

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ALEXANDRE DE OLIVEIRA BEZERRA

USO DA PIVE COM SÊMEN SEXADO PARA PRODUÇÃO DE
BEZERROS DE CORTE SUPERIORES

CAMPO GRANDE - MS

2016

ALEXANDRE DE OLIVEIRA BEZERRA

**USO DA PIVE COM SÊMEN SEXADO PARA PRODUÇÃO DE
BEZERROS DE CORTE SUPERIORES**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
como requisito parcial para obtenção do
título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Ériklis Nogueira

CAMPO GRANDE - MS

2016

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: BEZERRA, Alexandre de Oliveira

Título: Uso da PIVE com sêmen sexado para produção de bezerros de corte superiores

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Reprodução Animal, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMEZ – UFMS), como requisito para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Data: __/__/__

Banca examinadora:

Orientador: _____

Dr. Ériklis Nogueira

Embrapa Pantanal

Membro: _____

Fabiana de Andrade Melo Sterza

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - UEMS

Membro: _____

Alessandra Corallo Nicacio

Embrapa Gado de Corte - CNPGC

89

90

91

92

93

94

95

96

97

98

99

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

***“Se eu vi mais longe, foi porque estava
sobre ombros de gigantes.”***

117

118

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS:

Agradeço primeiramente ao meu Deus, autor da vida, que me deu a capacidade de sonhar. Ou melhor, que sonhou esses sonhos para mim. O Deus que me escolheu quando ainda estava no ventre da minha mãe. “O coração do homem pode fazer planos, mas a resposta certa dos lábios vem do Senhor. Provérbios 16.1”.

Agradeço aos meus pais, Gênesis e Jozabete, por serem meu porto seguro, por confiarem em mim (mesmo quando nem eu confiava), por investirem seu tempo e amor em minha vida, serei eternamente grato pelo exemplo e dedicação de vocês como pais.

Aos minha irmã e cunhado, Quézia e Rodrigo, também pelos bons momentos compartilhados, pelo companheirismo, boas conversas, pela paciência (e a falta dela também).

À minha maravilhosa e virtuosa esposa, Fernanda Rosa Alves Bezerra. Amor da minha vida, minha inspiração para sonhar e buscar crescer como pessoa e marido. Amo você minha gata, obrigado pelo incentivo, confiança, paciência, compreensão, por acreditar nos meus sonhos mais loucos!! Você é minha mulher única.

Não poderia deixar de agradecer a todos os meus amigos. Mas agora dedico essas palavras com lágrimas nos olhos, mas com muita alegria no coração, por ter tido ao meu lado um grande amigo (daqueles difíceis de achar). Ao meu grande amigo Pedro (Pedrão), sou grato pelos momentos compartilhados de boas risadas e conversas (ele era o cara!). Hoje só resta a saudade e a certeza de que em breve nos veremos novamente meu irmão!

Aos vários amigos da faculdade, dos projetos de pesquisa, das madrugadas de coletas, dos momentos no laboratório (Allan Rocha, Igor, Romeri) e também aos meus professores (em especial Dirlei Molinari, Louis, Graziela Barioni, Isabela), foram fundamentais na minha trajetória, se cheguei até aqui foi por que tive ao meu lado pessoas maravilhosas e ótimos profissionais.

À primeira turma de residência da UFMS (2013), aprendemos juntos a superar desafios. Foram bons momentos juntos...

Aos professores Valdemir, Fernando e Larissa, pelas orientações e exemplos de profissionalismo. Pelas oportunidades de crescer profissionalmente e como pessoa, aprendendo a superar as dificuldades e fazer o que deve ser feito com o que temos em mãos. Obrigado por todo o tempo dedicado e o conhecimento compartilhado. Gostaria ainda de agradecer ao Dr. Érikliis Nogueira. Grande exemplo e, posso dizer amigo. Se existe alguém que tem o dom de juntar pessoas e se relacionar bem, esse alguém é ele. Nesse último ano tive o privilégio de conviver com ele, e de aprender não apenas sobre veterinária, mas sobre a vida. Como ele mesmo disse: “eu não quero só ser um orientador de pesquisa, quero que vocês estejam bem no futuro”. Obrigado por se preocupar com cada um dos seus orientados. E por falar neles... apesar do pouco tempo de convívio com a maioria (ainda), já posso perceber grande companheirismo e amizade (Karine, Natalia, Witis, Cristopher, Jean). Agradeço pelos trabalhos, pelos momentos compartilhados e pelas contribuições para esse trabalho. A fazenda Primavera, que propiciou as condições para realização desse trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1. Produção de embriões <i>in vitro</i>	15
3.2. Criopreservação de embriões PIV.....	17
3.2.1. Métodos de criopreservação.....	18
3.3. Uso de sêmen sexado na fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	20
3.4. Cruzamentos.....	22
4. Referências Bibliográficas.....	23
CAPÍTULO 1.....	31
Resumo.....	31
Introdução.....	32
Materiais e Métodos.....	34
Resultados.....	40
Discussão.....	41
Conclusões.....	47
Referências.....	48
CAPÍTULO 2.....	56
Resumo.....	56
Introdução.....	58
Materiais e Métodos.....	60
Resultados.....	65

Discussão.....	66
Conclusões.....	71
Referências.....	72

168

169

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

- Tabela 1. Taxa de clivagem, blastocisto e prenhez para embriões PIV com sêmen sexado de acordo com a origem do oócito, se através de aspiração *in vivo* (vivo) ou de ovário de abatedouro (abate)..... 52
- Tabela 2. Taxa de prenhez para embriões PIV com sêmen sexado de acordo com o tratamento antes da inovulação, se a fresco ou após vitrificação/descongelamento..... 52

Capítulo 2

- Tabela 1. Cálculo da estimativa do custo-benefício do uso da IATF ou TETF/PIV em 1000 vacas de corte em regime de campo..... 75



Gado de Corte

Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Gado de Corte

CERTIFICADO

Protocolo Nº: 002/2015
Responsável: Ériklis Nogueira/ Alessandra Corallo Nicacio
Título do Projeto: Inovações para a cria no Pantanal e no Cerrado, visando à produção de novilho precoce
Vigência do Projeto: 01/02/2015 a 31/12/2018
Espécie/Linhagem: <i>Bos taurus</i>
Nº de Animais: 811 machos e 8640 fêmeas
Peso/Idade: > 300 Kg / > 12 meses - > 70 Kg / 3 meses
Sexo: machos e fêmeas
Origem: Rebanho bovino da Embrapa Gado de Corte

Certificamos que o processo acima referido – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA EMBRAPA GADO DE CORTE, em reunião de 16 de março de 2016.

Vanessa Felipe de Souza
Coordenadora da CEUA Embrapa Gado de Corte

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Corte
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
Avenida Rádio Maia, 830, Zona Rural – 79106-550 Campo Grande MS
Telefone (67) 3368 2000 Fax (67) 3368 2150
www.cnpqc.embrapa.br

Resumo

BEZERRA, A.O. Uso da PIVE com sêmen sexado para produção de bezerros de corte superiores. 2016. 76p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

Objetivou-se com esse trabalho avaliar a produção de embriões PIV com utilização de sêmen sexado e comparar as taxas de prenhez desses embriões transferidos frescos ou após vitrificação (Experimento 1). Avaliou-se também a viabilidade econômica da TETF em relação à IATF (Experimento 2), para produção de bezerros de corte cruzados de qualidade superior. No experimento 1, foram utilizadas receptoras Nelore, pluríparas, inovuladas em tempo fixo (TETF) com embriões PIV frescos ou vitrificados, obtidos de oócitos de doadoras Nelore provenientes de abatedouro (ABATE, n=66 embriões) ou OPU (VIVO, n=299 embriões) e fertilizados *in vitro* com sêmen sexado para macho. O diagnóstico de gestação foi realizado 60 dias após inovulação e os dados foram analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS ($P<0,05$). As taxas de clivagem foram de $63,96\% \pm 35,52$ e $39,18\% \pm 12,17$ para os grupos VIVO e ABATE, respectivamente, diferindo entre si ($P=0,021$). As taxas de blastocisto foram de $30,49\% \pm 32,34$ e $14,73\% \pm 11,09$ para os grupos VIVO e ABATE, respectivamente, e não foram diferentes ($P=0,0892$). Não houve diferença na taxa de prenhez ($P=0,72$) para os embriões FRESCOS (34,27%) ou VITRIFICADOS (30,38%), assim como para a origem dos oócitos (VIVO=35,12%; ABATE=25,76%; $P=0,17$). Já no experimento 2, foram aplicadas duas biotécnicas, PIV/TETF e IATF, em fazendas comerciais, e avaliando a sua relação benefício-custo. Para a PIV dos embriões, os oócitos foram coletados de doadoras Nelore através de OPU e fertilizados *in vitro* com sêmen sexado para macho. Já para o grupo IATF, utilizou-se sêmen convencional dos mesmos touros usados no grupo PIV/TETF. O diagnóstico de gestação foi realizado 60 dias após inovulação ou inseminação, e os custos foram estimados utilizando planilha CEPEA (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada–Esalq/USP) e os dados analisados pelo PROC GLIMMIX do SAS ($P<0,05$). Para PIV foram recuperados por OPU $16,67 \pm 12,11$ oócitos, com taxa de clivagem e de blastocisto de $63,96\% \pm 35,52$ e $30,49\% \pm 32,34$, respectivamente. A taxa de prenhez foi 35,42% e 47,70% para TETF e IATF, respectivamente, com maior proporção de machos na PIV/TETF. Conclui-se que a utilização de sêmen sexado associado à vitrificação é viável para otimizar a tecnologia de PIV. Em comparação à IATF, o sistema PIV/TETF apresentou maior custo (R\$ 615,89 vs. 557,81), porém maior lucratividade.

Palavras-chave: Embrião produzido *in vitro*, lucratividade, reprodução assistida, vitrificação.

Abstract

BEZERRA, A.O. Use of PIVE with sexed semen for production of beef calves superior. 2016. 76p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

The objective of this study was to evaluate the production of IVP embryos and comparing the pregnancy rates of these embryos transferred fresh or after vitrification (Experiment 1). The economic viability of FTET was also evaluated in relation to TAI (Experiment 2). In the experiment 1, Nelore, pluriparous, inovulated at fixed time (FTET) with fresh or vitrified IVP embryos, from Nellore donor oocytes from slaughterhouse (SLAUGHTER, n = 66 embryos) or OPU (LIFE, n = 299 Embryos) and fertilized *in vitro* with male sexed semen. The diagnosis of gestation was performed 60 days after inovulated and the data were analyzed by PROC GLIMMIX of SAS ($P < 0.05$). The cleavage rates were $63.96\% \pm 35.52$ and 39.18 ± 12.17 for the LIFE and SLAUGHTER groups, respectively, and were different ($P = 0.021$). The blastocyst rates were $30.49\% \pm 32.34$ and $14.73\% \pm 11.09$ for the LIFE and SLAUGHTER groups, respectively, and were not different ($P = 0.0892$). There was no difference in the pregnancy rate ($P = 0.72$) for the FRESH (34.27%) or VITRIFIED (30.38%) embryos, as well as for the oocyte origin (LIFE = 35.12%; SLAUGHTER = 25.76%, $P = 0.17$). In experiment 2, two biotechniques, IVP / FTET and TAI, were applied to commercial farms, estimating their cost-benefit. For the IVP of the embryos, the oocytes were collected from Nellore cows (OPU) and fertilized *in vitro* with male sexed semen. For the IATF group, conventional semen from the same bulls used in the IVP / FTET group was used. The diagnosis of gestation was performed 60 days after inovulation or insemination, and the costs were estimated using CEPEA (Center for Advanced Studies in Applied Economics-Esalq / USP) and the data analyzed by PROC GLIMMIX of SAS ($P < 0.05$). For IVP, 16.67 ± 12.11 oocytes were recovered by OPU, with a cleavage rate and blastocyst rate of $63.96\% \pm 35.52$ and $30.49\% \pm 32.34$, respectively. The pregnancy rate was 35.42% and 47.70% for FTET and TAI, respectively, with a higher proportion of males in the IVP / FTET. It is concluded that the use of sexed semen associated with vitrification is viable to optimize IVP technology. In comparison to TAI, the IVP / FTET system presented higher costs (R \$ 615.89 vs. 557.81), but higher profitability.

Keywords: Embryo produced in vitro, profitability, assisted reproduction, vitrification.

1. INTRODUÇÃO

As tecnologias de reprodução assistida (TRA's) para bovinocultura de corte têm como objetivo melhorar a eficiência reprodutiva e produtiva do rebanho (TORRES-JÚNIOR et al., 2009), eficiência esta demonstrada em estudos, com vantagens obtidas, por exemplo, com a implantação da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em relação a monta natural. A implantação das TRA's permite aumentar a qualidade e quantidade de bezerros genética e fenotipicamente superiores (TORRES-JÚNIOR et al., 2009).

Outro exemplo de TRA's é a produção *in vitro* de embriões (PIVE), que apresentou significativo avanço entre as décadas de 1980 e 1990 (LIMA et al., 2014). Mas somente a partir do ano 2000 a PIVE de embriões foi introduzida no Brasil em escala comercial, apresentando rápida expansão. Inicialmente supriu um mercado restrito de melhoramento genético para rebanhos de elite, principalmente de corte (VIANA, 2015), e logo a indústria de embriões encontrou no Brasil condições propícias para sua expansão, tornando o Brasil o maior produtor de embriões produzidos *in vitro* (PIV) do mundo em apenas cinco anos (LIMA et al., 2014), o que tem sido relacionado a vários fatores, dentre eles: o elevado potencial das raças zebuínas (*Bos indicus*) como doadoras de oócitos, consideravelmente superiores as raças européias (*Bos taurus*) (PONTES et al., 2011); os protocolos de tratamento e de superovulação hormonais não são necessários, reduzindo a mão de obra e o intervalo entre gerações; utilização de fêmeas pré-puberes, no terço final de gestação ou aquelas que não respondem a protocolos de superovulação; e a grande disponibilidade de fêmeas receptoras (VIANA et al., 2012; RODRIGUES, 2014).

A partir de 2006 houve uma estabilização da produção total de embriões. Apesar de haver um crescimento do uso da técnica em rebanhos de raças leiteiras, houve uma diminuição na utilização nas raças de corte, que até então representavam 90% do total de embriões PIV produzidos (VIANA, 2015). Com essa nova perspectiva de mercado para PIVE, houve uma mudança de foco, que inicialmente supria a demanda de animais puros

e de alto valor, para produzir cruzamentos para o setor produtivo com menor valor agregado. Essa mudança gerada foi impulsionada pela disponibilidade de sêmen sexado e uso de cruzamentos para formação de rebanhos melhorados e adaptados (RODRIGUES, 2014; VIANA, 2015).

O uso de uma biotecnologia depende principalmente de fatores econômicos e de mercado, assim, a probabilidade de um empreendimento ser rentável passa a depender da criação de diferenciais, como maior eficiência do processo, novos modelos de negócios, inovação tecnológica, ou abertura de novos mercados (LIMA et al., 2014; VIANA, 2015). Nesse contexto, além da eficiência produtiva, a relação benefício-custo ainda pode ser um entrave na difusão da PIVE. O uso mais eficiente e otimizado das receptoras pode representar o ponto chave para reduzir o custo total do processo, através da sincronização para inovulação em tempo fixo (TETF – transferência de embrião em tempo fixo) e criopreservação dos embriões excedentes (BELTRAME et al., 2007; 2010). Uma estatística que merece ser observada é a diferença entre os embriões produzidos e os efetivamente transferidos, que em 2013 foi próximo de 23% (PERRY, 2014), ou seja, essa diferença indica um alto índice de descarte de embriões viáveis (VIANA, 2015). Além disso, uma proporção ideal entre doadora/receptora pode determinar a eficiência econômica do processo (BELTRAME et al., 2010). Segundo Beltrame et al. (2007), a criopreservação do embrião também é importante para reduzir o custo e o risco em programas de transferência de embriões, já que a grande variabilidade na produção, dificulta na decisão a cerca do número de receptoras destinadas a sincronização. Com intuito de otimizar a utilização das receptoras, existe grande impulso para desenvolver e padronizar um método eficiente de criopreservação de embriões *B. indicus* (PONTES et al., 2009).

Apesar disso, até o ano de 2013 não houve avanço significativo no percentual de embriões criopreservados no Brasil (3 a 7%) (BLONDIN, 2015; VIANA, 2015), podendo ser reflexo dos resultados ainda inconsistentes das pesquisas relacionadas à criopreservação, permanecendo um desafio a ser superado (SUDANO et al., 2013).

A eficiência da PIVE irá depender do custo para produzir um bezerro vivo, e segundo Pontes et al. (2009) o custo de cada embrião produzido pela OPU/PIVE foi aproximadamente 1,5 vezes maior comparado ao método de superovulação, excluindo o custo do sêmen. Entretanto, alguns aspectos devem ser considerados, pois os embriões PIV têm sido preferencialmente produzidos utilizando sêmen de maior valor, pois nessa situação uma única dose pode ser usada para fertilizar todos os oócitos coletados a partir de mais de 10 vacas. Além disso, o método OPU/PIVE não requer qualquer tratamento hormonal ou estimulação folicular para as doadoras. E, finalmente, o método OPU/PIVE pode resultar em mais gestações por um período de tempo, devido ao menor intervalo entre as coletas (PONTES et al., 2009; BELTRAME et al., 2010).

Wilson et al. (2005) observaram taxas de concepção menores para embriões PIV com sêmen sexado em comparação ao grupo inseminado com sêmen não sexado, porém a PIVE com sêmen sexado parece promissora (WILSON et al., 2006), pelo aumento do número de animais nascidos do sexo de interesse (RUMPF, 2007). Entretanto, vale a pena ressaltar que um manejo adequado na propriedade é fundamental para garantir bons índices reprodutivos, tendo em vista os efeitos do meio ambiente e da nutrição sobre a produtividade (TORRES-JÚNIOR et al., 2009).

Melhorias nos sistemas de PIVE (HERRICK et al., 2016) e criopreservação (ALMIÑANA e CUELLO, 2015) permitiram a expansão dessa tecnologia, para rápida multiplicação de animais de genética superior (NOGUEIRA et al., 2013).

2. OBJETIVOS

- Comparar as taxas de prenhez com uso de embriões PIV provenientes de oócitos aspirados *in vivo* (OPU) ou de ovários de abatedouro, fertilizados com sêmen sexado;
- Comparar as taxas de prenhez de embriões PIV transferidos frescos ou após vitrificação;

- Comparar a viabilidade econômica do uso da PIV de embriões para transferência em tempo fixo (TETF) com inseminação artificial em tempo fixo (IATF).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção de embriões *in vitro*

A PIVE passa pelas etapas de coleta, maturação (MIV) e fecundação (FIV) *in vitro* do oócito, e cultivo (CIV) *in vitro* do zigoto/ embrião (GONÇALVES et al., 2008; LIMA et al., 2014).

