

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

**AVALIAÇÃO ECONÔMICA DA PRODUÇÃO *IN VITRO*  
DE EMBRIÕES BOVINOS DE DIFERENTES  
GRUPOS GENÉTICOS EM SISTEMA COMERCIAL**

**CARLOS AUGUSTO GONTIJO PELLEGRINO**

**BELO HORIZONTE  
ESCOLA DE VETERINÁRIA - UFMG  
2013**

**CARLOS AUGUSTO GONTIJO PELLEGRINO**

**AVALIAÇÃO ECONÔMICA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE  
EMBRIÕES BOVINOS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS EM  
SISTEMA COMERCIAL**

Tese apresentada à Escola de Veterinária  
da Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para a obtenção do  
grau de Doutor em Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal  
Orientador: Marc Roger Jean Marie Henry  
Co-orientador: Fabiano Alvim Barbosa

BELO HORIZONTE  
ESCOLA DE VETERINÁRIA-UFMG  
2013

P386a Pellegrino, Carlos Augusto Gontijo, 1975 –  
Avaliação econômica da produção *in vitro* de embriões bovinos de diferentes grupos genéticos em sistema comercial / Carlos Augusto Gontijo Pellegrino. – 2013.  
127 p. : il.

Orientador: Marc Roger Jean Marie Henry

Co-orientador: Fabiano Alvim Barbosa

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Bovino de corte – Reprodução – Teses. 2. Embriões – Teses. 3. Fertilização *in vitro* – Teses. 4. Reprodução animal – Teses. 5. Investimentos – Teses. I. Henry, Marc Roger Jean Marie. II. Barbosa, Fabiano Alvim. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 636.213 089 26

*A vida é como andar de bicicleta. Para manter o equilíbrio, é preciso se manter em movimento.*

Albert Einstein, em carta a seu filho Eduard,  
em 5 de fevereiro de 1930

*Basta que contemples com olhos abertos a viva  
natureza;  
Encontrarás assunto para todo o sempre  
e aprenderás a ser modesto.*

Karl von Frisch  
Prêmio Nobel de Biologia em 1973

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me direcionar nessa profissão tão engrandecedora e por me proporcionar a oportunidade de vivenciar e conquistar mais essa etapa da minha vida.

Aos meus pais, Lucia e Carlos Roberto, pelo exemplo de vida, pelo amor e por me ensinar a ser correto e justo. Sem vocês nada disso seria possível!

A minha esposa, amor da minha vida, Marina, por estar sempre ao meu lado, mesmo quando as viagens a trabalho e as preocupações da tese nos distanciou...essa vitória também foi sua!

As minhas irmãs, Bruna e Mariana, pelo apoio e carinho de sempre.

Ao meu orientador Prof. Marc Henry, pelos ensinamentos, pela paciência, pelas correções e por acreditar na minha capacidade de realização deste trabalho.

Ao meu coorientador e amigo Prof. Fabiano Alvim Barbosa, pelo exemplo de profissionalismo e caráter. Obrigado pelas valiosas sugestões e apoio durante a execução deste trabalho.

Aos Professores Otavio Ohashi, Guilherme Valle, Antônio de Pinho e Helton Matanna, pela colaboração e correções deste trabalho.

Ao Prof. Venício Andrade, que mesmo de licença médica, colaborou com sugestões e ideias.

A empresa Cauêmbryo, em nome dos sócios Evandro Dias e Antônio Mesquita e a toda equipe de embriologistas do laboratório de produção de embriões, técnicos de laboratório, funcionários da central e setor administrativo, pela acolhida como veterinário do quadro da empresa por quase oito anos e por me proporcionar a oportunidade de realização destes experimentos.

A empresa InVitro Brasil Pará, em nome do sócio Rodrigo Untura, e a empresa sede da InVitro Brasil (Mogi Mirim, SP), em nome do diretor-presidente José Henrique Pontes, pela grande ajuda e disponibilidade de informações, sem as quais não seria possível a realização deste trabalho.

Aos colegas e sócios na nova empresa (PROLE – Reprodução Animal Assistida), Robson Freitas e Guilherme Cambraia, pelo apoio, amizade e compreensão no período dos experimentos. Agora é trabalhar, moçada!

A todos estagiários que puderam me ajudar nestes experimentos, pela importante participação e dedicação que tiveram.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da EV-UFMG pela oportunidade de realização deste curso e em especial a Luzete e Débora, secretárias do Colegiado, pela enorme presteza, disponibilidade e exemplo de educação.

Aos companheiros de orientação: Carlos Clemente, Eduardo Arashiro, Ana Maria e Mayara, pelo incentivo e amizade.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da EV- UFMG pela contribuição ao meu aprendizado, pelos ensinamentos e experiências transmitidas.

---

## SUMÁRIO

---

	<b>RESUMO.....</b>	<b>13</b>
	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>14</b>
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1	Biotecnologia – conceito e importância .....	16
2.2	Biotécnicas reprodutivas na pecuária .....	17
2.3	Cenário brasileiro e mundial das biotécnicas de produção de embriões bovinos .....	19
2.4	Técnica da produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos .....	24
2.5	Aplicações e limitações da PIVE .....	28
2.6	Eficácia da metodologia de PIVE.....	29
2.7	Controle de qualidade do laboratório de produção de embriões .....	30
2.8	Fatores que influenciam a produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	31
2.9	Ponderações sobre a produção <i>in vitro</i> de embriões .....	36
2.10	Situação atual e particularidades da produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos.....	37
2.11	PIVE em bovinos de corte e de leite .....	38
2.12	Desafios comerciais da PIVE .....	39
2.13	Tecnologia de embriões – tendências de mercado .....	39
2.14	Custos de produção, análise econômica e de investimentos .....	40
2.15	Avaliações econômicas na pecuária bovina e na produção de embriões .....	42
<b>3.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>44</b>
	<b>CAPÍTULO 1 - Avaliação de resultados em diferentes raças de doadoras na produção <i>in vitro</i> de embriões <i>Bos taurus taurus</i> e <i>Bos taurus indicus</i></b>	
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>61</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>77</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>
	<b>CAPÍTULO 2 - Análise econômica do custo laboratorial da produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos de doadoras de diferentes grupos genéticos</b>	
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>87</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>93</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>99</b>
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>99</b>
	<b>CAPÍTULO 3 - Produção <i>in vitro</i> em larga escala de embriões bovinos de corte fertilizados com sêmen sexado para macho: análise comparativa em simulação com IATF</b>	
<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>103</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>104</b>
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>110</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>117</b>
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>118</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>123</b>
<b>5.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>124</b>

---

## LISTA DE TABELAS

---

### REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 01 -	Atividade em 2011 de embriões <i>in vivo</i> provenientes de coletas em diferentes continentes .....	20
Tabela 02 -	Embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> em 2011 em diferentes continentes.....	21
Tabela 03 -	Valores considerados no cenário base em uma fazenda.....	43

### CAPÍTULO 1

Tabela 01 -	Número total e média mais erro padrão de doadoras aspiradas e de sessões de OPU segundo a raça da doadora .....	68
Tabela 02 -	Parâmetros estatísticos descritivos das variáveis utilizadas para estimar a quantidade de oócitos totais coletados .....	69
Tabela 03 -	Parâmetros estatísticos descritivos das variáveis utilizadas para estimar a quantidade de oócitos viáveis .....	70
Tabela 04 -	Parâmetros estatísticos descritivos das variáveis utilizadas para estimar a quantidade de oócitos clivados .....	71
Tabela 05 -	Parâmetros estatísticos descritivos das variáveis utilizadas para estimar a produção de embriões (blastocistos) .....	72

### CAPÍTULO 2

Tabela 01 -	Número total e porcentagem dos embriões produzidos segundo a raça da doadora .....	93
Tabela 02 -	Número de sessões de OPU, doadoras aspiradas, zigotos em CIV e embriões produzidos segundo o grupo genético e a raça da doadora nos anos avaliados de 2010, 2011 e 2012.....	94
Tabela 03 -	Taxa de conversão de zigotos no CIV em embriões viáveis segundo o grupo genético e a raça da doadora nos anos avaliados de 2010, 2011 e 2012 .....	95
Tabela 04 -	Indicadores financeiros anuais, valor acumulado do período e a média dos anos avaliados de 2010, 2011 e 2012.....	97
Tabela 05 -	Custos operacionais totais médios por zigoto em cultivo <i>in vitro</i> (R\$/ano) de acordo com a raça e o grupo genético das doadoras nos anos avaliados de 2010, 2011 e 2012.....	98
Tabela 06 -	Lucros operacionais por embrião <i>in vitro</i> produzido (R\$/ano) de acordo com a raça e o grupo genético das doadoras nos anos avaliados de 2010, 2011 e 2012 .....	99

### CAPÍTULO 3

Tabela 01 -	Critérios para a classificação morfológica dos complexos <i>cummulus oophorus</i> recuperados .....	106
Tabela 02 -	Custos operacionais dos serviços de IATF, utilizando sêmen sexado para macho, com respectivos valores numéricos em projeto realizado na Fazenda Primavera, Pará .....	109
Tabela 03 -	Custos operacionais dos serviços de TETF, utilizando sêmen sexado para macho, com respectivos valores numéricos em projeto realizado na Fazenda Primavera, Pará .....	109
Tabela 04 -	Valores numéricos definidos do projeto em larga escala de produção de embriões produzidos com sêmen sexado para macho realizado na Fazenda Primavera, Pará .....	109
Tabela 05 -	Número de fêmeas múltiparas e primíparas que responderam ao protocolo de transferência de embriões em tempo fixo (TETF).....	111
Tabela 06 -	Taxa de prenhez em primíparas e múltiparas por grupamento racial .....	111

Tabela 07 -	Produção de oócitos, embriões e prenhezes obtidos a partir de ovários de fêmeas Nelore abatidas, e proporção de fetos machos e fêmeas diagnosticados após fertilização com sêmen sexado .....	112
Tabela 08 -	Taxa de aproveitamento das fêmeas trabalhadas no estudo comparativo entre serviços de IATF e TETF no projeto em larga escala de produção de embriões realizado na Fazenda Primavera .....	114
Tabela 09 -	Resultados obtidos nos serviços de IATF e TETF com sêmen sexado para estudo comparativo no projeto em larga escala de produção de embriões realizado na Fazenda Primavera .....	114
Tabela 10 -	Valores comerciais de OPU/PIVE simulando aspiração de uma doadora zebuína (tabela de preço dez/2012 – empresa comercial) .....	115
Tabela 11 -	Parâmetros de preço, receita e margem bruta estabelecidos para bezeros e bezerras na execução da biotécnica de IATF com sêmen sexado realizado na Fazenda Primavera, Pará .....	116
Tabela 12 -	Parâmetros de preço, receita e margem bruta estabelecidos para bezeros e bezerras na execução do projeto em larga escala de produção de embriões realizado na Fazenda Primavera, Pará .....	116

---

#### **ANEXO**

Tabela 01 -	Número e média de oócitos totais, viáveis, clivados e embriões produzidos por fêmea em sessão de aspiração folicular, segundo o grupo genético da doadora .....	124
Tabela 02 -	Número e média de oócitos totais, viáveis, clivados e embriões produzidos por fêmea em sessão de aspiração folicular, segundo a raça da doadora .....	125
Tabela 03 -	Número e média de oócitos totais, viáveis, clivados e embriões produzidos por fêmea em sessão de aspiração folicular, segundo o ano de avaliação .....	126
Tabela 04 -	Número e média de oócitos totais, viáveis, clivados e embriões produzidos por fêmea em sessão de aspiração folicular, segundo tipo de sêmen .....	127
Tabela 05 -	Número e média de oócitos totais, viáveis, clivados e embriões produzidos por fêmea em sessão de aspiração folicular, segundo época do ano .....	127



---

## LISTA DE FIGURAS

---

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 01 -	Produção de embriões bovinos no Brasil no período de 1995 – 2011 .....	22
Figura 02 -	Comparação do número de embriões <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> transferidos anualmente desde o ano 2000 .....	23
Figura 03 -	Tendências de embriões produzidos <i>in vitro</i> transferidos por continentes desde o ano 2000.....	23
Figura 04 -	Produção de embriões bovinos em 2011 de acordo com a forma de transferência dos embriões (a fresco ou após congelação).....	37
Figura 05 -	Produção de embriões bovinos em 2011 conforme especialização da atividade (corte X leite) e grupamento racial (zebuínos X taurinos e mestiços).....	38

### CAPÍTULO 1

Figura 01 -	Número de fêmeas submetidas à aspiração folicular e produção <i>in vitro</i> de embriões (OPU-PIVE), segundo a sub-espécie ( <i>Bos taurus indicus</i> e <i>Bos taurus taurus</i> ).....	67
Figura 02 -	Número de fêmeas bovinas de diferentes raças das sub-espécies <i>Bos taurus indicus</i> e <i>Bos taurus taurus</i> submetidas à aspiração folicular e produção <i>in vitro</i> de embriões (OPU-PIVE) .....	67

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

**BSA** – albumina sérica bovina  
**CCOs** – complexo *cumulus oophorus*  
**CIV** – cultivo *in vitro*  
**COF** – custo operacional fixo  
**COT** – custo operacional total  
**COV** – custo operacional variável  
**DNA** – ácido desoxirribonucleico  
**ECC** – escore da condição corporal  
**eCG** – gonadotrofina coriônica equina  
**FIV** – fertilização *in vitro*  
**FSH** – hormônio folículo estimulante  
**GnRH** – hormônio liberador de gonadotrofinas  
**hCG** – gonadotrofina coriônica equina  
**IA** – inseminação artificial  
**IATF** – inseminação artificial em tempo fixo  
**IETS** – *international embryo transfer society*  
**LH** – hormônio luteinizante  
**LOS** – *large offspring syndrome*  
**MIV** – maturação *in vitro*  
**MOET** – *multiple ovulation and embryo transfer*  
**OPU** – *ovum pick up* (aspiração folicular)  
**PBS** – fosfato salina tamponada  
**P&D&I** – pesquisa, desenvolvimento e inovação  
**PGF-2 $\alpha$**  – prostaglandina  
**PIVE** – produção *in vitro* de embrião  
**rbST** – somatotrofina bovina recombinante  
**RCI** – retorno do capital investido  
**RIO** – retorno sobre o investimento operacional  
**SFB** – soro fetal bovino  
**SOF** – *synthetic oviduct fluid*  
**TALP** – *tyrode albumin lactate pyruvate medium*  
**TCM** – *tissue culture media*  
**TE** – transferência de embrião  
**TETF** – transferência de embrião em tempo fixo  
**TIR** – taxa interna de retorno  
**VPL** – valor presente líquido

## RESUMO

A produção *in vitro* de embriões bovinos associada à aspiração folicular (OPU-PIVE) é uma biotécnica de alto valor econômico que, aliada ao uso de sêmen sexado, possibilita a multiplicação de fêmeas de alto valor genético. O número de profissionais e empresas relacionadas à PIVE tem aumentado nos últimos anos, gerando maior concorrência e preços mais competitivos. Entretanto, pouco se tem discutido acerca da viabilidade econômica desta biotécnica. No primeiro experimento foi avaliado, através de coleta de dados de um programa comercial de OPU-PIVE de uma central privada de produção de embriões nos anos de 2010, 2011 e 2012, a quantidade e a competência do desenvolvimento *in vitro* dos oócitos de doadoras zebuínas Nelore, Gir e Guzerá e de doadoras taurinas Holandês, Jersey e Pardo Suíço, fertilizados com sêmen sexado e convencional. O estudo foi conduzido não por avaliação individual de fêmea, mas por sessão de OPU com mais de uma fêmea trabalhada. Foram analisadas 10.086 aspirações, em 2.585 sessões, com total de 163.943 oócitos recuperados e de 36.749 embriões produzidos. Os resultados na PIVE foram analisados, através da construção de modelos de regressão variada, sobre o total de oócitos aspirados, viáveis, clivados e total de embriões produzidos. Doadoras Jersey e Pardo Suíço, nas sessões de OPU, tiveram resultados inferiores ( $P < 0,001$ ) nestas quatro variáveis na comparação com doadoras Nelore, Gir, Guzerá e, inclusive, Holandês. O sêmen sexado apresentou menores resultados ( $P < 0,001$ ) na produção de embriões, tanto em doadoras zebuínas quanto em taurinas, em comparação com o sêmen convencional. Não houve efeito da época do ano (seca e águas) na quantidade de oócitos recuperados e no desenvolvimento embrionário *in vitro*. No segundo experimento foram avaliados os custos operacionais e alguns indicadores econômicos da PIVE dentro de um sistema comercial de produção de embriões. Informações geradas no primeiro experimento foram incorporadas ao segundo experimento. Custos operacionais variáveis representaram 90,78% de todo o custo de produção do embrião em laboratório, sendo os custos de meios utilizados nos processos de maturação, fertilização e cultivo embrionário (55,34%) e de mão-de-obra (27,76%), os mais elevados. A melhor taxa de conversão de zigotos no CIV em embriões, obtida em doadoras zebuínas em relação à doadoras taurinas, representou um lucro médio de R\$34,18 contra R\$19,34 por embrião, respectivamente. No terceiro experimento realizado em uma estação de monta de uma fazenda comercial de bovinos de corte, foi feita uma análise técnica e econômica da produção em larga escala de machos de corte oriundos de embriões *in vitro*, produzidos a um baixo custo, fertilizados com sêmen sexado, e transferidos pela técnica de TETF. Foram sincronizadas 974 fêmeas Nelore e cruzadas para o experimento, obtendo uma taxa de aproveitamento de 84,4%. Objetivando reduzir o custo de produção de embriões *in vitro*, o processo de OPU de fêmeas vivas foi substituído pela coleta de ovários de fêmeas Nelore abatidas em frigorífico. Um total de 3.054 oócitos foram coletados de 500 ovários, resultando na produção de 1.050 embriões fertilizados com sêmen sexado para macho da raça Angus. 822 embriões foram transferidos, obtendo 345 prenhez (42%), sendo 328 (95,1%) machos e 17 (4,9%) fêmeas. Uma simulação, com dados da própria fazenda, utilizando a IATF com sêmen sexado, foi usada para estudo comparativo. Índice de 30% de prenhez foi obtido na IATF, resultando em 278 machos e 15 fêmeas. O projeto com embriões, após venda de bezerras desmamados, terá margem bruta de R\$135.382,00, contra R\$132.855,00 na simulação feita na IATF com sêmen sexado. A metodologia proposta de aspiração de ovários de fêmeas abatidas em projeto de produção de embriões machos em larga escala, com redução do custo da PIVE, representa nova alternativa de mercado em sistemas de produção de carne.

**Palavras chave:** embriões, produção *in vitro*, custo, investimento, sêmen sexado, bovinos de corte.

## ABSTRACT

The in vitro production (IVP) bovine embryos is a biotech that, associated with use of sexed semen, allows the multiplication of females of high genetic value. The general goal at this thesis was to analysis commercial data of in vitro embryo production from a private biotech company, discussing economic information of this biotechnology. The first experiment aimed to evaluate, during three years, the number and developmental competence of oocytes recovered from different genetic groups of the donors (*Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus*), and the ability of sexed or conventional semen to produce in vitro (IVP) bovine embryos, under the influence of season (dry and water). The data were collected from a commercial company specialized in ovum pick-up and in vitro production embryos (OPU-IVP). The total number of collected oocytes, the rates of viable and cleaved oocytes and IVP bovine embryos were analyzed in linear regression models. Zebu donors, although with differences between breeds, produced a greater ( $P<0.001$ ) number of oocytes per OPU session and higher rates ( $P<0.001$ ) of viable and cleaved oocytes and IVP embryos in relation of *Bos taurus taurus* donors. However, Holstein donors produced a greater ( $P<0.001$ ) number of oocytes per OPU session and higher rates ( $P<0.001$ ) of viable and cleaved oocytes in relation of Gyr donors, while showed a lower production of embryos. The conventional semen had higher rates of IVP embryos ( $P<0.001$ ) in relation of sexed semen. In order to evaluate the influence of season (dry and wet period), there was no direct effect in the results of *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* females for any of the variables studied ( $P>0.2$ ). Then, in order to evaluate operational costs and some economic indicators of IVP system from a commercial laboratory of IVP bovine embryos, data of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* donors were collected. Variable operational costs accounted for 90.78% of the entire cost of IVP embryo in the lab, where the highest costs were the medias used in the process of maturation, fertilization and embryo culture (55.34%), and laboratory labor (27.76%). The best convertin rate of in vitro culture zygotes to embryos, obtained in Zebu donors regarding *Bos taurus taurus* donors, represented an average profit per embryo of R\$34.18 against R\$19.34, respectively. The IVP lab activity had a higher accumulated revenue (R\$2,572,430.00) in relation of operational costs (R\$1,351,287.65), determining operational profit and a great economic capacity of the laboratory to grow. In the third experiment, conducted in a breeding season from a commercial beef cattle farm, aimed to analyse, technically and economically, the large-scale production of male calves derived from IVP embryos fertilized with sexed semen and using the fixed-time embryo transfer (FTET) technique. 974 Nelore and cross-breeding females were synchronized, achieving an utilization rate of 84.4%. In order to reduce the cost of IVP embryos, OPU technique was replaced by collecting ovaries of slaughtered Nelore cows. A total of 3054 oocytes were collected from 500 ovaries, resulting in production of 1050 embryos fertilized with male Angus sexed semen. 822 embryos were transferred, achieving 345 pregnancies (42%), with 328 (95.1%) males and 17 (4.9%) females. A simulation with data from the farm itself, using fixed-time artificial insemination (FTAI) with sexed semen, was used for a comparative study. 30% pregnancy rate was obtained in the FTAI, resulting in 278 males and 15 females. The FTET project, after the sale of weaned calves, will have a gross margin of R\$135,382.00 against R\$132,855.00 from FTAI simulation with sexed semen. The proposed methodology of ovum pick-up of ovaries from slaughtered cows to realize a project of large-scale male embryos, reducing the cost of IVP, represent a new market alternative in beef cattle systems.

**Keywords:** embryos, in vitro production, cost, investment, sexed semen, beef cattle.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

Na agropecuária, o desenvolvimento do setor de melhoramento genético animal tem determinado uma maior produção de alimentos seguros, e de forma sustentável em quantidade e qualidade para atender à demanda, contribuindo para o crescimento do agronegócio. A inserção da genética bovina brasileira no mercado internacional ganha importância diante da crescente exigência mundial, que trouxe à pecuária o desafio de aumentar a eficiência na produção de leite e de carne em áreas cada vez menores.

O cenário econômico nacional passou por profundas modificações nas últimas décadas. Na pecuária, estas mudanças acompanharam o desenvolvimento e aplicação comercial de biotécnicas da reprodução voltadas para o aumento da velocidade com a qual o melhoramento genético estava sendo conduzido. Biotécnicas de produção *in vivo* de embriões (Múltipla Ovulação e Transferência de Embrião - MOET) e *in vitro* (PIVE) foram aperfeiçoadas, determinando nos últimos anos considerável avanço no melhoramento genético.

A quantidade de profissionais e empresas relacionadas às biotécnicas reprodutivas tem aumentado nos últimos anos. O que caracterizou maior concorrência e, conseqüentemente, preços mais competitivos pelos serviços. Atualmente, a utilização da MOET e PIVE para a produção de reprodutores e matrizes bovinas, tanto de corte quanto de leite, tem sido mais relevantes, na comparação com a produção de animais elite.

Desde 2002, o Brasil tornou-se um dos países de maior uso de biotécnicas da reprodução em bovinos do mundo. Após um vasto e consolidado conhecimento e

utilização da colheita de embriões pelo método *in vivo*, o País passou também a dominar e empregar em larga escala a aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom associada à produção *in vitro* de embriões (OPU-PIVE). Após 2005, a rápida expansão da PIVE foi parcialmente compensada pela retração no uso da tecnologia da MOET. Esse crescimento no total de embriões produzidos confirma que a PIVE, além de substituir a MOET como técnica de eleição para produção de embriões, possibilitou a expansão do mercado. Isso ocorreu porque essa biotécnica, mais que otimizar a produção de embriões por doadora, tem efeitos positivos na escala de uso, na redução do custo e na criação de novas possibilidades de aplicação da transferência de embriões na produção animal (Viana, 2012).

O domínio do método *in vitro* de produção de embriões colocou o Brasil em uma posição de destaque neste setor, despertando o interesse de outros países não só pelas biotécnicas envolvidas, mas também pelo fato do País possuir o maior rebanho do mundo e ser um dos principais exportadores de carne bovina (Basso *et al.*, 2010).

Para fêmeas bovinas de raças zebuínas, pode-se admitir uma maior quantidade de embriões por procedimento com a PIVE, quando comparada à tecnologia da MOET (Nonato Jr. *et al.*, 2004). A grande produção de oócitos em fêmeas zebuínas, em particular da raça Nelore, é algo que deve ser ressaltado porque considerando outros aspectos reprodutivos, as divergências entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* são relativamente discretas. Há diferenças moderadas entre o tamanho do trato reprodutivo e a dinâmica de crescimento folicular (Adayemo e Heath, 1980; Sartorelli *et al.*, 2005) e, especificamente quanto à obtenção de embriões *in vivo*, as médias obtidas são similares (Castro Neto *et al.*, 2005). No

entanto, quanto ao número de oócitos, fêmeas zebuínas, de maneira geral, apresentam uma média de oócitos por sessão de aspiração folicular aproximadamente quatro vezes maior à produção obtida de fêmeas bovinas de raças européias, sem qualquer procedimento adicional, como aplicação de Hormônio Folículo Estimulante (FSH), Somatotrofina Bovina recombinante (rBST) ou controle do ciclo estral (Thibier, 2004; Rubin *et al.*, 2004; Rubin *et al.*, 2005).

