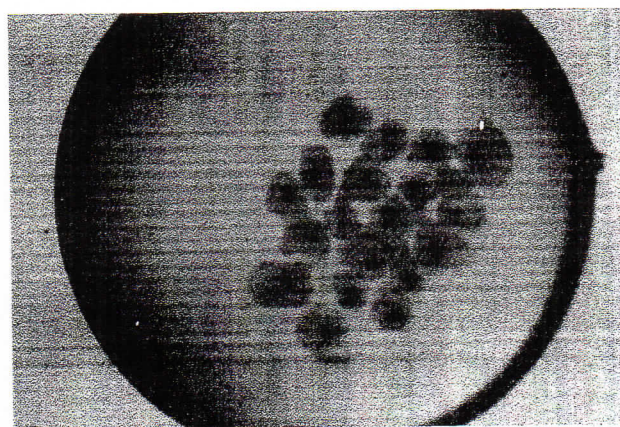


Figura 15.2 – Número médio de oócitos viáveis aspirados de uma mesma doadora distribuído nas gotas de maturação oocitária *in vitro*.

A separação dos espermatozoides viáveis para a FIV é realizada mediante centrifugação no gradiente de Percoll®, resultando na porção móvel de espermatozoide que é usada na FIV (Fig. 15.3). O processo de fecundação marca o início do desenvolvimento embrionário, caracterizado por uma sucessão de divisões celulares (clivagem) até alcançar os estádios de mórulas e blastocistos (Fig. 15.4), quando serão transferidos a fresco para receptoras sincronizadas.

Outro ponto importante é a seleção e o envase dos embriões produzidos, em que se deve prestar atenção para que não ocorra troca de embriões.

Variação nos Resultados

Os resultados obtidos da aplicação dessa técnica apresentam variação muito grande entre animais e, principalmente, na interação entre eles. Variam desde o número de folículos aspirados e oócitos recuperados, a taxa de clivagem e produção de blastocistos, até a taxa de gestação³¹⁻³⁴. A seguir, serão apresentadas algumas variações nos resultados obtidos pelos diversos laboratórios da Vitrogen.

Efeito de Doadoras

A variabilidade entre doadoras de oócitos é muito grande e os animais respondem de modo diferente à aspiração folicular. Na Tabela 15.4 observa-se que diferentes doadoras apresentam resultados variáveis tanto na recuperação de oócitos quanto no desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto e taxa de prenhez.

Constata-se que a média de oócitos viáveis por doadora é de 24, variando de 6 a 50 oócitos por doadora/OPU. A taxa média de blastocistos dessas doadoras foi de 41% (com variação de 21 a 73%), com prenhez de 35% de média e variação de 20 a 46%. Os números médios de embriões produzidos e de prenhez por doadora e sessão de OPU foram dez e três, respectivamente.

Efeito de Touros

A utilização de sêmen congelado de diferentes touros demonstrou que estes possuem importante papel no resultado final do processo de OPU-FIV. Assim sendo, a fertilidade dos touros é variável tanto a campo quanto na PIV³⁵. Na Tabela 15.5 observa-se a variação individual de 20 touros acasalados com diferentes doadoras, tanto na taxa de blastocisto quanto na de prenhez.

A produção média de blastocistos para os diferentes touros foi de 36% (variando de 22 a 44%), ao passo que a taxa de prenhez foi de 34%, com variação de 18 a 42%. Constata-se que a taxa de blastocisto produzida por determinado touro não está relacionada à taxa de prenhez.

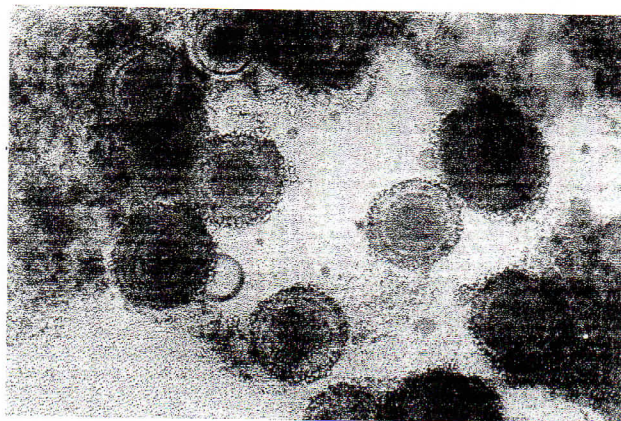


Figura 15.3 – Fecundação *in vitro* de oócitos bovinos maturados por 24h após a aspiração folicular.