A MIV do oócito é fator chave na obtenção de um embrião de qualidade, afetando a FIV e todo o desenvolvimento subsequente do embrião (CAVUSOGLU et al., 2015). Para o desenvolvimento de sistemas de cultivo que propiciem aumento na produção de embriões de boa qualidade é necessário compreender os mecanismos envolvidos na maturação dos oócitos (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). Esse processo envolve complexas alterações nucleares, citoplasmáticas e moleculares, o que tem dificultado a obtenção de melhores índices de produção de embriões (cerca de 30 – 40% dos oócitos se tornam blastocisto) (VARAGO et al., 2008; GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

Para a MIV dois tipos de meios podem ser utilizados: meios contendo sais fisiológicos básicos com sistemas tampão de bicarbonato, ou meios complexos definidos com adição de aminoácidos, purina e vitaminas. Sendo que o meio de maturação complexo mais utilizado é o meio de cultivo tecidual 199 (TCM-199) (GOTTARDI e MINGOTI, 2009; CAVUSOGLU et al., 2015). A suplementação com soro fetal bovino (SFB) ou albumina sérica bovina (BSA) no meio de maturação são as fontes proteicas mais utilizadas e podem melhorar o processo de MIV do oócito, porém também podem apresentar efeitos negativos sobre o desenvolvimento embrionário inicial pela diminuição da taxa de clivagem e da criotolerância do embrião, devido

ao acúmulo excessivo de gotas lipídicas no citoplasma (ACCORSI et al., 2015). Além disso, os meios contendo SFB ou BSA podem ser veículo de agentes infecciosos e tóxicos para o embrião (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

Ainda outros fatores podem influenciar na viabilidade do oócito para PIV, como por exemplo, observado por Satrapa et al. (2011), um efeito deletério no desenvolvimento embrionário dependente do tempo que o oócito permanece no folículo ovariano após a morte do animal, no caso da aquisição de ovários de abatedouro, e a temperatura que o ovário é armazenado até o momento da aspiração. Maior produção de blastocisto pode ser obtida com intervalo de quatro horas após a morte do animal (BLODIN et al., 1997; SARTRAPA et al., 2011). O status fisiológico da doadora, fase do ciclo estral, presença de corpo lúteo, estágio de desenvolvimento do folículo, são outros exemplos das variáveis que podem interferir no desenvolvimento da maturação oocitária (GOTTARDI e MINGOTI, 2009), fato que reforça a complexidade dos eventos e processos que antecedem o desenvolvimento embrionário.

A maturação do oócito pode ser confirmada morfollogicamente se houver expansão das células do *cumulus* e se no espaço perivitelino contiver um corpúsculo polar (CAVUSOGLU et al., 2015).

Uma vez concluída a MIV o oócito deve ser fecundado por um espermatozoide capacitado para que ocorra a sua ativação e início do desenvolvimento embrionário, processo conhecido como fertilização *in vitro* (FIV) (VARAGO et al., 2008; PARRISH, 2014). A capacitação espermática envolve a remoção de fatores decapacitantes e modificações bioquímicas na membrana do espermatozoide, possibilitando a reação acrossomal após a ligação do espermatozoide com glicoproteínas da zona pelúcida (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008). O meio para FIV mais utilizado é o Tyrode-albuminalactato-piruvato (TALP) que possui em sua composição fatores capazes de promover a capacitação e hiperativação espermática, se destacando dentre eles a heparina, um glicosaminoglicano (GONÇALVES et al., 2007; VARAGO et al., 2008). Como na maioria das

vezes é utilizado sêmen congelado, é necessário realizar a seleção dos espermatozoides móveis e remoção de diluidores e plasma seminal, sendo realizada essa separação na maioria das vezes pela técnica do gradiente de percoll, um composto de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações formando um gradiente descontínuo (VARAGO et al., 2008). Após essa separação os espermatozoides são diluídos no meio de FIV até atingir concentração final de 1 a 5×10^6 espermatozoides/ml (GONÇALVES et al., 2007), de acordo com a motilidade e população viva após seleção em gradiente de percoll (VARAGO et al., 2008).

Após a fecundação, inicia-se o desenvolvimento embrionário, fase crítica no processo de cultivo *in vitro* (CIV). Para o desenvolvimento inicial do embrião é necessário uma reserva de material genético e de proteínas de origem materna, obtidas durante a maturação citoplasmática. Em embriões bovinos a ativação do genoma embrionário, processo conhecido como transição materno-zigótica, ocorre no estágio de 8 a 16 células, processo que sem as condições de cultivo apropriadas leva ao bloqueio do desenvolvimento embrionário (GONÇALVES et al., 2007). O principal meio utilizado é denominado Synthetic Oviductal Fluid (SOF), ao qual pode-se adicionar fatores de crescimento e macromoléculas para melhorar o desenvolvimento embrionário (VARAGO et al., 2008).

Apesar de todos os avanços obtidos nos últimos 30 anos, as taxas de gestação ainda são muito variáveis, sendo um dos motivos a baixa qualidade do embrião (GARCIA et al., 2005; GONÇALVES et al., 2008). Após a MIV espera-se que aproximadamente 90% dos oócitos submetidos à maturação cheguem à metáfase II. Destes, 80% são fecundados e iniciam a clivagem, pelo menos até o estágio de duas a quatro células. Porém, apenas 25 a 40% destes embriões alcançam o estágio de blastocisto ou blastocisto expandido, demonstrando a carência, principalmente no CIV, de conhecimento para obtenção de melhores resultados (LONERGAN et al., 2001).

É importante considerar em relação ao método de PIVE, além da taxa de prenhez, o desenvolvimento fetal e o desenvolvimento pós-natal (PONTES et al., 2009), e indicadores como a taxa de nascimento podem nortear melhor a eficiência do processo (BALDASSARRE, 2012). Uma grande dificuldade é que, na maioria dos estudos, o resultado é avaliado, principalmente, pelas taxas de eclosão. Embora válidos e importantes, não se sabe o quanto esses parâmetros são eficientes para indicar a real capacidade do embrião em iniciar uma prenhez após a transferência. O teste ideal para a qualidade embrionária é o estabelecimento de gestação após a transferência para receptoras, resultando no nascimento de crias saudáveis (DODE et al., 2013).

Perdas embrionárias, que no primeiro trimestre de gestação podem chegar a 10 - 12%, e o nascimento de conceptos relativamente grandes, também podem trazer risco à rentabilidade da técnica (GALLI et al., 2001; SCANAVEZ et al., 2013). Embriões tardios, ou seja, que chegam ao estágio de blastocisto apenas após oito dias de cultivo *in vitro* apresentam maior taxa de perda embrionária (SCANAVEZ et al., 2013). Fatores como anormalidades cromossômicas, efeito da doadora, idade e qualidade dos embriões inovulados, sincronia doadora-receptora, estado nutricional e concentração sérica de progesterona na receptora, bem como estresse calórico, podem influenciar a sobrevivência embrionária (HANSEN, 2002).

3.2. Criopreservação de embriões PIV

O uso em larga escala de embriões PIV é, muitas vezes, limitado pela distância entre o laboratório de produção de embriões ou central de doadoras e as propriedades com as receptoras (MARINHO et al., 2012). Desse modo, a criopreservação pode tornar a técnica mais acessível e disponível para uso comercial, otimizando o uso das receptoras e permitindo o transporte por longas distâncias (HASLER, 2003; HWANG e HOCHI, 2014; RODRIGUES, 2014), abrindo novas oportunidades para o mercado de embriões e para o comércio internacional de material genético, respeitando

os padrões de biossegurança (BLONDIN, 2015; VIANA, 2015). A criopreservação de germoplasma (oócitos e embriões), apresenta inúmeras vantagens, como criação de bancos genéticos com finalidade de preservação de material genético para espécies em vias de extinção, maximização do uso dos gametas femininos e dos embriões, racionalização do uso de receptoras e da sua sincronização, aplicação da tecnologia em fazendas distantes dos laboratórios de PIV de embriões, permitindo então, maior difusão e expansão da técnica (SARAGUSTY e ARAV, 2011).

A crescente utilização da tecnologia de transferência de embrião tem estimulado o desenvolvimento de pesquisas focadas na criopreservação. Porém, grande variabilidade nos dados tem sido observada apenas com pequenas alterações na técnica de criopreservação (PRADO, 2011), nos componentes das soluções (KAIDI et al., 2000; BRUYÈRE et al., 2012) ou do estágio de desenvolvimento embrionário (MENEZO et al., 2004; CAMPOS-CHILLÒN et al., 2009; MEN et al., 2015).

Em temperaturas muito abaixo de zero, há completa parada da atividade biológica, permitindo preservação do estado funcional e viabilidade celular por longo período. Porém, no processo de criopreservação danos físicos a célula podem prejudicar ou impedir seu desenvolvimento pós-descongelamento. A formação de cristais de gelo intracelular é uma das principais causas de danos às células, podendo ser minimizado por alterações na curva de resfriamento e composição da solução crioprotetora (DALCIN e LUCCI, 2010). Embriões criopreservados podem apresentar alterações em nível molecular, na transcrição de diferentes genes (ARAÚJO et al., 2005; STINSHOFF et al., 2011). Fair et al. (2001) observaram mudanças ultraestruturais após a criopreservação de embriões bovinos PIV, tais como *debris* no espaço subzonal, edema do retículo endoplasmático rugoso e mitocôndrias, e diminuição das cristas mitocondriais, adelgaçamento da zona pelúcida (ZP) quando comparado com embriões *in vivo*, degeneração nuclear e corpos apoptóticos. Os danos causados pela criopreservação também podem estar associados à toxicidade dos crioprotetores, choque térmico e estresse osmótico, podendo causar a morte celular (FAHY et al., 2004).

3.2.1. Métodos de criopreservação

Apesar dos avanços obtidos nas últimas décadas em relação aos métodos de criopreservação, embriões PIV apresentam baixa criotolerância quando comparados aos produzidos *in vivo*, tornando a técnica muitas vezes inviável pelos baixos índices de nascimento (SUDANO et al., 2012).

Os fatores que influenciam a formação de cristais na solução são: velocidade de resfriamento, volume e concentração da solução crioprotetora (ARAV, 2014). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de métodos alternativos, com enfoque nas curvas de resfriamento/ aquecimento e nas substâncias crioprotetoras (VAJTA e KUWAYAMA, 2006; SANTIN et al., 2009).

Em relação à velocidade de resfriamento, atualmente existem dois métodos de criopreservação de gametas: método de congelamento lento e vitrificação (DODE et al., 2013; ARAV, 2014). Apesar de ambas as técnicas serem usadas para criopreservação, apresentam diferenças conceituais importantes (SUDANO et al., 2013). No método de congelamento lento, também denominado como método clássico ou “congelamento por equilíbrio” (DODE et al., 2013), o embrião é colocado em uma solução hipertônica contendo 1 – 1,5 mol/L de crioprotetores (CP) permeáveis de baixo peso molecular (ALMIÑANA e CUELLO, 2015). A curva de resfriamento é lenta (0,2- 2,0°C / min), sendo necessário equipamentos programáveis de alto custo, até atingir temperatura de -30 a -70 ° C, quando então é colocado diretamente em nitrogênio líquido (-196°C) (ALMIÑANA e CUELLO, 2015). A presença do crioprotetor provoca aumento da pressão osmótica do meio, sendo necessária adaptação gradual do embrião, que é colocado por 5 minutos em soluções de criopreservação com concentrações crescentes de crioprotetor (0,5M, 1M e 1,5M), ocorrendo saída gradual da água do meio intracelular para o extracelular, permitindo uma parcial desidratação do embrião, reduzindo a formação de cristais durante a criopreservação

(ALMIÑANA e CUELLO, 2015). Este procedimento permite os embriões atingirem o equilíbrio osmótico com a solução crioprotetora, ou seja, alcançar a mesma concentração de CP dentro e fora da célula (YOUNGS et al., 2011). Porém, nesse método, ainda ocorre a formação cristais de gelo no meio intra e extracelular (SARAGUSTY e ARAV, 2011).

Para o procedimento de congelamento lento, apesar de bem estabelecido e apresentar bons resultados para embriões bovinos produzidos *in vivo* (HASLER, 2003), os embriões PIV apresentam maior sensibilidade, sendo o método de congelamento lento pouco eficiente (ALMIÑANA e CUELLO, 2015). A alternativa para isso é o método de vitrificação, que é possível utilizando altas taxas de resfriamento e alta concentração de crioprotetores (FAHY et al., 1984).

A vitrificação é um método de criopreservação ultra-rápido, em que o meio sofre uma passagem direta do estado líquido para o estado vítreo e amorfo, sem a formação de cristais de gelo. Isso é possível pelo uso de soluções crioprotetoras de alta viscosidade e alta velocidade de congelamento, sendo frequentemente empregado pela facilidade de uso e baixo custo, sem a necessidade de equipamentos sofisticados, podendo ser amplamente utilizado em condições de campo (CARVALHO et al., 2011).

De acordo com Arav (2014) é mais provável alcançar a vitrificação, impedindo assim a cristalização do meio, com um menor volume ao invés de aumentar a taxa de resfriamento. Pequenos volumes permitem melhor transferência de calor, facilitando uma maior taxa de resfriamento. A velocidade de resfriamento depende da massa térmica da amostra e da superfície de área, e para alcançar um resfriamento mais rápido deve-se utilizar materiais com menor massa e máxima relação superfície:volume (ARAV, 2014). Atualmente a vitrificação tem produzido resultados satisfatórios por meio das metodologias que usam um volume mínimo (YU et al., 2010; ARAV, 2014).

Os sistemas de vitrificação podem ser classificados em fechado ou aberto (SARAGUSTY e ARAV, 2014), sendo que no sistema fechado, devido a movimentação de bolhas de ar e mudanças de temperaturas, alterações significativas ocorrem na pressão, aumentando a ocorrência de fraturas de

zona pelúcida (VARAGO et al., 2006). Já com a utilização de um método aberto, por exemplo, o OPS (Open Pulled Straw), mudanças de pressão não ocorrem em torno da solução, diminuindo a ocorrência de fraturas na zona pelúcida (VARAGO et al., 2006). Utilizando sistema fechado, Cavusoglu et al. (2015) observaram maior ocorrência de lesão na zona pelúcida na utilização de congelamento lento, comparado a vitrificação.

Ainda, Cavusoglu et al. (2015) observaram uma diminuição na espessura da zona pelúcida nos embriões criopreservados pelo método de vitrificação, quando comparados ao congelamento lento, podendo ser resultado da desidratação no processo de criopreservação ou das baixas temperaturas do congelamento.

A vitrificação é o melhor método para criopreservação de embriões sensíveis (VARAGO et al., 2006), como é o caso de embriões de suínos, os produzidos *in vitro* ou em estágio inicial de desenvolvimento (ALMIÑANA e CUELLO, 2015).

3.3. Uso de sêmen sexado na fertilização *in vitro* (FIV)

Ao avaliar o impacto econômico da aplicação da tecnologia de PIV de embriões deve-se considerar a proporção entre sexos e a taxa de produção de embriões, prenhez e nascimento, o que pode viabilizar ou não a implantação dessa tecnologia (MIKKOLA et al., 2015). O aumento na proporção do sexo de interesse pode ser realizado com o uso de sêmen sexado na FIV (SEIDEL JÚNIOR, 2014). A sexagem espermática é a separação da população de espermatozóides que contem cromossomo X ou Y, permitindo produzir um embrião com sexo pré-determinado (MORTON et al., 2007). Tem sido relatada uma grande variabilidade entre touros em programas de PIV (XU et al, 2006), e essa variação parece ser maior com o uso de sêmen sexado, afetando as taxas de desenvolvimento embrionário (PALMA et al., 2008). Porém, apenas um número limitado de touros tem sido utilizado para estudos de fertilização (MIKKOLA et al., 2015).

A citometria de fluxo tem sido o principal método de sexagem, podendo atingir cerca de 90% de acurácia (TUBMAN et al., 2004; FRIJTERS et al., 2009), entretanto, comparado ao sêmen convencional, o sêmen sexado apresenta baixa fertilidade quando usado na IA ou superovulação e TE (BERMEJO-ÁLVAREZ et al., 2008). A citometria de fluxo permite realizar a sexagem dos espermatozóides e, assim, controlar o sexo da prole, aumentando a produtividade, uma vez que é possível alcançar uma maior taxa de nascimentos de animias do sexo desejado. A utilização do sêmen sexado em programas de superovulação ou de PIV de embriões permite aumentar a multiplicação de animais considerados geneticamente superiores, potencializando os resultados de um programa de melhoramento genético (MIKKOLA et al., 2015).

Para melhor utilizar o sêmen sexado deve-se conhecer o que mais afeta a sua capacidade de fertilização, se é a baixa dose inseminante, o processo de sexagem ou variação entre touros (FRIJTERS et al., 2009). Segundo Frijters et al. (2009) os testes preliminares de campo, com sêmen convencional, não predizem com acurácia a fertilidade do touro após a sexagem. Segundo os autores, monitorar os resultados do sêmen sexado e manter os touros com maior fertilidade para sexagem é a melhor maneira de aumentar a fertilidade geral do sêmen sexado.

O sêmen sexado certamente é afetado pelo processo de sexagem e congelamento (SEIDEL JÚNIOR, 2014), porém a baixa dose pode ter um efeito considerável sobre a baixa fecundidade (FRIJTERS et al., 2009), comprometendo a produção de embriões *in vitro*, diminuindo as taxas de clivagem e de blastocisto e aumentando a proporção de oócitos não fertilizados e embriões degenerados (BERMEJO-ÁLVAREZ et al., 2008; MIKKOLA et al., 2015). FRIJTERS et al. (2009) estimaram que a baixa dose é responsável por reduzir dois terços da fertilidade, enquanto um terço da baixa fertilidade é devido ao processo de sexagem. Porém, uma grande variabilidade nos resultados pode ser relacionado ao touro (DEN DAAS et al., 1998; PALMA et al., 2008), sendo que tanto os efeitos da baixa dosagem

como do processo de sexagem diferem entre touros (FRIJTERS et al., 2009).

Entretanto, alguns estudos contradizem esses achados, mostrando que a taxa de concepção e nascimento não depende do número de espermatozoide na dose inseminante (DEN DAAS et al., 1998; CRESPILO et al., 2014). Porém, pode haver variação de acordo com o diluente de criopreservação do sêmen (CRESPILO et al., 2012; 2014).