Diversos trabalhos mostram vantagens reprodutivas mediante utilização da tecnologia de PIVE englobando em sua grande maioria estratégias que correlacionem positivamente métodos de sincronização de receptoras, estratégias para utilização de sêmen sexado e diferenciados tratamentos às doadoras que traduzem em uma maior produção de blastocistos e taxa de prenhez (Lu *et al.*, 1999; Wilson *et al.*, 2006; Wheeler *et al.*, 2006; Blondin *et al.*, 2009; Pontes *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009).

Embora se verifique o acréscimo na eficiência reprodutiva diante do citado acima, nada se tem discutido acerca da viabilidade econômica da aplicação destes métodos, e principalmente quando utilizá-los nos sistemas comerciais de PIVE tradicionais. Os trabalhos em sua maioria direcionam-se unicamente aos benefícios reprodutivos, sem estudar financeiramente como se comportam variáveis e resultados na atividade como todo.

Além desse aspecto, de contexto mais geral, verifica-se também um grande interesse em se acompanhar os resultados do sêmen sexado e a PIVE em larga escala, particularmente em projetos com gado de corte, pois com a utilização de estratégias inovadoras, tornou-se viável a utilização desse recurso no segmento aplicado.

A partir dessas lacunas e questionamentos,

o presente trabalho teve por objetivo:

- Comparar a quantidade e a competência do desenvolvimento *in vitro* de oócitos aspirados de doadoras de três raças *Bos taurus indicus* e de doadoras de três raças *Bos taurus taurus*, assim como, os resultados de produção de embriões *in vitro* fertilizados com sêmen sexado, em larga escala, utilizando dados obtidos de um sistema comercial de PIVE;
- Analisar economicamente a produção *in vitro* de embriões em um sistema comercial de exploração genética de doadoras de três raças *Bos taurus indicus* e de doadoras de três raças *Bos taurus taurus*;
- Avaliar através de análises econômicas, dentro de um programa de estação de monta de uma fazenda comercial de bovinos de corte, a viabilidade na produção em larga escala de machos oriundos de embriões produzidos em laboratório com sêmen sexado.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – Biotecnologia – conceito e importância

Há cerca de 50 anos, uma relevante descoberta, na área da biologia: a formulação do modelo do código genético, por Watson e Crick, possibilitaria o surgimento de um novo paradigma tecnológico (Dosi, 1982). A ideia de que seria possível trabalhar com o código genético dos seres vivos, a ponto de obter novas combinações, com novas características – algumas delas impossíveis de serem obtidas por métodos tradicionais – possibilitou o aprimoramento e

desenvolvimento de inovações tecnológicas. Novas áreas de pesquisa foram criadas, gerando um amplo leque de serviços tecnológicos, novos insumos e novos produtos, além de processos inéditos que passaram a competir com os processos convencionais, principalmente nas áreas da agropecuária e saúde humana (Silveira *et al.*, 2007).

No início dos anos 90 havia uma forte tendência, principalmente por parte das organizações envolvidas em Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (P&D&I) nos países desenvolvidos, de que os avanços da biotecnologia se dariam fundamentalmente no campo da saúde humana, criando novos produtos, principalmente em segmentos de classes terapêuticas. Todavia, o desenvolvimento na agropecuária não só ocorreu de forma vertiginosa, como proporcionou novos questionamentos, para além daquelas relacionadas à complexidade do padrão de desenvolvimento da biotecnologia (Assad e Aucélio, 2004).

A biotecnologia é o campo em que se observa a importância crescente da interação entre os universos da ciência, da pesquisa tecnológica e da produção industrial e agropecuária. Mais do que em qualquer outra atividade produtiva moderna, a natureza da pesquisa básica em biotecnologia é orientada pela busca do tipo de inovação que permite acabar com as fronteiras entre ciência e tecnologia (Silveira *et al.*, 2005).

Em função de sua estreita ligação com a atividade científica, a biotecnologia é classificada pelos economistas como “setor baseado na ciência” (Bell e Pavit, 1992). A diferença com outros setores relacionados à ciência, como o de informática por exemplo, pode ser explicada pelo fato de que o “chão da fábrica” é o próprio laboratório de pesquisa. Mais ainda, no caso da biotecnologia, a descoberta e o desenvolvimento de processos, produtos e

serviços são resultados de diferentes combinações de “blocos” de conhecimentos científicos puros – muitos ainda em fase inicial – com um conjunto de ferramentas derivadas da biologia e genética tradicionais. Nesse contexto, a biotecnologia pode ser definida como um bloco de conhecimentos e informações tecnológicas combinando protocolos e metodologias de pesquisa utilizadas no estudo da biologia da célula, da genética, da bioquímica, entre outras matérias, com novos conceitos científicos, derivados de disciplinas que não existiam há alguns anos atrás – como biologia molecular, genômica funcional e proteômica (Fonseca *et al.*, 2004).

## **2.2 - Biotécnicas reprodutivas na pecuária**

Economicamente, o mundo vive um período de grande apreensão, em particular após a eclosão da crise financeira nos Estados Unidos, em setembro de 2008. Os elos das cadeias produtivas do agronegócio precisam rever com frequência os seus planejamentos para a tomada de decisão mais adequada possível.

A pecuária corresponde hoje a mais da metade da produção agrícola em países desenvolvidos e mais de um quarto em países em desenvolvimento. Em resposta ao crescimento populacional e ao padrão de consumo que se eleva conforme a renda do consumidor, a pecuária cresce mais rápido do que outros setores da agricultura. Atualmente, o aumento na produção visa não só a expansão do número de animais, mas, principalmente, o aumento de sua eficiência (Milazzotto *et al.*, 2008).

Além da seleção de animais cada vez mais produtivos, busca-se também o desenvolvimento de biotecnias reprodutivas que visam o aumento do desempenho reprodutivo dos rebanhos. Apesar de

algumas destas biotécnicas existirem há mais de 50 anos, nos últimos dez anos houve um grande aprimoramento das já existentes e o desenvolvimento de novas, sendo que muitos centros de pesquisa migraram para locais mais próximos ao produtor. Atualmente, algumas técnicas já apresentam grande aplicabilidade a campo como a inseminação artificial (IA), a sexagem de sêmen, a transferência e criopreservação de embriões e a produção *in vitro* de embriões, enquanto outras ainda permanecem mais restritas a centros de pesquisa como a transgenia e a clonagem (Milazzotto *et al.*, 2008).

A aplicação de biotécnicas da reprodução vem contribuindo decisivamente para o aumento da produção e, principalmente, da produtividade na pecuária bovina, ao possibilitar, de maneira mais efetiva, a exploração de animais de valor genético superior. Adicionalmente, em função destas biotécnicas possibilitarem a obtenção do maior número de descendentes, em um curto período, elas têm sido úteis para o aprimoramento genético dos rebanhos, como tornou-se imprescindível na preservação de material genético raro ou em risco de extinção. Os avanços alcançados neste setor têm sido de extrema importância para a pesquisa em reprodução animal, proporcionando modelos experimentais para o estudo do desenvolvimento folicular, ovulação, fertilização, reconhecimento da gestação e sobrevivência embrionária, o que pode ser constatado pelo grande desenvolvimento da embriologia ocorrido nos últimos 30 anos (Betteridge, 2003). Mais recentemente, as biotécnicas da reprodução contribuíram para o estudo de novas linhas de pesquisa, com avanços significativos nas áreas de clonagem, transgenia em animais, cultivo e diferenciação de células tronco embrionárias (Stojkovic *et al.*, 2004; Vajta e Gjerris, 2006).

A ascendente necessidade mundial para

produção de alimentos e de maneira sustentável tem exigido adaptações da pecuária bovina, objetivando o aumento da eficiência reprodutiva e produtiva dos animais em áreas cada vez menores. Nesse sentido, as biotécnicas de reprodução animal têm contribuído para a produção de animais com genótipos superiores e com eficiência produtiva destacada.

O Brasil está situado no cenário mundial como usuário e fornecedor de genética bovina. No setor do melhoramento animal, os principais produtos comercializados são: sêmen, embriões e animais vivos (touro, matrizes e receptoras). O setor de genética bovina também abrange, embora ainda incipiente, o mercado de clones, que são embriões que trazem o mesmo conteúdo genético de seu doador (Neves *et al.*, 2010).

A maioria dos criadores de touros e matrizes além de produzirem animais para o abate ou para a produção de leite, selecionam genética, isto é, fazem uso de ferramentas para melhorarem seus rebanhos, produzindo animais geneticamente superiores para efetuarem a reposição de seus rebanhos e para ofertar aos sistemas comerciais de produção de carne e leite (Martins, 2010).

Neste sistema há uma relação bem estreita entre os pecuaristas, as centrais de inseminação artificial (IA), os laboratórios que produzem embriões *in vitro* e *in vivo*, as centrais de receptoras, as empresas que produzem equipamentos e medicamentos e os veterinários prestadores de serviços. As centrais de IA processam o sêmen dos reprodutores de mérito genético superior, fornecendo material para o acasalamento de fêmeas e para a produção de embriões. Empresas que fabricam equipamentos e medicamentos mantêm constante relacionamento com as centrais, laboratórios e prestadores de serviço para possibilitar a execução das biotécnicas que asseguram a viabilidade do sêmen e dos



embriões (Lopes *et al.*, 2012).

A procura pela viabilidade e eficiência dos sistemas de produção, a definição de animais mais adaptados, férteis e eficientes em transformar os nutrientes da dieta em carne ou leite é essencial para o aumento da produção e para elevar a competitividade da pecuária nacional. Sendo assim é extremamente importante o alinhamento da pesquisa com os pecuaristas e centros de biotecnias para promover os programas de melhoramento genético e torná-los acessíveis a todos os criadores (Lopes *et al.*, 2012).

### **2.3 - Cenário brasileiro e mundial frente às biotécnicas de produção de embriões bovinos**

As biotécnicas de produção de embriões *in vivo* (MOET – múltipla ovulação e transferência de embrião) e *in vitro* (PIVE) são importantes ferramentas para acelerar o melhoramento genético em rebanhos de alto valor e encurtar o intervalo entre gerações, facilitando as observações comparativas entre os produtos dos diferentes acasalamentos e promovendo uma rápida seleção dos animais mais produtivos (Martins, 2010).

Seguindo a evolução das principais biotécnicas adotadas e trabalhadas no Brasil, é importante ressaltar, inicialmente, o papel da IA, como sendo a primeira biotécnica adotada nos sistemas de produção brasileiros que visa a multiplicação de progênie de touros de alto valor. Com a introdução de esquemas de ovulações múltiplas, recuperação e transferência de embriões, junto com a criopreservação de embriões na década de 80, a bovinocultura passou a ter em mãos ferramentas para aumentar o número de gestações provenientes de fêmeas de alto mérito genético (Rodrigues, 2001).

A PIVE, por sua vez, é considerada a terceira geração de biotecnia aplicada ao melhoramento genético animal, após a IA e a MOET. No início da década de 90, com a introdução da aspiração folicular guiada por ultrasonografia seguida pela produção *in vitro* de embriões (OPU-PIVE), a expectativa no incremento da produtividade das fêmeas aumentou (Galli *et al.*, 2003).

Assim como a inseminação artificial potencializa o uso de material genético de touros superiores, a utilização de embriões permite o trabalho da genética de fêmeas de alto valor zootécnico. Desta maneira, a PIVE representa uma atividade comercial que tem atendido um nicho de mercado específico como ferramenta para a criação de rebanhos e comercialização de produtos de genética superior.

Embora o número de coletas de embriões subiu quase 13% em 2011, o número de embriões *in vivo* transferidos mundialmente permaneceu constante em comparação com os dados reportados em 2010. O número total de 732.862 embriões *in vivo* coletados em 2011 em todo o mundo foi bem próximo aos 732.000 embriões recuperados em 2010. No entanto, o número de embriões bovinos provenientes de coleta, transferidos a fresco em fêmeas receptoras, regrediu 3,1% (590.561 em 2010 vs. 572.342 em 2011). A diminuição do número de transferências foi vista principalmente na Ásia, Américas do Sul e do Norte. A Oceania relatou aumento do número de embriões *in vivo* transferidos. Globalmente, o número de embriões *in vivo* congelados e posteriormente transferidos superou transferências à fresco em 71.612 embriões (309.806 congelados vs. 238.194 à fresco). A tendência para mais transferências de embriões congelados do que à fresco tem sido constante desde meados da década de 1990 (Tabela 01) (Stroud, 2012).

**Tabela 01** - Atividade em 2011 de embriões *in vivo* provenientes de coletas em diferentes continentes

Continentes	Coletas	Embriões coletados	Número de embriões transferidos			
			À fresco	Congelado	Total	%
África	1.438	9.401	4.056	2.469	6.525	1,14%
Ásia	15.444	124.362	24.026	51.697	75.723	13,23%
Europa	23.480	108.712	41.040	69.381	110.421	19,29%
América do Norte	54.837	362.781	109.197	139.418	248.615	43,44%
América do Sul	12.174	68.187	36.953	26.054	63.007	11,01%
Oceania	10.755	59.419	32.921	35.130	68.051	11,52%
<b>Total 2011</b>	118.128	732.862	248.193	324.149	572.342	100,00%
<b>Total 2010</b>	104.651	732.000	243.885	291.279	590.561	-
<b>Diferença</b>	12,88%	0,12%	1,77%	11,28%	-3,09%	-

Stroud, 2012

O número total de embriões bovinos produzidos *in vitro* em todo o mundo foi de 453.471 em 2011 em comparação com 450.549 em 2010. Isso representa um aumento, ainda que ligeiro, na produção global de embriões em laboratório no sexto ano consecutivo. A América do Sul, principalmente o Brasil, mais uma vez lidera mundialmente a produção e a

transferência de embriões *in vitro*. O número total de embriões produzidos em laboratório transferidos mundialmente em 2011 foi de 373.836, no qual representa um aumento de 10% a partir de 2010 (339.685). Só o Brasil foi responsável por 318.119 (85%) transferências de embriões *in vitro* em 2011 (Tabela 02) (Stroud, 2012).

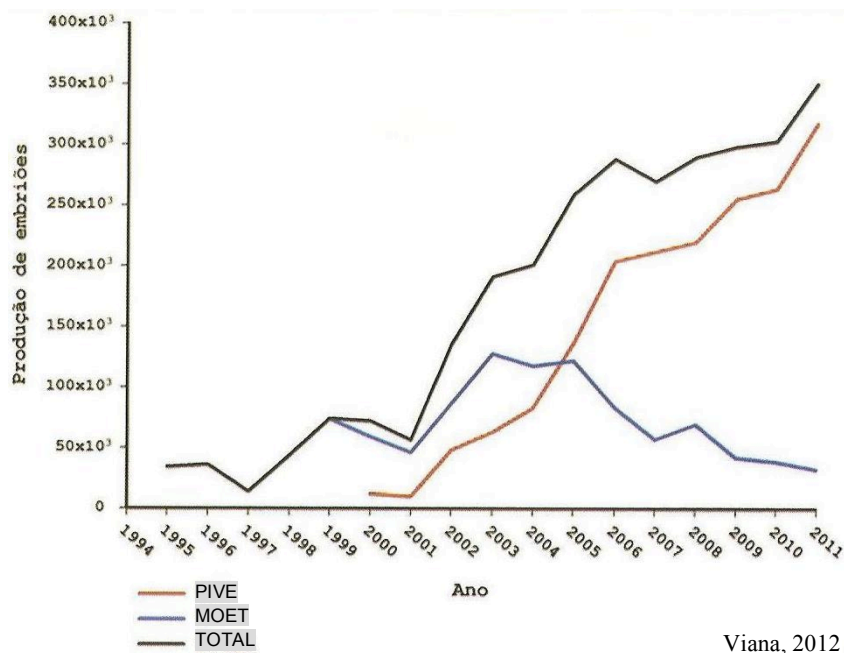
**Tabela 02** - Atividade em 2011 de embriões *in vitro* produzidos em diferentes continentes

Continentes	Embriões produzidos	Número de embriões transferidos			
		À fresco	Congelado	Total	%
África	0	0	0	0	0,00%
Ásia	62.418	4.086	6.699	10.785	2,88%
Europa	11.453	8.034	3.419	11.453	3,06%
América do Norte	48.474	17.850	2.930	20.780	5,56%
América do Sul	325.349	307.278	15.879	323.157	86,44%
Oceania	9.196	6.679	1.015	7.694	2,06%
<b>Total 2011</b>	453.471	343.927	29.942	373.869	100,00%
<b>Total 2010</b>	450.549	315.715	23.970	339.685	-
<b>Diferença</b>	0,65%	8,94%	24,91%	10,06%	-

Stroud, 2012

Dentro deste contexto de análise de produção de embriões bovinos, o Brasil é o maior produtor mundial de embriões *in vitro*, sendo referência mundial na utilização e sucesso desta técnica. Em 2011 a produção de embriões bovinos no Brasil alcançou a marca histórica de 350.000

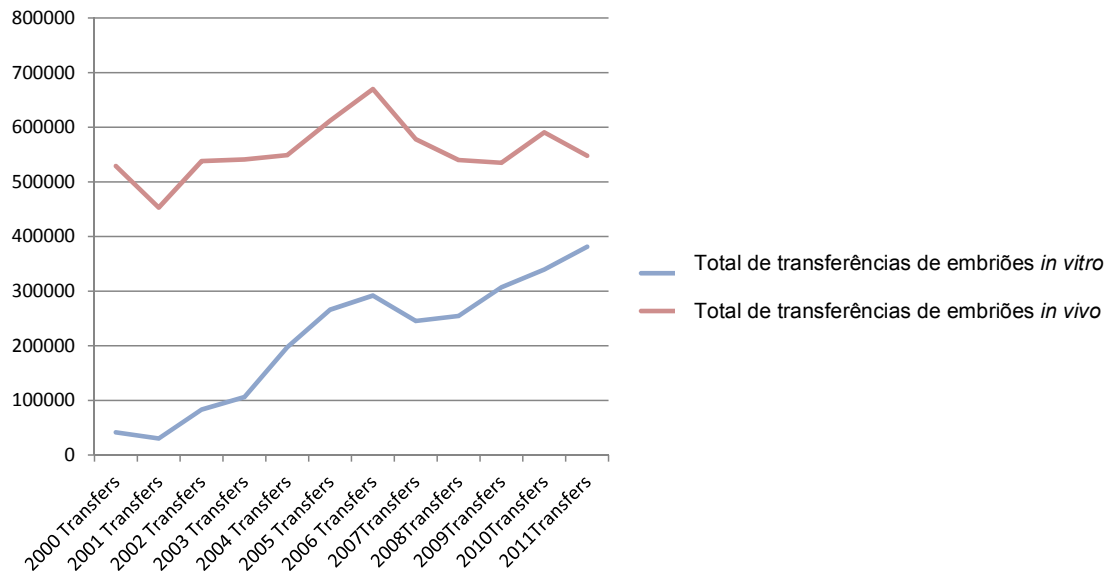
unidades, sendo que 90,7% dos quais produzidos *in vitro*. Isto representa um aumento de 15,7% em relação ao total de embriões produzidos em 2010, além de uma nova tendência de alta em relação aos anos anteriores (Figura 01) (Viana, 2012).



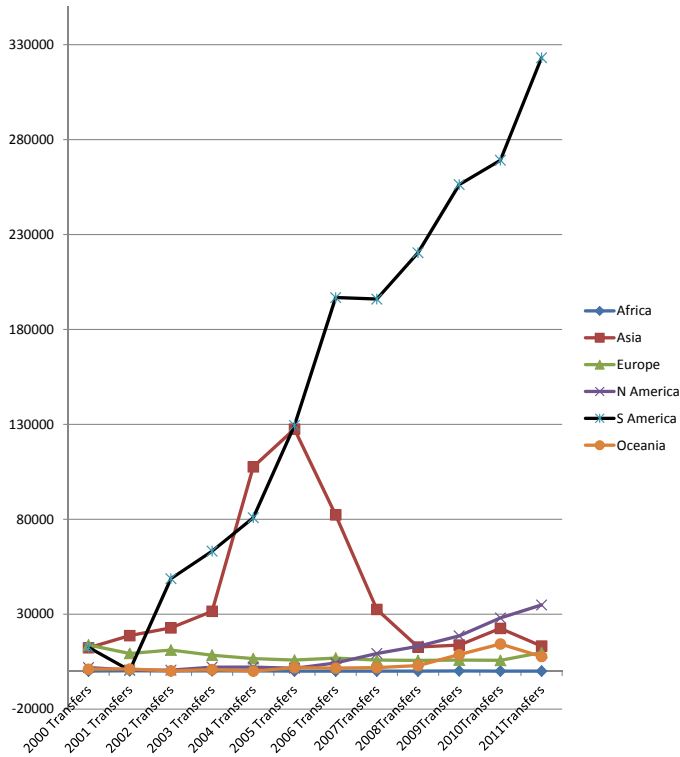
**Figura 01** – Produção de embriões bovinos no Brasil no período de 1995 – 2011

A Figura 02 compara o número de embriões *in vivo* em relação ao número de embriões *in vitro* transferidos anualmente em todo o mundo desde o ano 2000. As linhas tendem a continuar a evoluir no sentido da convergência. No entanto, a Figura 03 mostra que a maior parte da produção *in vitro* de embriões bovinos é proveniente da América do Sul, principalmente do Brasil. O gráfico mostra claramente que a América do Sul continua com uma elevada taxa na utilização da

tecnologia de embriões *in vitro*. Ainda na Figura 03 percebe-se que a América do Norte, particularmente os Estados Unidos, estão apresentando uma tendência de ascensão constante em relação aos últimos anos, mas nem por isso representa uma ameaça ao Brasil em se tratando da liderança da quota global da produção *in vitro* de embriões bovinos. O resto do mundo parece estável com a atividade de PIVE (Stroud, 2012).



**Figura 02** - Comparação do número de embriões bovinos *in vivo* e *in vitro* transferidos anualmente no mundo desde o ano 2000 (Viana, 2012)



**Figura 03** - Tendências de embriões produzidos *in vitro* transferidos por continentes desde o ano 2000

## **2.4 – Técnica da produção *in vitro* de embriões bovinos**

O primeiro relato de nascimento de animais gerados por fertilização *in vitro* foi feito por Chang *et al.* (1959) em coelhos. Os oócitos utilizados foram recuperados da tuba uterina após a indução da ovulação e o sacrifício da doadora. A partir de então, técnicas de produção de embriões *in vitro* foram desenvolvidas ou adaptadas para diferentes espécies domésticas, incluindo bovinos. Os primeiros resultados obtidos de maturação e de fecundação *in vitro* de oócitos bovinos foram de Iritani e Niwa (1977). Cinco anos depois surge o primeiro bezerro produzido pela equipe de Brackett (1982), com oócitos maturados *in vivo*. Somente em 1986, Hanada *et al.*, relataram o primeiro bezerro a partir de oócitos maturados e fertilizados *in vitro*, porém, utilizando o método de cultivo *in vivo*. Finalmente, em 1987, Lu *et al.* descreveram o sucesso com o primeiro bezerro após maturação, fecundação e cultivo *in vitro*. A eficiência dos procedimentos de produção *in vitro* de embriões, representada pelas taxas de fertilização e clivagem, aumentou significativamente a partir de então, particularmente após a descoberta do efeito da heparina na capacitação espermática (Parrish *et al.*, 1988).

Consequentemente, houve uma evolução da técnica, ocorrendo nos últimos anos um incremento significativo no número de embriões produzidos *in vitro*. Embora na maioria dos países a produção de um embrião de maneira convencional (MOET) seja mais barata do que a PIVE, em alguns países (Brasil, Japão, Itália), a PIVE tem sido a técnica de escolha para produção de embriões em escala comercial (Viana e Camargo, 2007).

No Brasil, a técnica de PIVE vem sendo a principal ferramenta utilizada pelos criadores nos últimos anos (Viana e Camargo, 2007), apresentando, de maneira

geral, uma maior flexibilidade em relação a MOET. Destacam-se a capacidade de uso frequente, a não necessidade de pré-estimulação hormonal, possibilidade de utilização em animais pré-púberes, em idade avançada e em início de gestação, sendo a técnica de escolha em animais com problemas reprodutivos adquiridos e/ou que não respondem à superovulação convencional (Hansen, 2006).

De maneira geral, a PIVE pode ser dividida em duas principais etapas, sendo elas, a obtenção dos oócitos, pela aspiração folicular ovariana guiada por ultrassom, e a etapa laboratorial, esta subdividida em maturação, fecundação e cultivo embrionário.

### **2.4.1 – Recuperação dos oócitos**

Segundo Pieterse *et al.* (1988), a recuperação de oócitos é a base do programa de PIVE. Há duas maneiras principais de obtenção de oócitos: provenientes de ovários coletados em abatedouros ou recuperados através da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom.

A produção individual de oócitos apresenta uma relativa constância, independentemente do esquema de recuperação utilizado. Observa-se, contudo, uma grande variação entre doadoras, não associada à raça, condição corporal, manejo ou qualquer outra causa aparente, e esta tem sido a principal fonte de variação nos resultados da aspiração folicular (Viana, 2002).