Interação entre Doadoras e Touros

Além da variação individual de touros e doadoras, também existe um efeito resultante da interação entre o touro e a doadora, em que uma mesma doadora apresenta variações na produção de embriões e de gestações quando acasalada com diferentes touros (Tabela 15.6). O resultado dessa tabela faz parte de um programa de produção de animais da raça Senepol com o objetivo de multiplicar rapidamente a genética de 54 doadoras importadas no ano de 2001. Para tanto, o projeto Senepol, desenvolvido na Fazenda Nova Vida (RO), foi dividido em duas fases (2001 e 2002) com três meses de trabalho contínuo no laboratório de FIV instalado na fazenda.

Após a colheita dos dados do primeiro ano do projeto, em que se avaliaram os acasalamentos com melhor taxa de prenhez, assim como as melhores doadoras na recuperação de oócitos, estabeleceram-se previamente os acasalamentos da segunda fase do projeto. Como pode ser observado na Figura 15.5, houve um incremento na taxa de recuperação de oócitos e na taxa de prenhez. No gráfico pode-se observar que haveria um incremento de 3,6 vezes a mais de prenhez se todos os embriões produzidos fossem transferidos.

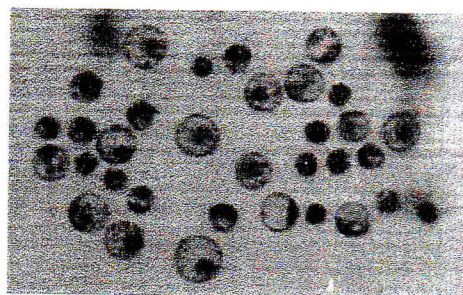


Figura 15.4 – Classificação dos embriões produzidos de uma mesma doadora em diferentes estádios de desenvolvimento.

Tabela 15.4 – Produção *in vitro* de embriões bovinos a partir de oócitos recuperados de diferentes doadoras (D1 a D23), acasaladas com diferentes touros

Doadoras	Touros	OPU	Oócitos viáveis	Blastocistos (%)	Prenhez (%)	Média/OPU		
						Oócitos	Blastocistos	Prenhez
D1	7	15	130	73	45	9	6	1
D2	10	23	1.013	72	48	44	32	10
D3	15	18	313	54	20	17	9	1
D4	8	16	304	54	36	19	10	3
D5	10	15	496	50	43	33	16	5
D6	7	23	390	47	35	17	8	2
D7	13	15	532	46	44	35	16	6
D8	12	18	1.039	44	45	58	25	8
D9	13	62	910	43	28	15	6	1
D10	8	15	693	43	46	46	20	8
D11	10	56	1.669	42	43	30	13	3
D12	13	30	1.220	40	31	41	16	3
D13	12	60	400	39	30	7	3	1
D14	5	16	390	38	38	24	9	2
D15	11	31	189	38	27	6	2	0
D16	10	45	679	33	42	15	5	2
D17	9	26	419	32	42	16	5	1
D18	3	19	260	30	41	14	4	1
D19	7	19	954	29	37	50	14	2
D20	12	53	708	28	36	13	4	1
D21	7	15	212	23	33	14	3	1
D22	5	24	455	22	39	19	4	1
D23	6	69	565	21	25	8	2	0
Total	213	683	13.940	41	35	24	10	3

OPU = aspiração folicular.

978-85-7241-744-0

Tabela 15.5 – Variação individual de touros na produção *in vitro* de embriões bovinos acasalados com diferentes doadoras