Mikkola et al. (2015) avaliaram a produção de embriões *in vivo* com sêmen sexado, pelo método de superovulação. A taxa de prenhez reduziu cerca de cinco pontos percentuais para embriões criopreservados e 8,7 pontos percentuais quando os embriões foram transferidos frescos, quando utilizado sêmen sexado em comparação com o sêmen convencional ($p < 0,001$).

Segundo Mikkola et al. (2015), com produção *in vivo* de embriões, apesar dos menores índices de embriões recuperados e menor taxa de gestação, quando comparada com o sêmen convencional, de maneira geral o uso do sêmen sexado é economicamente viável, tendo em vista que mais animais do sexo desejado serão produzidos com menos receptoras, sendo preferencialmente novilhas devido às maiores taxas de gestação. Os autores observaram também uma alta taxa de mortalidade no grupo de embriões sexados (convencional = 7,7%; sexado = 16%; $p < 0,05$) (MIKKOLA et al., 2015). Interessante observar que este e outros autores têm observado alta taxa de natimortalidade e mortalidade de bezerros machos no grupo que utilizou sêmen sexado (DeJARNETTE et al., 2009; NORMAN et al., 2010). Porém, alguns autores relatam taxa de mortalidade similar com o uso de sêmen sexado e convencional (RASMUSSEN et al., 2013).

Alguns relatos têm sido publicados com taxas de prenhez razoáveis com o uso de embriões FIV utilizando sêmen sexado (XU et al., 2006; PONTES et al., 2010), inclusive com boa sobrevivência após criopreservação (frescos: 52,8% vs. vitrificados: 42,0%; $P > 0,05$; Trigal et al., 2012). No entanto, Wilson et al. (2005) encontraram taxas de gestação

insatisfatórias com o uso de sêmen sexado- de 16,3% com base na detecção do estro e 20% para receptora sincronizadas (Ovsynch).

Os resultados do uso de sêmen sexado para PIV algumas vezes se mostram inconsistentes, e diferenças no processo de sexagem do espermatozóide, na maturação, fertilização do oócito e cultivo do embrião tornam de difícil interpretação esses resultados (MIKKOLA et al., 2015).

3.4. Cruzamentos

Atualmente outra possibilidade que vem sendo explorada, apesar de incipiente, é a utilização da PIV para produzir cruzamentos terminais em gado de corte (VIANA, 2015), permitindo rápidas e melhores possibilidades para executar programas de cruzamento (GONÇALVES et al., 2007). Contudo, o produtor deve construir um processo que permita a tomada de decisões seguras que conduzam a melhoria no desempenho produtivo e econômico da atividade (CEZAR, 2001). Na última década, o cruzamento industrial de bovinos tornou-se uma importante ferramenta para incrementar a produção de carne nos diferentes sistemas produtivos do Brasil. A combinação da seleção com cruzamentos permite a obtenção de animais eficientes nos mais diversos ambientes e em condições de atender, com flexibilidade, as exigências do mercado consumidor (TEIXEIRA e ALBUQUERQUE, 2003).

Um resultado importante dos cruzamentos é a heterose (vigor híbrido), que é um produto de maior diversidade de genótipos que aumentaria a produtividade e a probabilidade de adaptação às condições ambientais (VASCONCELLOS et al., 2003), incluindo maior resistência a ectoparasitas (HÜE et al., 2014). Rodrigues et al. (2015) observaram, em condições tropicais, que animais cruzados desmamaram com peso 10% superior comparado aos animais puros.

Entretanto, apesar dos vários benefícios oferecidos pelo cruzamento para produção de animais superiores, as exigências desses animais devem ser atendidas, principalmente nutricionais, possibilitando expressão plena do seu potencial produtivo (TEIXEIRA et al., 2006). Além disso, bezerros cruzados, devido a maior taxa de crescimento e ingestão de leite, podem prolongar o intervalo entre partos (RODRIGUES et al., 2015). Dessa forma a escolha adequada do touro e a garantia das condições ambientais e nutricionais são fundamentais para implantação dessa tecnologia na propriedade.

4. Referências

- Accorsi, M.F.; Leão, B.C.S.; Rocha-Frigoni, N.A.S.; Perri, S.H.V.; Mingoti, G.Z. Reduction in cytoplasmic lipid content in bovine embryos cultured *in vitro* with linoleic acid in semi-defined medium is correlated with increases in cryotolerance. **Zygote**, v.24, p.485–494, 2015.
- Almiñana C.; Cuello C. What is new in the cryopreservation of embryos? **Anim. Reprod.**, v.12, n.3, p.418-427, 2015.
- Araújo M.C.C.; Vale Filho, V.R.; Ferreira, A.M.; Sá, W.F.; Barreto Filho, J.B.; Camargo, L.S.A.; Serapião, R.V.; Silva, M.V.G.B. Interferon tau secretion in cattle embryos *in vitro* fertilized before and after cryopreservation. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.6, p.751-756, 2005.
- Arav A. Cryopreservation of oocytes and embryos. **Theriogenology**, v.81, p.96–102, 2014.
- Baldassarre, H. Practical aspects for implementing in vitro embryo production and cloning programs in sheep and goats. **Ani. Reprod. Sci.**, v. 9, n. 3, p.188-194, 2012.
- Beltrame, R.T.; Barioni L.G.; Maestri B.D.; Quirino C.R.. Economic optimization of the number of recipients in bovine embryo transfer programs. **Sci. Agric.**, v.64, n.3, p.221-226, 2007 .
- Beltrame, R.T.; Barioni, L.G.; Quirino, C.R.; Dantas O.D.. Modelagem bioeconômica da transferência de embriões em bovinos. **Ci. Anim. Bras.**, v. 11, n. 1, p.32-41, 2010.
- Bermejo-Álvarez, P.; Rizos, D.; Rath, D.; Lonergan, P.; Gutiérrez-Adán, A.. Can Bovine In Vitro-Matured Oocytes Selectively Process X- or Y-Sorted Sperm Differentially? **Biol. Reprod.**, 79, p.594–597, 2008.
- Blondin, P. Status of embryo production in the world. **Anim. Reprod.**, v.12, n.3, p.356-358, 2015.
- Blondin, P.; Coenen, K.; Guilbault, L.A. J; Sirardly M.A. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, 47, p.1061-1075, 1997.

- 742 Bruyère, P.; Baudot, A.; Guyader-Joly, C.; Guérina, P.; Louis, G.; Buff, S. Improved
743 cryopreservation of *in vitro*-produced bovine embryos using a chemically defined
744 freezing medium. **Theriogenology**, v.78, p.1294–1302, 2012.
- 745 Campos-Chillón, L.F.; Suh, T.K.; Barcelo-Fimbres, M.; Seidel Jr., G.E.; Carnevale,
746 E.M. Vitrification of early-stage bovine and equine embryos. **Theriogenology**, v.71,
747 p.349–354, 2009.
- 748 Carvalho, A.A.; Faustino, L.R.; Figueiredo, J.R.; Rodrigues, A.P.R.; Costa, A.P.R.
749 Vitrification: an alternative for preserving embryos and genetic material mammalian
750 females in cryobanking. **Acta Vet. Bras.**, v.5, n.3, p.236-248, 2011.
- 751 Cavusoglu, T.; Popken, J.; Guengoer, T.; Yilmaz, O.; Uyanikgil, Y.; Ates, U.; Baka,
752 M.; Oztas, E.; Zakhartchenko, V. Ultra-Structural Alterations in In Vitro Produced
753 Four-Cell Bovine Embryos Following Controlled Slow Freezing or Vitrification. **Anat.**
754 **Histol. Embryol.**, v.45, n.4, p.291–307, 2015.
- 755 Cezar, I.M. Racionalização de investimentos em pastagens: uma abordagem
756 sistêmica no processo decisório, in: Simpósio sobre Manejo de Pastagens, 18,
757 Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz”,
758 p.351-369, 2001.
- 759 Crespilho, A.M.; Papa, F.O.; Sá Filho, M.F.; Guasti, P.N.; Dell’Aqua Jr, J.A.;
760 Vasconcelos, J.L.M.; Novaes, J.L.C.; Martins Jr, A. The influence of insemination
761 dose on pregnancy per fixed-time artificial insemination in beef cows is affected by
762 semen extender. **Anim. Reprod.**, v.11, n.1, p.3-10, 2014.
- 763 Crespilho, A.M.; Sá Filho M.F.; Dell’Aqua Jr., J.A.; Nichi, M.; Monteiro, G.A.; Avanzi,
764 B.R.; Martins, A.; Papa, F.O. Comparison of *in vitro* and *in vivo* fertilizing potential of
765 bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. **Livestock Sci.**,
766 v.149, 1–6, 2012.
- 767 Dalcin, L.; Lucci, C.M.. Cryopreservation of livestock embryos: cryobiological
768 principles and current status. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.34, n.3, p.149-159, 2010.
- 769 DeJarnette, J.M.; Nebel, R.L.; Marshall, C.E. Evaluating the success of sex-sorted
770 semen in US dairy herds from on farm records. **Theriogenology**, 71, p.49–58, 2009.
- 771 Den Daas, J.H.G.; Jong G.; Lansbergen, L.M.T.E.; Van Wagtendonk-De Leeuw, A.
772 M. The relationship between the number of spermatozoa inseminated and the
773 reproductive efficiency of individual dairy bulls. **J. Dairy Sci.**, v.81, p.1714–1723,
774 1998.
- 775 Dode, M.A.N.; Leme, L.O.; Sprícigo, J.F.W. Cryopreservation of *in vitro* produced
776 bovine embryos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.37, n.2, p.145-150, 2013.
- 777 Fahy, G.M.; Wowk, B.; Wu, J.; Phan, J; Rasch, C; Chang, A; Zendejas, E..
778 Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances.
779 **Cryobiology**, v.48, n.2, p.157-78, 2004.
- 780 Fahy, G.M.; MacFarlane, D.R.; Angell, C.A.; Meryman, H.T. Vitrification as an
781 approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v.21, n.4, p.407-26, 1984.
- 782 Fair, T.; Lonergan, P.; Dinnyes, A.; Cottell, D.C.; Hyttel, P.; Ward, F.A.; Boland, M.P..
783 Ultrastructure of Bovine Blastocysts Following Cryopreservation: Effect of Method of
784 Blastocyst Production. **Molec. Reprod. Develop.**, v.58, p.186-195, 2001.
- 785 Frijters, A.C.J.; Mullaart, E.; Roelofs, R.M.G.; van Hoorne, R.P.; Moreno, J.F.;
786 Moreno, O.; Merton, J.S. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm
787 dosage or the sorting process? **Theriogenology**, v.71, p.64–67, 2009.

- 788 Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. Embryo production by ovum
789 pick up from live donors. **Theriogenology**, v.55, p.1341-1357, 2001.
- 790 Garcia JM, Avelino KB, Vantini R. Estado da arte da fertilização *in vitro* em bovinos.
791 in: Simpósio Internacional de Reprodução Animal aplicada, **Anais...**, Londrina, PR.
792 Biotecnologia da reprodução em bovinos. Londrina, PR: UEL, 2005, 201p.
- 793 Gonçalves, P. B. D.; Oliveira, M. A. L.; Mezzalira, A.; Montagner, M. M.; Visintin, J.
794 A., Costa, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo,
795 J. R.; Freitas, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São
796 Paulo: Roca, 2008, cap. 14, p. 61-91.
- 797 Gonçalves, P.B.D.; Barreta, M.H.; Sandri, L.R.; Ferreira, R.; Antoniazzi, A.Q. In vitro
798 production of bovine embryos: the state of the art. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo
799 Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, 2007.
- 800 Gottardi; F.P.; Mingoti; G.Z. Bovine oocyte maturation and influence on subsequent
801 embryonic developmental competence. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.33, n.2, p.82-
802 94, 2009.
- 803 Hansen, P.J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. **J. Anim.**
804 **Sci.** v.80, n. Suppl. 2, E33–E44, 2002.
- 805 Hasler, J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle.
806 **Ani. Reprod. Sci.**, v.79, 245–264, 2003.
- 807 Herrick, J.R.; Silva, E.; Krisher, R.L. Usos de novas ferramentas analíticas para
808 produção de melhores embriões *in vitro*. **Anais...** XXX Reunião Anual da Sociedade
809 Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, 2016.
- 810 Hwang I.S.; Hochi S. Recent progress in cryopreservation of bovine oocytes. **BioMed**
811 **Res. Intern.**, p.11, 2014.
- 812 Kaidi, S.; Donnay, I.; Lambert, P.; Dessy, F.; Massip, A. Osmotic behavior of in vitro
813 produced bovine blastocysts in cryoprotectant solutions as a potential predictive test
814 of survival. **Cryobiology**, v.41, p.106–115, 2000.
- 815 Lima, J.M.P.; Santos, F.A.; Pimentel, M.M.L.; Bezerra, M.B. Influence of methodology
816 progress on in vitro production of bovine embryo in Brazil. **Rev. Bras. Reprod.**
817 **Anim.**, v.38, n.3, p.135-140, 2014.
- 818 Lonergan P.; Rizos D.; Ward F.; Boland M.P. Factors influencing oocyte and embryo
819 quality in cattle. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.41, p.427-437, 2001.
- 820 Marinho, L. S. R.; Untura, R. M. ; Morotti, F. ; Molino, L.L.; Rigo, A.G.; Sanches, B.V.;
821 Pontes, J.H.F.; Seneda, M.M.; Seneda, M.M. Large-scale programs for recipients of
822 *in vitro*-produced embryos. **Ani. Reprod.**, v. 9, p.323-328, 2012.
- 823 Men H.; Spate L.D.; Murphy, C.N.; Prather R.S. Cryopreservation of In Vitro-
824 Produced Early-Stage Porcine Embryos in a Closed System. **BioResearch Open**
825 **Access**, v 4.1, p.12, 2015.
- 826 Menezo, Y. Cryopreservation of IVF embryos: which stage? **Europ. J. Obst. Gynec.**
827 **Reprod. Biol.**, v.113, p.28–32, 2004.
- 828 Mikkola, M.; Andersson, M.; Taponen, J. Transfer of cattle embryos produced with
829 sex-sorted semen results in impaired pregnancy rate and increased male calf
830 mortality. **Theriogenology**, v.84, p.1118–1122, 2015.
- 831 Morton, K.M.; Herrmann, D.; Sieg, B.; Struckmann, C.; Maxwell, W.M.C.; Rath, D.;
832 Evans, G.; Lucas-Hahn, A.; Niemann, H.; Wrenzycki, C. Altered mRNA Expression

- 833 Patterns in Bovine Blastocysts After Fertilisation In Vitro Using Flow-Cytometrically
834 Sex-Sorted Sperm. **Molec. Reprod. Develop.**, v.74, p.931–940, 2007.
- 835 Nogueira E.; Mingoti G.Z.; Nicacio A.C. Biotécnicas Reprodutivas Para Aceleração
836 Do Melhoramento Genético. In: Rosa, A.N.; Martins E.N.; Menezes, G.R.O.; Silva,
837 L.O.C., **Melhoramento genético aplicado em gado de corte. Programa**
838 **Geneplus-Embrapa** / Brasília, DF Embrapa, p.195-211, 2013.
- 839 Norman, H. D.; Hutchison, J. L.; Miller, R. H. Use of sexed semen and its effect on
840 conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. **J.**
841 **Dairy Sci.**, v.93, p.3880–3890, 2010 .
- 842 Palma, G. A.; Olivier, N. S.; Neumüller, Ch.; Sinowatz, F. Effects of Sex-sorted
843 Spermatozoa on the Efficiency of in vitro Fertilization and Ultrastructure of in vitro
844 Produced Bovine Blastocysts. **Anat. Histol. Embryol.**, v.37, p.67–73, 2008.
- 845 Parrish, J.J. Bovine in vitro fertilization: In vitro oocyte maturation and sperm
846 capacitation with heparin. **Theriogenology**, v.81, p.67–73, 2014.
- 847 Pontes, J.H.F.; Nonato-Junior, I.; Sanches, B.V.; Ereno-Junior, J.C.; Uvoa, S.;
848 Barreiros, T.R.R.; Oliveira, J.A.; Hasler, J.F.; Seneda, M.M. Comparison of embryo
849 yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore
850 (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v.71, p.690–697, 2009.
- 851 Pontes, J.H.F.; Silva, K.C.F.; Basso, A.C.; Rigo, A.G.; Ferreira, C.R.; Santos, G.M.G.;
852 Sanches, B.V.; Porcionato, J.P.F.; Vieira, P.H.S.; Faifer, F.S.; Sterz, F.A.M.;
853 Schenk, J.L.; Seneda, M.M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy
854 rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed
855 sperm. **Theriogenology**, v.74, p.1349–1355, 2010.
- 856 Pontes, J.H.F.; Sterza F.A.M.; Basso, A.C.; Ferreira, C.R.; Sanches, B.V.; Rubinc,
857 K.C.P.; Seneda, M.M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates
858 from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors.
859 **Theriogenology**, v.75, p.1640–1646, 2011.
- 860 Prado, F.R.A. Efeitos da congelação lenta e vitrificação sobre a qualidade e
861 viabilidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Trabalho de Doutorado**. 2011
862 Jaboticabal – São Paulo – Brasil.
- 863 Rasmussen, S.; Block, J.; Seidel Jr, G.E.; Brink, Z.; McSweeney, K.; Farin, P.W.;
864 Bonilla, L.; Hansen, P.J. Pregnancy rates of lactating cows after transfer of in vitro
865 produced embryos using X-sorted sperm. **Theriogenology**, v.79, p.453–461, 2013.
- 866 Rodrigues, C.F.M. Historical context of cattle embryo transfer technique in Brazil.
867 **Anim. Reprod.**, v.11, n.3, p.137-140, 2014.
- 868 Rodrigues, W.B.; Wechsler, F.S.; Nogueira, E. Reproductive Performance and
869 Reconception of Nelore Cows According to Their Pure- or Cross-Bred Calves.
870 **Reprod. Dom. Anim.**, v.50, p.431–436, 2015.
- 871 Rumpf, R. Methodological advances on in vitro embryo production. **R. Bras. Zootec.**,
872 v.36, suppl., p.229-233, 2007.
- 873 Santin, T.R.; Blume, H.; Mondadori, R.G. Criopreservação de Embriões –
874 Metodologias de Vitrificação. **Vet. e Zootec.**, v.16, n.4, p. 561-574, 2009.
- 875 Saragusty, J.; Arav A. Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by
876 slow freezing and vitrification. **Reproduction**, v.141, p.1–19, 2011.
- 877 Satrapa, R.A.; Nabhan, T.; Silva, C.F.; Simões, R.A.L.; Razza, E.M.; Puelker, R.Z.;
878 Trinca, L.A.; Barros, C.M. Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and

- interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of *in vitro*-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v.76, p.1162–1167, 2011.
- Seidel Jr, G. E., Update on sexed semen technology in cattle. **Animal**, v.8, n.1, 160–164, 2014.
- Scanavez, A.L.; Campos, C.C.; Santos, R.M. Taxa de prenhez e de perda de gestação em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.3, p.722-728, 2013.
- Stinshoff, H.; Wilkening, S.; Hanstedt, A.; Brüning, K.; Wrenzycki, C. Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular level. **Theriogenology**, v.76, p.1433–1441, 2011.
- Sudano, M.J.; Paschoal, D.M.; Maziero, R.R.D.; Rascado, T.S.; Guastali, M.D.; Crocomo, L.F.; Magalhães, L.C.O.; Monteiro, B.A.; Martins Jr, A.; Machado, R.; Landim-Alvarenga, F.D.C. Improving postcryopreservation survival capacity: an embryo-focused approach. **Anim. Reprod.**, v.10, n.3, p.160-167, 2013.
- Sudano, M.J.; Paschoal, D.M.; Rascado, T.S.; Crocomo, L.F.; Magalhães, L.C.O.; Martins Junior, A.; Machado, R.; Landim-Alvarenga, F.C. Crucial surviving aspects for vitrified *in vitro*-produced bovine embryos. **Zygote**, v.22, p.124–131, 2012.
- Teixeira, R.A.; Albuquerque, L.G. Efeitos Ambientais que Afetam o Ganho de Peso Pré-Desmama em Animais Angus, Hereford, Nelore e Mestiços Angus-Nelore e Hereford-Nelore. **R. Bras. Zootec.**, v.32, p.887-890, 2003.
- Teixeira, R.A.; Albuquerque, L.G.; Alencar, M.M.; Dias, L.T. Interação genótipo-ambiente em cruzamentos de bovinos de corte. **R. Bras. Zootec.**, v.35, n.4, supl, p.1677-1683, 2006.
- Torres-Júnior J.R.S.; Melo, W.O.; Elias, A.K.S.; Rodrigues L.S.; Penteado L.; Baruselli P.S. Technique and economic considerations about assisted reproduction in beef cattle. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.33, n.1, p.53-58, 2009.
- Trigal, B.; Gómez, E.; Caamaño, J.N.; Muñoz, M.; Moreno, J.; Carrocera S.; Martín, D.; Diez, C. In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v.78, p.1465–1475, 2012.
- Tubman, L.M.; Brink, Z.; Suh, T.K.; Seidel, G.E. Jr. Characteristics of calves produced with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.1029-1036, 2004.
- Vajta G; Kuwayama M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v.65, p.236–244, 2006.
- Varago, F.C.; Mendonça, L.F.; Lagares, M.A. Bovine in vitro embryo production: state of art and perspective of a constant evolution technique. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.32, n.2, p.100-109, 2008.
- Varago, F.C.; Saliba, W.P.; Alvim, M.T.T.; Vasconcelos, A.B.; Oliveira, C.H.; Stahlberg, R.; Lagares, M.A. Vitrification of *in vitro* produced Zebu embryos. **Anim. Reprod.**, v.3, n.3, p.353-358, 2006.
- Vasconcellos, B.F.; Pádua, J.T.; Muñoz, M.F.C.; Tonhati H. Efeitos genéticos e ambientais sobre a produção de leite, o intervalo de partos e a duração da lactação em um rebanho leiteiro com animais mestiços no Brasil. **Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Vida.**, v. 23, n. 1, p.39-45, 2003.
- Viana, J.H.M.; Figueiredo, A.C.S. Estatísticas da produção e transferência de embriões em 2013 e os novos rumos da indústria de embriões no Brasil. **J. O Embrião**, v.55, p.16-18, 2015.

- 926 Viana, J.H.M.; Siqueira, L.G.B.; Palhao, M.P.; Camargo, L.S.A. Features and
 927 perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Anim. Reprod.**, v.9, n.1, p.12-
 928 18, 2012.
- 929 Wilson, R. D.; Weigel, K. A.; Fricke, P. M.; Rutledge, J. J.; Leibfried-Rutledge, M. L.;
 930 Matthews, D. L.; Schutzkus, V. R. In Vitro Production of Holstein Embryos Using Sex-
 931 Sorted Sperm and Oocytes from Selected Cull Cows. **J. Dairy Sci.**, v.88, p.776–782,
 932 2005.
- 933 Wilson, R.D.; Fricke, P.M.; Leibfried-Rutledge, M.L.; Rutledge, J.J.; Syverson
 934 Penfield, C.M.; Weigel, K.A. In vitro production of bovine embryos using sex-sorted
 935 sperm. **Theriogenology**, v.65, p.1007–1015, 2006.
- 936 Xu J.; Guo Z.; Su L.; Nedambale T. L.; Zhang J.; Schenk J.; Moreno J. F.; Dinnyés
 937 A.; Ji, W.; Tian, X. C.; Yang, X.; Du, F.,. Developmental Potential of Vitrified Holstein
 938 Cattle Embryos Fertilized In Vitro with Sex-Sorted Sperm. **J. Dairy Sci.**, v.89, n.7,
 939 p.2510–2518, 2006.
- 940 Youngs, C.R.; Leibo, S.P.; Godke, R.A. Embryo cryopreservation in domestic
 941 mammalian livestock species. *In*: Hemming, D. (Ed). **Animal Science Review**.
 942 Oxfordshire, UK: CABI. p.245-256, 2011.
- 943 Yu, X.L.; Deng, W.; Liu, F.J.; Li, Y.H.; Li, X.X.; Zhang, Y.L.; Zan, L.S. Closed pulled
 944 straw vitrification of in vitro–produced an in vivo–produced bovine embryos.
 945 **Theriogenology**, v.73, p.474–479, 2010.

CAPÍTULO 1

Normatizado segundo Periódico: **Reproduction in Domestic Animals**

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1439-0531/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1439-0531/homepage/ForAuthors.html)

Mestrado em Ciências Veterinárias, UFMS, Campo Grande, Brasil

Aplicação da vitrificação de embriões bovinos produzidos *in vitro* com sêmen sexado para produção de bezerros de corte cruzados.

Alexandre de Oliveira Bezerra, Walvonvitis Baes Rodrigues, Natalia Albanese Anache, Karine Casanova da Silva, Jean do Prado Jara, Alessandra Corallo Nicacio, Érikliis Nogueira

Resumo

Frente a crescente utilização da produção *in vitro* (PIVE) de embriões no Brasil e a busca por tecnologias que tornem o sistema produtivo mais eficiente e lucrativo, avaliou-se a taxa de prenhez de receptoras Nelore inovuladas com embriões PIV frescos ou vitrificados, produzidos a partir de oócitos de doadoras Nelore provenientes de abatedouro (ABATE, n= 66 embriões) ou submetidas a aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) (VIVO, n= 299 embriões) e fertilizados *in vitro* com sêmen sexado para macho de touro *Bos taurus*. Os embriões foram cultivados por 7 dias, e apenas os considerados de qualidade grau I foram transferidos a fresco (FRESCO, n= 286) ou após vitrificação (VITRIFICADO, n= 79). As receptoras foram sincronizadas em dia aleatório do ciclo estral (D0) para realização de transferência de embrião em tempo fixo (TETF). O D10 foi considerado o dia do cio e no D17 as receptoras que possuíam corpo lúteo maior que 20 mm de diâmetro foram inovuladas. O diagnóstico de gestação foi realizado 60 dias após inovulação e os dados foram analisados

pelo PROC GLIMMIX e PROC LOGISTIC do SAS, com nível de significância menor que 0,05. As taxas de clivagem foram de 63,96 % $\pm$ 35,52 e 39,18% $\pm$ 12,17 para os grupos VIVO e ABATE, respectivamente (P= 0,0209). Houve uma tendência (P= 0,0892) da taxa de blastocisto ser superior no grupo VIVO (30,49% $\pm$ 32,34 e 14,73% $\pm$ 11,09). Não houve diferença na taxa de prenhez (P=0,72) para os embriões FRESCO (34,27%) ou VITRIFICADO (30,38%), assim como para a origem dos oócitos (VIVO = 35,12%; ABATE = 25,76; P=0,17). O tamanho e tipo do CL não influenciaram na taxa de prenhez (P=0,44; P=0,82, respectivamente). A utilização de sêmen sexado associado à vitrificação é viável para otimizar a tecnologia de PIV, melhorando sua aplicação em larga escala.

Palavras-chave: PIV, TETF, criopreservação, cruzamento.

1. Introdução

A crescente pressão das fronteiras agrícolas e o aumento da demanda por alimentos desafia o setor pecuário a desenvolver novas tecnologias que possibilitem produzir mais em menos tempo, e com menor custo (Blondin, 2015). O uso da produção *in vitro* de embriões (PIVE), tanto para bovinos de corte como de leite, tem potencial para maximizar o aproveitamento genético dos animais mais produtivos, melhorando a eficiência reprodutiva, por reduzir o intervalo entre gerações, e otimizar programas de cruzamentos e melhoramento genético (Block et al., 2011), visto que em mesmo intervalo de tempo é possível produzir mais embriões utilizando o método *in vitro* (9,4 $\pm$ 5,3) comparado com *in vivo* (6,7 $\pm$ 3,7; P<0,05) (Pontes et al., 2009). Maior impacto da PIVE pode ser alcançado com a utilização de sêmen sexado de animais de elevado mérito genético, melhorando o equilíbrio na relação custo/benefício da técnica (Rodrigues, 2014).

A grande preocupação quanto à utilização do sêmen sexado é a baixa fertilidade do espermatozoide sexado, em comparação com o convencional (Xu et al., 2009; Wheeler et al., 2006; Liu et al., 2015), pois o mesmo é afetado pelo processo de sexagem e congelamento (Seidel Jr., 2014), podendo comprometer os resultados da taxa de gestação quando utilizado na inseminação artificial ou superovulação para produção de embriões *in vivo*, diminuindo as taxas de clivagem e de blastocisto e aumentando a proporção de oócitos não fertilizados e embriões degenerados (Bermejo-Alvarez et al., 2008; Mikkola et al., 2015). O menor número de espermatozoide por dose também pode ter um efeito considerável sobre a baixa fecundidade (Frijters et al., 2009). Como a PIVE necessita de doses menores, o uso do sêmen sexado torna-se viável (Wheeler et al., 2006).

Outro grande desafio para indústria de embriões é a criopreservação. Tal fato assume maior importância no Brasil, onde é frequente a escassez de receptoras aptas a receberem um embrião, principalmente devido ao grande número de embriões que tem sido produzidos (Pontes et al., 2011), podendo levar ao descarte de grande quantidade de embriões. Alternativas como a criopreservação dos embriões e sincronização para transferência em tempo fixo (TETF), podem otimizar e maximizar o uso dessa ferramenta.

Para PIV de embriões, os oócitos podem ser coletados de ovários de abatedouro ou, com auxílio de ultrassonografia, por *ovum pick-up* (OPU). Sendo, no primeiro caso, mais difícil manter um rigor sanitário (Ponsart e Pozzi, 2013) e controle do mérito genético dos animais (Wilson et al., 2006). Entretanto, a utilização de ovários provenientes de abatedouro pode contribuir com a redução dos custos da PIVE bovinos (Wilson et al., 2006). Outra alternativa, para melhorar a relação custo-benefício da técnica, é a utilização cruzamentos com oócitos provenientes de doadoras *Bos indicus* e sêmen de touros geneticamente superiores *Bos taurus*, permitindo intensificar a produção de carne nos diferentes sistemas, pois bezerros cruzados podem desmamar 10-15% mais pesados que os bezerros puros (Rodrigues et al., 2015).

Objetivou-se com esse estudo avaliar a eficiência do uso de oócitos provenientes de ovários de abatedouro ou aspirados *in vivo* para produção de embriões *in vitro* com sêmen sexado para macho e transferidos após criopreservação ou frescos para receptoras Nelore.

2. Material e Métodos

2.1. Produção dos embriões in vitro

2.1.1 Coleta dos oócitos

Salvo indicação contrária, os produtos químicos foram adquiridos da Sigma (Sigma–Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA). Os oócitos bovinos foram obtidos de duas origens, provenientes de ovários de abatedouro (ABATE) ou de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) (VIVO).

No grupo VIVO, as doadoras (23) eram novilhas da raça Nelore, cíclicas, com idade entre 18 – 36 meses, escore corporal entre 2,5 e 3 (em uma escala de 1 a 5, segundo Lowman et al., 1976), e pertenciam a um rebanho com programa de seleção e avaliação genética. Os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizanta*, com suplementação mineral *ad libitum*. Foram realizadas duas aspirações com intervalo de 22 dias, independente do estágio do ciclo estral.

Antes de cada coleta as fezes foram removidas do reto, realizada a limpeza da região perineal com papel toalha e anestesia epidural com lidocaína 2% (Anestésico L, Eurofarma, Campo Belo, São Paulo, Brasil), na dose de 0,02 mg/kg, para reduzir os movimentos peristálticos e o desconforto.

1038 A coleta foi realizada com auxílio de equipamento de ultrassom (Aloka 500), com transdutor
1039 7,5 MHz convexo acoplado em guia especial para aspiração (WTA, Cravinhos, São Paulo,
1040 Brasil). Os folículos entre 2 – 8 mm foram puncionados com agulha descartável de 20 G
1041 (Terumo, São Paulo, Brasil) conectada via tubo de silicone (1,20 m) a um tubo tipo Falcom e
1042 sistema de vácuo de aspiração (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil) com pressão negativa de
1043 70 mm Hg. O meio de lavagem foi o *Tissue Culture Medium 199* (TCM-199) (Embryo Rio
1044 Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil).

1045 No grupo ABATE, ovários de vaca Nelore de origem desconhecida foram coletados logo após
1046 o abate e transportados até o laboratório em recipiente térmico com solução PBS (phosphate-
1047 buffered saline, Nutricell, Campinas São Paulo, Brasil), em temperatura entre 30 – 37 °C
1048 dentro de 2 - 3 horas, totalizando duas coletas em dias distintos. Para obtenção do complexo
1049 cumulus oócito (COCs), folículos entre 3 – 8 mm de diâmetro foram aspirados com agulha 18
1050 G conectada a uma seringa de 20 ml. Os COCs foram colocados em tubos Falcom em banho-
1051 maria, à 30°C, até aspiração dos folículos de todos os ovários, totalizando aproximadamente 6
1052 horas.

1053 A maturação dos oócitos, fertilização, cultivo *in vitro*, e avaliação dos embriões foram
1054 realizadas em laboratório comercial, para ambos os grupos (VIVO e ABATE).

1055 2.1.2. Seleção e maturação dos oócitos

1056 Após a aspiração dos dois grupos, o material foi filtrado através do filtro Emcon com solução
1057 PBS (Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil). Os COCs imaturos recuperados foram
1058 quantificados e classificados morfolologicamente como viáveis ou inviáveis, sendo
1059 considerados viáveis aqueles com presença de múltiplas camadas compactas de células do
1060 *cumulus* e ooplasma homogêneo, e os inviáveis os desnudos ou picnóticos, com ooplasma
1061 heterogêneo e vesículas apoptóticas.

Os COCs foram lavados três vezes com meio TCM-199. O meio de MIV consistiu de TCM-199 suplementado com 10% (v:v) de soro fetal bovino (FCS), 0,2 mM de piruvato de sódio, 25 mM de bicarbonato de sódio, 50 mg/mL de amicacina, 0,5 mg/mL de FSH (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), e 100 UI/mL de hCG (Vetecor; Hertape Calier). Para MIV, os COCs selecionados foram transferidos para microgotas de 400 µL do meio de maturação sob óleo mineral, com 30 a 40 oócitos por gota, e mantidos em estufa por 22 - 24 horas a 38,5°C, 5% de CO₂ em umidade saturada do ar.

2.1.3. *Preparação do sêmen e fertilização in vitro*

O meio de fertilização consistiu de Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP), como descrito por Parrish (1988), contendo 0,2 mM de piruvato de sódio, 6 mg/mL de BSA, 25 mM de bicarbonato de sódio, 13 mM de lactato de sódio, 50 mg/mL de amicacina, 40 µL/mL de solução PHE (concentração final de 20 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina, 2 µM de epinefrina), e 10 mg/mL de heparina. Sêmen sexado congelado de dois touros da raça *Aberdeen Angus*, de fertilidade conhecida, foram descongelados em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Para seleção dos espermatozoides móveis e remoção de diluidores e plasma seminal, foi realizada centrifugação em gradiente descontinuo de Percoll (200 µL de 45% sobre 200 µL de 90%) em 3000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* contendo os espermatozoides viáveis foi ressuspensionado em 1 ml de meio de fertilização, sendo novamente centrifugado a 1700 rpm por 5 min. Os espermatozoides viáveis foram, então, avaliados quanto a motilidade e concentração, sob microscopia de luz, e colocados em meio de fertilização para atingir uma concentração final de 1×10^6 espermatozóides/mL.

Os oócitos maturados foram lavados uma vez em meio TLsêmen e uma vez em meio de fertilização, e então transferidos para gota do meio de fertilização (25 oócitos por gota em 90 µL do meio de fertilização) sob óleo mineral. Os oócitos e os espermatozoides presentes nas

1086 microgotas foram incubados por 18 a 22 horas, a 38,5°C, em atmosfera com 5% de CO₂ e
1087 umidade saturada.

1088 2.1.4. *Cultivo in vitro*

1089 O meio utilizado para o cultivo (CIV) consistiu de meio SOF modificado, como descrito por
1090 Vajta et al. (1999), suplementado com 50 mg/mL de amicacina, 5 mg/mL de BSA e 2,5% de
1091 (v:v) FCS. Após a fertilização (D0), as células do cumulus foram removidas dos presumíveis
1092 zigotos por pipetagens sucessivas, e os oócitos desnudos foram lavados uma vez em meio
1093 TLsêmen, uma vez em meio 50% TLsêmen mais 50% SOF modificado e mais uma vez em
1094 meio SOF modificado, e então transferidos em grupos de 25 oócitos para gotas de 100 µl de
1095 meio SOF modificado. Os embriões foram cultivados *in vitro* (CIV), a 38,5°C, 5% de CO₂ e
1096 umidade saturada, durante 7 dias. O meio de cultivo foi parcialmente substituído com 50 µl de
1097 meio SOF modificado fresco em 48 horas após a fertilização (D3), quando foi avaliada a taxa
1098 de clivagem.

1099 2.1.5. *Avaliação dos embriões*

1100 Foi realizada uma avaliação no dia sete (D7) para verificar as taxas de desenvolvimento. A
1101 classificação foi de acordo com os critérios da IETS (Bó e Mapletoft, 2013) e foram
1102 transferidos apenas embriões classificados como grau I de qualidade. Em seguida os embriões
1103 em estágio de mórula ou blastocisto (D7) foram transferidos, frescos ou vitrificados, para
1104 receptoras Nelore previamente sincronizadas. A taxa de blastocisto foi baseada no número
1105 total de oócitos maturados.