### **2.4.2 – Aspiração folicular de ovários de abatedouros**

A utilização dos oócitos de vacas de abatedouro atualmente destina-se às pesquisas com transferência nuclear,

produção de animais transgênicos, produção *in vitro* e criopreservação de embriões (Hoeschele, 1990; Hasler *et al.*, 1995). No entanto, a sua utilização apresenta algumas desvantagens, tais como o desconhecimento do estado de saúde ou o padrão hormonal dos animais e a impossibilidade de se repetir a técnica em um mesmo animal.

Yang *et al.* (1993) demonstraram que oócitos obtidos de ovários coletados em abatedouro, conservados entre 24-25°C em solução de fosfato salina tamponada (PBS) durante 11 horas continuam viáveis, com índice de clivagem e porcentagem de blastocistos comparáveis aos oócitos obtidos logo após o abate.

#### **2.4.3 – Aspiração folicular guiada por ultrassom ou *Ovum Pick Up* (OPU)**

A origem dos oócitos utilizados nos primeiros trabalhos de PIVE realizados no início da década de 80 permaneceu sendo primordialmente a aspiração folicular ou *slicing* de ovários obtidos em abatedouros, o que, apesar da praticidade e conveniência, limitava a utilização comercial da PIVE (Larsson, 1998). O desenvolvimento de técnicas para recuperação de oócitos ganhou grande impulso após o nascimento dos primeiros bebês gerados pelos procedimentos de fertilização *in vitro* e transferência de embriões (Steptoe e Edwards, 1978), e uma série de equipamentos destinados à recuperação de oócitos humanos tornou-se comercialmente disponível no início dos anos 80. O maior avanço neste sentido foi a mudança do uso do laparoscópio para as técnicas de aspiração transvaginal orientada por ultrassonografia (Feichtinger e Kemeter, 1986), que eliminaram a necessidade da abordagem cirúrgica dos ovários. O procedimento de aspiração folicular pode ser caracterizado como uma biópsia, sendo de execução mais simples e principalmente

menos traumática para os pacientes, sendo hoje amplamente utilizada em clínicas de reprodução assistida.

Após uma evolução técnica considerável a partir de procedimentos poucos eficientes, como laparotomia, colpotomia, laparoscopia transvaginal ou paralombar (Lambert *et al.*, 1986), a aspiração folicular encontra-se relativamente estabilizada quanto ao uso de equipamentos e aparatos técnicos (Galli *et al.*, 2003). Uma equipe composta por um veterinário responsável pelo serviço de aspiração e um técnico de laboratório no rastreamento e classificação de oócitos é capaz de trabalhar com um número grande de fêmeas e capaz de gerar suficiente demanda para as etapas seguintes da produção *in vitro* de embriões.

A OPU originalmente foi desenvolvida para uso na reprodução humana, mas em 1988, Pieterse *et al.* adaptaram a técnica para uso em fêmeas bovinas. As potenciais vantagens técnicas e econômicas levaram a uma rápida difusão da OPU entre os grupos de pesquisa em PIVE (Galli *et al.*, 2003; Seneda e Blaschi, 2004). A associação das técnicas de aspiração folicular e PIVE (OPU-PIVE) foi considerada como uma alternativa aos programas clássicos de superovulação e transferência de embriões (Kruip *et al.*, 1991; Castilho *et al.*, 2009), concentrando sua utilização em animais de alto valor genético e, principalmente em animais com problemas de fertilidade adquiridos ou histórico de insucesso na superovulação (Looney *et al.*, 1994; Bols *et al.*, 1996; Scherthaner *et al.*, 1999).

Com o auxílio de um ultrassom e um transdutor acoplado a um guia de aspiração, realiza-se a aspiração mediante introdução de uma agulha no interior dos folículos ovarianos. Um sistema de bomba a vácuo permite a recuperação dos oócitos e do líquido folicular para um tubo coletor. Os oócitos são, então, transportados até o laboratório, onde se inicia o processo de

produção *in vitro* de embriões (Garcia *et al.*, 2004).

A aspiração folicular pode obter oócitos de fêmeas a partir dos 6 meses de idade, de vacas gestantes até normalmente o quarto mês de gestação, ou mesmo após o parto (2 a 3 semanas), segundo Hasler *et al.* (1995). Brogliatti e Adams (1996) obtiveram oócitos de bezerras com apenas 6 semanas de idade com a utilização de um transdutor adequado. Sauvé (1998) constatou que vacas gestantes podiam ser submetidas à técnica até o sexto mês de gestação, sem que fosse notado qualquer prejuízo à gestação ou às vacas.

A aspiração folicular também apresentou-se viável para fêmeas com limitações reprodutivas. São frequentes os casos de aderência de ovário e útero, metrites crônicas e infecções tubéricas (Looney *et al.*, 1994). A OPU-PIVE permite a produção de progênie de fêmeas com tais enfermidades (Kruip *et al.*, 1994). No entanto, sua aplicação mostrou-se mais ampla quando utilizadas em fêmeas saudáveis, produzindo, no mínimo, quatro vezes mais embriões em relação à MOET (Kruip *et al.*, 1994), além de poder ser repetida várias vezes em um mesmo animal (Kruip *et al.*, 1991; Pieterse *et al.*, 1991; Bols *et al.*, 1995; Meintjes *et al.*, 1995; Bols *et al.*, 1996), inclusive com um aumento no número de folículos após várias semanas de aspirações (Stubbings e Walton, 1995).

Segundo Bols *et al.* (1997), aspectos biológicos e técnicos influenciam o resultado final da recuperação de oócitos via transvaginal. Entre as considerações técnicas pode-se citar o tamanho e tipo da agulha, pressão de vácuo, comprimento do bisel da agulha e a frequência do transdutor (Seneda e Blaschi, 2004).

O intervalo entre as sessões de aspiração folicular influencia a quantidade e a

qualidade de oócitos colhidos (Merton *et al.*, 2003). Segundo Gonçalves *et al.* (2002), a aspiração folicular pode ser realizada em duas sessões semanais por alguns meses sem prejudicar o futuro desempenho reprodutivo do animal.

A OPU, em geral, não promove danos ao sistema reprodutor feminino, embora em alguns casos já tenha sido relatada a predominância de tecido conjuntivo no parênquima ovariano de vacas doadoras que estavam sendo submetidas a sessões de aspiração quinzenais (Rodrigues e Garcia, 2000). Segundo Dayan (2002), a OPU não causa efeitos deletérios significativos aos animais, mesmo após cinco meses de aspirações, duas vezes por semana, no que concerne aos exames de saúde e fertilidade, clínicos ou *post mortem*.

Outra vantagem do uso da técnica da OPU em comparação à MOET está associada ao fato de que não se faz necessário o tratamento das doadoras com gonadotrofinas (Garcia *et al.*, 2004), pois mesmo sem o uso de protocolos hormonais, oócitos imaturos obtidos via transvaginal de fêmeas com ciclo estral normal podem ser utilizadas com eficiência na produção *in vitro* de embriões (Kruip *et al.*, 1991). Assim, muitos trabalhos têm optado por aspirações mais frequentes sem a estimulação hormonal (Brogliatti *et al.*, 1999; Majerus *et al.*, 1999).

Desta forma, a OPU-PIVE pode ser uma alternativa para uma maior produção de embriões de doadoras vivas, pois com a aspiração de uma fêmea duas vezes por semana durante três meses, é possível produzir três a quatro vezes mais embriões do que pela MOET realizada no mesmo período (Peixer *et al.*, 1997).

#### 2.4.4 - Seleção e classificação dos oócitos

A qualidade morfológica do oócito está



altamente relacionada com sua competência em evoluir para um embrião (Hazeleger e Stubbings, 1992; Hawk e Wall, 1994; Khurana e Niemann, 2000; Wit *et al.*, 2000; Wit e Kruip, 2001). Assim, após a recuperação dos oócitos, com o auxílio da lupa estereoscópica, faz-se a seleção, levando em consideração o número de camadas de células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma do oócito (Gonçalves *et al.*, 2002).

Segundo Gonçalves *et al.* (2002) a classificação dos oócitos é realizada com escala gradativa de qualidade de 1 a 4, sendo:

- Qualidade 1: *Cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células. Ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom.
- Qualidade 2: *Cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares. Ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida.
- Qualidade 3: *Cumulus* presente, mas expandido. Ooplasma contraído com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerando, vacuolizando ou fragmentando.
- Qualidade 4: Oócito desnudo sem *cumulus*.

Realizada a seleção, três passos biológicos que ocorrem *in vivo* são realizados em

laboratório para produção de embriões: maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos, fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) (Garcia *et al.*, 2004).

#### 2.4.5 - Maturação *in vitro* (MIV)

A maturação tem início logo após a remoção do oócito do interior do folículo ovariano. Em bovinos, são necessárias de 20 a 22 horas para que ocorra a maturação nuclear, com progressão do estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estágio de metáfase II. Após o tempo de incubação da MIV, os oócitos completam a maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e estão prontos para a fecundação (Garcia *et al.*, 2004).

Considerando que oócitos maturados *in vitro*, quando comparados aos *in vivo*, apresentam menores taxas de blastocistos após a fecundação e o cultivo *in vitro* (Takagi *et al.*, 2001), entenda-se que a maturação em laboratório representa ainda um problema na PIVE (Dode e Rumpf, 2002). Portanto, são necessários mais estudos para o entendimento dos mecanismos que ocorrem durante a retenção da meiose e a maturação oocitária (Cordeiro, 2001).

#### 2.4.6 - Fertilização *in vitro* (FIV)

A fertilização é um processo complexo, que resulta da união de dois gametas, com restauração do número de cromossomos somáticos e, conseqüentemente, início do desenvolvimento de um novo indivíduo (Gordon, 1994).

Os espermatozoides de mamíferos não possuem habilidade para fecundar os oócitos imediatamente após a ejaculação, mesmo estando móveis e com aparente morfologia normal. No processo *in vivo*, os

espermatozóides alcançam esta capacidade fecundante no trato genital feminino. A capacidade de adquirir competência fecundante foi denominada de capacitação espermática (Chang, 1951; Austin, 1951).

Portanto, para que ocorra a fecundação dos oócitos, os espermatozóides precisam estar previamente capacitados. Desta forma, adicionam-se agentes capacitores como a heparina e o cálcio ionóforo (Yang *et al.*, 1993), sendo a heparina, o glicosaminoglicano mais utilizado para capacitar espermatozóides para a FIV (Gonçalves *et al.*, 2002).

No processo de fertilização *in vitro* são usados espermatozóides de palhetas de sêmen congelado. Em geral, a concentração de espermatozóides usada é de  $2 \times 10^6$  espermatozóides/mL, sendo o número de doses calculado de acordo com a motilidade e a concentração da fração viva de espermatozóides obtida após a centrifugação em gradiente Percoll. O período de incubação dos oócitos com os espermatozóides varia entre 6 e 20 horas (Garcia *et al.*, 2004).

#### **2.4.7 - Cultivo *in vitro* (CIV)**

O cultivo *in vitro* corresponde a etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto. O desenvolvimento embrionário *in vitro* é avaliado no 6º dia de cultivo, visualizando-se a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocèle, sendo que no 7º dia é feita a seleção e a avaliação final dos embriões para a transferência a fresco ou para congelamento (Garcia *et al.*, 2004).

#### **2.5 – Aplicações e limitações da PIVE**

A produção *in vitro* de embriões tem se destacado de outras biotécnicas reprodutivas pelo seu potencial de

multiplicação de animais e o seu impacto no ganho genético. A grande vantagem dessa técnica é o maior aproveitamento da população de oócitos presentes no ovário que sofreriam atresia, tornando-a mais interessante do que outras biotécnicas reprodutivas como a MOET. De fato, a utilização da PIVE por empresas comerciais tem aumentado, já ocupando um espaço próprio entre o total de embriões produzidos em todo o mundo (Thibier, 2006; Stroud, 2012).

As técnicas de PIVE têm sido utilizadas nos diferentes segmentos da reprodução assistida das áreas humanas e animal. Inicialmente, essas técnicas foram empregadas unicamente na pesquisa fundamental como instrumento para estudar fenômenos fisiológicos relacionados aos gametas feminino e masculino. Esses estudos permitiram o melhor entendimento dos fenômenos de crescimento, maturação e fertilização dos oócitos, da capacitação espermática, assim como do desenvolvimento embrionário precoce e de seus mecanismos de regulação (Gonçalves *et al.*, 2002).

Apesar do elevado número de trabalhos que contribuíram para elucidar muitos questionamentos científicos, pouco se conhece sobre a regulação desses fenômenos fisiológicos, principalmente no âmbito molecular. Assim sendo, a PIVE tem sido importante instrumento no esclarecimento desses mecanismos por permitir a utilização da própria espécie estudada como modelo experimental. Adicionalmente, ela tem respaldado o desenvolvimento de biotécnicas como clonagem, transgenia, sexagem de espermatozóides e embriões, e preservação de oócitos e embriões (Camargo, 2005).

Além da aplicabilidade na pesquisa, a PIVE também tem sido empregada em situações especiais de infertilidade humana e animal com enfoques bastante diferenciados. Na

produção animal, particularmente nos bovinos, a utilização da PIVE ainda apresenta limites, principalmente, em função do custo inicial para construção da infra-estrutura laboratorial e do tempo consumido para executar a rotina de produção de embriões que vai desde a aspiração folicular até o desenvolvimento *in vitro* de embriões (Gonçalves *et al.*, 2002).

Existem diversos desafios associados à tecnologia de PIVE. Estes desafios já existem ou são derivados do fato de que a origem dos oócitos utilizados (estádio do ciclo estral, estágio da onda folicular, etc.) é desconhecida e, portanto a qualidade do oócito é variável; existem várias diferenças na capacidade dos espermatozoides para fertilizar oócitos *in vitro* visto que são coletados de diferentes touros; e alterações nas condições de cultivo pós-fertilização podem alterar drasticamente a qualidade do embrião. Além disso, após a transferência, a qualidade de embriões *in vitro* é consideravelmente menor que a de embriões produzidos *in vivo*, o que tem sido frequentemente associado com anormalidades fetais e neonatais (Blondin *et al.*, 2002).

Em diversos estudos, os processos de maturação de oócitos, fertilização e desenvolvimento dos embriões *in vitro* têm sido modificados no intuito de aumentar a produção e resultados pós inovulação dos embriões. Entretanto, as taxas de blastocisto, prenhez e criopreservação obtidos de oócitos maturados e fecundados *in vitro* são inferiores às obtidas pelo sistema de produção *in vivo* (Rizos *et al.*, 2002a).

Geralmente é aceito que embriões produzidos *in vitro* para fins de transferência são de qualidade inferior àqueles produzidos *in vivo*. Existem muitos indícios na literatura que apóiam essa afirmação com base em dados

morfológicos, de criotolerância, perfis de expressão de transcrito e, é claro, sobre as taxas de gestação após transferência (Rizos *et al.*, 2002; Lonergan *et al.*, 2006; Tesfaye *et al.*, 2007). No entanto, esta informação deve ser qualificada pela ressalva de que existem muitos tipos de sistemas de cultivo *in vitro* e alguns são claramente melhores que outros (Lonergan, 2008).

## 2.6 – Eficácia da metodologia de PIVE

Nos protocolos atuais de PIVE, as taxas de maturação, fertilização e clivagem são similares aos do processo *in vivo*. No entanto, os índices de blastocistos produzidos são significativamente inferiores no processo *in vitro* (Camargo, 2005). Enquanto a maturação e a fertilização procedem aparentemente de modo normal, aproximadamente 30% dos oócitos que são submetidos ao processo de maturação *in vitro* alcançam o estágio de blastocisto, havendo oscilações desses resultados, variando entre 5 e 60% (Zhang *et al.*, 2003; Lu e Seidel, 2004; Alomar *et al.*, 2008; Blondin *et al.*, 2009), e aqueles que atingem esse estágio estão frequentemente comprometidos em qualidade e capacidade (Lonergan, 2008). Essas variações têm inúmeras causas que podem estar relacionadas com o sêmen e sua capacidade de resposta à capacitação com heparina, qualidade e capacitação do oócito, habilidade do técnico, qualidade dos produtos empregados nos meios de cultivo, precisão dos equipamentos, entre outras (Garcia *et al.*, 2004). Como é um processo extremamente complexo, os resultados são geralmente cíclicos e os problemas são de difícil identificação. Muitas vezes, essas variações são devidas à existência de diferença no potencial dos oócitos em produzir blastocistos, apesar de apresentarem-se morfológicamente normais (Gonçalves *et al.*, 2002).

Estruturalmente, muitas das mórulas

produzidas *in vitro* não se compactam e apresentam menos estruturas de ligações entre os blastômeros, em comparação com mórulas produzidas *in vivo*. A membrana dos blastômeros é menos elástica e a blastocele muitas vezes se forma em vários pontos do embrião. Os embriões *in vitro* apresentam citoplasma mais escuro e de menor densidade, consequência de sua alta concentração de lipídios, zona pelúcida mais frágil, reduzida expressão de processos de comunicação intercelular, e maior incidência de anormalidades cromossômicas (Lonergan *et al.*, 2006).

Devido a apresentarem um maior número de folículos por onda de crescimento folicular em relação às fêmeas *Bos taurus taurus* (Carvalho *et al.*, 2008), doadoras de raças zebuínas normalmente não requerem superovulação. Embora esta possa ocorrer na PIVE, este processo é diferente em comparação à produção de embriões *in vivo*. O objetivo na superestimulação na MOET é maximizar o número de ovulações sem compromisso com a qualidade embrionária. Na PIVE, o tratamento superovulatório prioriza aumentar o número de folículos para aspiração, estando estes em um diâmetro entre 5 e 10 mm. Embora diversos fatores possam afetar este processo, o profissional que conduz o processo de aspiração é a fonte de variação mais importante que afeta os resultados obtidos (Merton *et al.*, 2003).

O uso de fêmeas muito jovens na OPU-PIVE, em comparação a MOET tem o potencial de reduzir o intervalo de gerações. Entretanto uma redução na acurácia da seleção realizada pode ocorrer visto informações da performance dos pais ainda não estarem disponíveis ao momento da aplicação da biotécnica (Velazquez, 2008). Vários autores destacam uma maior produção de embriões pela técnica da OPU-PIVE em comparação a MOET (Pontes *et al.*, 2009).

Pontes *et al.* (2009) foram precursores em relatar resultados diante da associação da MOET e PIVE em vacas zebuínas. Neste trabalho citado, 96 aspirações e 43 colheitas de embriões foram realizadas de maneira aleatória em 30 doadoras. Uma média de  $3,2 \pm 1,2$  aspirações e  $1,4 \pm 0,6$  colheitas de vacas superovuladas foram realizadas por doadora. O intervalo mínimo entre as aspirações foi de 15 dias e de 45 para as colheitas por lavagem uterina. Embora os procedimentos de PIVE tenham resultado em maior número de embriões produzidos (média de  $9,4 \pm 5,3$  da PIVE vs.  $6,7 \pm 3,7$  da MOET), os autores concluíram que a associação entre as técnicas possui caráter vantajoso. Tal fato se deve ao intervalo pequeno entre as colheitas e aumento da eficiência dos protocolos de superovulação, devido à aspiração dos folículos constituir método eficiente para o controle da dinâmica folicular. Diante da sincronização de receptoras com prostaglandina (PGF-2 $\alpha$ ), taxas de prenhez de 41,5% e 33,5% foram obtidas para MOET e PIVE, respectivamente.

## 2.7 – Controle de qualidade do laboratório de produção de embriões

Cada uma das etapas executadas em um laboratório de PIVE deve ser realizada com extrema atenção e responsabilidade, desde a obtenção dos oócitos, até o envase dos embriões, passando pela manipulação dos meios de cultura e do sêmen (Llerena, 2002). Descuidos ou falta de atenção podem provocar danos ao desenvolvimento do embrião e, conseqüentemente, prejudicar a qualidade dos resultados obtidos pelo laboratório.

Em geral um laboratório de produção de embrião é avaliado apenas quanto as suas taxas de gestação. Entretanto não se pode esquecer que para definir a qualidade do serviço prestado por um laboratório, deve-se inicialmente saber qual o objetivo final

desse serviço. Se este for apenas a obtenção da gestação, então possuir altas taxas de gestação seria um excelente parâmetro de qualidade (Alper *et al.*, 2002). Porém, o objetivo de um laboratório de PIVE deve ser, além de se obter o maior número de gestações possíveis, promover também a melhoria na qualidade genética dos animais, evitar a transmissão de doenças infecciosas, e fornecer um serviço diferenciado que possibilite a competição no mercado tanto nacional quanto internacional (Garcia *et al.*, 2004).

Para tanto é necessário o estabelecimento de um programa de controle de qualidade. O controle de qualidade é um conjunto de normas que devem ser seguidas em um estabelecimento, permitindo a padronização e a otimização dos procedimentos realizados. O objetivo da implementação de um sistema de controle de qualidade é assegurar o melhor desenvolvimento e precisão dos procedimentos e técnicas utilizadas, almejando a otimização dos resultados com maior segurança e fidelidade (WHO, 1999). Necessita-se de um controle rigoroso da rotina, da aparelhagem e do desempenho da equipe de laboratório, que deve estar apta a identificar e corrigir eventuais problemas.

## **2.8 – Fatores que influenciam a produção *in vitro* de embriões bovinos**

### **2.8.1 – Aspectos fisiológicos e fatores que podem afetar a qualidade do oócito**

O estudo da foliculogênese e de fatores de crescimento folicular é indispensável para que se torne possível desenvolver alternativas que aumentem a eficiência da PIVE. Alguns estudos demonstraram a influência dos fatores de crescimento folicular, das gonadotrofinas e dos hormônios esteróides sobre o desenvolvimento folicular e qualidade dos

oócitos (Fair, 2003; Mihm e Bleach, 2003; Sartori *et al.*, 2004).

O crescimento de folículos antrais em bovinos, assim como em outras espécies, apresenta dois estádios de crescimento. Uma fase de crescimento lento, que dura em torno de 30 dias, se estendendo desde a formação do antro, com diâmetro de 300 µm, até cerca de 3 a 5 mm (Lussier *et al.*, 1987). Esta fase é crítica para o desenvolvimento da capacidade do oócito, na qual atinge o tamanho e a competência final (Fair *et al.*, 1995; Fair *et al.*, 1997). A segunda fase, rápida, ocorre em apenas 5 a 7 dias e vai desde a detecção do antro folicular por ultrassom, com 3 mm de diâmetro, até a possível ovulação deste folículo (Sunderland *et al.*, 1994).

Ainda são insuficientes as informações sobre as influências endócrinas ou igualmente da dependência do crescimento de pequenos folículos antrais quando ocorre comprometimento na função folicular ou oocitária (Cushman *et al.*, 2001; Roth *et al.*, 2001). Experimentos conduzidos em vacas nas quais a liberação das gonadotrofinas reguladas pelo GnRH hipotalâmico foi abolida (Gong *et al.*, 1995; Gong *et al.*, 1996; Crowe *et al.*, 2001) demonstraram que a primeira fase de crescimento folicular antral pode ocorrer em um ambiente caracterizado por concentrações basais de FSH e sem pulsos de LH. Ainda não está claro como o crescimento de pequenos folículos antrais é possível sem influência do FSH. A parede folicular neste estágio não possui habilidade de resposta ao FSH, sendo que os folículos não demonstram progressão de estádios pré-antrais até o desenvolvimento de pequenos folículos antrais (Abel *et al.*, 2000). No entanto, a onda folicular durante a segunda fase de crescimento folicular antral é absolutamente dependente da elevação das concentrações de FSH e adequados pulsos de LH (Mihm e Bleach, 2003).

### 2.8.2 – Competência do oócito em produzir embriões *in vitro*

Existem evidências consideráveis sobre a influência significativa da origem folicular no potencial de desenvolvimento do oócito e parece que uma vez que o oócito é removido do folículo sua capacidade de desenvolvimento é limitada. As evidências sugerem que, enquanto as condições de cultivo durante a produção *in vitro* de embriões bovino possam ter impacto sobre o potencial de desenvolvimento inicial do embrião, a qualidade intrínseca do oócito é o fator chave que determina a proporção de oócitos que se desenvolverão até o estágio de blastocisto (Lonergan, 2008).

A capacidade de um oócito em desenvolver-se até blastocisto em um sistema de produção *in vitro* não depende somente de fatores intrínsecos, mas está relacionada ao processo de PIVE, ao espermatozóide, à doadora e ao método de coleta do oócito (Hendricksen *et al.*, 2000). Além disso, o crescimento do oócito dentro do folículo ovariano é determinado por vários fatores que influenciam sua viabilidade e competência para o desenvolvimento *in vitro*. Estes fatores incluem tamanho folicular, dia do ciclo estral, nível de atresia e influência de outros folículos, tal como o folículo dominante (Lonergan *et al.*, 1994; Seneda *et al.*, 2001; Castilho e Garcia, 2005).

Outro aspecto relevante está relacionado às variações individuais entre doadoras, considerando-se peso, idade, e raça entre outros. Relatos de oócitos de qualidade inferior em animais senis são frequentes (Garcia *et al.*, 1999). Looney *et al.* (1994), relataram a possibilidade de aspiração folicular em fêmeas bastante jovens. A origem dos oócitos pode ter um significativo impacto no seu potencial desenvolvimento *in vitro*. Animais senis produzem poucos oócitos e com baixo percentual de desenvolvimento, além da

baixa qualidade devido ao pequeno número de camadas de células do *cumulus* (Garcia *et al.*, 1999). Parece haver um consenso quanto à condição corporal, em que animais subnutridos seriam doadores de oócitos com menor capacidade para desenvolverem-se até blastocisto (Lopez Ruiz *et al.*, 1996), e há indícios de que animais submetidos à situações de estresse também sejam doadores de oócitos menos competentes (Seneda *et al.*, 2000).