Touros	Doadoras	Oócitos viáveis	Blastocistos	Blastocistos (%)	Total de TE	TE palpadas	Total de prenhez	Prenhez (%)
T1	102	3.678	1.613	44	1.192	1.119	436	37
T2	135	4.793	2.017	42	1.178	1.116	404	34
T3	159	4.960	1.874	38	1.255	1.172	495	42
T4	173	6.565	2.414	37	1.690	1.690	501	30
T5	1.851	79.453	28.901	36	24.052	19.140	6.716	35
T6	418	20.431	7.420	36	6.975	4.929	1.823	37
T7	116	3.609	1.303	36	915	904	226	25
T8	1.263	49.529	17.776	36	14.913	12.849	3.968	31
T9	773	26.566	9.525	36	8.687	6.061	2.284	38
T10	146	5.107	1.813	36	1.063	942	390	37
T11	186	9.336	3.257	35	2.525	2.525	457	18
T12	789	31.442	10.951	35	8.459	6.737	2.442	36
T13	2.016	80.032	26.811	34	22.839	16.004	5.182	32
T14	279	9.936	3.247	33	3.209	2.158	825	38
T15	706	26.530	8.061	30	6.778	4.913	1.869	38
T16	694	28.357	8.586	30	6.830	5.429	2.052	38
T17	170	3.338	977	29	609	609	140	23
T18	811	35.685	10.101	28	9.118	6.164	2.405	39
T19	171	5.559	1.556	28	1.177	805	312	39
T20	330	11.036	2.427	22	2.128	1.436	466	32
Total	11.288	445.942	150.630	34	125.592	96.702	33.393	35

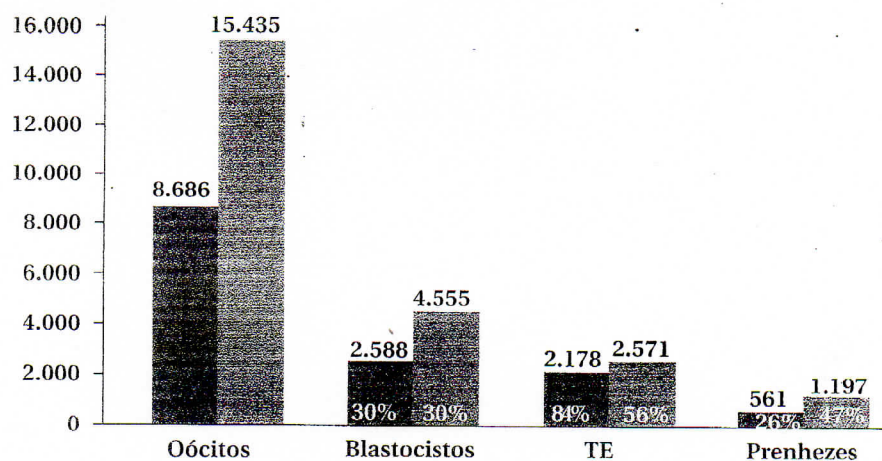


Figura 15.5 – Comparação na taxa de recuperação de oócitos, blastocistos e prenhez em períodos diferentes (fases 1 e 2) após aplicação do estudo do melhor acasalamento. TE = transferência de embriões.

A produção média de blastocistos para as diferentes raças trabalhadas foi de 32% no sétimo dia de cultivo com uma variação de 23 a 38%.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As informações apresentadas neste capítulo, principalmente os resultados obtidos desde o início da aplicação comercial da OPU-FIV no Brasil e na América Latina, mostram o quanto essa técnica tem crescido no Brasil, não somente em número, mas na qualidade dos serviços e no aperfeiçoamento da técnica, o que se verifica pela taxa de gestação nos últimos anos.

Tabela 15.7 – Produção de embriões por meio de aspiração folicular e fecundação *in vitro* nas diferentes raças

Raça	Oócitos	Blastocistos	Blastocistos (%)
Angus	2.149	513	24
Bonsmara	787	187	24
Brahman	143.678	51.235	36
Brangus	963	215	22
Charolês	84	29	35
Gir	28.619	9.336	33
Girolando	40	15	38
Guzerá	19.443	6.098	31
Hereford	777	269	35
Holandês	2.972	797	27
Jersey	506	105	21
Nelore	568.896	177.465	31
Nelore Mocho	2.489	935	38
Pardo Suíço	925	209	23
Senepol	28.706	7.991	28
Simental	787	176	22
Tabapuã	219	54	25
Total	802.345	255.700	32

É necessário lembrar que todos os setores envolvidos na aplicação comercial da técnica têm colaborado muito com esses resultados, desde o manejo na fazenda e a padronização da PIV nos laboratórios até as estruturas nas centrais de doadoras e receptoras. Além disso, é importante salientar que sem a parceria com os diferentes setores de pesquisa das universidades e dos órgãos governamentais, não se consegue trabalhar com bons resultados em um curto período de tempo e com menor custo. É um modelo de transferência de biotecnologia entre a pesquisa e o campo aplicado em vários países.