1106 2.2. *Vitrificação e aquecimento*

1107 Os embriões produzidos foram aleatoriamente transferidos frescos (n = 15 ABATE e 271
1108 VIVO) ou após vitrificação/aquecimento (n = 51 ABATE e 28 VIVO).

Todos os materiais usados para o procedimento de vitrificação/aquecimento foram fornecidos pela Ingámed Ltda (Perobal, PR, Brasil), incluindo as soluções de vitrificação (VI-I e VI-II), as soluções de descongelamento (DV-I, DV-II e DV-III) e as hastes de vitrificação (Vitri-Ingá) e suas bainhas plásticas. A técnica two-step foi utilizada para vitrificação dos blastocistos de acordo com Almodin et al. (2010) e Rocha-Frigoni et al. (2013). Resumidamente, os blastocistos expandidos (grau 1 e 2) foram lavados duas vezes em meio de manutenção (SOF suplementado com 250 mM de HEPES e 20% FBS) e transferidos para VI-I e mantidos durante cinco minutos em 37°C. Os embriões foram transferidos para gotas de 10 µl de VI-II por 60 segundos em temperatura ambiente. Na sequência, os embriões foram colocados em meio de manutenção na ponta de uma haste da Vitri-Ingá em quantidade mínima de solução de vitrificação, então eles foram imersos diretamente em nitrogênio líquido (N₂L). As bainhas plásticas, que foram previamente resfriadas em vapor de N₂L por 1 minuto, foram verticalmente imersa em N₂L. A haste Vitri-Ingá foi inserida dentro da bainha plástica para armazenamento. Para o procedimento de descongelamento, a haste Vitri-Ingá foi retirada do N₂L e transferida para solução de descongelamento DV-I por 1 minuto, em temperatura de 37°C. Após isso, os embriões foram transferidos para DVII por 3 minutos a temperatura ambiente e foram lavados duas vezes em DV-III por 5 minutos cada. Os embriões foram lavados duas vezes e cultivados por 2 horas em meio SOF suplementado com 2,5% de FBS e 5 mg/ml de BSA em atmosfera de 5% de CO₂ em umidade saturada. Avaliou-se então a taxa de re-expansão, sendo envasados apenas os considerados viáveis. Os embriões foram então transportados até a propriedade em recipientes térmicos apropriados (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil), mantendo a temperatura entre 36 – 37°C.

2.3. Transferência de embrião em tempo fixo (TETF)

Foram utilizadas como receptoras vacas Nelore, pluríparas com escore corporal variando de 2,5 – 3,5 (escala de 1 a 5, segundo Lowman et al., 1976), com período puerperal médio de 45 dias.

As receptoras foram sincronizadas para transferência de embrião em tempo fixo (TETF) com o seguinte protocolo: no primeiro dia do protocolo (D0) foi inserido dispositivo intravaginal de progestágeno (Cronipress® Mono Dose M-24, Biogénesis Bagó, Curitiba, Paraná, Brasil) e administrado 2 mg de Benzoato de Estradiol (Estrogin, Biofarm, Jaboticabal, São Paulo, Brasil); no dia 8 (D8) foi retirado o dispositivo de progesterona concomitante com aplicação de 112,5 µg de d-cloprostenol (Prolise, Tecnopec, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil), 1 mg de benzoato de estradiol (Estrogin, Biofarm, Jaboticabal, São Paulo, Brasil) e 300 UI de eCG (Folligon® 5000UI, MSD, São Paulo, Brazil). O dia do cio foi considerado o dia 10 (D10), sendo sete dias após realizada a inovulação nos animais que apresentaram corpo lúteo (CL) com no mínimo 20 mm de diâmetro, avaliados por ultrassonografia. O diâmetro e o tipo (compacto ou cavitário) do CL foram avaliados. O diagnóstico de gestação foi realizado 60 dias após inovulação por ultrassonografia.

2.4. Delineamento experimental e análise estatística

A análise estatística foi realizada através de um modelo linear generalizado misto, utilizando procedimento GLIMMIX do SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA), para avaliar o desenvolvimento embrionário e a taxa de prenhez. As variáveis incluídas no modelo usadas para avaliar a taxa de prenhez foi touro, escore de condição corporal (ECC) das vacas no primeiro dia do protocolo de sincronização (escala de 1 - 5, sendo 1 magra e 5 obesa), origem dos oócitos (VIVO ou ABATE), criopreservação (FRESCOS ou VITRIFICADOS), tamanho

de CL e interações. As variáveis em que o efeito não foi significativo ($P < 0,05$) foram eliminadas do modelo.

A probabilidade de prenhez em relação ao diâmetro do CL foi avaliada através de regressão logística, pelo procedimento LOGISTIC do SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Diferenças com $P < 0,05$ foram consideradas significativas, enquanto que tendências foram consideradas quando $0,1 > P \geq 0,05$. Os dados serão apresentados como média $\pm$ desvio padrão (D.P.).

3. Resultados

O total de ovócitos obtidos através de aspiração folicular *in vivo* (VIVO) foi de 950 (média de $16,67 \pm 12,11$ oócitos/ doadora), já a aspiração dos ovários obtidos de abatedouro (ABATE) gerou um total de 582 ovócitos.

As taxas de clivagem foram de $63,96 \% \pm 35,52$ e $39,18 \% \pm 12,17$ para os grupos VIVO e ABATE respectivamente ($P = 0,020$). Houve uma tendência ($P = 0,089$) de superioridade da taxa de blastocisto do grupo VIVO ($30,49 \% \pm 32,34$ e $14,73 \% \pm 11,09$). Do total de embriões em estágio de blastocisto, 66 foram do grupo ABATE e 299 do grupo VIVO, sendo transferidos frescos (286 embriões) ou após vitrificação (79 embriões). A taxa de re-expansão após descongelamento foi de 72,32%. Não houve diferença na taxa de prenhez ($P = 0,72$) para os embriões transferidos a fresco ($34,27 \% \pm 47,5$) ou após vitrificação ($30,38 \% \pm 46,2$), assim como para a origem dos oócitos (VIVO = $35,12 \% \pm 47,8$; ABATE = $25,76 \% \pm 44,0$; $P = 0,17$) (Tabelas 1 e 2). A taxa de prenhez por touro não foi diferente ($P > 0,05$).

Em relação ao diâmetro do corpo lúteo (CL), as receptoras apresentaram um diâmetro médio de $21,5 \pm 3,45$ mm, e não houve influência do tamanho do CL sobre a probabilidade de

gestação (P=0,44). O tipo do CL (compacto ou cavitário) também não influenciou na taxa de gestação (P=0,82).

4. Discussão

A raça Nelore é alta produtora de oócitos, apresentando por sessão de OPU uma média de 25 a 30 oócitos (Pontes et al., 2009; Pontes et al., 2011), aparentemente maior que a observada nas raças taurinas (Pontes et al., 2009; Rubin et al., 2005). No presente estudo observou-se uma média de $16,96 \pm 12,01$ oócitos por procedimento de OPU, no entanto fêmeas Nelore têm uma variação individual considerável no número de folículos e oócitos (Pontes et al., 2011), sendo neste estudo observado uma variação entre 0 a 60 oócitos por sessão de OPU.

A alta população folicular para a raça Nelore contribui para manter o Brasil com status de maior produtor de embriões bovinos *in vitro* do mundo. A raça compõe 80% do rebanho bovino brasileiro, e tem elevado valor de mercado. A expansão da PIVE está intimamente associada à sua produção de oócitos, pois quanto maior o número de oócitos recuperados maior será a produção de embriões e a taxa de gestação resultante (Pontes et al., 2011).

Neste estudo as taxas de clivagem, dependendo da origem do oócito, diferiram entre si, porém as taxas de blastocisto não foram diferentes, apesar de apresentar tendência. As taxas de desenvolvimento obtidas dos oócitos provenientes de OPU foram similares às encontradas por outros autores (taxa de clivagem: 64,0% e taxa de blastocisto: 32,7%; Varago et al., 2006), mesmo com o uso de sêmen sexado (taxa de blastocisto: 33,2%; Xu et al., 2006). Porém, outros estudos mostram uma menor taxa de blastocisto com o uso de sêmen sexado ($12,2\% \pm 2,3$) quando comparado com sêmen convencional ($20,1\% \pm 2,9$; $P < 0,05$), cuja fonte dos oócitos foi ambos de ovários de abatedouro (Wilson et al., 2006). Zhang et al. (2003) não

encontraram diferença significativa na taxa de blastocistos com o uso de sêmen sexado (20,3% $\pm$ 2,2) ou não sexado (22,3% $\pm$ 1,8), mas observaram menor taxa de clivagem ($P < 0,05$) com o uso de sêmen sexado (53,1% $\pm$ 3,3) em relação ao não sexado (69,7% $\pm$ 2,8). Malard et al. (2015) observaram taxas de produção de blastocisto menores quando utilizado sêmen sexado (29% x 37,1%; $P < 0,001$), apesar disso os autores encontraram uma maior taxa de prenhez para os embriões PIV com sêmen sexado (36,9% x 30,1%; $P < 0,001$). Essa variação nos resultados pode ser explicada pela baixa capacidade de fertilização dos espermatozoides após o processo de sexagem (Grant e Chamley, 2007). Entretanto, os resultados algumas vezes se mostram inconsistentes, e diferenças no processo de sexagem do espermatozóide, na maturação, fertilização do oócito e cultivo do embrião tornam de difícil interpretação esses resultados (Mikkola et al., 2015). Apesar dos menores índices da PIVE com sêmen sexado, a proporção de animais nascidos do sexo de interesse pode compensar a utilização da técnica.

Alguns outros fatores podem influenciar na viabilidade do oócito para PIVE, como descrito por Satrapa et al. (2011) um efeito deletério no desenvolvimento embrionário dependente do tempo que o oócito permanece no folículo ovariano após a morte do animal, no caso da aquisição de ovários de abatedouro, e a temperatura que o ovário é armazenado até o momento da aspiração. No presente estudo a baixa taxa de clivagem e blastocisto dos ovários de abatedouro pode ter sido resultado do intervalo de cerca de 6 horas entre a coleta do ovário, transporte e aspiração no laboratório, reduzindo a qualidade do oócito (Satrapa et al., 2011). Maior produção de blastocisto pode ser obtida com intervalo de até quatro horas entre a morte do animal e aspiração dos folículos (Blodin et al., 1997; Sartrapa et al., 2011).

Deve-se considerar também o efeito do touro sobre a taxa de produção de blastocisto, pois a eficiência na PIV pode ser alterada conforme o touro utilizado (Bayeux et al., 2015), já que

tem sido relatada uma grande variabilidade entre touros em programas de PIVE (Xu et al, 2006). Essa variação parece ser maior com o uso de sêmen sexado, afetando as taxas de desenvolvimento embrionário (Palma et al., 2008).

No presente estudo, a taxa de prenhez não variou ($P=0,72$) entre os embriões do grupo FRESCO ($34,27\% \pm 47,5$) ou VITRIFICADO ($30,38\% \pm 46,2$), assim como para a origem dos ovócitos (VIVO = $35,12\% \pm 47,8$; ABATE = $25,76\% \pm 44,0$; $P=0,17$). Stinshoff et al. (2011) observaram nos embriões criopreservados alterações em nível molecular, ou seja, na transcrição de diferentes genes. Como, por exemplo, interferência na secreção do interferon-tau (IFN- τ), que executa papel fundamental no reconhecimento materno da gestação e, dependendo do seu estágio de desenvolvimento, pode indicar uma pior qualidade embrionária com menores chances de desenvolver uma gestação (Araújo et al., 2005; Stinshoff et al., 2011). Vários estudos tem demonstrado efeitos negativos da criopreservação sobre o futuro desenvolvimento embrionário (Cavusoglu et al., 2015), porém os efeitos da criopreservação podem variar de acordo com a espécie animal, raça, origem (*in vitro* ou *in vivo*), composição lipídica do embrião, tamanho e estágio de desenvolvimento, qualidade do embrião/ oócito, permeabilidade das células, toxicidade e propriedade osmótica dos crioprotetores e taxas de resfriamento e aquecimento (Almiñana e Cuello, 2015). De maneira contraditória, para produção *in vitro* de embriões, alguns relatos têm sido publicados, com taxas de gestação razoáveis com o uso de embriões fertilizados com semen sexado (Xu et al., 2006; Pontes et al., 2010) com boa sobrevivência após criopreservação (frescos: 52,8% vs. vitrificados: 42,0%; $P > 0,05$; Trigo et al., 2012). É nítido que nos últimos anos houve progresso significativo com relação aos processos de cultivo e criopreservação dos embriões, independente do uso de sêmen sexado (Xu et al., 2009), o que tem permitido a expansão da utilização da técnica em larga escala, otimizando o uso das receptoras e o acesso a lugares distantes.

Como a origem do oócito também não interferiu na taxa de gestação, esta pode ser uma alternativa interessante para redução do custo, entretanto, atenção deve ser dada no acondicionamento dos ovários e o intervalo até aspiração dos folículos. Porém, mais estudos são necessários para avaliar a produtividade futura dos animais nascidos, pois os ovários obtidos de abatedouro são de animais com mérito genético desconhecido. Com intuito de responder essa, e outras questões, a nossa equipe de pesquisa está avaliando o desenvolvimento dos animais do nascimento até o abate, considerando os diferentes méritos genéticos.

Xu et al. (2006) encontraram taxa de prenhez de 40,9%, após transferência de 3.627 embriões produzidos com sêmen sexado para fêmea, vitrificados, e inovulados em receptoras sincronizadas, quase idêntico quando utilizaram sêmen não sexado (41,9%, n = 481). Porém no presente estudo, os dois touros foram selecionados com base no mérito genético, e não necessariamente na fertilidade *in vitro* e pós sexagem (Xu et al., 2006), mas os resultados da taxa de gestação encontrados no presente trabalho podem ser consideradas satisfatórios.

A obtenção de um corpo lúteo (CL) maior nas receptoras pode elevar a taxa de prenhez (Binelli et al., 2001). Spell et al. (2001) observaram que a variação da concentração sérica de progesterona (P4) é um reflexo das diferentes taxas de desenvolvimento do corpo lúteo. Alguns autores têm observado diferença ($P < 0,05$) sobre a taxa de gestação em relação ao diâmetro do CL, sendo que CL maior representa aumento na probabilidade de gestação (Nogueira et al., 2012). Entretanto, nosso estudo não observou relação entre o diâmetro do CL e a taxa de prenhez, provavelmente pela seleção prévia das receptoras com CL maior que 20 mm de diâmetro, demonstrando a importância da avaliação do diâmetro do CL no momento da transferência (Spell et al., 2001; Looney et al., 2006; Gonella-Diaza et al., 2013). Apesar de Nogueira et al. (2012) não observarem influência da concentração de progesterona sérica

no momento da ovulação sobre a taxa de prenhez, encontraram uma correlação positiva entre o diâmetro do CL e a concentração de progesterona ($r=0,32$; $P<0,05$). Já Leal et al. (2009) observaram que não houve influência do volume do CL nas taxas de prenhez ($P = 0,49$). Entretanto, no trabalho citado, a avaliação foi subjetiva e por meio de palpação transretal. Essa avaliação deve ser feita por meio de ultrassonografia (US), que possui maior sensibilidade e especificidade do que a palpação transretal, além de depender diretamente da experiência do examinador (Leal *et al.*, 2009). Gonella-Díaz et al. (2013) analisando 17.521 transferências de embriões, com taxa de prenhez de 31,4% (5.495), observaram associação positiva entre a taxa de prenhez e o diâmetro do CL ($P<0,01$). É esperada uma maior concentração de progesterona quanto maior a massa luteal, entretanto fatores como fluxo sanguíneo, presença de agentes luteotróficos ou luteolíticos, fatores de crescimento e a disponibilidade de precursores para a biossíntese da progesterona podem interferir nesse resultado (Skarzynski et al., 2008).

Alguns trabalhos também demonstraram não haver influência negativa ($P>0,05$) com relação ao tipo de CL (compacto ou cavitário) sobre a taxa de gestação (Leal et al., 2009; Nogueira et al., 2012; Barreiros et al., 2006). Segundo Nogueira et al. (2012) não há diferença entre CL compacto e cavitário, sendo apenas uma diferença morfológica, não afetando a produção de progesterona e a taxa de prenhez. Barreiros et al. (2006), utilizando protocolo de sincronização da ovulação, classificaram 22,7% do CL como cavitário (CV) e 77,2% como compacto (CP) e não observaram diferenças na taxa de prenhez (41,1% CV; 38,3% CP), sendo que no presente estudo foi observado semelhante proporção de CL cavitário (38,7%) e compacto (61,3%), também sem interferir na taxa de gestação ($29,3\pm 33,3\%$ CV; $25,0\pm 43,5\%$ CP; $P>0,05$).

5. Conclusão

Conclui-se que a utilização de sêmen sexado associado à vitrificação é viável para aplicação em larga escala da PIVE, apresentando taxas de prenhez semelhantes aos embriões inovulados a fresco em receptoras Nelore. Além disso, a taxa de gestação com embriões produzidos a partir de ovários de abatedouro é semelhante aos provenientes de OPU, podendo ser alternativa para produção de embriões PIV visando bezerros de corte superiores.

6. Referências

- Almiñana, C., & Cuello, C. (2015). What is new in the cryopreservation of embryos? *Animal Reproduction*, 12, 418-427.
- Almodin, C.A., Minguetti-Camara, V.C., Paixao, C.L., & Pereira, P.C. (2010). Embryo development and gestation using fresh and vitrified oocytes. *Human Reproduction*, 25, 1192–1198.
- Andrade, G.A., Fernandes, M.A., Knychala, R.M., Pereira Junior, M.V., Oliveira, A.J., Nunes, D.P., Bonato, G.L., & Santos, R.M. (2012). Factors affecting pregnancy rate of recipients of bovine embryos produced *in vitro*. *Brazilian Journal of Animal Reproduction*, 36, 66-69.
- Araújo, M.C.C., Vale Filho, V.R., Ferreira, A.M., Sá, W.F., Barreto Filho, J.B., Camargo, L.S.A., Serapião, R.V., & Silva M.V.G.B. (2005). Secreção de interferon-tau em embriões bovinos produzidos *in vitro* frescos e congelados. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 57, 751-756.