A taxa de recuperação do oócito pela técnica da OPU parece ser influenciada pelo tamanho do folículo, que demonstrou ser significativamente superior para folículos menores ou iguais a 4 mm (Seneda *et al.*, 1999) e já foi demonstrado que folículos menores viabilizam recuperação oocitária mais eficiente (Seneda *et al.*, 2001). Pavlock *et al.* (1992), também observaram melhor desempenho na produção de blastocistos quando foram aspirados oócitos de folículos médios (2-4 mm) e grandes (4-8 mm) e utilizados em comparação a oócitos aspirados de folículos pequenos (1-2 mm). Hendricksen *et al.* (2000), concluíram que a competência para o desenvolvimento *in vitro* é maior para oócitos oriundos de folículos maiores que 6-8 mm quando comparado com folículos de 3-6 mm. No entanto, Carolan *et al.* (1996), não observaram influência do tamanho folicular sobre a maturação do oócito. Resultado similar foi obtido por Seneda *et al.* (2001), avaliando oócitos oriundos de folículos pequenos (<4 mm) e grandes (>4 mm) aspirados *in vivo*.

No bovino, o oócito e o folículo crescem de forma contínua até o folículo atingir o diâmetro de 3 mm, com o oócito alcançando 120-130 µm e permanecendo com esta dimensão até antes da ovulação, quando o folículo mede entre 15 a 20 mm em taurinos (Fair *et al.*, 1995) e 10 a 12 mm em zebuínos (Figueiredo *et al.*, 1997). Com o crescimento do oócito ocorrem mudanças no mesmo, como proliferação e

reestruturação das organelas citoplasmáticas. Há aparecimento do espaço perivitelino, redução da quantidade de retículo endoplasmático liso e rugoso e migração de mitocôndrias, complexo de Golgi e grânulos corticais para a periferia do citoplasma. Além disso, o oócito atinge capacidade transcricional, acumulando RNA mensageiro, ribossomos e polipeptídeos, fundamentais na fase final de seu desenvolvimento (Fair, 2003).

Como a dinâmica folicular em bovinos se caracteriza por possuir, na maioria das vezes, 2 ou 3 ondas de crescimento folicular, tanto em fêmeas *Bos taurus indicus* (Figueiredo *et al.*, 1997) como em fêmeas *Bos taurus taurus* (Ginther *et al.*, 1989), torna-se possível realizar a recuperação de oócitos por via transvaginal durante todo o ciclo estral (Galli *et al.*, 2003). Machatková *et al.* (1996), demonstraram que oócitos aspirados nos dias 14 a 16 do ciclo estral apresentavam melhores índices de competência para o desenvolvimento embrionário quando comparados aos aspirados nos dias 7, 8 e 9, e outro trabalho, concluiu que o desenvolvimento até blastocisto foi significativamente maior em oócitos colhidos durante a fase de crescimento folicular independente do diâmetro do folículo, porém a competência oocitária tendeu a aumentar em oócitos oriundos de folículos maiores (Hagemann, 1999). Por outro lado, em relação a onda folicular, Vassena *et al.* (2003), demonstraram que a aspiração folicular nos dias 2 ou 3 da nova onda folicular (próximos da divergência folicular) proporcionaram baixa produção de blastocistos possivelmente devido à menor competência oocitária, e que o melhor momento para recuperação seria no dia 5. Entretanto, em trabalhos mais recentes não houve diferença na produção de blastocistos quando os oócitos foram aspirados nos dias 2, 3 ou 5 (Hendriksen *et al.*, 2004, Machatková *et al.*, 2004). Por outro lado, nas fases mais avançadas do

período de dominância, nos dias 7 ou 8, aqueles autores observaram queda na produção, concluindo que neste período o estágio avançado de atresia compromete a competência oocitária nos folículos subordinados (Hendriksen *et al.*, 2000; Vassena *et al.*, 2003; Hendriksen *et al.*, 2004; Machatková *et al.*, 2004). Em vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) aspiradas nos dias 3 e 5 da onda folicular, o número total de oócitos e a porcentagem de blastocistos foram maiores do que os aspirados nos dias 7 e 9 (Melo, 2008).

O complexo *cumulus oophorus* do folículo é a última parte a ser afetada no processo de atresia. Em folículos que apresentam sinais de atresia avançada, somente 25% dos oócitos mostram claros sinais de degeneração, com os demais oócitos apresentando taxa de blastocisto semelhante aos oriundos de folículos não atrésicos (Hendriksen *et al.*, 2000). Wit *et al.* (2000) afirmaram existir alta correlação entre o grau de atresia do folículo e qualidade do oócito, com os folículos não atrésicos ou com atresia moderada apresentando oócitos com maior capacidade de produção de embriões. Estudos indicam que um grau médio de atresia folicular não prejudica a capacidade do oócito (Campbell *et al.*, 1991), podendo sua capacidade de desenvolvimento ser até aumentada com baixo grau de atresia (Blondin e Sirard, 1995). Isto pode ser explicado por mudanças estruturais associadas à degeneração em oócitos oriundos de folículos subordinados (Blondin *et al.*, 1997), as quais se assemelham às ocorridas em oócitos de folículos pré-ovulatórios (Assey *et al.*, 1994).

Petyim *et al.* (2003), afirmaram que a presença do folículo dominante, através da indução da atresia dos folículos subordinados, afeta negativamente o número de folículos disponíveis para aspiração e o número de oócitos recuperados. Uma vez que a atresia

folicular é induzida durante a fase de dominância da onda folicular, os autores assumem que a qualidade dos oócitos oriundos de folículos subordinados pode ser afetada. Hagemann *et al.* (1999) verificaram que oócitos oriundos de folículos subordinados possuem menor capacidade de produzir embrião que oócitos oriundos de folículos em crescimento. Entretanto, Smith *et al.* (1996) não encontraram diferença na produção de embriões em animais em fase de crescimento e dominância folicular, concluindo que o folículo dominante afeta negativamente a competência dos oócitos oriundos de folículos subordinados, somente quando provoca um grau avançado de atresia.

Quanto ao intervalo das aspirações foliculares, menores taxas de recuperação de oócitos e de produção de blastocistos são observadas quando a OPU é realizada semanalmente em comparação com OPU a cada 3-4 dias (Goodhand *et al.*, 1999). Possivelmente a alta frequência nas aspirações previna o estabelecimento do folículo dominante (Hendriksen *et al.*, 2000). Por outro lado, o cultivo com outras células (Stock e Smith, 1996) quando foram utilizadas camadas do *cumulus* de folículos grandes para maturar oócitos aspirados de folículos pequenos, estes autores observaram que a taxa de blastocisto foi semelhante às obtidas de oócitos de folículos grandes (6-9 mm), demonstrando que fatores parácrinos secretados pelo oócito e ou células do *cumulus* durante a maturação final são importantes para o desenvolvimento do embrião.

Os oócitos aspirados para a produção *in vitro* são obtidos de folículos em diferentes etapas do desenvolvimento e em diversas fases do ciclo estral, portanto, expostos a variadas concentrações de estradiol, progesterona, LH e FSH. Estes fatores podem afetar a competência oocitária para o desenvolvimento de embriões *in vitro*

(Wit *et al.*, 2000). Chaubal *et al.* (2007), propuseram a utilização de tratamentos hormonais para aumentar a taxa de recuperação e a qualidade de oócitos. Estes autores testaram a associação de progesterona com a aplicação de FSH exógeno para crescimento folicular, e uso de um pico de LH exógeno seis horas antes da aspiração folicular para induzir a maturação oocitária *in vivo*.

Vários protocolos de superestimulação ovariana, com o uso de gonadotrofinas (FSH, eCG e r-bST), têm sido estudados visando aumentar a eficiência da OPU-PIVE (Pieterse *et al.*, 1992; Meintjes *et al.*, 1995; Bols *et al.*, 1998; Roover *et al.*, 2005; Seneda *et al.*, 2005). Roover *et al.* (2005), consideraram que a aplicação exógena de FSH foi capaz de aumentar o tamanho dos folículos, mas não houve alteração quantitativa, atribuindo a este último aspecto, como variação individual. As vantagens esperadas da estimulação folicular são de que maior número de folículos resultariam em mais oócitos (Roover *et al.*, 2005). No entanto, apesar dos protocolos pré-aspiração promoverem aumento de tamanho dos ovários, tornando mais fácil sua manipulação (Techakumphu *et al.*, 2004), e ainda proporcionarem maior número de folículos viáveis por aspiração, a eficiência da recuperação dos oócitos diminuiu com o uso do FSH ou r-bST (Pieterse *et al.*, 1992; Walton *et al.*, 1993; Bols *et al.*, 1998). Supõe-se que os folículos com diâmetros maiores produzidos por estes protocolos poderiam induzir menor eficiência da recuperação oocitária devido aos seguintes aspectos: maior pressão intrafolicular, fluido folicular mais viscoso e em maior quantidade, o que dificultaria a aspiração (Seneda *et al.*, 2001). Pieterse *et al.* (1991) e Goodhand *et al.* (1999), relataram melhor recuperação quando predominavam folículos pequenos no ovário e menos oócitos por sessão quando havia predomínio de folículos maiores que seis milímetros.



Apesar dos folículos maiores que 5 mm serem aspirados mais facilmente, a aspiração de folículos pequenos mostrou-se mais eficiente quanto à captação dos oócitos (Seneda *et al.*, 2001). Assim, a estratégia mais eficiente para associar utilização de FSH e presença de folículos pequenos é controlar o período de crescimento folicular, conforme relatado por Seneda *et al.* (2002).

Merton *et al.* (2003), consideraram que a utilização de FSH anterior à aspiração folicular durante 2 semanas otimizou a produção de embriões por sessão. No entanto, a frequência de OPU afetou a qualidade e a quantidade dos oócitos coletados. A OPU quando realizada de forma descontínua (entre o início do estro e 12 dias após), permitiu que as doadoras retornassem a ciclicidade de forma natural, não afetando a função ovariana. Entretanto, a OPU contínua pode alterar o período de ovulação. Os estudos de Petyim *et al.* (2003) demonstraram que o número de oócitos não diferiu em ambos os esquemas de aspiração, mas sugeriram que a OPU descontínua seja aplicada.

### **2.8.3 – Utilização de sêmen sexado no processo de fertilização *in vitro***

O controle da seleção do sexo em animais permite rápido progresso genético, alta produtividade e flexibilidade do sistema de produção diante da possibilidade de minimização do sexo indesejável (Rath *et al.*, 2009). A seleção do sexo tem um valor econômico significativo nos animais de interesse zootécnico com aptidão para produção de leite ou carne e em sistemas onde a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos (Taylor *et al.*, 1988; Ruvuna *et al.*, 1992; Hohenboken, 1999).

Na espécie bovina, mesmo diante da aplicação comercial da sexagem de

espermatozóide há mais de uma década, resultados decorrentes da seleção e congelamento do sêmen permanecem altamente variáveis (Rath *et al.*, 2009, Johnson, 2005).

Na técnica de citometria de fluxo, que é a mais utilizada para sexagem de sêmen em bovinos, a velocidade de separação dos espermatozoides X e Y é relativamente lenta – aproximadamente 3.000 a 4.000 células por minuto para cada sexo. No intuito de otimizar o processo, a dose de sêmen normalmente utilizada é de aproximadamente  $2 \times 10^6$  espermatozoides por palheta. Este valor é inferior se comparado com a quantidade de espermatozoides utilizada nos grupos submetidos à IA com sêmen convencional (mínimo de  $10 \times 10^6$  espermatozoides por dose). Existem trabalhos que relacionam certos comprometimentos na fertilidade quando um número pequeno de espermatozoides é utilizado por dose inseminante (Baruselli *et al.*, 2007).

A quantidade de material genético do cromossomo Y entre as raças bovinas também é variável. Devido a isso, a variabilidade entre a eficiência do processo de separação dos espermatozoides X e Y, assim como nos resultados de prenhez após a utilização de sêmen sexado em raças taurinas e zebuínas é observada (Baruselli *et al.*, 2007).

Alguns estudos relatam uma redução na produção *in vitro* de embriões utilizando sêmen sexado em relação ao não sexado. Avelino *et al.* (2007), avaliando a fertilização de 30.939 oócitos demonstraram uma redução média de 15% na clivagem e 12,8% na produção de embriões com a utilização de sêmen sexado em relação ao não sexado, considerando a variação de 3,6% a 28,8% de cada touro, determinado por sua competência individual na produção *in vitro* de embriões.

A avaliação da produção de embriões em fêmeas zebuínas, no caso vacas da raça Nelore, a partir da utilização de sêmen sexado, foi realizada por Baruselli *et al.* (2007). Estes autores verificaram uma diminuição no número de embriões viáveis ( $6,80 \pm 0,66$  vs  $4,20 \pm 0,74$ ) e nos embriões passíveis de congelamento ( $5,90 \pm 0,71$  vs.  $3,50 \pm 0,65$ ) respectivamente. Uma acuidade para o sexo desejado de cerca de 90% confirmada pela ultrassonografia e taxa de gestação de 47% para o sexo desejado foram demonstradas neste trabalho citado.

## 2.9 – Ponderações sobre a produção *in vitro* de embriões

De certo, a PIVE atualmente é uma biotécnica consolidada, com expressivo número de animais nascidos por este procedimento, particularmente no Brasil (Seneda e Blaschi, 2004).

A aspiração de oócitos imaturos diretamente de folículos ovarianos, associada à maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, permite que seja produzida, pelo menos, uma gestação por semana por doadora (Peixer *et al.*, 2000a,b; Bousquet *et al.*, 2000).

A possibilidade de produção de bezerros de fêmeas de dois a três meses de idade também é de grande interesse, visto que o intervalo entre gerações pode ser significativamente reduzido, proporcionando ganho genético elevado do rebanho em um menor período de tempo (Dode e Rumpf, 2002). Desta forma, tem-se obtido embriões viáveis, gestações e bezerros nascidos, provenientes de oócitos de bezerras pré-púberes em diferentes idades (Fry *et al.*, 1998; Brogliatti *et al.*, 1999; Malard, 2000; Taneja *et al.*, 2000).

Além disso, a capacidade de obtenção de embriões em situações de infertilidade

extra-ovariana motivou vários grupos à realização do procedimento de OPU-PIVE, tendo-se verificado o nascimento de diversos produtos (Looney *et al.*, 1994; Hasler *et al.*, 1995; Bols *et al.*, 1996; Seneda *et al.*, 2000).

Atualmente, os índices de gestação têm variado entre 20 e 60%, de acordo com o sistema de produção *in vitro* usado pelos diferentes laboratórios. Dayan *et al.* (2000) constataram que cerca de 30 a 50% dos oócitos fertilizados chegam ao estágio de blastocisto e os índices de gestação estão em torno de 35%. No entanto, segundo Galli *et al.* (2001), as perdas durante o primeiro trimestre de gestação podem atingir 10 a 12%.

Há vários relatos descritos na literatura de prolongamento da gestação, distocia, aumento de mortalidade pré-natal e de peso corpóreo, constituindo a denominada “Síndrome do Bezerro Grande” (LOS - *Large Offspring Syndrome*) (Young *et al.*, 1998). Acredita-se que estes problemas estejam relacionados à altas concentrações de soro fetal bovino (SFB) utilizadas no cultivo, visto que no cultivo *in vitro* de embriões de ovelhas sem o uso de altas concentrações de SFB ou de albumina sérica bovina (BSA), até 95% das gestações foram normais e a incidência desta “Síndrome” foi diminuída (Galli *et al.*, 2001; Numabe *et al.*, 2000; Van Wagtendonk-De Leeuw *et al.*, 2000; Sangild *et al.*, 2000).

Apesar destas limitações, a PIVE tem sido utilizada em vários países do mundo com perspectivas promissoras, tendo viabilizado nascimento de expressivo número de produtos desde 1996 (Galli e Lazzari, 1996; Pontes *et al.*, 2010). No entanto, a permuta de informações acadêmicas é considerada etapa essencial para superação dos atuais entraves, tais como, redução dos custos de realização da técnica e problemas relacionados ao parto (Seneda e Blaschi,

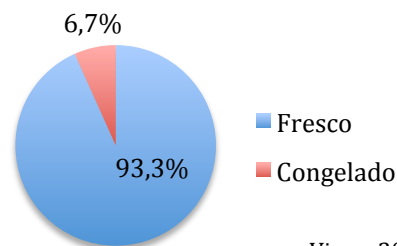
2004).

É importante salientar também que, por se tratar de uma técnica relativamente nova, o monitoramento rigoroso das doadoras, dos oócitos coletados, dos embriões e dos produtos nascidos é de fundamental importância para que essa técnica possa ser utilizada com segurança, de forma adequada e nas situações mais indicadas (Dode e Rumpf, 2002).

### 2.10 – Situação atual e particularidades da produção *in vitro* de embriões bovinos

Pode-se dizer que a produção de embriões *in vitro* é mais eficiente que pela MOET, visto que não requer o afastamento da doadora do setor produtivo e possibilita a realização de inúmeras coletas (aspirações) na doadora sem a necessidade de esperar períodos de recuperação da mesma, já que na PIVE não é feita indução hormonal na doadora. No entanto, os embriões *in vitro* são mais sensíveis ao processo de criopreservação que os embriões da MOET (*in vivo*), fato que tem limitado o transporte destes produtos por longas distâncias (Varago *et al.*, 2008).

Do total de embriões produzidos no Brasil em 2011, 328.341 (93,3%) foram transferidos a fresco (Figura 04). O percentual de embriões congelados se manteve praticamente constante no período de 2006 à 2011 (5 a 7% do total) e demonstra que, a despeito de alguns progressos na criopreservação de embriões produzidos *in vitro*, esta técnica ainda não apresenta consistência de resultados que possibilite o uso comercial em larga escala. Esta limitação fica mais evidente quando se compara o percentual de embriões congelados produzidos *in vitro* e *in vivo* (4,9% e 23,6%, respectivamente).



Viana, 2012

**Figura 04** - Produção de embriões bovinos em 2011 de acordo com a forma de transferência dos embriões (a fresco ou após congelamento)

Essa baixa viabilidade dos embriões produzidos em laboratório previamente congelados constitui um dos principais gargalos da PIVE, visto que torna necessário sincronizar várias receptoras para o recebimento dos embriões produzidos *in vitro*. Segundo Stroud e Bó (2011), esta limitação pode ser trabalhada no Brasil com mais facilidade que em outros países, diante do tamanho do rebanho brasileiro que proporciona maior número de fêmeas disponíveis para serem utilizadas como receptoras. No entanto, restringe a dispersão dos embriões brasileiros no cenário internacional.

Apesar da limitação existente quanto à viabilidade dos embriões produzidos *in vitro* pós-criopreservação, as instituições do setor, sobretudo a iniciativa privada, têm avançado nas pesquisas e vêm apresentando resultados promissores para o aprimoramento das técnicas, tanto no que se refere ao transporte climatizado dos embriões quanto à evolução das técnicas de cultivo e/ou de criopreservação de embriões (Viana, 2012).

Diante do êxito que os laboratórios vêm obtendo na produção de embriões e da necessidade de se transferir os embriões *in vitro* a fresco, ou seja, em curto período após sua produção, e do fato do número de embriões produzido por doadoras ser muito variável, uma nova oportunidade de

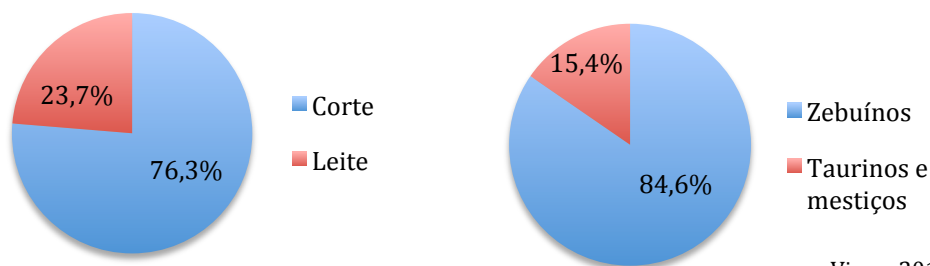
mercado surgiu nesta cadeia, as centrais de receptoras. Estas centrais são sistemas pecuários que disponibilizam normalmente fêmeas mestiças, sem caracterização racial definida, mas com boa habilidade materna, férteis e saudáveis, principalmente novilhas, para receberem os embriões e parirem os produtos da fertilização feita nos laboratórios (Lopes *et al.*, 2012).

Mesmo com os progressos obtidos nos processos de maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) para o desenvolvimento embrionário, a técnica de criopreservação de embriões *in vitro* ainda apresenta algumas desvantagens que precisam ser melhoradas e solucionadas (Hasler *et al.*, 1995). Além da extrema sensibilidade destes embriões ao processo de criopreservação, como mencionado anteriormente, o que tem limitado a utilização maximizada desta tecnologia, as taxas de blastocistos bovinos oriundos de oócitos maturados e fertilizados *in vitro* têm permanecido relativamente estáticas na última década, onde somente em torno de um terço (Lonergan *et al.*, 1994; Thompson, 1996; Lonergan *et al.*, 2006; Dayan *et al.*, 2000) dos oócitos selecionados morfológicamente antes de serem submetidos a MIV resultam em embriões viáveis.

### 2.11 – PIVE em bovinos de corte e de leite

O expressivo aumento no número de embriões produzidos em 2011 foi associado a dois fatores distintos. O primeiro foi uma recuperação no mercado de embriões de raças de corte. Após 5 anos de progressiva retração, em 2011 houve um aumento de 12,6% na produção de embriões nestas raças. A predominância da tecnologia de produção de embriões *in vitro* foi mantida no grupo das raças de corte e em raças zebuínas, situação esta observada nos anos anteriores (Viana, 2012).

A segunda razão para o aumento na produção de embriões foi associada ao uso da PIVE em raças leiteiras. O crescimento na participação de raças leiteiras no total de embriões produzidos segue tendência observada desde 2005, provavelmente desencadeada pela disponibilidade de sêmen sexado e seu uso na PIVE. O interessante, neste caso, é que a participação relativa das raças leiteiras (23,7% do total em 2011) tenha aumentado mesmo com a recuperação nos números das raças de corte (Figura 05) (Viana, 2012).



Viana, 2012

**Figura 05** - Produção de embriões bovinos em 2011 conforme especialização da atividade (raças de corte X leite) e grupamento racial (zebuínos X taurinos e mestiços)

Os números apresentados em 2011 confirmam a recente tendência de ampliação do mercado de PIVE no Brasil, e consequente mudança de paradigma. A tecnologia, inicialmente associada apenas aos rebanhos de gado elite, foi gradualmente sendo adotada pelos chamados rebanhos multiplicadores, visando a produção de touros para uso em rebanhos comerciais de gado de corte e de novilhas de reposição para rebanhos leiteiros. Esta mudança foi importante para desmistificar a tecnologia, e possibilitar explorar todo o seu potencial para beneficiar os diferentes segmentos da cadeia – dos rebanhos altamente especializados em melhoramento genético aos rebanhos de produção – e, desta forma, contribuir decisivamente para o aumento de produtividade da pecuária nacional (Viana, 2012).

#### **2.12 – Desafios comerciais da PIVE**

A produção em escala comercial de embriões bovinos *in vitro* apresenta desafios operacionais que a tornam distinta do modelo de PIVE sistematizado pelos laboratórios acadêmicos e de pesquisa. O sucesso comercial da PIVE refere-se à superação de várias barreiras, desde questões relacionadas ao tratamento comercial com o cliente até a seleção de receptoras e posterior transferência dos embriões produzidos, passando pela intensa rotina laboratorial. Estas ponderações fazem da PIVE uma técnica complexa e desafiadora, que sem muita atenção e organização está destinada a obter baixos resultados (Queiroz *et al.*, 2005).

Na literatura são encontrados diferentes protocolos de PIVE, cada qual com sua particularidade e seus respectivos resultados. Entretanto, o objetivo deles é similar, buscando a maturação oocitária *in vitro*, a preparação espermática, a fecundação propriamente dita e o cultivo *in*

*vitro* (Lonergan *et al.*, 2006). A diferença encontrada nos protocolos dos diferentes laboratórios comerciais são os desafios a que se propõem alcançar.

#### **2.13 – Tecnologia de embriões – tendência de mercado**

A disseminação das ferramentas da engenharia genética nas últimas décadas abriu novos mercados no Brasil e fez surgir uma infinidade de empresas e de profissões que, dentre outras coisas, contribuem para a geração de trabalho e renda e consequentemente o crescimento da economia.

Dentro das expectativas de mercado para a pecuária de corte e leite, é desejável que o setor da genética bovina também aumente sua contribuição para a valorização e aumento da produtividade brasileira. Mesmo sendo o segundo maior rebanho do mundo e detendo tecnologias e programas que permitam o melhoramento genético dos rebanhos adaptados às condições de pastejo tropicais, o Brasil ainda destaca-se como um grande importador de genética. Entretanto, cabe ressaltar que o País possui condições sanitárias, genética selecionada e centrais de inseminação e de embriões qualificadas para inserir-se de maneira mais arrojada no cenário internacional (Martins, 2010).