A cada nova biotecnologia que surge para a pecuária, seja de corte ou de leite, novos investimentos e aperfeiçoamento técnico são necessários para disponibilizar ao mercado a escolha de aplicação dessas técnicas, de forma individual ou coletiva, ao pecuarista de elite ou de gado comercial, como nos casos de utilização do sêmen sexado, sexagem de embriões e sua criopreservação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONARVICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M. A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol. Reprod.*, v. 27, p. 147-158, 1982.
- AUSTIN, C. R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Austr. J. Sci. Res.*, v. 134, p. 581, 1951.
- CHANG, M. C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the Fallopian tubes. *Nature*, v. 168, p. 697-698, 1951.
- CHANG, M.C. *In vitro* fertilization of mammalian eggs. *J. Reprod. Fert.*, v. 27, p. 15-22, 1968.
- IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *J. Reprod. Fert.*, v. 50, p. 119-121, 1977.
- LAMBERT, R. D.; BERNARD, C.; RIOUX, J. E.; EELAND, R.; D'AMOURS, D.; MONTREUIL, A. Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology*, v. 20, p. 149-161, 1983.

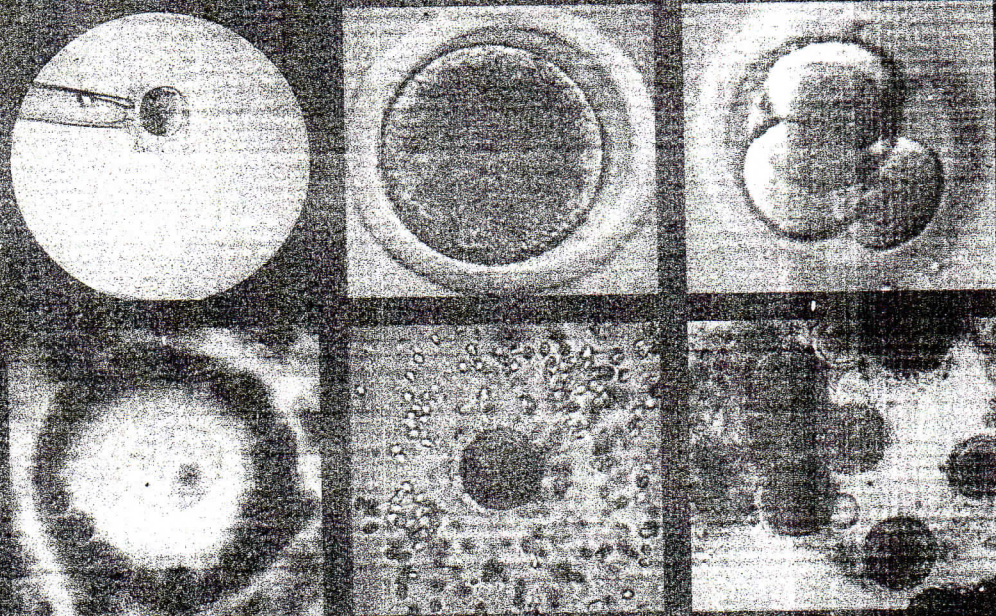
7. HANADA, A.; ENYA, Y.; SUZUKI, T. Birth of calves by non-surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes matured *in vitro*. *Jap. J. Anim. Reprod.*, v. 32, p. 208, 1986.
8. LU, K. H.; GORDON, I.; GALLAGHER, M.; MCGOVERN, H. Pregnancy established by transfer derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Vet. Rec.*, v. 121, p. 259-260, 1987.
9. PIETERSE, M. C.; KAPPEN, K. A.; KRUIP, A. M.; TAVERNE, M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning ovaries. *Theriogenology*, v. 30, p. 751-756, 1988.
10. WATANABE, Y. F. *Desenvolvimento In Vitro de Embriões Bovinos após Maturação e Fecundação In Vitro com Sêmen de Bos taurus e Bos indicus*. Jaboticabal, 1994, 131p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.
11. WATANABE, Y. F.; OLIVEIRA FILHO, E. B.; QUETGLAS, M. D.; GARCIA, J. M.; NOGUEIRA, M. F. G.; SILVA FILHO, I. R.; VANTINI, R. Desenvolvimento de gestação em bovinos com embriões produzidos em programa de fecundação *in vitro*. *ARS Veterinária*, v. 2, p. 191, 1993.
12. PEIXER, M. A.; SOUZA, R. V.; RUMPF, R.; DE BEM, A. R.; NETO, M. A. P. Nascimento dos primeiros produtos de FIV da raça Nelore no Cenargen. *Zootecnia*, v. 32, p. 49, 1994.
13. AZAMBUJA, R. M.; WATANABE, Y. F.; PERIPATO, A. C.; WATANABE, M. R.; VILA, R. A.; MENDES, F. C.; LÔBO, R. B. Primeiras prenhez no Brasil em Nelore registrado. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 24, p. 264, 1996.
14. WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F.; PERIPATO, A. C.; VILA, R. A.; FIRMINO, F.; NOGUEIRA, M. F. G.; PUPIM, F. P. V.; LÔBO, R. B. Taxa de prenhez de embriões bovinos produzidos *in vitro* após vitrificação. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 24, p. 264, 1996.
15. WATANABE, M. R. *Criopreservação de Embriões Bovinos Produzidos In Vitro*. Ribeirão Preto, 1996. 91p. Monografia – Universidade de São Paulo.
16. PEIXER, M. A. S.; RUMPF, R.; CAMARA, J. U. Obtenção de gestação a partir de embriões FIV de bovinos congelados com etileno glicol. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 24, p. 260, 1996.
17. BOLLS, P. E. J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. T.; VANDENHEEDE, J. M. M.; KRUIP, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocytes complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 45, p. 1001-1014, 1996.
18. DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; LÔBO, R. B.; FRANCESCINI, P. H.; WATANABE, Y. F. A influência da condição ovariana na aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões em raças zebuínas. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 27, n. 1, p. 226, 1999.
19. BROGLIATTI, G. M.; ADAMS, G. P. Ultrasound guided transvaginal oocytes collection in prepuberal calves. *Theriogenology*, v. 45, p. 1163, 1996.