- 1320 Barreiros, T.R.R., Blaschi, W., Borsato, E.A., Ludwig, H.Ê., Silva, D.R.M., & Seneda, M.M.
 1321 (2006). Comparison the pregnancy rates between bovine recipients with cavitary or compact
 1322 corpus luteum after cloprostenol or fixed time embryo transfer. *Semina: Ciências Agrárias*,
 1323 27, 657-664.
- 1324 Bayeux, B.M., Monteiro, F.M., Batista, E.O.S., Vieira, L.M., Accorsi, M.F., Campanholi,
 1325 S.P., Dias, E.A.R., Souza, A.H., & Baruselli, P.S. (2015). *In vitro* embryo production of
 1326 Nelore (*Bos indicus*) donors submitted to a commercial program during 12 months. *Animal*
 1327 *Reproduction, Abstracts*, 12, 355.
- 1328 Bermejo-Álvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P., & Gutiérrez-Adán, A. (2008). Can
 1329 Bovine In Vitro-Matured Oocytes Selectively Process X- or Y-Sorted Sperm Differentially?
 1330 *Biology of Reproduction*, 79, 594–597.
- 1331 Binelli, M., Thatcher, W. W., Mattos, R., & Baruselli, P. S. (2001). Antiluteolytic strategies to
 1332 improve fertility in cattle. *Theriogenology*, 56, 1451-1463.
- 1333 Block, J., Hansen, P.J., Loureiro, B., Bonill L. (2011). Improving post-transfer survival of
 1334 bovine embryos produced *in vitro*: Actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating
 1335 factor-2 and hyaluronan. *Theriogenology*, 76, 1602–1609.
- 1336 Blondin P., Coenen K., Guilbault L.A., & Sirard M.A. (1997). In vitro production of bovine
 1337 embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*, 47,
 1338 1061–1075.
- 1339 Blondin, P. (2015). Status of embryo production in the world. *Animal Reproduction*, 12, 356-
 1340 358.
- 1341 Bó, G.A., & Mapletoft, R.J. (2013). Evaluation and classification of bovine embryos. *Animal*
 1342 *Reproduction*, 10, 344-348.

- 1343 Cavusoglu, T., Popken, J., Guengoer, T., Yilmaz, O., Uyanikgil, Y., Ates, U., Baka, M.,
 1344 Oztas, E., & Zakhartchenko, V. (2016). Ultra-Structural Alterations in *In Vitro* Produced
 1345 Four-Cell Bovine Embryos Following Controlled Slow Freezing or Vitrification. *Anatomia,*
 1346 *Histologia, Embryologia*, 45, 291–307.
- 1347 Frijters, A.C.J., Mullaart, E., Roelofs, R.M.G., Hoorne, R.P.V., Moreno, J.F., Moreno, O., &
 1348 Merton, J.S. (2009). What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the
 1349 sorting process? *Theriogenology*, 71, 64–67.
- 1350 Gonella-Diaza, A.M., Holguín, G., Montaña, D., & Valbuena, D. (2013). Corpus luteum
 1351 diameter and embryo developmental stage are associated with pregnancy rate: data analysis
 1352 from 17,521 embryo transfers from a commercial *in vitro* bovine embryo production program.
 1353 *Animal Reproduction*, 10, 106-111.
- 1354 Grant V.J., & Chamley L.W., (2007). Sex-sorted sperm and fertility: An Alternative View.
 1355 *Biology of Reproduction*, 76, 184–188.
- 1356 Leal, L.S., Oba, E., Fernandes, C.A.C., & Sá Filho, O.G. 2009. Evaluation of corpus luteum,
 1357 uterine contractility and progesterone and estradiol plasmatic concentrations in recipients of
 1358 bovine embryos. *Ciência Animal Brasileira*, 10, 174-183.
- 1359 Liu, X., Hu, T., Sun, W., Hao, H., Liu, Y., Zhao, X., Zhu, H., & Du, W. (2015). Comparison
 1360 of the developmental competence and quality of bovine embryos obtained by *in vitro*
 1361 fertilization with sex-sorted and unsorted semen from seven bulls. *Livestock Science*, v.181,
 1362 263–270.
- 1363 Looney, C.R., Nelson, J.S., Schneider, H.J., & Forrest, D.W. (2006). Improving fertility in
 1364 beef cow recipients. *Theriogenology*, 65, 201–209.

- 1365 Lowman, B.G., Scott, N.A., & Somerville, S.H. (1976). Condition scoring of cattle, Bulletin
1366 No.6 (revised edition), East of Scotland College of Agriculture, 31p.
- 1367 Malard, P.F., Oliveira, L.G.A., Santos, A.L., & Queiroz, L.M.V. (2015). Comparasion of IVF
1368 embryo production and pregnancy, using conventional sperm and sex-sorted sperm in cattle.
1369 *Animal Reproduction, Abstract*, 12, 681.
- 1370 Mikkola, M., Andersson, M., & Taponen, J. (2015). Transfer of cattle embryos produced with
1371 sex-sorted semen results in impaired pregnancy rate and increased male calf mortality.
1372 *Theriogenology*, 84, 1118–1122.
- 1373 Moreno, E.R., Arias, A.L., Mogollon, E.M., Rodriguez, A.C., Carvalho, B.P., & Dubeibe,
1374 D.F. (2015). Influence of ovarian status on bovine *in vitro* embryo production. *Animal*
1375 *Reproduction, Abstract*, 12, 705.
- 1376 Nogueira, E., Cardoso, G.S., Marques Junior, H.R., Dias, A.M., Ítavo, L.C.V, & Borges, J.C.
1377 (2012). Effect of breed and corpus luteum on pregnancy rate of bovine embryo recipients.
1378 *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41, 2129-2133.
- 1379 Nogueira, E., Pantoja, T.A.R., Pedroso, M.F., Marques Junior, H.R., Borges, J.C., Dias, A.M.,
1380 & Itavo, L.C.V. (2013). Comparison of estrous synchronization protocols to bovine embryos
1381 recipients. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, 14, 558-564.
- 1382 Palma, G. A., Olivier N. S., Neumüller Ch., & Sinowatz F. (2008). Effects of Sex-sorted
1383 Spermatozoa on the Efficiency of in vitro Fertilization and Ultrastructure of in vitro Produced
1384 Bovine Blastocysts. *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 37, 67–73.
- 1385 Parrish, J.J. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, 38,
1386 1171–1180.

- 1387 Ponsart, C., & Pozzi, N. (2013). Sanitary requirements for bovine gametes and embryos in
1388 international trade. *Animal Reproduction*, 10, 283-296.
- 1389 Pontes, J.H.F., Nonato-Junior, I., Sanches, B.V., Ereno-Junior, J.C., Uvoa, S., Barreiros,
1390 T.R.R., Oliveira, J.A., Hasler, J.F., & Seneda, M.M. (2009). Comparison of embryo yield and
1391 pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor
1392 cows. *Theriogenology*, 71, 690–697.
- 1393 Pontes, J.H.F., Sterza F.A.M., Basso, A.C., Ferreira, C.R., Sanches, B.V., Rubinc, K.C.P., &
1394 Seneda, M.M. (2011). Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a
1395 large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*,
1396 75, 1640–1646.
- 1397 Rocha-Frigoni, N.A.S., Leão, B.C.S., Nogueira, É., Accorsi, M.F., & Mingoti, G.Z. (2013).
1398 Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated
1399 with increases in cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro* in the presence of
1400 antioxidants. *Reproduction Fertility and Development*, 25, 797–805.
- 1401 Rodrigues, C.F.M. (2014). Historical context of cattle embryo transfer technique in Brazil.
1402 *Animal Reproduction*, 11, 137-140.
- 1403 Rodrigues, W.B., Wechsler, F.S., & Nogueira, E. (2015). Reproductive Performance and
1404 Reconception of Nelore Cows According to Their Pure- or Cross-Bred Calves. *Reproduction*
1405 *Domestic Animal*, 50, 431–436.
- 1406 Rubin, K.C.P., Pontes, J.H.F., Nonato Jr., I., Ereno Jr., J.C., Pansard, H., & Seneda, M.M.
1407 (2005). Influência do grau de sangue Nelore na produção *in vitro* de ovócito. *Acta Scientiae*
1408 *Veterinariae, Suplemento*, 33, 183.

- 1409 Satrapa, R.A., Nabhan, T., Silva, C.F., Simões, R.A.L., Razza, E.M., Puelker, R.Z., Trinca,
 1410 L.A., & Barros, C.M. (2011). Influence of sire breed (*Bos indicus* versus *Bos taurus*) and
 1411 interval from slaughter to oocyte aspiration on heat stress tolerance of *in vitro*-produced
 1412 bovine embryos. *Theriogenology*, 76, 1162–1167.
- 1413 Seidel Jr, G. E. (2014). Update on sexed semen technology in cattle. *Animal*, 8, 160–164.
- 1414 Skarzynski, D.J., Ferreira-Dias, G., & Okuda, K. (2008). Regulation of Luteal Function and
 1415 Corpus Luteum Regression in Cows: Hormonal Control, Immune Mechanisms and
 1416 Intercellular Communication. *Reproduction in Domestic Animal*, 43, 57–65.
- 1417 Spell, A. R., Beal, W. E., Corah, L. R., & Lamb, G. C. (2001). Evaluating recipient and
 1418 embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*,
 1419 56, 287-297.
- 1420 Stinshoff, H., Wilkening, S., Hanstedt, A., Brüning, K., & Wrenzycki, C. (2011).
 1421 Cryopreservation affects the quality of *in vitro* produced bovine embryos at the molecular
 1422 level. *Theriogenology*, 76, 1433–1441.
- 1423 Trigal, B., Gómez, E., Caamaño, J.N., Muñoz, M., Moreno, J., Carrocera, S., Martín, D., &
 1424 Diez, C. (2012). In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-
 1425 sorted sperm. *Theriogenology*, 78, 1465–1475.
- 1426 Vajta, G., Rindom, N., Peura, T.T., Holm, P., Greve, T., & Callesen, H. (1999). The effect of
 1427 media, serum and temperature on in vitro survival of bovine blastocysts after open pulled
 1428 straw (OPS) vitrification. *Theriogenology*, 52, 939–948.
- 1429 Varago, F.C., Saliba, W.P., Alvim, M.T.T., Vasconcelos, A.B., Oliveira, C.H., Stahlberg, R.,
 1430 & Lagares, M.A. (2006). Vitrification of *in vitro* produced Zebu embryos. *Animal*
 1431 *Reproduction*, 3, 353-358.

- 1432 Wheeler, M.B., Rutledge, J.J., Fischer-Brown, A, VanEtten, T., Malusky, S., & Beebe, D.J.
 1433 (2006). Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle.
 1434 *Theriogenology*, 65, 219–227.
- 1435 Wilson, R.D., Fricke, P.M., Leibfried-Rutledge, M.L., Rutledge, J.J., Syverson Penfield,
 1436 C.M., & Weigel, K.A. (2006). In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm.
 1437 *Theriogenology*, 65, 1007–1015.
- 1438 Xu J., Guo Z., Su L., Nedambale T. L., Zhang J., Schenk J., Moreno J. F., Dinnyés A., Ji, W.,
 1439 Tian, X. C., Yang, X., & Du, F. (2006). Developmental Potential of Vitrified Holstein Cattle
 1440 Embryos Fertilized In Vitro with Sex-Sorted Sperm. *Journal of Dairy Science*, 89, 2510–
 1441 2518.
- 1442 Xu, J., Chaubal S.A., & Du F. (2009). Optimizing IVF with sexed sperm in cattle.
 1443 *Theriogenology*, 71, 39–47.
- 1444 Zhang, M., Lu, K.H., & Seidel Jr., G.E. (2003). Development of bovine embryos after in vitro
 1445 fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from
 1446 different bulls. *Theriogenology*, 60, 1657–1663.
- 1447
- 1448 Tabela 1. Taxa de clivagem, blastocisto e prenhez para embriões PIV com sêmen sexado de
 1449 acordo com a origem do oócito, se através de aspiração *in vivo* (vivo) ou de ovário de
 1450 abatedouro (abate).

	Vivo (299)	Abate (66)	Erro padrão	P
Taxa de clivagem	63,96 %	39,18%	10,22	0,020
Taxa de blastocisto	30,49%	14,73%	9,13	0,089
Taxa de prenhez	35,12%	25,76%	0,39	0,17

1451

1452 Tabela 2. Taxa de prenhez para embriões PIV com sêmen sexado de acordo com o tratamento
1453 antes da inovulação, se a fresco ou após vitrificação.

	Fresco (286)	Vitrificado (79)	Erro padrão	P
Taxa de prenhez	34,27%	30,38%	0,35	0,72

1454

1455

1456

1457

1458

1459

1460

1461

1462

1463

1464

1465

1466

1467

1468

1469

1470

1471

CAPÍTULO 2

Normatizado segundo Periódico: **Livestock Science**

<http://www.livestockscience.com/content/authorinfo>

Avaliação econômica da inseminação artificial em tempo fixo *versus* transferência de embrião em tempo fixo com embriões PIV para produção de bezerros de corte cruzados.

Alexandre de Oliveira Bezerra^a, Walvonvitis Baes Rodrigues, Natalia Albanese Anache^a,
Karine Casanova da Silva^a, Jean do Prado Jara, Fabiana de Andrade Melo Sterza^c, Alessandra
Corallo Nicacio^d, Ériklis Nogueira^{a,b}

^a Mestrado em Ciências Veterinárias, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil.

^b Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Pantanal, CPAP, Corumbá, MS, Brasil.

Endereço para correspondência: eriklis.nogueira@embrapa.br

^c Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, UEMS, Aquidauana, MS, Brasil.

^d Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Gado de Corte, CNPCG, Campo Grande, MS, Brasil.

Resumo

Com a crescente demanda por alimentos de qualidade, se faz necessária a integração de novas biotecnologias para aumentar a produtividade do setor pecuário. Esse estudo visa dar subsídios para tomada de decisão no processo produtivo, com estratégias que reduzam o custo e maximizem os ganhos. Objetivou-se comparar a aplicação da tecnologia de PIV de embriões com sêmen sexado para produção de bezerros machos cruzados geneticamente superiores em relação à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com sêmen

convencional, avaliando o custo e a viabilidade econômica das técnicas empregadas. Assim foram aplicadas duas técnicas, PIV/TETF ou IATF, em fazendas comerciais, avaliando-se o custo e os ganhos gerados pelo processo. Para a PIVE, os oócitos foram coletados de doadoras Nelore e fertilizados *in vitro* com sêmen sexado para macho de dois touros Angus (*B. taurus*). Os embriões foram cultivados (CIV) por 7 dias, e apenas os considerados grau I de qualidade foram transferidos a fresco (n= 271). As receptoras foram sincronizadas em dia aleatório do ciclo estral (D0) para realização de transferência de embrião em tempo fixo (TETF). O D10 foi considerado o dia do cio e no D17 as receptoras que possuíam corpo lúteo maior que 20 mm de diâmetro foram inovuladas. Já para o grupo IATF, vacas Nelore foram sincronizadas em dia aleatório do ciclo estral e inseminadas no D10 com sêmen convencional dos mesmos touros usados no grupo PIV/TETF. O diagnóstico de prenhez foi realizado 60 dias após inovulação ou inseminação, e os custos de produção foram calculados utilizando planilha CEPEA . Para a produção dos embriões, $16,67 \pm 12,11$ oócitos foram recuperados por OPU, com taxa de clivagem e de blastocisto de $63,96 \% \pm 35,52$ e $30,49\% \pm 32,34$, respectivamente. A taxa de prenhez foi de 35,42% para TETF e 47,70% para IATF ($P < 0,05$). Considerando a taxa de prenhez ao final da estação de monta (EM) de 80% e taxa de mortalidade até a desmama de 5%, o sistema com TETF produziu 51,5% de bezerros machos e 24,5% de fêmeas em relação ao total de vacas em reprodução, enquanto que a IATF 38,0% de macho, com mesma proporção de fêmeas. Em relação à IATF, o sistema TETF apresentou maior custo (R\$ 637,37 vs. 557,81), porém maior lucratividade.

Palavras-chave: bezerros cruzados, produtividade, PIV, IATF, custo de produção.

Destaques (Arquivo separado na submissão)

► Avaliação da viabilidade econômica da PIV/TETF com sêmen sexado. ► Maximização da produção de bezerros de corte superiores. ► Comparação da PIV/TETF com IATF em sistema produtivo convencional.

1. Introdução

É evidente que o aumento da população mundial, acarretando crescente demanda por alimentos, desafia o setor de produção animal a produzir mais em menos tempo (Blondin, 2015). Porém, além do aumento quantitativo, a exigência mercadológica relacionada à qualidade desses alimentos é constante, representando mais um dos desafios de quem produz alimentos de origem animal. O setor agropecuário se beneficiará ao integrar novas tecnologias em seus sistemas de produção, garantindo sustentabilidade e produtividade, compensando a demanda global por alimentos (Blondin, 2015).

Dentre as biotecnologias que permitem intensificar os sistemas de produção, as inovações na área das Tecnologias de Reprodução Assistida (TRA's) permitem ganhos em eficiência e rentabilidade ao setor pecuário. Dentre as TRA's destacam-se a inseminação artificial (IA), criopreservação de sêmen, sincronização de estro, transferência de embriões (TE), congelamento e sexagem de embriões, produção *in vitro* (PIV), clonagem e sexagem de sêmen (Blondin, 2015). A produção *in vitro* de embriões (PIVE), permite melhor utilização dos animais de genética superior e aperfeiçoar os esquemas de cruzamento (Block et al., 2011).

O real sentido do uso das TRAs está ligado à produção de animais em quantidade e custo satisfatórios com o sistema de produção (Sá Filho et al., 2014). Um maior impacto da utilização da PIVE pode ser alcançado com a sua aplicação associada à sexagem de espermatozoides (Rumpf, 2007), possibilitando produção de embriões do sexo de interesse para o sistema de criação (Baruselli et al., 2007; Sá Filho et al., 2014). Para a pecuária de

1541 corte, o bezerro macho apresenta maior valor agregado, devido a melhor conversão alimentar
1542 e maior rendimento de carcaça (Coutinho Filho et al., 2006; Sá Filho et al., 2014). Entretanto,
1543 os resultados do sêmen sexado ainda são limitados para outras biotecnologias, como a
1544 inseminação artificial em tempo fixo (IATF), isso devido à baixa capacidade de fertilização e
1545 a baixa dose inseminante (Seidel Júnior, 2014).