O mercado da biotecnologia possui uma cadeia produtiva extensa que engloba serviços de transferência, manejo nutricional, manejo sanitário que dão trabalho a muitos médicos veterinários e técnicos. E envolve também a indústria de hormônios, empresas que produzem materiais de consumo (descartáveis) para PIVE e MOET, aparelhos para transportar embriões e oócitos, equipamentos de laboratório e centrais de doadoras, entre outros (Martins, 2010).

Existem algumas peculiaridades nesse segmento. É notório que há um interesse muito maior do mercado de elite de bovinos pelas fêmeas e isso aumenta a oferta de touros machos para a cadeia de produção (Dayan, 2002). Aliado a esse desequilíbrio entre oferta e demanda, há ainda o alto custo de produção da carne e do leite, agravado com escassez de subsídios governamentais e falta de uma política de apoio. Considerando estes fatores é altamente salutar que os custos de implementação das biotécnicas de manipulação de embriões sejam adequadamente e profundamente avaliados para que o setor produtivo possa tomar decisões adequadas baseadas em análise de viabilidade econômica.

## **2.14 – Custos de produção, análise econômica e de investimentos**

### **2.14.1 – Custos de produção**

O sistema de custos é um conjunto de procedimentos administrativos que registra, de forma sistemática e contínua, a efetiva remuneração dos fatores de produção empregados nos serviços rurais. Os objetivos são auxiliar a administração na organização e controle da unidade de produção, revelar ao administrador as atividades de menor custo e mais lucrativas, além de mostrar os pontos críticos da atividade (Santos *et al.*, 2002).

Dentre os procedimentos utilizados para a avaliação econômica da atividade agropecuária, o custo de produção representa um dos principais parâmetros, e pode ser definido como a soma dos valores de todos os recursos (insumos e serviços) que são utilizados no processo produtivo de uma atividade (Frank, 1978; Reis, 2002). Segundo dados da Universidade Federal de Lavras (1999), o custo de produção é um dos parâmetros utilizados na tomada de

decisão para definir se o negócio é rentável ou não. A estimativa do custo de produção está ligada à gestão de tecnologia, ou seja, à alocação eficiente de recursos produtivos, e ao conhecimento dos preços destes recursos.

Segundo Reis (2002), considera-se *custo operacional* todo aquele exigido para que as operações produtivas ocorram, sendo, portanto, imprescindíveis para a execução das operações e dos processos produtivos. Os *custos operacionais totais (COT)* são calculados somando-se os *custos operacionais variáveis (COV)* e os *custos operacionais fixos (COF)*.

Os *custos operacionais fixos* são aqueles correspondentes aos recursos que não são assimilados pelo produto no curto prazo. Assim, considera-se apenas a parcela de sua vida útil por meio de depreciação. Também se incluem nesse grupo os recursos que não são facilmente alteráveis no curto prazo e que seu conjunto determina a capacidade de produção, ou seja, a escala de produção. Enquadram-se nesta categoria: benfeitorias, máquinas, equipamentos, consultorias fixas, impostos e taxas fixas.

Os *custos operacionais variáveis* são aqueles referentes aos insumos que se incorporam totalmente ao produto no curto prazo, não podendo ser aproveitados ou claramente aproveitados para outro ciclo. São aqueles alteráveis no curto prazo, ou seja, durante um ciclo produtivo (seja na produção de carne ou leite), podem ser modificados. Também os recursos que exigem dispêndios monetários de custeio enquadram-se nesta categoria: fertilizantes, agrotóxicos, combustíveis, alimentação, medicamentos, manutenção, mão-de-obra, serviços de máquinas e equipamentos, entre outros.

### **2.14.2 - Análise econômica**

A análise econômica é a comparação entre a receita obtida na atividade produtiva com os custos, incluindo, em alguns casos, os riscos, permitindo a verificação de como os recursos empregados no processo produtivo estão sendo remunerados (Reis, 2002).

De acordo com Nix (1995), Corrêa *et al.* (2000), Reis (2002) e Nogueira (2004), para fazer esta comparação, podem ser utilizados os seguintes indicadores:

- Margem bruta = receita total – custos variáveis;
- Lucro operacional ou Margem líquida = receita total – custos operacionais totais.

Os indicadores são usados para que o administrador possa ter uma visão mais precisa da situação pela qual a empresa está passando.

### 2.14.3 – Análise de investimentos

As análises de investimentos têm o tempo como componente fundamental de seu processo. Isto ocorre, pois um investimento é uma decisão que envolve desembolso de capital realizado no presente que proporcionará receitas no futuro. Por esse motivo, ao avaliá-lo, é preciso projetar as receitas e despesas que ocorrerão em tempos diferentes e então ajustá-las para que se possa fazer uma análise econômica adequada.

Uma empresa é estruturada para maximizar o lucro de seu investimento. Dessa forma, os critérios para investir permitem determinar o valor de um grupo de propostas, de forma que se possa escolher entre elas, a partir de uma ordenação das mais lucrativas (Chudleigh, 1982).

Outros indicadores financeiros que podem ser usados para se avaliar um investimento são (Antunes e Ries, 2001):

- Retorno sobre o investimento operacional (RIO) = lucro operacional ÷ capital investido na atividade (patrimônio + desembolsos no período);
- Retorno do capital investido (RCI) = lucro total ÷ capital investido na atividade (patrimônio + desembolsos no período).

A análise de projetos é de extrema importância. No cenário mundial atual, onde a liberação de crédito é cada vez mais escassa, cenários mais promissores permitem retorno seguro do investimento minimizando risco e taxas de juros aplicadas nos negócios.

Um investimento em qualquer situação é um desembolso que é feito visando gerar um fluxo de benefícios futuros, usualmente superior a um ano. Hoje, em função da própria dinâmica dos negócios, as técnicas de análise de investimentos estão sendo usadas tanto para análise de investimentos de porte, associados a longos horizontes de planejamento dentro de um projeto, como também para operações de curto prazo, onde as operações de compras a vista e compras a prazo são efetuadas (Lapponi, 2000).

O grande campo de aplicação das técnicas de análise de investimentos, sem dúvida, ainda está associado ao processo de geração de indicadores utilizados na seleção de alternativas superiores de investimentos. A decisão de fazer investimento de capital é parte de um processo que envolve a geração e avaliação de diversas alternativas que atendam as especificações técnicas dos investimentos. Após relacionadas as alternativas viáveis tecnicamente, é que se analisará quais delas são atrativas financeiramente (Penedo, 2005).

### Ponto de resíduo

O ponto de resíduo indica o nível de produção no qual a atividade tem seu custo operacional igual à receita total (Reis, 2002). Indica o quanto a empresa tem que faturar para não trabalhar no prejuízo (Antunes e Ries, 2001; Reis, 2002; Correia Neto, 2007). Sua determinação orienta a formação das metas de faturamento mínimo a serem atingidas (Correia Neto, 2007).

### **2.15 – Avaliações econômicas na pecuária bovina e na produção de embriões bovinos**

Com a introdução das tecnologias no sistema de produção ocorre aumento dos custos operacionais, necessitando de maiores desembolsos no fluxo de caixa da empresa rural. Em contrapartida, o aumento da produção (bezerros desmamados, arrobas produzidas, animais abatidos, etc.) tende a diluir os custos operacionais fixos (depreciações e despesas fixas) fazendo com que o custo operacional total unitário seja menor. Esses resultados serão melhores ou piores em função da região (preços de insumos, terra e de arroba), do mercado (preços de compra e venda) e da escala de produção ou tamanho da propriedade. As taxas de rentabilidade mais baixas, normalmente, são de fazendas localizadas em regiões com preço elevado da terra, e as taxas mais elevadas de rentabilidade nas fazendas de terras com preços mais baixos. Essas taxas também variam em função do sistema de produção, local, escala e nível de intensificação (correção e adubação de pastagens, suplementação nutricional, IA, MOET, PIVE, etc.) (Barbosa e Souza, 2007).

Estudos econômicos das variáveis que influenciam os resultados das técnicas de produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos são escassos na literatura. A viabilidade dessas atividades depende dos índices reprodutivos, e é variável em diversas situações. Projeções antecipadas

dos resultados econômicos da MOET e PIVE facilitam a tomada de decisões na medida em que proporcionam a antecipação dos prováveis resultados e da formação do custo da prenhez.

Alguns trabalhos recentes têm tentado projetar a produção embrionária para uso em simulação. Em virtude da variação na produção embrionária ser inerente ao processo reprodutivo, simulações e projetos que consideram o uso do número médio de embriões viáveis representam situações inexistentes e distantes da realidade. Essas situações têm sido minimizadas quando metodologias corretas de simulação são implementadas (Beltrame *et al.*, 2007; Beltrame, 2010; Beltrame *et al.*, 2010).

Tanto na biotécnica de MOET quanto na de PIVE, a grande variabilidade na produção de embriões pelas doadoras (Slenningl e Wheeler, 1989; Galli *et al.*, 2003) e a necessidade de compra e sincronização de receptoras, antes que se conheça o número de embriões coletados ou produzidos, dificultam a decisão acerca do número de animais que devem ser destinados à sincronização.

Com a finalidade de esclarecer esses problemas e projetar antecipadamente resultados de atividades que apresentem elevado risco, alguns modelos matemáticos foram desenvolvidos (Slenningl & Wheeler, 1989; Ostergaard *et al.*, 2005), para auxiliar na tomada de decisão em diferentes etapas do sistema de produção de bovinos.

Beltrame *et al.* (2010), em um estudo de simulação e análise econômica da produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos, avaliaram o efeito das variáveis número de receptoras, protocolo de sincronização, indicadores de eficiência reprodutiva e custo da prenhez na eficiência econômica da produção de embriões em bovinos.



Com o propósito de promover a visualização dos resultados da simulação, um cenário base originado em taxas tradicionais de desempenho reprodutivo nas técnicas de MOET e PIVE, encontrados na bibliografia (Spell *et al.*, 2001; Tomita, 2003; Barreiros *et al.*, 2004), foi proposto e introduzido no aplicativo de simulação como referência para comparações. Neste cenário, definiu-se que cinco doadoras seriam utilizadas em cada colheita e/ou aspiração, o período de simulação seria de dez anos, e o intervalo entre colheita ou aspiração seria de 60 dias para MOET e 30 dias para PIVE.

O cenário foi proposto para contemplar a atividade em uma propriedade, onde taxas e custos tradicionais da MOET e PIVE fossem introduzidos como dados de entrada. Assim, possibilitou-se a determinação da viabilidade dessa atividade na situação proposta do estudo. Nesse caso, custos de doadoras, receptoras e indicadores de eficiência reprodutiva foram completamente inseridos no modelo, e possibilitaram a determinação do valor presente líquido (VPL) e da taxa interna de retorno (TIR), sob uma taxa de desconto de 0,5% mensal (Tabela 03). Neste caso, baseou-se em um negócio que obtivesse um rendimento de 6% ao ano, próximo ao oferecido pela caderneta de poupança. As estimativas de custo inseridas no modelo tiveram como base valores de mercado pesquisados em novembro de 2008, e paridade de câmbio de US\$ 1,00 para R\$ 2,60.

**Tabela 03** - Valores considerados no cenário base em uma fazenda

Item	Base (R\$)
Custo de aquisição da doadora	15.000,00
Valor residual da doadora	15.000,00
Valor de descarte da receptora	980,00
Custo do protocolo de adaptação	62,60
Custo de manutenção da receptora	34,20
Custo de sincronização da receptora	12,00
Custo de manutenção da doadora	49,19
Custo do protocolo de superovulação	303,20
Honorários veterinários por doadora em:	
. coleta	500,00
. aspiração	300,00
Custo do embrião <i>in vitro</i> produzido	70,00
Valor de venda da prenhez	2.500,00
Valor de venda da prenhez macho	2.500,00
Valor de venda da prenhez fêmea	4.000,00

Fonte: Beltrame *et al.* (2010)

No cenário base, o modelo foi utilizado para determinar e projetar um fluxo de caixa da atividade, de forma a estimar o número de prenhez produzidas, as receitas provenientes do descarte de receptoras, da venda de prenhez e os índices econômicos ao final do período. Uma relação de 40 receptoras por doadora na propriedade foi utilizada, tendo sido então utilizadas 200 receptoras em todos os cenários em um momento inicial.

Todos os resultados apresentados no estudo

foram obtidos com o programa de simulação. Para os cenários que envolveram a PIVE, os indicadores exibiram comportamento similar ao demonstrado na MOET. Valores positivos foram observados no cenário onde ocorreu a sincronização para inovulação em tempo fixo (TETF).

Nos cenários para MOET e PIVE, a sincronização para a realização da TETF

reduziu a ociosidade de receptoras e, conseqüentemente, o custo final da prenhez em comparação à metodologia tradicional. Idéia similar já havia sido demonstrada por Beltrame *et al.* (2007), em IA com sêmen convencional na MOET. A sexagem fetal deve estar associada à produção *in vivo* de embriões bovinos. Além disso, o número ótimo de receptoras por doadora é variável e dependente dos parâmetros de entrada do sistema.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEL, M.H., WOOTTON, A.N., WILKINS, V., HUHTANIEMI, I., KNIGHT, P.G., CHARLTON, H.M. The effect of a nullmutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene on mouse reproduction. *Endocrinology*, 141, 1795–1803, 2000.
- ADAYEMO, O.; HEATH, E. Plasma progesterone concentration in *Bos taurus* and *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v.14, p. 422 - 420, 1980.
- ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE, F.; PAUL, D.; DONNAY, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. *Animal Reproduction Science*, v.107, p.48-61, 2008.
- ALPER, M.M.; BRINDEN, P.R.; FISHER, R.; WIKLAND, M. Is your IVF programme good? *Hum. Reprod.* 17(1): 8-10, 2002.
- ANTUNES, L.M.; RIES, L.R. Gerência Agropecuária. Guaíba Agropecuária Ltda. 268p., 2001.
- ASSAD, A.L.; AUCÉLIO, J.G. Biotecnologia no Brasil: recentes esforços. In: Silveira, J.M.F.J. *et al.*, (Org.). Biotecnologia e Recursos Genéticos: Desafios e Oportunidades para o Brasil. Campinas: Instituto de Economia/finep, 2004.
- ASSEY, R.J.; HYTTTEL, P.; GREVE, T.; PURWANTARA, B. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, v.37, p.335-344, 1994.
- AUSTIN, C.R. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Australian Journal of Science Research*, v 4, n.1, p. 581 – 596, 1951.
- AVELINO, K.B.; ROSSETTO, M.; MARAIA, A.C.; LANDIM JR., L.P.; GARCIA, J.M. Produção *In vitro* de embriões: sêmen convencional vs. sexado, *Acta Scientiae Veterinariae*. 35(Supl. 3): 2007.
- BARBOSA, F.A.; SOUZA, R.C.; Administração de fazendas de

- bovinos – leite e corte. Viçosa: Aprenda Fácil, 342p., 2007.
- BARREIROS, T.R.R., BORSATO, E.A., LUDWIG JR, H.E., MARQUES, M.O., RIBEIRO JR, M., SILVA, R.C.P., SENEDA, M.M. Eficiência de diferentes protocolos para sincronização de cio em receptoras de embrião em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae* – Vol 32, p. 195, Porto Alegre: UFRGS – Out, 2004.
- BARUSELLI, P.S.; SOUZA, A.H.; MARTINS, C.M.; UNNO, L.; AYRES, H.; ANDRADE, A.F.C.; CLÁUDIA, et al. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 31(3): p. 374-381. 2007.
- BASSO, A.C.; SCHNEIDER, C.L.; PONTES, J.H.F. Novas alternativas para a aplicação em larga escala de embriões produzidos *in vitro*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 4, 2004, Londrina, PR. Anais... São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, p. 205-209, 2010.
- BELL, M.; PAVIT, K. Technology Accumulation and Industrial Growth. *Industrial and Corporate Change*, v.2, n.2. Oxford U.P., p.157-210, 1992.
- BELTRAME, R.T. Impacto bioeconômico da sexagem de espermatozoides em programas de transferência de embriões e fertilização *in vitro* em zebuínos. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes; 113p., 2010.
- BELTRAME, R.T.; BARIONI, L.G.; MAESTRI, B.D.; QUIRINO, C.R. Economic optimization of the number of recipients in bovine embryo transfer programs. *Scientia Agricola*, v. 64, p. 221-226, 2007.
- BELTRAME, R.T.; QUIRINO, C.R.; BARIONI, L.G.; DIASA, J.B.; SOUZA, P.M. Análise da produção de embriões na fertilização *in vitro* e transferência de embriões para doadoras Nelore. *Ciência Animal Brasileira*, v.11, p.21-27, 2010.
- BETTERIDGE, K.J. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. *Animal Reproduction Science*, Werribee, v. 79, p. 203-244, 2003.
- BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V.; MORIN, N.; CRAWFORD, L.; MADAN, P.; KING, W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology*, v.71, p.30-38, 2009.
- BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M.-A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, v.66, p.38-43, 2002.
- BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.A.; SIRARD, M.-A. In vitro production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. *Theriogenology*, v.47, p.1061-1075, 1997.
- BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for

- developmental competence in bovine oocytes. *Mol. Reprod. Dev.*, v.41, p.54-62, 1995.
- BOLS, P.E.J.; VANDENHEEDE, J.M.M.; VAN SOOM, V.; DE KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. *Theriogenology*, v.43, p.677-687, 1995.
- BOLS, P.E.J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; VANDENHEEDE, J.M.M.; KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on *cumulus* oocyte complex morphology and development capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 45, p. 1001 – 1014, 1996.
- BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; LEIN, A.; CORYN, M.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF program. *Theriogenology*, v. 49, p. 983-995, 1998.
- BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Effects of needle tip bevel aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact *cumulus* oocyte complexes. *Theriogenology*, v.47, p.1221 – 1236, 1997.
- BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; DUROCHER, J.; BARNES, F.L.; SIRARD, M.A. Effect of LH injection before ovum pick up on *in vitro* embryo production with oocytes collected at different intervals after the last FSH injection. *Theriogenology*, v.53, p. 347, 2000.
- BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWICK, W.J.; EVANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, v.27, p.147 – 158, 1982.
- BROGLIATTI, G.M.; ADAMS, G.P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, v.45, p. 1163-1176, 1996.
- BROGLIATTI, G.M.; FURNUS, C.C.; De MATOS, D.G.; MARTINEZ, A.G. *In vitro* fertilization program in prepubertal Brangus calves and later embryo collection. *Theriogenology*, v.51, n. 1, p. 313, 1999.
- CAMARGO, L.S.A. Produção *in vitro* e expressão gênica em embriões bovinos. 2005. 86f. Tese (doutorado em Ciência Animal, área de concentração em Reprodução Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CAMPBELL, B. K.; PICTON, H. M.; MANN, G. E.; McNEILL Y, A. S.; BAIRD, D. T., Effect of steroid and inhibin-free ovine follicular fluid on ovarian follicles and ovarian hormone secretion. *J. Reprod. Fert.*, v.93, p.81-96, 1991.
- CAROLAN, C.; LONERGAN P.; MONGET P.; MONNIAUX D.; MERMILLOD P. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. *Molecular Reproduction Development*, v. 43, p. 477-483, 1996.

- CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* × *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. *Theriogenology*, 2008. 69(2): p. 167-175.
- CASTILHO, C.; GARCIA, J.M. Divergência no crescimento folicular: efeito na competência ovocitária para produção *in vitro* de embriões – revisão. *Arch. Vet. Sci.*, v.10, p.17-23, 2005.
- CASTILHO, C.; RENESTO, A.; MUSTAFÁ, F.C.; SILVA, J.O.F.; COELHO, L.A.; GARCIA, J.M. Associação da MOET e OPU-PIV na produção de embriões bovinos. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, n.1, p.231-237, 2009.
- CASTRO NETO, A.S.; SANCHES, B.V.; BINELLI, M.; SENEDA, M.M.; PERRI, S.H.; GARCIA, J.F. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology*, v.63, p.1249-1255, 2005.
- CHANG, M.C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tube. *Nature*, v. 168, n.1, p. 697 – 698, 1951.
- CHANG, M.C. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. *Nature*, v.184, p. 466 – 467, 1959.
- CHAUBAL, S.A.; FERRE, L.B.; MOLINA, J.A.; FABER, D.C.; BOLS, P.E.J.; REZAMAND, P.; TIAN, X.; YANG, X. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU-IVP system. *Theriogenology*, v.67, p.719-728, 2007.
- CHUDLEIGH, P.D. Análise de investimento. In: SEMINÁRIO SOBRE A APLICAÇÃO DE UM ENFOQUE DE SISTEMAS NA PESQUISA DE PRODUÇÃO ANIMAL, 1, 1978, Campo Grande. *Anais...* Brasília: Embrapa/CNPGC, Documento 4, p. 35-53, 1982.
- CORDEIRO, D. Estabelecimento da técnica de análise de proteoma de complexos *cumulus* ovócitos bovinos bloqueados ou não com 6-dimetilaminopurina durante a maturação *in vitro*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 105p, 2001.
- CORRÊA, E.S.; VIEIRA, A.; COSTA, F.P. *et al.* Sistema semi-intensivo de produção de carne de bovinos nelores no Centro-Oeste do Brasil. Campo Grande: Embrapa/CNPGC, Documento 95, 2000.
- CORREIA NETO, J.F. Excel para profissionais de finanças: manual prático. Rio de Janeiro: Elsevier, 283p., 2007.
- CROWE, M.A., KELLY, P., DRIANCOURT, M.A., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Effects of follicle-stimulating hormone with and without luteinizing hormone on serum hormone concentrations, follicle growth, and intrafollicular estradiol and aromatase activity in gonadotropin-releasing hormone-immunised heifers. *Biol. Reprod.*, 64, 368– 374, 2001.
- CUSHMAN, R.A., DESOUSA, J.C., HEDGPETH, V.S., BRITT, J.H. Alteration of activation, growth, and

- atresia of bovine preantral follicles by long-term treatment of cows with estradiol and recombinant bovine somatotropin. *Biol. Reprod.*, 65, 581–586, 2001.
- DAYAN, A. Utilização das técnicas de aspiração folicular e fecundação *in vitro* na reprodução bovina. In: Workshop sobre embriões bovinos produzidos *in vitro*, I, 2002, Juiz de Fora: [Anais...] Embrapa Gado de Leite, p. 13 – 26, 2002.
- DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 15 2000, Rio Quente: [Anais...]. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, Porto Alegre, v.28, n.1, p. 181 – 185, 2000. Suplemento.
- DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões bovinos. In: Workshop sobre embriões bovinos produzidos *in vitro*, I, 2002, Juiz de Fora: [Anais...] Embrapa Gado de Leite, p. 13 – 26, 2002.
- DOSI, G. Technological Paradigms and Technological Trajectories. Research Policy, 11, 147-162, 1982.
- FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence *Anim. Reprod. Sci.*, v. 78, p. 203–216, 2003.
- FAIR, T., HULSHOF, S.C.J., HYTTEL, P., BOLAND, M., GREVE, T. Bovine oocyte ultrastructure in primordial to tertiary follicles. *Anat. Embryol.*, v. 195, p. 327–336, 1997.
- FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*, v.42, p.437-442, 1995.
- FEICHTINGER, W.; KEMETER, P. Transvaginal sector scan sonography for needle guided transvaginal follicle aspiration and other applications in gynecologic routine and research. *Fertility and Sterility*, v.45, p.722-725, 1986.
- FIGUEIREDO, R. A.; BARROS C. M.; PINHEIRO O. L. et al. Ovarian follicular dynamics in Nellore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v.47, p.1489-1505, 1997.
- FONSECA, M.G.D.; LAGES, C.; SILVEIRA, J.M.F.J. Institutional and Financial Requirements for the Emergence of Biotechnology in Brazil, iss. In. 10<sup>th</sup> International Joseph A. Schumpeterian Society Conference, Milan, Italy, [www.schumpeter2004.unibocconi.it](http://www.schumpeter2004.unibocconi.it), paper download (\*.pdf ), Milan Cespy - University of Bocconi, 2004.
- FRANK, R.G. Introducción al cálculo de costos agropecuarios. Buenos Aires: El Ateneo, 1978.
- FRY, R.C.; SIMPSON, T.L.; SQUIRES, T.J. Ultrasonically guided transvaginal oocyte from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology*, v. 49, n. 6, p. 1077 – 1082, 1998.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, v. 55, p. 1341 –

- 1357, 2001.
- GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, v.59, p.599-616, 2003.
- GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.42, p.371 – 379, 1996.
- GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R. Estado da arte da fecundação *in vitro* em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1, 2004, Londrina, PR. Anais... São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, p. 223-230, 2004.
- GARCIA, J.M., ESPER, C.R., AVELINO, K.B., PUELKER, R.Z., VANTINI, R., ALMEIDA Jr., I., RODRIGUES, C.F.M. Desempenho e limitações na produção *in vitro* de embriões bovino de vacas com infertilidade adquirida. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v.27, n.1, p. 237, 1999. (Abstract).
- GINTHER O.J.; KNOPF L.; KASTELIC J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal Reproduction Fertility*, v.87, p.223-30, 1989.
- GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L. Produção *in vitro* de embriões. In: Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: Livraria Varela, 2002, cap.10, p.195-226.
- GONG, J.G., BRAMLEY, T.A., GUTIERREZ, C.G., PETERS, A.R., WEBB, R. Effects of chronic treatment with a gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH and ovarian function in heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 105, 263–270, 1995.
- GONG, J.G., CAMPBELL, B.K., BRAMLEY, T.A., GUTIERREZ, C.G., PETERS, A.R., WEBB, R.. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol. Reprod.*, v.55, p.68–74, 1996.
- GOODHAND, K. L.; WATT, R. G.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M.; BROADBENT, P. J. In vitro oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, v.51, p.951-961, 1999.
- GORDON, I. R. Oocyte recovery and maturation. In: Laboratory Production of Cattle Embryos. Cab International. Wallingford. Oxon. UK., p.30 - 142, 1994.
- HAGEMANN, L.J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. *Theriogenology*, v.51, p.449-459, 1999.
- HANADA, A.; ENYA, Y.; SUZUKI, T. Birth of calves by non-surgical transfer of *in vitro* fertilized embryos obtained from oocytes