20. GIBBONS, J. R.; BEAL, W. E.; KRISHER, R. L.; FABER, E. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of once versus twice weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocytes recovery and embryo development. *Theriogenology*, v. 42, p. 405, 1994.
21. WATANABE, M. R.; LÔBO, R. B.; FRANCESCINI, P. H.; DAYAN, A.; VILA, R. A.; GALERANI, M. A. V.; WATANABE, Y. F. Produção *in vitro* de embriões por sessão de aspiração em fêmeas nelore. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 26, n. 1, p. 382-383, 1998.
22. FERRAZ, M. L.; DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F. Influência da frequência de OPU-FIV em bovinos. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 28, n. 1, p. 251, 2000.
23. KRUIP, A. M.; BONI, R.; WURTH, Y. A.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, v. 42, p. 675-684, 1994.
24. PEIXER, M. A. S.; RUMPF, R.; DE BEM, A. R.; QUEIROZ, L. M. V. Produção de embriões e gestações a partir de ovócitos recuperados por ultra-sonografia em fêmeas bovinas superovuladas. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 24, p. 231, 1996.
25. LOONEY, C. R.; DAMIANI, P.; LINDSEY, B. R.; LONG, C. R.; GONSETH, C. L.; JOHNSON, D. L.; DUBY, R. T. Use of prepuberal heifers as oocytes donors for IVF: Effect of age and gonadotrophin treatment. *Theriogenology*, v. 43, p. 269, 1995.
26. WATANABE, Y. F.; WATANABE, M. R.; VILA, R. A.; GALERANI, M. A. V.; SILVA, A. R. R.; LÔBO, R. B. Efeito do meio de cultivo frente a diferentes tipos celulares sobre o desenvolvimento de embriões bovinos. *Ciência Animal*, v. 7, n. 2, p. 126, 1997.
27. HASLER, J. F. Commercial production of *in vitro*-derived bovine embryos. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 24, p. 117-134, 1996.
28. DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 28, n. 1, p. 181-185, 2000.
29. GORDON, I. Potential application of cattle *in vitro* fertilization in commercial practice and research. *Embryo Transfer Newsletter*, v. 9, p. 4-17, 1991.
30. GORDON, I.; LU, H. K. Production of embryos *in vitro* and its impact on livestock production. *Theriogenology*, v. 33, p. 77-87, 1990.
31. WATANABE, Y. F.; DAYAN, A.; MEIRELLES, F. V.; WATANABE, M. R. Pre and post implantation development of IVP bovine embryos. *Theriogenology*, v. 55, p. 441, 2001.
32. DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; FERRAZ, M. L.; MEIRELLES, F. V.; WATANABE, Y. F. Influence of the embryo stage, development kinetics and recipient synchronization on pregnancy rates of OPU-IVF embryos. *Theriogenology*, v. 57, p. 492, 2002.
33. ACCORSI, M. F.; GONÇALVES, D. D.; FERRAZ, M. L.; WATANABE, M. R.; MEIRELLES, F. D. P.; MEIRELLES, F. V.; WATANABE, Y. F. Variação de touros na produção *in vitro* e a interação com diferentes doadoras. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 33, n. 1, p. 364, 2005.
34. STRANIERI, P.; ACCORSI, M. F.; BISHOP, W. L.; SANTOS, R. G.; WATANABE, M. R.; MEIRELLES, F. D. P.; MEIRELLES, F. V.; WATANABE, Y. F. Avaliação da relação macho:fêmea na produção *in vitro* de embriões bovinos. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v. 33, n. 1, p. 418, 2005.
35. WATANABE, Y. F. *A fecundação In Vitro e Reação Acrossomal como Critério de Seleção para Fertilidade em Touros Jovens da Raça Nelore*. Ribeirão Preto, 1998, 67p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
36. DAYAN, A. *Fatores que Interferem na Produção de Embriões Bovinos Mediante Aspiração Folicular e Fecundação In Vitro*. Botucatu, 2001, 56p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.
37. DE ARMAS, R.; SOLANO, R.; PUPO, C. A.; AGUILAR, A.; AGUIRRE, A.; RIEGO, E.; CASTRO, F. O. Effect of the donor oocytes breed on *in vitro* fertilization results in cattle. *Theriogenology*, v. 41, p. 186, 1994.
38. LOONEY, C. R.; LINDSEY, B. R.; GONSETH, C. L.; JOHNSON, D. L. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, v. 41, p. 73, 1994.
39. DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; MEIRELLES, F. V.; LÔBO, R. B.; WATANABE, Y. F. Bos indicus and Bos taurus *in vitro* produced embryos develop similarly in tropical conditions. *Theriogenology*, v. 53, p. 348, 2000.