1546 Também está estabelecido que o cruzamento entre raças bovinas é uma importante ferramenta
1547 para incrementar a produção de carne, resultando em sinergia das características de
1548 adaptabilidade e produtividade nos diferentes sistemas produtivos do Brasil (Koger, 1980;
1549 Teixeira e Albuquerque, 2003). Assim sendo, outra possibilidade que vem sendo explorada
1550 atualmente, apesar de incipiente, é a utilização da PIVE para produzir cruzamentos terminais
1551 em gado de corte (Viana e Figueiredo, 2015). Contudo, o produtor deve construir um
1552 processo que o leve a tomada de decisões seguras que conduzam a melhoria no desempenho
1553 produtivo e econômico da atividade (Cezar, 2001). Ao avaliar o impacto econômico da
1554 aplicação da biotecnologia de PIVE deve-se considerar a proporção entre sexos, a taxa de
1555 produção de embriões, prenhez e nascimento, o que pode viabilizar ou não a implantação
1556 dessa tecnologia (Mikkola et al., 2015). O número de receptoras necessárias e a sua taxa de
1557 aproveitamento também influencia diretamente o custo final da prenhez (Beltrame et al.,
1558 2010).

1559 A IATF é outra biotecnologia reprodutiva amplamente usada, que permite aumentar o número
1560 de descendentes de animais geneticamente superiores, alcançando taxas médias de prenhez ao
1561 redor de 50% (Sá Filho et al., 2009). Porém o uso da PIVE tem sido limitada pelos menores
1562 índices de prenhez gerados (~30-40% de prenhez; Pontes et al., 2009; 2010). A otimização
1563 dessa biotecnologia, com o uso do sêmen sexado e cruzamentos de animais de alto mérito

genético para características produtivas, permitirá sua implantação em sistemas comerciais com melhor relação custo/benefício.

Vários fatores tornam a implantação de ambas tecnologias, tanto a IATF como TETF, um empreendimento de alto risco. Na tentativa de auxiliar a tomada de decisão no processo produtivo objetivou-se, com a realização desse trabalho, estimar a viabilidade econômica da aplicação da tecnologia de PIVE com sêmen sexado para produção de bezerros machos cruzados superiores em comparação ao uso da inseminação artificial em tempo fixo (IATF) com sêmen convencional, tendo como base a avaliação dos índices obtidos em uma fazenda comercial de gado de corte e os custos para implantação.

2. Material e Métodos

2.1. Delineamento experimental

O experimento foi conduzido na região Centro-Oeste do Brasil, em Mato Grosso do Sul, no período de outubro de 2015 a fevereiro de 2016, em propriedade rural que possui 1000 vacas em reprodução. Foram realizadas avaliações de acordo com a biotecnologia implantada, IATF e PIV/TETF. Após os procedimentos de IATF ou TETF, as vacas foram acasaladas com touros Nelore com relação touro vaca de 1:40, em estação de monta (EM) de 90 dias.

2.2. Produção de embriões in vitro

2.2.1. Coleta dos oócitos

Para produção dos embriões *in vitro*, os oócitos bovinos foram obtidos por aspiração guiada por ultrassonografia (OPU). Todas as doadoras eram da raça nelore, saudáveis e estavam ciclando. As doadoras tinham idade entre 18 – 36 meses e escore corporal entre 2,5 e 3 (em

uma escala de 1 a 5, segundo Lowman et al., 1976). Os animais foram mantidos em pastagem de *Brachiaria brizanta*, com suplementação mineral *ad libitum*. As aspirações foram realizadas com intervalo de 15 a 22 dias, independente do estágio do ciclo estral, totalizando duas sessões de OPU.

Antes de cada sessão de OPU, as fezes foram removidas do reto, realizada a limpeza da região perineal com papel toalha e anestesia epidural com lidocaína 2% (Anestésico L, Eurofarma, Campo Belo, São Paulo, Brasil), na dose de 0,02 mg/kg, para reduzir os movimentos peristálticos e o desconforto.

A coleta foi realizada com auxílio de um equipamento de ultrassonografia (Aloka 500), com transdutor microconvexo de 7,5 MHz acoplado em guia especial para aspiração (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil). Os folículos entre 2 – 8 mm foram puncionados com agulha descartável de 20 gauge (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil) conectada via tubo de silicone (1,20 m) a um tubo tipo Falcon e sistema de vácuo de aspiração (WTA, Cravinhos, São Paulo, Brasil) com pressão negativa de 70 mmHg. O meio de coleta foi o *Tissue Culture Medium* 199 (TCM-199).

Após a aspiração, o material foi filtrado através do filtro Emcon com solução fosfatada tamponada (PBS – phosphate buffered saline, Nutricell, Campinas São Paulo, Brasil). Os complexos *cumulus* oócitos (COCs) imaturos recuperados foram quantificados e classificados morfolologicamente como viáveis ou inviáveis, sendo considerados viáveis aqueles com presença de múltiplas camadas compactas de células do *cumulus* e ooplasma homogêneo, e os inviáveis os desnudos ou picnóticos, com ooplasma heterogêneos e/ou vesículas apoptóticas.

2.2.2. *Maturação in vitro*

O meio de MIV consistiu de TCM-199 suplementado com 10% (v:v) de soro fetal bovino (FCS), 0,2 mM de piruvato de sódio, 25 mM de bicarbonato de sódio, 50 mg/mL de amicacina, 0,5 mg/mL de FSH (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), e 100 UI/mL de hCG (Vetecor; Hertape Calier). Para MIV, os COCs selecionados foram transferidos para microgotas de 400 µL do meio de maturação sob óleo mineral, com 30 a 40 oócitos por gota, e mantidos em estufa por 22 - 24 horas a 38,5°C, 5% de CO₂ em umidade saturada do ar.

2.2.3. Fertilização in vitro

O meio de fertilização consistiu de Tyrode's albumin lactate pyruvate (TALP), como descrito por Parrish (1988), contendo 0,2 mM de piruvato de sódio, 6 mg/mL de BSA, 25 mM de bicarbonato de sódio, 13 mM de lactato de sódio, 50 mg/mL de amicacina, 40 µL/mL de solução PHE (concentração final de 20 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina, 2 µM de epinefrina), e 10 mg/mL de heparina. Sêmen sexado congelado de dois touros da raça Aberdeen Angus, de fertilidade conhecida, foi descongelado em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Para seleção dos espermatozoides móveis e remoção de diluidores e plasma seminal, foi realizada centrifugação em gradiente descontinuo de Percoll (200 µL de 45% sobre 200 µL de 90%) em 3000 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* contendo os espermatozoides viáveis foi ressuspensionado em 1 ml de meio de fertilização, sendo novamente centrifugado a 1700 rpm por 5 min. Os espermatozoides viáveis foram, então, avaliados quanto a motilidade e concentração, sob microscopia de luz, e colocados em meio de fertilização para atingir uma concentração final de 1×10^6 espermatozóides/ml.

Os oócitos maturados foram lavados uma vez em meio TLsêmen e uma vez em meio de fertilização, e então transferidos para gota do meio de fertilização (25 oócitos por 90 µl do meio de fertilização) sob óleo mineral. Os oócitos e os espermatozoides presentes nas

microgotas foram incubados por 18 a 22 horas, a 38,5°C, em atmosfera com 5% de CO₂ e umidade saturada.

2.2.4. *Cultivo in vitro*

O meio utilizado para o cultivo (CIV) consistiu de meio SOF modificado, como descrito por Vajta et al. (1999), suplementado com 50 mg/mL de amicacina, 5 mg/mL de BSA e 2,5% de (v:v) FCS. Após a fertilização (D0), as células do cumulus foram removidas dos presumíveis zigotos por pipetagens sucessivas, e os oócitos desnudos foram lavados uma vez em meio TLsêmen, uma vez em meio 50% TLsêmen mais 50% SOF modificado e mais uma vez em meio SOF modificado, e então transferidos em grupos de 25 oócitos para gotas de 100 µl de meio SOF modificado (Embryo Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil). Os embriões foram cultivados *in vitro* (CIV), a 38,5°C, 5% de CO₂ e umidade saturada, durante 7 dias. O meio de cultivo foi parcialmente substituído com 50 µl de meio SOF modificado fresco em 48 horas após a fertilização (D3), quando foi avaliada a taxa de clivagem.

A taxa de blastocisto foi avaliada no dia sete (D7) (número de blastocisto/número de COCs). Em seguida os embriões em estágio de blastocisto considerados grau I (Bó e Mapletoft, 2013) foram transferidos a fresco para receptoras Nelore previamente sincronizadas.

2.2.5. *Transferência de embriões*

Todas as receptoras eram vacas Nelore, pluríparas. O intervalo médio do último parto foi de 45 dias. Escore corporal variando de 2,5 – 3,5 (escala de 1 a 5, segundo Lowman et al., 1976). As receptoras foram sincronizadas para transferência de embrião em tempo fixo (TETF) com o seguinte protocolo: no primeiro dia do protocolo (D0) foi inserido dispositivo intravaginal de progestágeno (Cronipress® Mono Dose M-24, Biogénesis Bagó, Curitiba, Paraná, Brasil) e administrado 2 mg de Benzoato de Estradiol (Estrogin, Biofarm, Jaboticabal, São Paulo,

Brasil); no dia 8 (D8) foi retirado o dispositivo de progestágeno concomitante com aplicação de 112,5 µg de d-cloprostenol (Prolise, Tecnopec, Embu-Guaçu, São Paulo, Brasil), 1 mg de benzoato de estradiol (Estrogin, Biofarm, Jaboticabal, São Paulo, Brasil) e 300 UI de ECG (Folligon® 5000UI, MSD, São Paulo, Brazil). O dia do cio foi considerado o dia 10 (D10), sendo sete dias após realizada a inovulação nos animais que apresentaram corpo lúteo com no mínimo 20 mm de diâmetro, avaliados por ultrassonografia.

2.3. Inseminação artificial em tempo fixo

Para o grupo IATF os animais passaram por avaliação ginecológica em dia aleatório do ciclo estral (D0) e receberam dispositivo intravaginal de progestágeno (Cronipress® Mono Dose M-24, Biogenesis Bago, Paraná, Brasil) e administração de 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin®, Biofarm, São Paulo, Brasil). No D8, o implante foi retirado e aplicado 1 mg de cipionato de estradiol (ECP®, Zoetis, Brasil), 150µg de d-cloprostenol (Prolise®, Arsa, Argentina) e 300 UI de eCG (Folligon® 5000UI, MSD, São Paulo, Brasil). No D10, 48 horas após a retirada do implante, as vacas foram inseminadas com sêmen convencional previamente avaliado dos mesmos touros usados no grupo PIV/TETF sexado.

O diagnóstico de gestação foi realizado 60 dias após a inovulação ou inseminação, dependendo do tratamento.

2.4. Análise dos dados

No sistema IATF foi avaliada a taxa de prenhez e estimou-se em 50% a proporção de bezerros machos, enquanto que para PIV/TETF considerou-se, as taxas de recuperação de oócitos, clivagem e blastocisto, e a taxa de prenhez com 90% de machos produzidos (Frijters *et al.*, 2009). A planilha para coleta e análise dos dados foi criada dentro do escopo do projeto Indicadores Pecuários, desenvolvido pelo Centro de Estudos Avançados em Economia

Aplicada (CEPEA), e pela Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil (CNA). O objetivo foi desenvolver ferramenta de coleta de dados, e de suporte para análise dos painéis dos sistemas de produção em pecuária de corte das principais regiões de bovinocultura de corte do Brasil (Mello et al., 2013). A planilha foi sistematizada segundo a metodologia descrita em documento do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA, 2010). Em todos os casos levou-se em conta o custo da operação para produzir um bezerro e os índices zootécnicos, para os diferentes sistemas, salientando-se que os custos adicionais como nutrição (suplementação animal), mão-de-obra, sanidade (vacinas, antibióticos, controle parasitário e medicamentos em geral), hormônios para sincronização de cios e ovulação e manutenção/depreciação das instalações (equipamentos e benfeitorias) foram considerados os mesmos para ambos sistemas. Para o grupo PIVE, os custos adicionais forma o procedimento de OPU, PIVE e inovulação, além do sêmen sexado (4 doses). No Grupo IATF, os custos adicionais foram o sêmen convencional (239 doses) e o processo de inseminação (Tabela 1). A análise estatística foi realizada utilizando-se o PROC GLIMMIX do SAS, e diferenças com $P < 0,05$ foram consideradas significativas.

3. Resultados

No processo de PIVE obteve-se média de $16,67 \pm 12,11$ oócitos recuperados por procedimento de OPU, com taxa de clivagem e de blastocisto de $63,96 \% \pm 35,52$ e $30,49\% \pm 32,34$, respectivamente. Foram transferidos a fresco apenas os embriões considerados grau I de qualidade ($n=271$) (Bó e Mapletoft, 2013), resultando em taxa de prenhez de 35,42%. Já os animais inseminados em tempo fixo (IATF) ($n=239$) apresentaram maior taxa de prenhez ($47,70\%$; $P < 0,05$).

1701 Após os resultados de prenhez de IATF ou TETF, simulou-se a implantação de ambos
1702 sistemas em uma propriedade com 1000 matrizes durante o período da EM, utilizando taxa de
1703 prenhez de 80% ao final da EM com repasse de touros Nelore (*Bos indicus*).

1704 Para o grupo PIVE, considerando que a citometria de fluxo, a forma de sexagem utilizada
1705 para os espermatozoides da FIV, pode ter cerca de 90% de acurácia (Tubman *et al.*, 2004;
1706 Frijters *et al.*, 2009), estimou-se, a partir da taxa de prenhez, uma taxa de nascimento de
1707 bezerros machos cruzados de 31,9% e de fêmeas cruzadas de 3,5% para os embriões PIV.
1708 Além de 44,6% de nascimento de bezerros e bezerras produzidos por monta natural do
1709 repasse com touros. Utilizando uma taxa de mortalidade até o desmame de 5%, as taxas de
1710 desmame seriam 30,3% e 3,4%, respectivamente para machos e fêmeas cruzados, enquanto
1711 que de 21,2% para machos e 21,2% para fêmeas de bezerros Nelore oriundos de monta
1712 natural, totalizando 51,5% de bezerros machos e 24,5% de fêmeas.

1713 Já para o sistema com uso da IATF, apesar da maior taxa de prenhez, estimou-se um total de
1714 23,85% de bezerros machos e 23,85% fêmeas produtos de inseminação, pois nesse caso se
1715 utilizou sêmen convencional com proporção entre sexos igual (1:1) (Xu *et al.*, 2009). Da
1716 mesma forma, prevendo uma taxa de prenhez ao final da estação de monta de 80%, estimou-
1717 se um total de 32,4% de bezerros provenientes de monta natural. Considerando 5% a taxa de
1718 mortalidade até o desmame, os cruzados oriundo de IATF seriam 45,4% (22,7% machos e
1719 22,7% fêmeas) e os Nelore oriundos de Monta natural totalizando 30,6 % (15,3% machos e
1720 15,3% fêmeas). O total de bezerros machos desmamados foi de 38,0%, mesma proporção de
1721 fêmeas.

1722 Levando em consideração os valores atuais de mercado, calculou-se o custo por bezerro
1723 produzido para cada tecnologia, resultando em 615,89 e 557,81 reais, respectivamente, para
1724 TETF/PIV e IATF, sendo a cotação atual do bezerro macho 6,00 reais/kg e da fêmea 4,50

1725 reais/kg (Scot Consultoria, julho/2016). Além disso, estimou-se para os animais cruzados um
1726 peso 10% superior no desmame em relação aos puros (Rodrigues et al., 2015).

1727

1728 **4. Discussão**

1729 A alta taxa de recuperação de oócitos observada na raça nelore (25 a 30 oócitos; Pontes et al.,
1730 2009; Pontes et al., 2011) é um dos fatores que mantêm a indústria de embriões brasileira em
1731 condições propícias para expansão, ocupando o status de maior produtor de embriões PIV do
1732 mundo (Lima et al., 2014), por ser um rebanho composto predominantemente por raças
1733 zebuínas (*B. indicus*). Segundo Pontes et al. (2011), o curto intervalo entre as coletas, de no
1734 mínimo 15 dias, associado a uma média de oito embriões produzidos por procedimento de
1735 OPU/PIV também contribui para o crescimento da PIV no Brasil (Beltrame et al., 2010;
1736 Pontes et al., 2009).

1737 No presente trabalho foi realizado um total de 57 procedimentos de OPU ($16,67 \pm 12,11$
1738 ovócitos/OPU). A grande variação individual observada na população folicular ovariana e
1739 oócitos recuperados e, conseqüentemente, na produção de embriões (Pontes et al., 2010;
1740 Silva-Santos et al., 2011), torna um desafio a tomada de decisão a cerca do número de
1741 receptoras a serem sincronizadas, já que o processo de sincronização inicia antes mesmo da
1742 coleta dos oócitos (Beltrame et al., 2010). Nesse estudo houve variação de 0 a 60 oócitos
1743 aspirados por sessão de OPU.

1744 A taxa de prenhez da TETF (35,42%) foi inferior à IATF (47,70%). Wilson et al. (2005),
1745 trabalhando com vacas holandesas, também encontraram menor taxa de prenhez com o uso de
1746 embriões produzidos *in vitro* com sêmen sexado (24,3%) em comparação com vacas
1747 inseminadas com sêmen convencional (36,1%). No presente estudo, as taxas de prenhez para

as diferentes técnicas foram semelhantes as médias observadas em outros trabalhos, tanto para IATF com taxa média de prenhez de 50% (Sá Filho et al., 2009) como para TETF que varia de 30 a 40% de prenhez (Pontes et al., 2009; 2010). A viabilidade da implantação de qualquer biotecnologia reprodutiva irá depender dos índices zootécnicos alcançados em associação ao custo de produção.

Os índices observados nesse trabalho foram compatíveis com o observado na literatura (Pontes et al., 2009; 2010) e portanto considerados satisfatórios (PIV/TETF 35,42% x IATF 47,7%). Apesar da menor prenhez, ainda assim, o uso de sêmen sexado e a proporção de nascimento de bezerros machos pode viabilizar a utilização dessa biotecnologia em larga escala, para produzir animais cruzados de alta qualidade para terminação, já que os machos apresentam melhor conversão alimentar e maior rendimento de carcaça (Coutinho Filho *et al.*, 2006; Sá Filho *et al.*, 2014). Além disso, bezerros cruzados desmamam em média 10% mais pesados que bezerros puros (Rodrigues et al., 2015), agregando valor ao produto, pois a comercialização é baseada no peso dos animais e no potencial genético de ganho de peso.

A citometria de fluxo, principal forma de sexagem utilizada, pode atingir cerca de 90% de acurácia (Tubman et al., 2004; Frijters et al., 2009), entretanto, comparado ao sêmen convencional, o sexado pode apresentar baixa fertilidade (Bermejo-Álvarez et al., 2008). Mas a PIVE associada com o uso de sêmen sexado pode apresentar uma sinergia considerável, permitindo a aplicação dessas biotecnologias combinadas de forma mais eficaz (Wilson et al., 2005; Wheeler et al., 2006), pois para a fertilização *in vitro* (FIV) é necessário menos espermatozoides do que para IA, reduzindo custo e melhorando o aproveitamento do sêmen sexado. Portanto, essa pode ser outra vantagem, pois o melhor uso do sêmen permite utilizar doses de valor mais elevado (Nogueira et al., 2013 a). Além disso, aumenta a proporção de

1771 animais nascidos do sexo de interesse, compensando o maior custo e os baixos índices
1772 (Wilson et al., 2005).