- matured *in vitro*. *Jpn J Reprod*, v.32, p.208, 1986.
- HANSEN P.J. Realizing the promise of IVF in cattle – an overview. *Theriogenology*, 65:119-25, 2006.
- HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTMAN, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, v.43, p.141-152, 1995.
- HAWK, H.W.; WALL, R.J. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro* produced oocytes. Selection of oocytes and zygotes. *Theriogenology*, v. 41, p. 1571 – 1583, 1994.
- HAZELEGER,N.L.; STUBBINGS, R.B. Developmental potential of selected bovine oocyte cumulus complexes. *Theriogenology*, v. 37, n. 1, p. 219, 1992.
- HENDRIKSEN, P.J.M.; STEENWEG, W.N.M.; HARKEMA, J.C.; MERTON, J.S.; BEVERS, M.M.; VOS, P.L.A.M.; DIELEMAN, S.J. Effect of different stages of the follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.61, p.909-920, 2004.
- HENDRICKSEN, P.M.J.; VOS, P.L.A.M.; STEENWEG, W.N.M.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. *Theriogenology*, v.53, p.11-20, 2000.
- HOESCHELE, I. Potential gain from insertion of major genes into dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 73, p. 2601 – 2618, 1990.
- HOHENBOKEN, W.D. Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology*, 52(8): p. 1421-1433, 1999.
- IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization *in vitro* of cattle follicular oocytes matured in culture. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 50, p. 119 – 121, 1977.
- JOHNSON, S.K. Possibilities with today's reproductive technologies. *Theriogenology*, 64(3): p. 639-656, 2005.
- KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 54, n. 5, p.741 – 756, 2000.
- KRUIP, T.A.M.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, v. 42, p.675 – 684, 1994.
- KRUIP, T.A.M.; PIETERSE, M.C.; VAN BENEDEN, T.H.; VOS, P.L.A.M.; WURTH, Y.A.; TAVERNE, M.A.M. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. *Veterinary Record*, v.128, p. 208 – 210, 1991.
- LAMBERT, R. D.; SIRARD, M.A.; BERNARD, C.; BELAND, R.;



- RIOUX, J.E.; LECLERC, P.; MENARD, D.P. BEDOYA, M. In vitro fertilization of bovine oocytes matured in vivo and collected at laparoscopy. *Theriogenology*, v. 25, n. 01, p. 117-133, 1986.
- LAPPONI, J.C. *Projetos de investimento: Construção e avaliação do fluxo de caixa: modelo em EXCEL*. São Paulo, LT ed., 2000.
- LARSSON, B. In vitro fertilization using different sources of oocytes. *Acta Agric. Scandinavica*, Suppl. 29, p. 30 – 36, 1998.
- LLERENA, P.V. Control de calidad en el laboratorio de reproducción asistida. In: *Reproducción humana e infertilidad*. Ed. Imp. Boutique creativa, Quito, cap10, p.475, 2002.
- LONERGAN, P. In vitro-produced bovine embryos – Dealing with problems. *Acta Scientiae Veterinariae*, 36(Supl. 2): p.349-360, 2008.
- LONERGAN, P.; FAIR, T.; CORCORAN, D.; EVANS, A.C.O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*, v. 65, p. 137-152, 2006.
- LONERGAN, P.; FAIR, T.; EVANS, A.C.O. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v.37, n.1, p.48-53, 1994.
- LOONEY, C.R.; LINDSEY, B.R.; GONSETH, C.L.; JOHNSON, D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, v. 41, p. 67-72, 1994.
- LOPES, B.C.; MATARIM, D.L.; FRANÇA, M.G.B.; MIZIARA, M.N.; LOPES, P.A.; FRANCO, T. Genética Bovina Brasileira: Mercado Internacional e Mapeamento das Competências e Tecnologias Mineiras. In: CENTRO DE INTELIGÊNCIA EM GENÉTICA BOVINA. Uberaba, [2012]. Disponível em:<<http://cigeneticabovina.com.br/pe/6f46f451e506ba21fdc300190dd53256.pdf>>.
- LOPEZ RUIZ, L.; ALVAREZ, N.; NUNEZ, I.; MONTES, I.; SOLANO, R.; FUENTES, D.; PEDROSO, R.; PALMA, G.A.; BREM, G. Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 45, p. 292, 1996. (Abstract).
- LU, K.H.; CRAN, D.G.; SEIDEL JR, G.E. In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm. *Theriogenology*, v. 52, 1392-1405, 1999.
- LU, K.H.; GORDON, I.; GALLAGHER, M.; McGOVERN, H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived in vitro fertilization of follicular oocytes matured in vitro. *Veterinary Record*, v.121, p. 159 – 260, 1987.
- LU, K.H.; SEIDEL JR, G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow

- cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology*, v.62, p.819-830, 2004.
- 5b992e42cb8442a5cb2c20dfb09a46.pdf>.
- LUSSIER, J.G., MATTON, P., DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil.*, 81, 301–307, 1987.
- MEINTJES, M.; BELLOW, M.S.; BROUSSARD, J.R.; PAUL, J.B.; GODKE, R.A. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone – treated pregnant beef for *in vitro* fertilization. *Journal of Animal Science*, v.73, p. 967 – 974, 1995.
- MACHATKOVÁ M.; JOKESOVÁ E.; PETELÍKOVÁ J.; DVORÁČEK V. Developmental competence of bovine embryo derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. *Theriogenology*, v. 45, p. 801-810, 1996.
- MELO, D.S. Produção *in vitro* de embriões derivados de oócitos obtidos de diferentes fases da onda folicular de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). 2008. 88f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu SP.
- MACHATKOVÁ, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, v.61, p.329-335, 2004.
- MERTON, J.S.; DE ROOS, A.P.W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P.L.A.M.; DIELEMAN, S.J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, v.59, p.651-674, 2003.
- MAJERUS, V.; De ROOVER, R.; ETIENNE, D.; KAIDI, S.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology*, v. 52, n.7, p. 1169-1179, 1999.
- MIHM, M.; BLEACH, E.C.L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, 78 217–237, 2003.
- MALARD, P.F. Coleta, maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de ovócitos de bezerras da raça Nelore de 2 a 3 meses de idade. Dissertação (Mestrado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG: UFMG, 47p., 2000.
- MILAZZOTTO, M.P.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O. Biotecnologias da reprodução: Biologia molecular aplicada à biotecnologia. *Ciênc. Vet. Tróp.*, v.11, suplemento 1, p.145-148, 2008.
- MARTINS, C.F. O impacto da transferência de embriões e da fecundação *in vitro* na produção de bovinos no Brasil. [S.I.], 2010. Disponível em: <<http://cigeneticabovina.com.br/pe/26>
- NEVES, M.F.; SIMPRINI, E.; MILAN, P. Estudo de Atratividade do Polo de Excelência em Genética Bovina. In: CENTRO DE INTELIGÊNCIA

- EM GENÉTICA BOVINA. *Pesquisas e estudos*. Uberaba, [2010]. Disponível em: <<http://cigeneticabovina.com.br/pe/6f46f451e506ba21fdc300190dd53256.pdf>>.
- NIX, J. Farm management pocketbook. Kent: Wye College, 1995.
- NOGUEIRA, E. Análise de investimentos. In: BATALHA, M.O. (coord.) *Gestão agroindustrial*, 3 ed., São Paulo: ATLAS, p.224-288, 2001.
- NOGUEIRA, M.P. Gestão de custos e avaliação de resultados: agricultura e pecuária. Bebedouro: Scot Consultoria, 219p., 2004.
- NONATO JR, I.; RUFINO, F.A.; SANCHES, B.V.; PONTES, J.H.F.; UVO, S.; ERENO JR., J.C.; SENEDA, M.M. Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, p.95, 2004.
- NUMABE, T.; OIKAWA, T.; KIKUCHI, T.; HORIUCHI, T. Birth – weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of *in vitro* or *in vivo* produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science*, v.64, p.13 – 20, 2000.
- OSTERGAARD, S., FRIGGENS, N.C., CHAGUNDA, M.G.G. Technical and economic effects of an inline progesterone indicator in a dairy herd estimated by stochastic simulation. *Theriogenology*. v.64, p 819-843, 2005.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.; WINER, M.A. *et al.* Capacitation of bovine spermatozoa by heparin. *Biol. Reprod.*, v.38, p. 1171 – 1188, 1988.
- PAVLOK A.; LUCANS-HAHN, NIEMANN H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Molecular Reproduction Development*, v.31, p. 63-67, 1992.
- PEIXER, M.A.S.; DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões bovinos. In: Workshop sobre Reprodução Animal, I, 2000, Pelotas: [Anais...] Embrapa Clima Temperado, p. 95 – 99, 2000a.
- PEIXER, M.A.S.; DODE, M.A.N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* de embriões – visão da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 15 2000, Rio Quente: [Anais...]. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, Porto Alegre, v.28, n.1, p. 175, 2000b. Suplemento.
- PEIXER, M.A.S.; RUMPF, R.; DE BEM, A.R.; QUEIROZ, L.M.V. Produção de embriões e gestações a partir de ovócitos recuperados por ultra-sonografia em fêmeas bovinas superovuladas. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 1997.
- PENEDO, R.C. *A taxa Interna de Retorno na análise de investimentos*. 1ed – Brasília: Lettera Editora Ltda. 2005.
- PETYIM, S.; BAGE, R.; HALLAP, T.; BERGQVIST, A. –S.; RODRÍGUEZ- MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B. Two different schemes of twice-weekly ovum

- pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology*, v.60, p.175-188, 2003.
- PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K.A.; KRUIP, T.A.M.; TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound-scanning of the ovaries. *Theriogenology*, v. 30, p.751-762, 1988.
- PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M.; WURTH, Y.A.; VAN BENEDEN, T.H.; WILLENSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, v. 35, n. 1, p. 19 – 24, 1991.
- PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M.; WURTH, Y.A.; VAN BENEDEN, T.H.; WILLEMSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M. Repeated transvaginal ultrasound- guided ovum pick-up in ECG-treated cows. *Theriogenology*, v. 37, p. 273, 1992. (Abstract).
- PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods on the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v.71, p.690-697, 2009.
- PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P.H.S.; FAIFER, F.S.; STERZA, F.A.M.; SCHENK, J.L.; SENEDA, M.M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, 74:1349-1355, 2010.
- PUCCHINI, A.L. *Matemática financeira Objetiva e aplicada*. 6a ed, São Paulo: Saraiva, 1999.
- QUEIROZ, L.M.V.; PEIXER, M.A.S.; MALARD, P.F.; SANTANA, G.M.; XAVIER, M.C.; SOUSA, R.R. Desafios da fecundação *in vitro* comercial. *Acta Scientiae Veterinariae* 33(Suplemento 1): 159-161, 2005.
- RATH, D.; MOENCH-TEGEDER, G.; TAYLOR, U.; JOHNSON, L.A. Improved quality of sex sorted sperm: a prerequisite for wider commercial application. *Theriogenology*, 71:22-29, 2009.
- REIS, R.P. Fundamentos de economia aplicada. Lavras: UFLA/FAEPE, 95p., 2002.
- RIBEIRO, A.C.; QUEIROZ, S.A.; McCALLISTER, A.J. Análise da sensibilidade da receita líquida vitalícia de bovinos da raça holandesa aos itens de receita e de custo. In: REUNIÃO ANNUAL DA SBZ, 38, 2001, Piracicaba, *Anais...*, Piracicaba: SBZ, CD-ROM, 2001.
- RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and*

- Development*, v. 61, p. 234-248, 2002.
- RODRIGUES, J. L. Transferência de Embriões Bovinos - Histórico e Perspectivas Atuais. *Revista Brasileira De Reprodução Animal*, v. 25, n. 2, p. 102-107, 2001.
- RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. Fecundação *in vitro*: aplicação comercial. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v.28, n.1, p. 186-187, 2000.
- ROOVER, de R.; GENICOT, G.; LEONARD, S.; BOLS, P.; DESSY, F. Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Animal Reproduction Science*, v. 86, p. 13- 25, 2005.
- ROTH, Z., ARAV, A., BOR, A., ZERON, Y., BRAW-TAL, R., WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat-stressed cows. *Reproduction*, 122, 737-744, 2001.
- RUBIN KCP, PONTES JHF, NONATO-JUNIOR I, ERENO-JUNIOR JC, PANSARD H, SENEDA MM. Influência do grau de sangue Nelore na produção in vivo de oócitos. *Acta Scientiae Veterinariae* 2005; 33:183.
- RUBIN KCP, RIGO AG, SCHROEDER RV, SILVA RCP, MARQUES MO, SENEDA MM. Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para obtenção in vivo de oócitos bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae* 2004; 32:121.
- RUVUNA, F.; TAYLOR, J.F.; WALTER, J.P.; TURNER, J.W.; THALLMAN, R.M. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: I. description of a biological model for steer production. *Journal Animal Science*, 70: 1077-1083, 1992.
- SANGILD, P.T.; SCHMIDT, M.; JACOBSEN, H.; FOWDEN, A.L.; FORHEAD, A.; AVERY, B.; GREVE, T. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from *in vitro* produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*, v.62, p.1495 – 1504, 2000.
- SANTOS, G.J.; MARION, J.C.; SEGATTI, S. Administração de custos na agropecuária. Atlas, São Paulo, 165p., 2002.
- SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (Bos indicus) heifers and cows. *Theriogenology*, v.63, p.2382 - 2394, 2005.
- SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M.C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. *J. Dairy Science*, 87: 905-920, 2004.
- SAUVÉ, R. Ultrasound guided follicular aspiration and in vitro fertilization. In: XIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, [Anais ...] v. 26, n. 1, p. 141-145, 1998.

- SCHERNTHANER, W.; WENIGERKIND, H.; STOJKOVIC, M.; PALMA, G.A.; MODL, J.; WOLF, E.; BREM, G. Pregnancy rate after ultrasound-guided follicle aspiration in nonlactating cows from different breeds. *J. Vet. Med. Ass.*, v.46, p.33-37, 1999.
- SENEDA, M.M.; BLASCHI, W. Ovum pick up em bovinos: considerações técnicas. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1, 2004, Londrina, PR. Anais... São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootécnica, Universidade de São Paulo, 2004. p.231-237.
- SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; ANDRADE, E. R.; BINELLI, M.; OLIVEIRA, J. A.; MAX, M. C.; GARCIA, J. M. Relationship between follicle size after FSH treatment and efficiency of oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, v. 2, n. 3, p. 178-182, 2005.
- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; ANDRADE, E.R.; GARCIA, J.M.; OLIVEIRA, J.A. Shorter interval between fsh administration and follicle aspiration increases efficiency of oocyte recovery, *Theriogenology*, v. 57, p. 684, 2002. (Abstract).
- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; DE OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, v.67, p.37-43, 2001.
- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA A, J.M.; PUELKER, R.Z.; OLIVEIRA, J.A. Obtenção de embriões bovinos em um caso de obstrução uterina. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v.28, n.1, p.331, 2000.
- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; VANTINI, R. Relação entre tamanho do folículo e aspiração folicular transvaginal para o desenvolvimento *in vitro* de embriões. *Arquivos Faculdade Veterinária UFRGS.*, v.27, n.1,p. 293, 1999.
- SILVEIRA, J.M.F.J.; BORGES, I.C.; FONSECA, M.G.D. Biotecnologia e Desenvolvimento de Mercados: Novos Desafios, Novos Conceitos? In: Dimensões do Agronegócio Brasileiro: Políticas, Instituições e Perspectivas. MDA; Brasília, DF, p.319-355, 2007.
- SILVEIRA, J.M.F.J.; BORGES, I. C.; BUAINAIN, A. M. Biotecnologia e Agricultura: da Ciência e Tecnologia aos Impactos da Inovação. São Paulo em Perspectiva, Vol. 19, No 2, Abril/Junho, 2005.
- SLENNING, B. D.; WHEELER, M.B. Risk evaluation for bovine embryo transfer services using computer simulation and economic decision theory. *Theriogenology*. v. 31(3), p.653- 673, 1989.
- SMITH, L. C.; OLIVERA-ANGEL, M.; GROOME, N. P. ; BHA TIA, B.; PRICE, C. A. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. *J. Reprod. Fert.*, v.106, p.193-199, 1996.
- SPELL, A.R.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R.; LAMB, G.C. Evaluating

- recipient and embryo factors that affect pregnancy rates embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, v. 56, p. 287-297, 2001.
- STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*, v.2, p. 366, 1978.
- STOCK, A.E., SMITH, L. Developmental of bovine oocytes from small follicles is enhanced after maturation in medium conditioned by oocytes from big follicles. *Biology Reproduction*, v. 55, p.174 (472), 1996. Abstr.
- STOJKOVIC, M.; LAKO, M.; STOJKOVIC, P.; STEWART, R.; PRZYBORSKI, S. Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture. *Stem Cell*, Durham, v. 22, p. 790-797, 2004.
- STROUD, B; BO, G. A. Estatísticas mundiais de 2009 para transferência embrionária em animais domésticos de fazenda: Resumo do relatório da comissão de recuperação de dados da Sociedade Internacional para transferência de embriões (IETS). In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. XXV, 2011, Cumbuco. *Anais...* Cumbuco: SBTE, p. 157 – 163, 2011.
- STROUD, B.; The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsletter*, December, 2012.
- STUBBINGS, R.B.; WALTON, J.S. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, v. 43, p. 705 – 712, 1995.
- SUNDERLAND, S.J., CROWE, M.A., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F., IRELAND, J.J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J. Reprod. Fertil.*, 101, 547–555, 1994.
- TAKAGI, M.; KIM, I.H.; IZADYAR, F.; HYTTEL, P.; BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; HENDRIKSEN, P.J.; VOS, P.L. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. *Reproduction*, v. 121, p. 941 – 951, 2001.
- TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VAN DE VELDE, A.; JU, J.C.; SCHREIBER, D.; TRIPP, M.W.; LEVINE, H.; ECHELARD, Y.; RIESEN, J.; YANG, X. Developmental competence of juvenile calf oocytes *in vitro* and *in vivo*: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 1, p. 206 – 213, 2000.
- TAYLOR, J.F.; PHILLIPS, K.R.; TOMASZEWSKI, M.A. Net present value and economic merit of sexed semen and splitting units of semen for Australian Holsteins. *J. Dairy Science*. 71: 3100-3111. 1988.
- TECHAKUMPHU, M.; PROMDIREG, A.; NA-CHIENGMAI, A.; PHUTIKANIT, N. Repeated oocyte pick up in prepubertal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH superstimulation. *Theriogenology*, v. 61, n. 9, p. 1705-1711, 2004.

- TESFAYE, D.; NGANVONGPANIT, K.; BESENFELDER, U.; LONERGAN, P.; SCHELLANDER, K. Targeted suppression of E-cadherin and connexin 43 gene expression in bovine preimplantation embryos cultured either *in vivo* or *in vitro* using RNA interference technology. *Mol. Reprod. Dev.*, 2007; 74: 978-988.
- THIBIER M. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world. *IETS Embryo Transfer Newsletter* 2004; 22:12-19.
- THIBIER, M. Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in others species in 2005. *IETS Embryo Transfer Newsletter*, v.24, p.11-19, 2006.
- THOMPSON, J.G. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, v.45, p.27-40, 1996.
- TOMITA, S. Y. Viabilidade prática e custo da indução de gestações gemelares em bovinos de corte, a partir de embriões produzidos *in vitro* e criopreservados para transferência direta. 70 f. Tese (Doutorado). FCAV, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS. Como calcular o custo de produção. Lavras, Informativo técnico do café, n.3, 1999.
- VAJTA, G.; GJERRIS, M. Science and technology of farm animal cloning: State of art. *Animal reproduction Science*, Werrabee, v. 92, p. 211-230, 2006.
- VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constant evolução. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.32, n.2, p.100-109, 2008.
- VASSENA, R.; MAPLETOFT, J.R.; ALLODI, S.; SINGH, J., ADAMS P.G. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*, v. 60, p 923-932, 2003.
- VELAZQUEZ, M.A. Assisted reproductive technologies in cattle: Applications in livestock production, biomedical research and conservation biology. *O Embrião*. v.37 8-15. 2008.
- VIANA, J.H.M. Punção folicular orientada por ultra-som em vacas da raça Gir. Tese (doutorado em Ciência Animal, área de concentração em Reprodução Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 124 p., 2002.
- VIANA, J.H.M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. *O Embrião*, ano XVI, edição 51, p.6-10, 2012.
- VIANA J.H.M.; CAMARGO L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35(Supl. 3): s915-s924. 2007.



- XU, J.; CHAUBAL, S.A.; DU, F. Optimizing IVF with sexed sperm in cattle. *Theriogenology*, 71(1): p. 39-47. 2009.
- WALTON, J. S.; CHRISTIE, K. A.; STUBBINGS, R. B. Evaluation of frequency of ultrasonically guided follicle aspiration on bovine ovarian dynamics. *Theriogenology*, v. 9, n. 1, p. 6, 1993.
- WHEELER, M.B.; RUTLEDGE, J.J.; FISCHER-BROWN, A.; VANETTEN, T.; MALUSKY, S.; BEEBE, D.J. Application of sexed semen technology to in vitro embryo production in cattle. *Theriogenology*, v.65, p.2219-227, 2006.
- WILSON, R.D.; FRICKE, P.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; RUTLEDGE, J.J.; PENFIELD, C.M.S.; WEIGEL, K.A. In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology*, v.65, p.1007-1015, 2006.
- WIT, A.A.C; KRUIP, T.A.M. Bovine cumulus-oocyte-complex-quality is reflected in sensitivity for alpha-amanitin, oocyte-diameter and developmental capacity. *Animal Reproduction Science*, v.65, n. 1-2, p.51 – 65, 2001.
- WIT, A.A.C; WURTH, Y.A.; KRUIP, T.A.M. Effect of ovarian phase and follicle quality on morphology and developmental capacity of the bovine cumulus-oocyte-complex. *Journal Animal Science*, v.78, n. 5, p.1277 – 1283, 2000.
- WORLD HEALTHY ORGANIZATION (WHO). Quality control in the andrology laboratory. In: *WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction*, 4th ed., Cambridge University Press, UK, cap. 4, p. 36, 1999.
- YANG, X.; JIANG, S.; FOOTE, R.H. Bovine oocyte development following different oocyte maturation and sperm capacitation procedures. *Molecular Reproduction and Development*, v. 34, n.1, p. 94 – 100, 1993.
- YOUNG, L.E.; SINCLAIR, K.D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. *Rev. Reprod.*, v.3, p.155 – 163, 1998.
- ZHANG, M.; LU, K.H.; SEIDEL JR, G.E. Development of bovine embryos after in vitro fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology*, v.60, p.1657-1663, 2003.

## **CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DE RESULTADOS EM DIFERENTES RAÇAS DE DOADORAS NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES *BOS TAURUS TAURUS* E *BOS TAURUS INDICUS***

### **RESUMO**

Com o objetivo de avaliar ao longo de três anos, através do levantamento de dados de uma central comercial de produção *in vitro* de embriões bovinos, a quantidade e a competência do desenvolvimento dos oócitos aspirados de doadoras *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, analisou-se a capacidade de produção *in vitro* de embriões fertilizados com sêmen sexado e convencional, sob influência da época do ano (seca e água). O número de oócitos coletado, as taxas de oócitos viáveis, clivados e embriões produzidos *in vitro* foram aninhados em modelos de regressão linear. Doadoras zebuínas, embora com diferenças entre as raças, produziram maior quantidade ( $P<0,001$ ) de oócitos por sessão de aspiração e maiores taxas ( $P<0,001$ ) de oócitos viáveis, clivados e embriões *in vitro*, que doadoras taurinas. No entanto, doadoras da raça Holandês produziram maior quantidade ( $P<0,001$ ) de oócitos por sessão de aspiração e maiores taxas ( $P<0,001$ ) de oócitos viáveis e clivados, que doadoras da raça Gir, embora apresentaram uma menor produção de embriões. O sêmen convencional apresentou maiores taxas de produção de embriões ( $P<0,001$ ), que o sêmen sexado. Não houve efeito direto da época do ano (seca e águas), na avaliação dos resultados de fêmeas zebuínas e taurinas, para nenhuma das variáveis estudadas ( $P>0,2$ ).

**Palavras chave:** bovinos, *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus*, oócitos, produção *in vitro* de embriões, sêmen sexado, época do ano.