Paulo Bayard Dias Gonçalves
José Ricardo de Figueiredo
Vicente José de Figueirêdo Freitas

BIOTÉCNICAS

Aplicadas à Reprodução Animal

Segunda Edição



ROCA

Copyright © 2008 da 1ª Edição pela Editora Roca Ltda.
ISBN: 978-85-7241-744-0

Nenhuma parte desta publicação poderá ser reproduzida, guardada pelo sistema "retrieval" ou transmitida de qualquer modo ou por qualquer outro meio, seja este eletrônico, mecânico, de fotocópia, de gravação, ou outros, sem prévia autorização escrita da Editora.

CIP-BRASIL. CATALOGAÇÃO-NA-FONTE
SINDICATO NACIONAL DOS EDITORES DE LIVROS, RJ.

G628b
2.ed.

Gonçalves, Paulo Bayard Dias
Biotécnicas aplicadas à reprodução animal
/ Paulo Bayard Dias Gonçalves; José Ricardo de Figueiredo;
Vicente José de Figueirêdo Freitas - 2. ed. - São Paulo :
Roca, 2008.

Inclui bibliografia
ISBN 978-85-7241-744-0

1. Biotecnologia. 2. Reprodução animal. 3. Fisiologia reprodutiva.
4. Inseminação artificial. I. Título.

07-4702.

CDD: 636.089
CDU: 619

2008

Todos os direitos para a língua portuguesa são reservados pela

EDITORA ROCA LTDA.
Rua Dr. Cesário Mota Jr., 73
CEP 01221-020 - São Paulo - SP
Tel.: (11) 3331-4478 - Fax: (11) 3331-8653
E-mail: vendas@editoraroca.com.br - www.editoraroca.com.br

Impresso no Brasil
Printed in Brazil