1773 Entretanto, tem sido relatada uma grande variabilidade entre touros em programas de PIVE
1774 (Xu et al, 2006), e essa variação parece ser maior com o uso de sêmen sexado, afetando as
1775 taxas de desenvolvimento embrionário (Palma et al., 2008). Considerando o uso de apenas
1776 dois touros no presente estudo, não foi observado efeito do touro nos índices de produção
1777 embrionária e taxa de gestação. Em vários trabalhos não se observa taxa de prenhez inferior
1778 com o uso do sêmen sexado, porém isso é devido à escolha prévia do touro fornecedor do
1779 sêmen (Xu et al., 2006; Trigal et al., 2012; Pessoa et al., 2014).

1780 A seleção de touros eficientes para o processo de sexagem e PIV pode aumentar a eficiência
1781 do processo de FIV (Zhang et al., 2003), e monitorar os resultados do sêmen sexado e manter
1782 os touros com maior fertilidade para sexagem parece ser uma boa alternativa para aumentar a
1783 fertilidade geral do sêmen sexado (Frijters et al., 2009).

1784 Segundo Mikkola et al. (2015), trabalhando com embriões produzidos *in vivo*, apesar dos
1785 menores índices de embriões recuperados e menor taxa de gestação, quando comparada com o
1786 sêmen convencional, de maneira geral o uso do sêmen sexado é economicamente viável,
1787 tendo em vista que mais animais do sexo desejado serão produzidos com menos receptoras.

1788 Para PIVE o custo da prenhez também pode variar de acordo com a eficiência do protocolo de
1789 sincronização (Bó et al., 2012) e a taxa de produção de embriões (Pontes et al., 2011) pois o
1790 excesso ou falta de embriões, em relação ao número de receptoras, representa desperdício no
1791 processo produtivo, questão que pode ser superada com o aperfeiçoamento das técnicas de
1792 vitrificação, criopreservando os embriões excedentes.

1793 Ao utilizarem sêmen convencional na PIVE, Beltrame et al. (2010), encontraram viabilidade
1794 na implantação dessa tecnologia apenas quando realizada a sincronização das receptoras
1795 (TETF), reduzindo assim o custo de manutenção com receptoras ociosas e o descarte dos
1796 embriões excedentes, diminuindo significativamente o custo da prenhez. Além disso, com o
1797 uso do protocolo de sincronização da ovulação, se obtêm otimização nas taxas de
1798 aproveitamento das receptoras aptas para transferência (Nogueira et al., 2013b). Dessa forma,
1799 para a implantação da PIVE em um sistema, sugere-se a sincronização para ovulação em
1800 tempo fixo, maximizando o processo produtivo. Outro fator importante a ser considerado é a
1801 heterose obtida nos bezerros cruzados, agregando valor à comercialização (Teixeira e
1802 Albuquerque, 2003). Neste estudo, o uso da PIV/TETF permitiu a produção de maior número
1803 de bezerros cruzados (30,3% vs 23,9%).

1804 Em relação aos custos gerados pelo uso de ambos os sistemas, o uso da IATF resultou em
1805 menor custo de produção do bezerro (R\$ 557,81). Estima-se que os ganhos obtidos pelo uso
1806 da TETF com embrião sexado sejam superiores aos custos (R\$ 615,89) adicionais gerados,
1807 portanto com melhor custo benefício (Tabela 1).

1808 É importante salientar que a escolha da biotécnica a ser utilizada não significa uma prenhez de
1809 menor custo, mas sim a estimativa do retorno do investimento por ela proporcionado
1810 (Beltrame et al., 2010). Portanto, a previsão do sexo de nascimento da prole pode viabilizar a
1811 implantação dessa biotécnica para produzir animais para terminação com alto potencial
1812 genético. Além disso, a expectativa da obtenção de animais geneticamente superiores,
1813 presumindo maior peso a desmama e menor idade de abate também devem ser observados.

1814 Levando em consideração as inúmeras variáveis que compõem um sistema de produção, não é
1815 correta a generalização dos resultados, sendo o mais importante observar a relação entre os
1816 valores encontrados. Por exemplo, variação no preço do sêmen ou do embrião pode alterar

completamente o cenário apresentado, sendo necessária a busca por melhores taxas de prenhez e eficiência do sistema. Observa-se uma proximidade entre o lucro obtido com uso de TETF e IATF, tornando mais atrativa e competitiva a utilização da TETF. Porém, a escolha da propriedade onde será implantado o sistema PIV/TETF é de extrema importância, devendo-se observar as condições de estrutura, mão de obra capacitada e sanidade reprodutiva bem controlada (Pereira et al., 2013), permitindo alcançar melhores índices gerais na propriedade.

Mais estudos devem ser conduzidos com intuito de tornar mais acessível à aplicação dessas tecnologias, como por exemplo, associação da IATF com resincronização para TETF. Com as melhorias obtidas nos processos de sexagem de espermatozoide e de PIV de embriões, melhores índices podem ser obtidos e redução dos custos, tornando mais atraente a aplicação dessas técnicas em larga escala. A associação com outras estratégias que visem reduzir os custos devem ser avaliadas quanto ao custo/benefício, como por exemplo a obtenção de oócitos de animais de abatedouro de animais de alto mérito genético descartados por problemas adquiridos ou mesmo sem mérito genético conhecido (Wilson et al., 2005).

5. Conclusão

A PIVE, comparada com IATF, apresentou maior custo de implantação, porém maior lucratividade na venda de animais na desmama, porém a associação com outras TRAs e o uso estratégico em categorias animais também devem ser avaliados. Com maior valorização do bezerro de sexo definido, a utilização de embriões com uso de sêmen sexado é alternativa viável para sistemas de produção de gado de corte.

1840

1841 **6. Referências**

1842 Baruselli, P.S., Souza, A.H., Martins, C.M., Gimenes, L.U., Sales, J.N.S., Ayres, H., Andrade,
 1843 A.F.C., Raphael C.F., Arruda R.P., 2007. Sexed semen: artificial insemination and embryo
 1844 transfer. Rev. Bras. Reprod. Anim. 31, 374-381.

1845 Beltrame, R.T., Quirino, C.R., Barioni, L.G., Dias, Â.J.B., Souza, P.M., 2010. Analysis of
 1846 embryo production *in vitro* fertilization and embryo transfer to Nellore donors. Ci. Anim.
 1847 Bras. 11, 17-23.

1848 Bermejo-Álvarez, P., Rizos, D., Rath, D., Lonergan, P., Gutiérrez-Adán, A., 2008. Can
 1849 Bovine In Vitro-Matured Oocytes Selectively Process X- or Y-Sorted Sperm Differentially?
 1850 Biology of Reproduction 79, 594–597.

1851 Block, J., Hansen, P.J., Loureiro, B., Bonill L., 2011. Improving post-transfer survival of
 1852 bovine embryos produced *in vitro*: Actions of insulin-like growth factor-1, colony stimulating
 1853 factor-2 and hyaluronan. Theriogenology 76, 1602–1609.

1854 Blondin, P., 2015. Status of embryo production in the world. Anim. Reprod. 12, 356-358.

1855 Bó, G.A., Baruselli, P.S., Mapletoft, R.J., 2012. Increasing pregnancies following
 1856 synchronization of bovine recipients. Anim. Reprod. v.9, 312-317.

1857 Bó, G.A., Mapletoft, R.J., 2013. Evaluation and classification of bovine embryos. Anim.
 1858 Reprod. 10, 344-348.

1859 Centro De Estudos Avançados em Economia Aplicada – CEPEA. Metodologia do índice de
 1860 preços dos insumos utilizados na produção pecuária brasileira. Confederação da Agricultura e

- 1861 Pecuária do Brasil, 2010. Disponível em: <<http://www.cepea.esalq.usp.br/boi/>
1862 metodologiacna.pdf>. Acesso em: 24 mar. 2010.
- 1863 Cezar, I.M., 2001. Racionalização de investimentos em pastagens: uma abordagem sistêmica
1864 no processo decisório, in: Simpósio sobre Manejo de Pastagens, 18, Piracicaba. Anais...
1865 Piracicaba: Fundação de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz”, pp.351-369.
- 1866 Coutinho Filho, J.L.V., Peres, R.M., Justo, C.L., 2006. Meat production in feedlot Santa
1867 Gertrudis young bulls and heifers fed finishing diets. R. Bras. Zootec. 35, 2043-2049.
- 1868 Frijters, A.C.J., Mullaart, E., Roelofs, R.M.G., Hoorne, R.P., Moreno, J.F., Moreno, O.,
1869 Merton, J.S., 2009. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the
1870 sorting process? Theriogenology 71, 64-67.
- 1871 Koger M., 1980. Effective crossbreeding systems utilizing zebu cattle. J. Anim. Sci. 50, 1215-
1872 1220.
- 1873 Lima, J.M.P., Santos, F.A., Pimentel, M.M.L., Bezerra, M.B., 2014. Influence of
1874 methodology progress on *in vitro* production of bovine embryo in Brazil. Rev. Bras. Reprod.
1875 Anim. 38, 135-140.
- 1876 Lowman, B.G., Scott, N.A., Somerville, S.H., 1976. Condition scoring of cattle, Bulletin No.6
1877 (revised edition), East of Scotland College of Agriculture, 31p.
- 1878 Mello, J. C. C. B. S., Gomes, E. G., Abreu, U. G. P., Carvalho, T. B., ZEN, S., 2013. Análise
1879 de desempenho de sistemas de produção modais de pecuária de cria no Brasil. Produção, 23,
1880 877-886.

- 1881 Mikkola, M., Andersson, M., Taponen, J., 2015. Transfer of cattle embryos produced with
1882 sex-sorted semen results in impaired pregnancy rate and increased male calf mortality.
1883 Theriogenology 84, 1118–1122.
- 1884 Nogueira E.; Mingoti G.Z.; Nicacio A.C. Biotécnicas Reprodutivas Para Aceleração Do
1885 Melhoramento Genético. in: Rosa, A.N., Martins, E.N., Menezes, G.R.O., Silva, L.O.C. (Eds)
1886 Melhoramento genético aplicado em gado de corte: Programa Geneplus-Embrapa, Brasília,
1887 DF : Embrapa, pp.195-211, 2013 a.
- 1888 Nogueira, E., Pantoja, T.A.R., Pedroso, M.F., Marques Junior, H.R., Borges, J.C., Dias, A.M.,
1889 Itavo, L.C.V., 2013. Comparison of estrous synchronization protocols to bovine embryos
1890 recipients. Rev. Bras. Saúde Prod. Anim. 14, 558-564, b.
- 1891 Palma, G. A., Olivier, N. S., Neumüller, Ch., Sinowatz, F., 2008. Effects of Sex-sorted
1892 Spermatozoa on the Efficiency of in vitro Fertilization and Ultrastructure of in vitro Produced
1893 Bovine Blastocysts. Anat. Histol. Embryol. 37, 67–73.
- 1894 Pereira, M.H.C., Cooke, R.F., Alfieri, A.A., Vasconcelos, J.L.M., 2013. Effects of vaccination
1895 against reproductive diseases on reproductive performance of lactating dairy cows submitted
1896 to AI. Anim. Reprod. Sci. 137, 156– 162.
- 1897 Pontes, J.H.F., Nonato-Junior, I., Sanches, B.V., Ereno-Junior, J.C., Uvoa, S., Barreiros,
1898 T.R.R., Oliveira, J.A., Hasler, J.F., Seneda, M.M., 2009. Comparison of embryo yield and
1899 pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor
1900 cows. Theriogenology 71, 690–697.
- 1901 Pontes, J.H.F., Silva, K.C.F., Basso, A.C., Rigo, A.G., Ferreira, C.R., Santos, G.M.G.,
1902 Sanches, B.V., Porcionato, J.P.F., Vieira, P.H.S., Faifer, F.S., Sterza, F.A.M., Schenk, J.L.,
1903 Seneda, M.M., 2010. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos*

- 1904 *taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology* 74,
1905 1349–1355.
- 1906 Pontes, J.H.F., Sterza F.A.M., Basso, A.C., Ferreira, C.R., Sanches, B.V., Rubinc, K.C.P.,
1907 Seneda, M.M., 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a
1908 large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology* 75,
1909 1640–1646.
- 1910 Rodrigues, W.B., Wechsler, F.S., Nogueira, E ., 2015. Reproductive Performance and
1911 Reconception of Nelore Cows According to Their Pure- or Cross-Bred Calves. *Reprod Dom*
1912 *Anim* 50, 431–436.
- 1913 Rumpf, R., 2007. Methodological advances on *in vitro* embryo production. *R. Bras. Zootec.*
1914 36, suppl., 229-233.
- 1915 Sá Filho, M.F., Marques, M.O., Girotto, R., Santos, F.A., Sala, R.V., Barbuio, J.P., Baruselli,
1916 P.S., 2014. Resynchronization with unknown pregnancy status using progestinbased timed
1917 artificial insemination protocol in beef cattle. *Theriogenology* 81, 284–290.
- 1918 Sá Filho, O.G., Meneghetti, M., Peres, R.F.G., Lamb, G.C., Vasconcelos, J.L.M., 2009.
1919 Fixed-time artificial insemination with estradiol and progesterone for *Bos indicus* cows II:
1920 Strategies and factors affecting fertility. *Theriogenology* 72, 210–218.
- 1921 Scot Consultoria, 2016. Cotações. <https://www.scotconsultoria.com.br/cotacoes/?ref=mnp>
1922 (accessed 09.07.16).
- 1923 Seidel Júnior, 2014. Update on sexed semen technology in cattle. *Animal* 8, 160 – 164.
- 1924 Silva-Santos, K.C., Santos, G.M.G., Siloto, L.S., Hertel, M.F., Andrade, E.R., Rubin, M.I.B.,
1925 Sturion, L., Melo-Sterza, F.A., Seneda, M.M., 2011. Estimate of the population of preantral

- 1926 follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology* 76,
1927 1051–1057.
- 1928 Teixeira, R.A., Albuquerque, L.G., 2003. Efeitos Ambientais que Afetam o Ganho de Peso
1929 Pré-Desmama em Animais Angus, Hereford, Nelore e Mestiços Angus-Nelore e Hereford-
1930 Nelore. *R. Bras. Zootec.* 32, 887-890.
- 1931 Trigal, B., Gómez, E., Caamaño, J.N., Muñoz, M., Moreno, J., Carrocera S., Martín, D., Diez,
1932 C., 2012. In vitro and in vivo quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted
1933 sperm. *Theriogenology* 78, 1465–1475.
- 1934 Tubman, L.M., Brink, Z., Suh, T.K., Seidel, G.E. Jr., 2004. Characteristics of calves produced
1935 with sperm sexed by flow cytometry/cell sorting. *J. Anim. Sci.* 82, 1029-1036.
- 1936 Viana, J.H.M., Figueiredo, A.C.S., 2015. Estatísticas da produção e transferência de embriões
1937 em 2013 e os novos rumos da indústria de embriões no Brasil. *J. O Embrião* 55, 16-18.
- 1938 Wheeler, M.B., Rutledge, J.J., Fischer-Brown, A., VanEtten, T., Malusky, S., Beebe, D.J.,
1939 2006. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle.
1940 *Theriogenology* 65, 219–227.
- 1941 Wilson, R. D., Weigel, K. A., Fricke, P. M., Rutledge, J. J., Leibfried-Rutledge, M. L.,
1942 Matthews, D. L., Schutzkus, V. R., 2005. In Vitro Production of Holstein Embryos Using
1943 Sex-Sorted Sperm and Oocytes from Selected Cull Cows. *J. Dairy Sci.* 88, 776–782.
- 1944 Xu J., Guo Z., Su L., Nedambale T. L., Zhang J., Schenk J., Moreno J. F., Dinnyés A., Ji, W.,
1945 Tian, X. C., Yang, X., Du, F., 2006. Developmental Potential of Vitrified Holstein Cattle
1946 Embryos Fertilized In Vitro with Sex-Sorted Sperm. *Journal of Dairy Science* 89, 2510–2518.

- 1947 Xu, J., Chaubal S.A., Du F., 2009. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle.
 1948 Theriogenology 71, 39–47.
- 1949 Zhang, M., Lu, K.H., Seidel Jr., G.E., 2003. Development of bovine embryos after in vitro
 1950 fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from
 1951 different bulls. Theriogenology 60, 1657–1663.
- 1952
- 1953 Tabela 1. Cálculo da estimativa do custo-benefício do uso da IATF ou PIV/TETF em 1000
 1954 vacas de corte em regime de campo.

Valor por item		Sub-total (R\$)
Custo IATF ³		
R\$/Bez	n° Bezerros	
R\$ 557,81	760 cab	R\$ 423.935,60
Retorno IATF		
R\$/Bez ¹	n° Bezerros	Peso ² Sexo/ Origem
R\$ 1.260,00	153 cab	210 kg Macho/ Nelore
R\$ 796,50	153 cab	177 kg Fêmea/ Nelore
R\$ 1.386,00	227 cab	231 kg Macho/ Cruzado
R\$ 876,15	227 cab	195 kg Fêmea/ Cruzada
Total		R\$ 828.152,55
Total retorno IATF		R\$ 404.216,95
Custo PIV/TETF ⁴		
R\$/Bez	n° Bezerros	
R\$ 615,89	760 cab	R\$ 468.076,40
Retorno PIV/TETF		
R\$/Bez ¹	n° Bezerros	Peso ² Sexo/ Origem

R\$ 1.260,00	212 cab	210 kg	Macho/ Nelore	R\$ 267.120,00
R\$ 796,50	212 cab	177 kg	Fêmea/ Nelore	R\$ 168.858,00
R\$ 1.386,00	303 cab	231 kg	Macho/ Cruzado	R\$ 419.958,00
R\$ 876,15	34 cab	195 kg	Fêmea/ Cruzada	R\$ 29.789,10
Total				R\$ 885.725,10
Total retorno TETF				R\$ 417.648,70
Diferença TETF - IATF				R\$ 13.431,75
Ganho da TETF em relação a IATF				3,323%

- 1955 ¹ Valor em reais do Kg do bezerro, macho ou fêmea, Scot Consultoria, julho/2016
- 1956 ² Rodrigues et al., 2015
- 1957 ³ Custo do sêmen: R\$ 15,00
- 1958 ⁴ Custo da PIV: R\$ 60,00 por embrião + R\$ 150,00 por OPU, resultando em 8 embriões por
- 1959 OPU.
- 1960