### **ABSTRACT**

*This study aimed to evaluate, during three years, the number and developmental competence of oocytes recovered from different genetic groups of donors (Bos taurus indicus and Bos taurus taurus), and the ability of sexed or conventional semen to produce in vitro (IVP) bovine embryos, under the influence of season (dry and water). The data were collected from a commercial company specialized in ovum pick-up and in vitro production embryos (OPU-IVP). The total number of collected oocytes, the rates of viable and cleaved oocytes and produced IVP bovine embryos were analyzed in linear regression models. Zebu donors, although with differences between breeds, produced a greater ( $P<0.001$ ) number of oocytes per OPU session and higher rates ( $P<0.001$ ) of viable and cleaved oocytes and IVP embryos in relation of Bos taurus taurus donors. However, Holstein donors produced a greater ( $P<0.001$ ) number of oocytes per OPU session and higher rates ( $P<0.001$ ) of viable and cleaved oocytes in relation of Gyr donors, while showed a lower production of embryos. The conventional semen had higher rates of IVP embryos ( $P<0.001$ ) in relation of sexed semen. In order to evaluate the influence of season (dry and wet period), there was no direct effect in the results of Bos taurus taurus and Bos taurus indicus females for any of the variables studied ( $P>0.2$ ).*

**Keywords:** bovine, *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus*, oocytes, IVP embryos, sexed semen, season.

## 1. INTRODUÇÃO

O cenário econômico nacional sofreu profundas modificações nas últimas décadas. Na pecuária, estas modificações acompanharam o desenvolvimento e aplicação comercial de biotécnicas da reprodução destinadas a aumentar a velocidade com a qual o melhoramento genético estava sendo realizado. Não diferente, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) foi aperfeiçoada, o que determinou nos últimos anos notável avanço no melhoramento genético. Nos últimos dez anos a disseminação desta técnica no País atingiu grande relevância. Já no ano de 2005, o Brasil tornou-se um dos países de maior aplicação de biotécnicas da reprodução em bovinos do mundo (Viana e Camargo, 2007).

O domínio da PIVE colocou o Brasil em uma posição de destaque no segmento, despertando o interesse de outros países não só pelas biotécnicas envolvidas, mas também pelo fato do País possuir um dos maiores rebanhos do mundo e ser um dos principais exportadores de carne bovina. Além do aspecto do gado de corte, os trabalhos referentes ao sistema de produção de leite a pasto, com animais do cruzamento das raças Gir e Holandês (Girolando) apresentaram-se extremamente promissores, pelo contexto de se obter um animal resistente aos desafios das regiões tropicais, com uma apreciável produção de leite a baixo custo (Pontes *et al.*, 2010).

Os trabalhos internacionais de PIVE têm sido conduzidos quase que exclusivamente em bovinos de origem europeia. Entretanto, seus resultados não podem ser extrapolados totalmente para animais zebuínos, devido às diferenças fisiológicas entre essas duas

subespécies, como na secreção de hormônios (Randel, 1984), sensibilidade a hormônios exógenos (Munro, 1986), comportamento sexual (Galina, 1995) e alguns aspectos ultra-estruturais nos oócitos e embriões (Assey *et al.*, 1994; Visintin *et al.*, 2002). Krininger *et al.* (2003) já relataram diferenças entre fêmeas das raças Brahman e Holandesa quanto à fecundação e aos eventos que induzem às primeiras clivagens. Diversos trabalhos também demonstraram diferenças na fisiologia reprodutiva entre fêmeas *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* (Baruselli *et al.*, 2007).

A PIVE tem sido alvo de muitas pesquisas e estudos com o intuito de melhorar a sua utilização comercial, já que um dos principais problemas da técnica é a variabilidade nos resultados do desenvolvimento *in vitro* dos embriões por doadora trabalhada (Slenning e Wheeler, 1989; Galli *et al.*, 2003). São descritas diferenças existentes nos diversos parâmetros da fisiologia ovariana em fêmeas zebuínas, como número de ondas de crescimento, momento da divergência folicular, número de folículos recrutados por onda, tamanho máximo dos folículos, persistência dos folículos dominantes, perfil de recrutamento folicular, entre outros (Rhodes *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 1997; Dayan *et al.*, 2000; Viana *et al.*, 2000; Seneda *et al.*, 2002; Sartorelli *et al.*, 2005). Estas diferenças determinam maior número de folículos em crescimento nos ovários e, conseqüentemente, no maior número de oócitos recuperados pela aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) (Viana *et al.*, 2004). A comparação de resultados obtidos com doadoras *Bos taurus taurus* (Wagtendonk-de Leeuw, 2005), favoreceram a difusão desta biotécnica nas doadoras zebuínas. Considerando-se que as taxas de

fertilização, clivagem, produção de blastocistos e gestações são relativamente similares entre laboratórios, diferenças no número de oócitos obtidos de cada doadora podem determinar a viabilidade desta biotecnia (Viana e Camargo, 2007). A repetibilidade no processo de aspiração folicular em uma mesma doadora (Boni *et al.*, 1997) é a logística mais simples na recuperação dos oócitos, assim como o uso de sêmen sexado para fêmea na bovinocultura leiteira (Hayakawa *et al.*, 2009), que também permitem tornar a PIVE mais competitiva e a biotecnia de eleição para o melhoramento e produção animal.

Trabalhos sobre a influência do grupo genético da doadora de oócitos ainda são poucos e limitados à comparação apenas entre uma raça de cada grupo genético. Em um estudo de PIVE em larga escala, Pontes *et al.* (2009) mostraram a maior capacidade de obtenção de oócitos com maior produção de embriões de fêmeas zebuínas, no caso da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), em relação, especialmente, às doadoras da raça Holandês (*Bos taurus taurus*) (Hasler *et al.*, 1995; Bousquet *et al.*, 1999). Em outro trabalho com mais de 5.000 embriões produzidos e analisados, Pontes *et al.* (2010) observaram maior produção de blastocistos de doadoras aspiradas da raça Gir (*Bos taurus indicus*) em relação à produção de embriões de doadoras da raça Holandês. Estas informações indicam a possível influência do genótipo da doadora na quantidade dos oócitos recuperados e na competência do desenvolvimento embrionário *in vitro*. O conhecimento dessas diferenças determinam possíveis ajustes nas sessões de aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões, otimizando a eficiência dessas doadoras

nos programas de produção e melhoramento genético.

A seleção do sexo tem um valor econômico significativo nos animais de interesse zootécnico com aptidão para produção de leite ou carne e em sistemas onde a produtividade é favorecida pela progênie de um dos sexos (Taylor *et al.*, 1988; Ruvuna *et al.*, 1992; Hohenboken, 1999). No entanto, existem na literatura poucos estudos sobre a eficiência do sêmen sexado na produção *in vitro* de embriões em escala comercial. Embora as taxas de produção de embriões pareçam ser menores quando o sêmen sexado é utilizado, quando comparado com o sêmen não sexado (convencional) (Lu e Seidel, 2004; Avelino *et al.*, 2007; Blondin *et al.*, 2009), a associação deste tipo de sêmen com a PIVE ainda é a técnica mais viável para gerar descendentes com o sexo pré-determinado em bovinos (Faber *et al.*, 2003). Esta observação é devido à otimização do uso de uma única dose de sêmen sexado na fecundação de oócitos de mais de uma fêmea, o que não é possível na inseminação artificial (IA) e na coleta de embriões de fêmeas superovuladas (MOET) (Faber *et al.*, 2003).

Efeitos da época do ano na produção e desenvolvimento de embriões podem estar relacionados aos parâmetros climáticos. Estes efeitos são especificamente relativos à disponibilidade e qualidade dos alimentos, ocorrendo principalmente em sistemas de produção onde os animais são manejados a pasto (Tríbulo *et al.*, 1991; Rubin *et al.*, 2005; Márquez *et al.*, 2005; Souza *et al.*, 2007).

O presente trabalho foi inspirado em um estudo anterior realizado pela

pesquisadora Michele Spegorin em dissertação de mestrado defendida no ano de 2010, mas ainda não publicada, sob orientação do Prof. Álan Maia Borges, com o levantamento de resultados de um banco de dados obtidos da mesma central usada no presente estudo, baseando-se, no entanto, nos anos de 2007 e 2008, enquanto os dados aqui analisados são dos anos 2010 à 2012. A metodologia da PIVE empregada foi a mesma nos dois estudos, sendo que os resultados encontrados na pesquisa inicial demonstraram similaridade aos resultados aqui obtidos, apesar do número de animais avaliados ter sido maior no segundo estudo.

O objetivo, portanto, do presente estudo foi montar uma base de dados de produção *in vitro* de embriões (OPU-PIVE), que permitisse, na sequência, fazer a análise econômica do processo. Neste capítulo serão apresentados apenas os resultados de levantamento dos dados e nos subseqüentes far-se-á a análise econômica. A base de dados inclui o levantamento dos resultados de doadoras de três raças *Bos taurus indicus* e de três raças *Bos taurus taurus*, além de avaliar a capacidade de produção em larga escala de embriões fertilizados *in vitro* com sêmen convencional (não sexado) e sexado.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Local do experimento**

O estudo foi realizado em doadoras bovinas que participavam do programa comercial OPU-PIVE de uma central de produção de embriões, localizada no município de Funilândia, Minas Gerais. Foram realizadas e, posteriormente, analisadas aspirações foliculares e

PIVE de janeiro de 2010 a dezembro de 2012.

### **2.2. Doadoras bovinas de oócitos**

As doadoras de oócitos foram novilhas e vacas, de variadas idades e populações foliculares, e pertencentes à diferentes raças *Bos taurus indicus* (Nelore, Gir e Guzerá) e *Bos taurus taurus* (Holandês, Jersey e Pardo Suíço).

Não foi acompanhada a avaliação do escore da condição corporal (ECC) das doadoras trabalhadas, assim como não foram levados em consideração eventuais protocolos hormonais para controle de onda folicular ou superovulação e monitoramento da condição reprodutiva das doadoras. O manejo nutricional e sanitário preconizado para as doadoras também não foi controlado em função de que a maioria dos animais localizava-se em diferentes propriedades dos clientes da empresa. Nenhuma das doadoras possuía manejo específico para realização das aspirações, que eram realizadas de acordo com a solicitação do proprietário. Entretanto, um período mínimo de 15 dias era estabelecido entre as sessões de aspiração. Todas as doadoras estavam alojadas em propriedades localizadas no estado de Minas Gerais, sendo a maioria em um raio máximo de 400 km de distância do laboratório de produção *in vitro* de embriões bovinos.

### **2.3. Aspiração folicular e classificação dos oócitos**

Todas as sessões de OPU estudadas foram realizadas por uma equipe técnica, que enviaram os oócitos aspirados de fêmeas doadoras para a

produção *in vitro* de embriões. Esta equipe era composta por um veterinário (autor), responsável pela OPU, e um técnico de laboratório, responsável pelo rastreamento e seleção dos oócitos recuperados. Por isso, a técnica e os equipamentos de OPU descritos abaixo, assim como a classificação dos oócitos recuperados, foram os utilizados pela mesma equipe técnica responsável pelas sessões de OPU estudadas no experimento.

As sessões de OPU foram realizadas com o auxílio de ultrassom (Aloka SSD 500, Japão) adaptado com transdutor microconvexo setorial de 5,0 MHz. Agulhas hipodérmicas descartáveis de 18 a 20 Gauge, conectadas a um tubo cônico de 50mL (Corning, Acton, MA, EUA) por mangueira de silicone de 2 mm de diâmetro interno. A OPU foi conduzida com uso de uma bomba de vácuo (Cook Veterinary Products, Queensland, Australia) sob uma pressão negativa de 80 a 100 mmHg, e o meio de coleta foi constituído por solução tampão salina fosfatada - DPBS (Nutricell, Campinas, Brasil), acrescido de 20.000 UI/L de heparina sódica (Liquemine<sup>TM</sup>, Roche, SP, Brasil), mantido à 36°C durante a aspiração.

Imediatamente após a OPU, o material recuperado foi lavado em filtros para colheita de embriões (Nutricell, Campinas, Brasil ou WTA, Cravinhos, Brasil) com solução salina tamponada - DPBS (Nutricell, Campinas, Brasil) -, e depositado em placas de Petri descartáveis de 60mm ou 90mm x 15mm (TPP, Suécia). Sob estereomicroscópio, os oócitos recuperados foram lavados em três gotas de meio TCM-199 (Gibco BRL; Grand Island, NY, EUA) tamponado com Hepes, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL;

Grand Island, NY, EUA), 0,20 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, RJ, Brasil).

Os oócitos foram classificados em:

- Viáveis: quando o citoplasma do oócito era homogêneo (sem sinais de degeneração) e circundado completamente por pelo menos uma camada de células do *cummulus oophorus*;
- Desnudos: quando a camada de células do *cummulus oophorus* ao redor do oócito era incompleta ou ausente;
- Degenerados: quando o citoplasma era irregular (heterogêneo), podendo ou não conter células do *cummulus oophorus* ao seu redor;
- Atrésicos: quando o citoplasma era irregular e escuro, com células do *cummulus oophorus* já expandidas.

Como metodologia utilizada pela equipe da OPU, os oócitos classificados como degenerados e atrésicos foram descartados.

Sessões de aspiração folicular ovariana nas doadoras que não produziram oócitos não foram informadas ao laboratório e, por isso, não entraram no estudo.

Em seguida, os oócitos foram transferidos para criotubos de 2,0 mL (TPP, Suécia) contendo meio de maturação *in vitro* (MIV), constituído por meio TCM-199 suplementado com 10% de SFB, 1 µg/mL FSH (Folltropin<sup>TM</sup>, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont., Canadá), 50 µg/mL hCG (Profasi<sup>TM</sup>, Serono, SP, Brasil) e estradiol (1 µg/mL), 0,20 mM de

piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina. Esses criotubos eram gaseificados utilizando uma mistura gasosa industrial contendo 5% de CO<sub>2</sub>, contida em um cilindro portátil, e então selados. Os mesmos permaneciam, durante o transporte até o laboratório, em incubadoras de transporte de oócitos (WTA, Cravinhos, Brasil) com temperatura controlada (37°C).

#### **2.4. Maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos**

Logo após a recepção, os oócitos foram mantidos dentro de incubadora (38,5°C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima), sob óleo mineral, em gotas de 100 µL de meio de maturação *in vitro* (o mesmo do transporte) contendo, no máximo, 25 oócitos por microgota, por 22 a 26 horas.

#### **2.5. Preparo do sêmen e fertilização *in vitro* (FIV)**

Para a fertilização *in vitro* foi utilizado, exclusivamente, sêmen congelado de touros escolhidos por proprietários das doadoras. Apenas fertilizações *in vitro* realizadas com sêmen de touros de mesma raça da doadora foram incluídas no estudo. Antes da FIV, o sêmen foi descongelado em água aquecida a 35° C por 30 segundos e, em seguida, processado segundo protocolos do laboratório para a seleção dos espermatozóides vivos.

Os protocolos utilizados baseavam-se na centrifugação através de gradiente descontínuo de Percoll (45-90%), por cinco minutos a 2.900 rpm; ou centrifugação em tubo cônico de 15 mL (Corning, Acton, MA, EUA) contendo 2 mL de meio TALP suplementado

com 0,2 mM de piruvato e 83,4 g/mL de amicacina, tamponado com 10 mM de Hepes por 5 minutos a 900 rpm. Em ambos os protocolos, após esta primeira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo os espermatozóides foi ressuspensionado em 1 mL do mesmo meio da FIV, para que fosse novamente centrifugado por 5 minutos a 900 rpm.

Após processamento do sêmen, a concentração de espermatozóides vivos foi ajustada para 25x10<sup>6</sup> células móveis/mL e o volume de quatro microlitros de sêmen (10<sup>5</sup> espermatozóides) foi adicionado em cada gota de 90 µL de meio TALP-FIV (TALP suplementado com 10 g/mL de heparina, 18 M de penicilamina, 10 M de hipotaurina e 8 M de epinefrina), sob óleo mineral, já contendo os oócitos maturados. O co-cultivo dos oócitos e espermatozóides ocorreu durante 22-24 horas, em incubadora a 38,5° C com 5% CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima.

#### **2.6. Cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões**

Após a FIV os prováveis zigotos foram cultivados em grupo máximo de 25 por gota de 100 µL de meio de cultivo, constituído por meio SOF (Wells *et al.*, 1999) acrescido de 2,5% SFB e 0,5% de albumina sérica bovina (BSA), sob óleo mineral. Os mesmos foram mantidos em incubadora (38,5° C com 5% CO<sub>2</sub> e 5% O<sub>2</sub> em ar e umidade máxima), sem co-cultivo com células da granulosa. No dia três (D3) após a FIV, todos os embriões com quatro células ou mais foram considerados como clivados e, no dia cinco (D5) foi realizada a substituição de 50% do volume das gotas de cultivo por meio de cultivo novo.

No dia sete (D7) após a FIV, os embriões considerados excelentes (grau I) ou bons (grau II) (segundo manual da IETS, 2010) foram selecionados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento:

- Mórula compacta (Mc): embrião compacto, com distinto espaço perivitelino, e sem blastocele;
- Blastocisto inicial (Bi): blastocele presente e ocupando menos da metade do embrião;
- Blastocisto (Bl): blastocele ocupando já metade do embrião e a zona pelúcida ainda mais espessa;
- Blastocisto expandido (Bx): embrião com diâmetro aumentado, blastocele ocupando mais da metade do embrião e a zona pelúcida de espessura mais delgada;
- Blastocisto eclodido (Be): embrião com zona pelúcida rompida ou ausente.

## 2.7. Análise estatística

Os resultados obtidos em laboratório envolvendo a produção *in vitro* de embriões tanto em fêmeas *Bos taurus indicus* quanto em fêmeas *Bos taurus taurus* foram mensurados com a análise de quatro variáveis: total de oócitos aspirados, oócitos viáveis, clivados e total de embriões produzidos; idealmente, espera-se que as fêmeas doadoras tenham uma grande população folicular, conseqüentemente produzam uma grande quantidade de oócitos, tenham uma elevada proporção destes oócitos como sendo viáveis, resultando em uma boa taxa de

clivagem e, por final, alcançando uma excelente produção de embriões para serem posteriormente transferidos ou congelados. Porém, em uma rotina comercial intensa de produção de embriões, com volume de material genético cada vez maior, envolvendo inúmeras doadoras com variadas respostas e doses de sêmen de touros com diferentes resultados, este ideal torna-se difícil de ser alcançado. Identificar estas variáveis e tentar analisá-las pode contribuir na melhora do sistema de PIVE.

Neste sentido as análises estatísticas são prioritárias para a planificação e formulação de estratégias e para avaliar todas as etapas laboratoriais da produção *in vitro* de embriões. Estatísticas descritivas e multivariadas foram utilizadas neste estudo para avaliar todo o processo de produção de embriões em laboratório.

Modelos aninhados de regressão linear multivariada de mínimos quadrados ordinários foram desenvolvidos para as quatro variáveis resposta utilizando em todos os casos as mesmas variáveis independentes. Foram também avaliados os efeitos de ano, época do ano (seca e águas) e tipo de sêmen (convencional e sexado) dentro do sistema de PIVE de fêmeas zebuínas e taurinas. Os modelos de regressão foram aplicados com a utilização do software STATA 12 (StataCorp, 2011).

O uso de modelos de regressão foi recomendado por dois motivos. O primeiro é porque a utilização de testes não paramétricos com um “n” muito grande aumentaria a chance do aparecimento de resultados falsos-positivos, ou seja, a possibilidade de achar diferenças nos resultados onde, na verdade, não existiria. O segundo

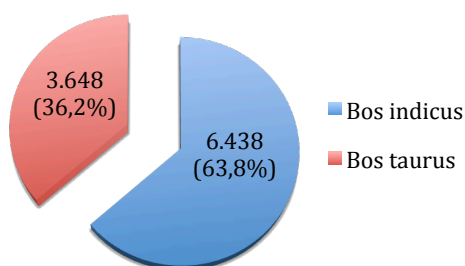


motivo é que dados não planejados ou desbalanceados, como os do presente estudo, recomenda-se a utilização de modelos matemáticos como a regressão.

O processo da construção do modelo de regressão final se deu em duas etapas. Em uma primeira etapa desenvolveu-se uma regressão univariada, ou seja, a variável resposta (oócitos totais, viáveis, clivados e embriões produzidos) com as variáveis predictoras (raça, sub-espécie, ano, época do ano e tipo de sêmen), tendo os valores de P inferiores a 0,2. Na segunda etapa somente foram utilizadas em um modelo de regressão multivariado aquelas variáveis que os valores de P foram inferiores a 0,05 (Dohoo *et al.*, 2010).

### 3. RESULTADOS

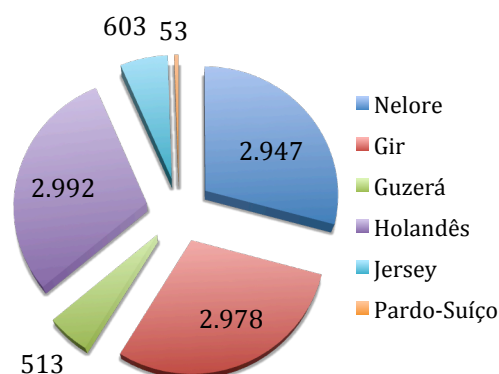
Do total (n = 10.086) de aspirações foliculares estudadas em três anos de avaliações, 63,8% (6.438) foram realizadas em doadoras das raças Nelore, Gir e Guzerá, e 36,2% (3.648) em doadoras das raças Holandês, Jersey e Pardo Suíço (Figura 01).



**Figura 01** - Número de fêmeas submetidas

à OPU-PIVE, segundo a sub-espécie (*Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*)

Das fêmeas submetidas à aspiração folicular, 2.947 (29,2%) foram da raça Nelore, 2.978 (29,5%) Gir, 513 (5,1%) Guzerá, 2.992 (29,7%) Holandês, 603 (6,0%) Jersey e 53 (0,5%) Pardo Suíço. (Figura 02).



**Figura 02** - Número de fêmeas bovinas de diferentes raças das sub-espécies *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* submetidas à OPU-PIVE

O total de fêmeas aspiradas e de sessões de OPU por raça estudada está apresentado na Tabela 01, assim como suas respectivas médias e erros padrões. As sessões de OPU de fêmeas das raças taurinas (*Bos taurus taurus*) estudadas, principalmente as da raça Holandês, caracterizaram-se por apresentar um maior número de fêmeas por sessão de aspiração, situação esta em função da menor resposta individual de recuperação de oócitos das fêmeas desta raça.

**Tabela 01** - Número total e média mais erro padrão de doadoras aspiradas e de sessões de OPU segundo a raça da doadora

Raça	Fêmeas aspiradas	Sessões de aspiração	Média (fêmea aspirada por sessão)	Erro padrão
Nelore	2.947	1.071	2,75	0,07
Gir	2.978	639	4,66	0,15
Guzerá	513	239	2,15	0,09
Holandês	2.992	492	6,08	0,18
Jersey	603	122	4,94	0,34
Pardo Suíço	53	22	2,41	0,38
<b>Total</b>	<b>10.086</b>	<b>2.585</b>	<b>3,90</b>	<b>0,07</b>

As análises descritivas do número e média de oócitos totais, viáveis, clivados e embriões produzidos por fêmea em sessão de aspiração folicular, segundo a sub-espécie, a raça, o ano, o tipo de sêmen (sexado ou convencional) e a época do ano, estão em tabelas no ANEXO.

Os dados coletados foram separados de acordo com cada sessão de aspiração folicular ao longo dos três anos de avaliações. A análise individual de cada fêmea aspirada não foi possível de ser realizada em função da indisponibilidade de dados desta natureza. Sendo assim, no intuito de otimizar o estudo, as análises dos resultados obtidos foram baseadas em sessões de OPU, onde mais de uma doadora foi aspirada e, conseqüentemente, analisada dentro de um montante de fêmeas também aspiradas. Certamente, a variação individual de resposta se fez presente nas fêmeas em sessões de OPU.

O processo de análise estatística das sessões de OPU-PIVE envolveu quatro variáveis resposta, portanto foram produzidos quatro modelos de regressão, o primeiro para avaliar a quantidade de oócitos totais recuperados, o segundo para avaliar a quantidade de oócitos viáveis, o terceiro para avaliar a quantidade de oócitos clivados e o quarto para avaliar a produção de embriões (blastocistos) no dia sete após

a fecundação *in vitro*. Como a intenção foi buscar uma associação da variável resposta com as seis raças de duas sub-espécies presentes nos quatro modelos, foram reportados modelos irrestritos com as variáveis que obtiveram significância para uma dependente e não para a outra, visando comparabilidade.

Nas análises realizadas foram definidos os resultados obtidos de doadoras da raça Nelore como referência na comparação com demais raças, assim como o ano de 2010 foi estabelecido como referência na comparação com 2011 e 2012; fêmeas da raça Pardo Suíço foram omitidas no modelo de regressão em função de restrição estatística (“n” insignificante).

Analizando os modelos de regressão propostos, para a variável *total de oócitos* (Tabela 02), doadoras da raça Nelore tiveram uma produção de 21,28 oócitos totais em 2010; 19,76 em 2011 e 19,09 em 2012, segundo as estimativas do modelo. As fêmeas *Bos taurus taurus* tiveram uma produção de 11,26 oócitos totais em 2010; 9,74 em 2011 e 9,07 em 2012. A equação utilizada para a obtenção destes valores na Tabela 02 pode ser interpretada da seguinte maneira:

$$\text{Variável Total de oócitos} = 21,28 (\text{const.}) - 4,61 (\text{Gir}) - 2,48 (\text{Guz}) + 6,88 (\text{Hol}) + 2,05$$

(Jer) – 10,02 (*Bos taurus*) – 1,52 (ano 2011) – 2,19 (ano 2012)

Hol<sub>2011</sub>: 21,28 + 6,88 – 10,02 – 1,52 = 16,62  
 Hol<sub>2012</sub>: 21,28 + 6,88 – 10,02 – 2,19 = 15,95

Sendo, o cálculo da produção de oócitos totais de doadoras Nelore igual a constante tendo o ano de 2010 como referência. Na comparação com fêmeas taurinas, equaciona-se a constante referente ao Nelore (21,28) com o coeficiente *Bos taurus* (-10,02) de acordo com cada ano avaliado.

Doadoras da raça Gir tiveram uma produção total de oócitos em 2010 de 16,67; em 2011 de 15,15 e em 2012 de 14,48, segundo as estimativas do modelo.

Doadoras da raça Guzerá tiveram uma produção total de oócitos em 2010 de 18,80; em 2011 de 17,28 e em 2012 de 16,61, segundo as estimativas do modelo.

As doadoras da raça Holandês, por exemplo, em 2010 tiveram uma produção de 18,14 oócitos totais; 16,62 em 2011 e 15,95 em 2012, segundo as estimativas do modelo (Tabela 02):

Doadoras da raça Jersey tiveram uma produção total de oócitos em 2010 de 13,31; em 2011 de 11,79 e em 2012 de 11,12, segundo as estimativas do modelo.

Hol<sub>2010</sub>: 21,28 + 6,88 – 10,02 = 18,14

**Tabela 02** - Parâmetros estatísticos descritivos das variáveis utilizadas para estimar a quantidade de oócitos totais coletados

Variável	Coeficiente	Valor P	95% Confiabilidade	Intervalo
. Total de oócitos				
<b>Raça</b>				
<b>Valor de P (geral) &lt; 0,001</b>				
Nelore	(referência)	(referência)	(referência)	(referência)
Gir	- 4,61		- 5,77	- 3,44
Guzerá	- 2,48		- 4,16	- 0,81
Holandês	6,88		1,80	11,97
Jersey	2,05		- 3,35	7,45
Pardo Suíço	-		-	-
<b><i>Bos taurus</i></b>	- 10,02	< 0,001	- 15,04	- 4,99
<b>Ano</b>				
<b>Valor de P (geral) &lt; 0,001</b>				
2010	(referência)	(referência)	(referência)	(referência)
2011	- 1,52		- 2,62	- 0,42
2012	- 2,19		- 3,35	- 1,04
<b>Constante</b>	21,28	< 0,001	20,31	22,26

Quanto aos *oócitos viáveis* (Tabela 03), doadoras da raça Nelore tiveram 12,21 no ano de 2010; 11,60 em 2011 e 10,43 em 2012, segundo as estimativas do modelo. Fêmeas *Bos taurus taurus* tiveram 6,60 oócitos viáveis no ano de 2010; 5,99 em 2011 e 4,82 em 2012.

Doadoras da raça Gir tiveram 9,14 oócitos viáveis no ano de 2010; 8,53 em 2011 e 7,36 em 2012, segundo as estimativas do modelo.

Doadoras da raça Guzerá tiveram 10,21 oócitos viáveis no ano de 2010; 9,60 em

2011 e 8,43 em 2012, segundo as estimativas do modelo.

Doadoras da raça Holandês tiveram 9,88 oócitos viáveis no ano de 2010; 9,27 em 2011 e 8,10 em 2012, segundo as estimativas do modelo.

Doadoras da raça Jersey tiveram 7,12 oócitos viáveis no ano de 2010; 6,51 em 2011 e 5,34 em 2012, segundo as estimativas do modelo.

**Tabela 03** - Parâmetros estatísticos descritivos das variáveis utilizadas para estimar a quantidade de oócitos viáveis

Variável	Coefficiente	Valor P	95% Confiabilidade	Intervalo
<b>Oócitos viáveis</b>				
<b>Raça</b>	<b>Valor de P (geral) &lt; 0,001</b>			
Nelore	(referência)	(referência)	(referência)	(referência)
Gir	- 3,07		- 3,76	- 2,39
Guzerá	- 2,00		- 2,98	- 1,02
Holandês	3,28		0,31	6,26
Jersey	0,52		- 2,64	3,68
Pardo-Suíço	-		-	-
<b>Bos taurus</b>	- 5,61	< 0,001	- 8,55	- 2,67
<b>Ano</b>	<b>Valor de P (geral) &lt; 0,001</b>			
2010	(referência)	(referência)	(referência)	(referência)
2011	- 0,61		- 1,25	0,34
2012	- 1,78		- 2,46	- 1,11
<b>Constante</b>	12,21	< 0,001	11,64	12,78

Doadoras da raça Nelore tiveram 9,92 oócitos clivados (Tabela 04) no ano de 2010; 9,27 em 2011 e 8,02 em 2012, segundo as estimativas do modelo. Fêmeas *Bos taurus taurus* tiveram 5,00 oócitos clivados no ano de 2010; 4,35 em 2011 e 3,10 em 2012.

Doadoras da raça Gir tiveram 7,22 oócitos clivados no ano de 2010; 6,57 em 2011 e 5,32 em 2012, segundo as estimativas do modelo.

Doadoras da raça Guzerá tiveram 7,85 oócitos clivados no ano de 2010; 7,20 em 2011 e 5,95 em 2012, segundo as estimativas do modelo.

Doadoras da raça Holandês tiveram 7,78 oócitos clivados no ano de 2010; 7,13 em 2011 e 5,88 em 2012, segundo as estimativas do modelo.

Doadoras da raça Jersey tiveram 5,70 oócitos clivados no ano de 2010; 5,05 em 2011 e 3,80 em 2012, segundo as estimativas do modelo.

**Tabela 04** - Parâmetros estatísticos descritivos das variáveis utilizadas para estimar a quantidade de óocitos clivados

Variável	Coefficiente	Valor P	95% Confiabilidade	Intervalo
<b>. Óocitos clivados</b>				
<b>Raça</b>	<b>Valor de P (geral) &lt; 0,001</b>			
Nelore	(referência)	(referência)	(referência)	(referência)
Gir	- 2,70		- 5,37	- 3,33
Guzerá	- 2,07		- 3,68	- 0,75
Holandês	2,78		1,17	10,05
Jersey	0,70		- 3,16	6,28
Pardo-Suíço	-		-	-
<b>Bos taurus</b>	- 4,92	< 0,001	- 12,93	- 4,15
<b>Ano</b>	<b>Valor de P (geral) &lt; 0,001</b>			
2010	(referência)	(referência)	(referência)	(referência)
2011	- 0,65		- 2,83	- 0,91
2012	- 1,90		- 4,94	- 2,92
<b>Constante</b>	9,92	< 0,001	18,08	19,79

Os resultados de *embriões produzidos* podem ser vistos na Tabela 5. Doadoras da raça Nelore tiveram 5,77 embriões produzidos no ano de 2010; 5,96 em 2011 e 5,38 em 2012, segundo as estimativas do modelo. As fêmeas *Bos taurus taurus* tiveram 1,98 embriões produzidos no ano de 2010; 2,17 em 2011 e 1,59 em 2012.

Doadoras da raça Gir tiveram 3,94 embriões produzidos no ano de 2010; 4,13 em 2011 e 3,55 em 2012, segundo as estimativas do modelo.

Doadoras da raça Guzerá tiveram 3,90 embriões produzidos no ano de 2010; 4,09 em 2011 e 3,51 em 2012, segundo as estimativas do modelo.

Doadoras da raça Holandês tiveram 3,59 embriões produzidos no ano de 2010; 3,78 em 2011 e 3,20 em 2012, segundo as estimativas do modelo.

Doadoras da raça Jersey tiveram 2,25 embriões produzidos no ano de 2010; 2,44 em 2011 e 1,86 em 2012, segundo as estimativas do modelo.

**Tabela 05** - Parâmetros estatísticos descritivos das variáveis utilizadas para estimar a produção de embriões (blastocistos)

Variável	Coefficiente	Valor P	95% Confiabilidade	Intervalo
. Embriões produzidos				
<b>Raça</b>	<b>Valor de P (geral) &lt; 0,001</b>			
Nelore	(referência)	(referência)	(referência)	(referência)
Gir	- 1,83		- 2,30	- 1,37
Guzerá	- 1,87		- 2,41	- 1,33
Holandês	1,61		- 0,02	3,24
Jersey	0,27		- 1,46	2,00
Pardo-Suíço	-		-	-
<b>Bos taurus</b>	- 3,79	< 0,001	- 5,41	- 2,17
<b>Sêmen Sexado</b>	- 0,66	< 0,001	- 1,06	- 0,25
<b>Ano</b>	<b>Valor de P (geral) &lt; 0,001</b>			
2010	(referência)	(referência)	(referência)	(referência)
2011	0,19		- 0,16	0,54
2012	- 0,39		- 0,76	- 0,02
<b>Constante</b>	5,77	< 0,001	5,46	6,09

#### 4. DISCUSSÃO

##### 4.1. Número e competência de desenvolvimento *in vitro* dos oócitos aspirados, segundo a sub-espécie (*Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*) e raça da doadora de oócitos

Doadoras de oócitos zebuínas (*Bos taurus indicus*) nos três anos de estudo, apresentaram maior quantidade de oócitos totais coletados, de oócitos viáveis e maior quantidade de oócitos clivados, por fêmea aspirada, assim como também apresentaram maior produção de embriões no dia sete após a fecundação *in vitro*, quando comparadas com doadoras taurinas (*Bos taurus taurus*).

As quatro variáveis analisadas diferiram também entre raças de mesma sub-espécie, embora doadoras de raças zebuínas, particularmente as da raça Nelore, tenham mantido a superioridade em relação às doadoras de raças taurinas nesses mesmos aspectos, indicando que, além de seus oócitos, seus embriões também foram mais competentes em se desenvolverem.

Blaschi *et al.* (2004), trabalhando com fêmeas da raça Nelore, relataram média de 18,4 oócitos por sessão de aspiração folicular; Rubin *et al.* (2004) relataram média de 24,1 oócitos por sessão e Nonato Jr. (2005), utilizando 30 fêmeas da mesma raça, obteve média de 25,7 oócitos por sessão de aspiração, muito semelhante à média de 25,6 oócitos encontrada por Pontes *et al.* (2009), também com fêmeas Nelore. Essas médias de oócitos aspirados de fêmeas Nelore, de forma semelhante ao encontrado no presente estudo, foram superiores ao reportado por Hasler *et al.* (1995), que encontraram média de 4,9 oócitos por sessão de aspiração em vacas da raça Holandês, semelhante ao resultado obtido por Looney *et al.* (1994) que relataram média de 6,3 oócitos por sessão em fêmeas da raça Holandês.

Deve-se considerar que todos os trabalhos citados relataram um número bem menor de animais. Como demonstrado no presente estudo, alguns animais apresentaram médias de produção de oócitos muito superiores. Assim, ressalta-se a importância de se analisar um número bem amplo de

doadoras de oócitos para diminuir o efeito da variação individual.

Cruz *et al.* (2009), encontraram taxa média de oócitos aspirados de 4,6 estruturas por sessão em fêmeas bovinas da raça Devon (*Bos taurus taurus*), e 16,3 oócitos na raça Nelore (*Bos taurus indicus*). Rubin *et al.* (2005), avaliando a influência da composição genética de zebu na produção de oócitos observaram que para os animais da raça Aquitânica (*Bos taurus taurus*), a média foi de 3,7 oócitos por aspiração, para os animais da raça Canchim (*Bos taurus taurus* x *Bos taurus indicus*) 13,6 e para as doadoras da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) de 18,4 estruturas. Esses resultados mostram que aumentando a porcentagem de sangue *Bos taurus indicus* na composição racial, há também um aumento na produção de oócitos. Portanto, o número de oócitos totais aspirados nas fêmeas Nelore, Gir e Guzerá deste trabalho mostraram o potencial deste grupo de doadoras da subespécie zebuína para a biotécnica utilizada.

O maior número de oócitos encontrados em zebuínos no presente estudo deve estar relacionado ao fato de fêmeas *Bos taurus indicus* apresentarem maior número de folículos antrais por ciclo estral, quando comparadas com fêmeas *Bos taurus taurus* (Boni *et al.*, 1997; Viana, 2002).

Na raça Nelore, o número de folículos disponíveis para a aspiração folicular apresenta variações conforme a fase de crescimento folicular, sendo o início da onda o momento mais favorável para a recuperação, pelo maior número de folículos e pela melhor eficiência na captação dos oócitos a partir de folículos menores (Seneda *et al.*, 2001). Na literatura é relatado que, apesar de ser influenciada pelo padrão de crescimento e pela regressão dos folículos dominantes, a principal fonte de variação no número de folículos presentes é o padrão individual de recrutamento folicular, particularmente

durante o período correspondente à primeira onda de crescimento folicular (Ferreira *et al.*, 2004). Neste estudo, foi observada ampla variação individual entre as doadoras avaliadas, quanto ao número de estruturas recuperadas e cultivadas (ANEXO). Leivas *et al.* (2003), também observaram que houve significativa variação na média do número de estruturas aspiradas entre as doadoras *Bos taurus indicus*, submetidas ao mesmo número de sessões de OPU. Apesar do semelhante potencial entre os indivíduos da mesma raça, a variabilidade individual entre doadoras na produção de uma população viável de folículos pode influenciar os resultados da aspiração folicular (Seneda *et al.*, 2006). Além disso, a literatura revela que parâmetros reprodutivos como o recrutamento e desenvolvimento folicular podem variar amplamente mesmo entre pares de gêmeas monozigóticas (Machado *et al.*, 2003). Merton *et al.* (2009), demonstraram a influência genética da doadora nos resultados de aspirações, tanto para quantidade de oócitos, como para o número de embriões produzidos, e que a herdabilidade para morfologia e competência oócitaria foram menores, mas ainda presentes.

Na literatura, diversos trabalhos mostram que as diferenças existentes nos diversos parâmetros da fisiologia ovariana em fêmeas zebuínas são referentes ao número de ondas de crescimento, momento da divergência, maior número de folículos recrutados por onda, tamanho máximo, persistência dos folículos dominantes, perfil de recrutamento folicular (Rhodes *et al.*, 1995; Figueiredo *et al.*, 1997; Dayan *et al.*, 2000; Viana *et al.*, 2000; Seneda *et al.*, 2002; Sartorelli *et al.*, 2005). Estes parâmetros acabam determinando o maior número de folículos em crescimento nos ovários e, conseqüentemente, o maior número de oócitos recuperados (Viana *et al.*, 2004), quando comparado com os resultados obtidos com fêmeas *Bos taurus*

*taurus* (Wagtendonk-De Leeuw, 2006).

Não está claro o por quê de doadoras *Bos taurus indicus* sejam capazes de produzir muito mais oócitos que doadoras *Bos taurus taurus*. Não se observou diferença na quantidade de folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) em ovários de fetos e novilhas de fêmeas zebuínas e taurinas, sugerindo que o número total de folículos nos ovários não é a resposta para essa diferença na produção de oócitos (Pontes *et al.*, 2010). Possivelmente espera-se uma menor taxa de atresia folicular para fêmeas *Bos taurus indicus*, por isso estas disponibilizariam mais folículos a serem aspirados. Outra hipótese a ser levantada é a questão controversa da renovação folicular (Johnson *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005), mas este novo conceito precisa ser melhor aceito antes de ser considerado (Eggen *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007).

Desta forma pode-se afirmar que matrizes zebuínas, especificamente as da raça Nelore, são boas doadoras de oócitos para programas de PIVE em larga escala, já que existe um consenso de que os animais zebuínos produzem mais oócitos que as raças taurinas, e este maior número de oócitos refletem em uma maior produção de embriões e prenhez (Pontes *et al.*, 2009). Neste estudo, a variação individual de respostas nas fêmeas trabalhadas em sessões de OPU-PIVE foi bastante significativa. Segundo Pontes *et al.* (2010), estes dados devem ser considerados positivos e tornam viáveis a aplicação comercial em larga escala da técnica de produção, caso, seja realizada uma prévia seleção de doadoras e de touros. A grande contribuição para a produção animal, é que com a utilização da PIVE, maximizou-se a utilização das matrizes geneticamente superiores, podendo-se atingir médias de 25 a 50 bezerros por vaca ano (Varago *et al.*, 2008).

Cabe ressaltar a importância da experiência do veterinário responsável pelos serviços de aspiração folicular na recuperação de um maior número de oócitos de qualidade. A eficiência do procedimento de OPU está diretamente relacionada a metodologia adequada, sendo que as variáveis técnicas para a obtenção de oócitos possuem considerável impacto sobre a quantidade e a morfologia dos complexos *cumulus oophorus* (CCOs), e conseqüentemente sobre a competência para o desenvolvimento (Bols *et al.*, 1997). Outro aspecto relevante está relacionado às variações individuais entre doadoras, considerando-se peso, idade, manejo, raça, época, entre outros.

No presente estudo, dentre as doadoras da sub-espécie *Bos taurus taurus*, fêmeas da raça Holandês produziram maior quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis, de oócitos clivados e de embriões produzidos por sessão de OPU em comparação às doadoras da raça Jersey. Interessantemente, essas doadoras da raça Holandês apresentaram também maior quantidade de oócitos totais, de oócitos viáveis e de oócitos clivados do que doadoras da raça Gir, entretanto, tiveram uma menor produção de embriões. Embora fêmeas de raças zebuínas, de maneira geral, como as da raça Gir, caracterizam-se por apresentar melhor resposta na recuperação de oócitos em comparação às fêmeas de raças taurinas, o resultado encontrado no presente estudo pode ter sido influenciado pela idade de algumas doadoras aspiradas. Em decorrência do estudo ter sido realizado com doadoras pertencentes a um programa comercial de OPU-PIVE de uma central privada de produção de embriões, muitas destas fêmeas, particularmente as da raça Gir, apesar de possuírem mérito genético superior, apresentavam idade avançada. Viana *et al.* (2004), avaliando fêmeas da raça Gir, relataram um número baixo de oócitos por aspiração (média de  $13,9 \pm 1,6$  estruturas), presente em doadoras acima de



10 anos. Ferreira *et al.* (2008), avaliando também um rebanho Gir, relataram que o número de oócitos aspirados foi influenciado pela idade da doadora, ocorrendo uma queda de 1,58 estruturas por ano de idade da vaca, constatando que nas vacas acima de 12 anos, a queda foi mais acentuada, ocorrendo a partir desta idade, aproximadamente a redução média de duas estruturas para cada ano a mais na idade da doadora. Malhi *et al.* (2008), também encontraram resultados semelhantes, sugerindo uma redução da fertilidade com a idade, visto que vacas velhas tiveram uma proporção maior de estruturas não fertilizadas e zigotos degenerados. Em relação ao número de embriões produzidos, a quantidade manteve-se maior nas fêmeas *Bos taurus indicus* (raça Gir) na comparação com fêmeas *Bos taurus taurus* (raça Holandês), determinando melhor competência do desenvolvimento embrionário *in vitro*, corroborando com dados da literatura.

#### **4.2. Influência do ano na produção *in vitro* de embriões**

Embora o número de fêmeas submetidas ao processo de OPU-PIVE nos três anos do estudo foi bastante expressivo e muito próximo entre os referidos anos, provavelmente as diferenças estatísticas constatadas das quatro variáveis dos modelos de regressão para com os anos avaliados entre as raças estudadas foram determinadas pela variação individual de resposta das doadoras.

#### **4.3. Influência do tipo de sêmen (sexado e convencional) na produção *in vitro* de embriões**

Nas análises de regressão, o sêmen convencional apresentou maior taxa de embriões produzidos do que o sêmen sexado ( $P < 0,001$ ), tanto em doadoras

zebuínas quanto em taurinas. Isto pode indicar que o processo de sexagem prejudica a capacidade de fecundação dos espermatozoides e o desenvolvimento embrionário subsequente, mesmo após primeiras clivagens.

O uso do sêmen sexado na PIVE tem sido investigado por muitos estudos. Entretanto, discrepâncias são relatadas e a causa é atribuída a inúmeros fatores. Alguns trabalhos encontraram baixa taxa de clivagem e formação de blastocistos (Merton *et al.*, 1997; Bermejo-Alvarez *et al.*, 2008; Palma *et al.*, 2008; Stinshoff *et al.*, 2012). Entretanto em outros, nenhuma diferença foi observada entre sêmen sexado e não sexado (convencional) (Zhang *et al.*, 2003; Lu e Seidel, 2004; Underwood *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2010). Blondin *et al.* (2009) relataram taxa de clivagem, usando sêmen sexado, similar na comparação com uso de sêmen não sexado, embora baixa formação de blastocistos, corroborando com os resultados do presente estudo, mostrando que o sêmen sexado foi menos hábil em produzir embrião, quando utilizado na fecundação *in vitro*. Essas diferenças podem ser devido à variação na metodologia de seleção de oócitos, qualidade do sêmen utilizado ou meios de cultura diferentes (Underwood *et al.*, 2010).

Além do mais, é importante salientar que diferenças individuais entre animais são observadas, mostrando que há touros que apresentam resultados melhores (Zhang *et al.*, 2003). Há também relato de que o sêmen de alguns touros é mais afetado negativamente pelo processo de sexagem (Blondin *et al.*, 2009). Quando Lu e Seidel (2004) testaram o sêmen sexado de diferentes touros, foi necessário ajustar individualmente diferentes concentrações de heparina para obter melhor capacitação espermática *in vitro*. Esses autores mostraram que alguns touros não foram beneficiados com heparina como um indutor de capacitação. A concentração

espermática utilizada na FIV também teve necessidade de alteração entre sêmen sexado e convencional do mesmo touro.

Apesar da reduzida motilidade progressiva e integridade de membrana do espermatozóide sexado, Carvalho *et al.* (2010) não encontraram baixa produção de embriões *in vitro*. Entretanto, a ultraestrutura embrionária demonstrou estar alterada em números e estruturas de organelas, como mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso (Palma *et al.*, 2008). Esta discrepância em relação ao comprometimento embrionário pode ser atribuída à fragmentação do DNA dos espermatozoides de alguns touros. Gonsálvez *et al.* (2011) mostraram que alguns touros apresentam mais alterações de DNA em seu espermatozóide que outros. A identificação de indivíduos resistentes ao rigoroso processo de sexagem poderá permitir uma maior utilização dessa tecnologia na PIVE e em outras biotecnias da reprodução.

Quando utilizado na IA, muitos trabalhos também têm mostrado que o sêmen sexado apresenta menor fertilidade que o sêmen convencional (Baruselli *et al.*, 2007). Devido à limitada eficiência na produção de sêmen sexado pela citometria de fluxo, uma dose comercial deste tipo de sêmen contém  $2,0 \times 10^6$  espermatozoides, enquanto a dose convencional possui  $15-20 \times 10^6$  espermatozoides (Frijters *et al.*, 2009). Diante disso, muito se especula sobre a influência da menor quantidade de espermatozoides na dose do sêmen sexado sobre a fertilidade à IA.

No entanto, essa baixa concentração de espermatozoides na dose de sêmen sexado parece não interferir na produção *in vitro* de embriões, uma vez que a concentração de espermatozoides viáveis, acrescentados às gotas de fecundação *in vitro*, é semelhante para o sêmen sexado e o convencional. Dentro dos fatores importantes que afetam

o sucesso da PIVE, o touro é responsável por uma grande variação. Há uma série de questões que influenciam as taxas de sucesso do uso de sêmen sexado para a produção *in vitro* de embriões bovinos, que incluem redução nas taxas de fertilização (Cran *et al.*, 1995), menores taxas de clivagem (Lu e Seidel, 2004), menor número de blastocistos (Merton *et al.*, 1997) e baixas taxas de prenhez (Cran *et al.*, 1995). No entanto, o uso de sêmen sexado é uma potente ferramenta para a produção de embriões do sexo pré-determinado (Wheeler *et al.*, 2006), e a utilização do sêmen sexado em programas de PIVE, tem ocasionado grande variação na geração de embriões viáveis à transferência.

Estudos compararam a utilização de sêmen sexado por citometria de fluxo ao sêmen convencional (não sexado), em relação à produção *in vitro* de embriões bovinos, e concluíram que ambos podem ser utilizados para PIVE obtendo-se índices de clivagem e desenvolvimento embrionário acima de 75% e 35%, respectivamente (Lima, 2007). Zhang *et al.* (2003), não observaram diferenças significativas entre as taxas de produção de embriões utilizando sêmen sexado, sêmen submetido somente ao corante para sexagem ou sêmen convencional (20,3%, 21,6% e 22,3%, respectivamente), concluindo que a separação dos espermatozoides ou o corante utilizado para a separação por citometria de fluxo não interferem no desenvolvimento embrionário *in vitro*. No entanto, Lu *et al.* (1999), encontraram diferenças significativas nas taxas de produção de blastocistos utilizando sêmen sexado ou convencional, mas afirmaram que a utilização desta biotécnica é viável para programas de PIVE.

Devido à menor fertilidade e menor produção *in vitro* de embriões a partir do sêmen sexado, quando comparado com o seu respectivo não sexado, e pela grande

variabilidade na fertilidade entre touros (Lu e Seidel, 2004; Alomar *et al.*, 2008; Blondin *et al.*, 2009), muitos criadores preferem utilizar o sêmen sexado apenas quando o touro possui, conhecidamente, boa fertilidade na produção de embriões *in vitro*.

#### 4.4. Influência da época do ano (seca e águas) na produção *in vitro* de embriões

Na comparação da distribuição dos resultados da OPU-PIVE de fêmeas zebuínas e taurinas ao longo dos períodos de menor ou maior índice pluviométrico (seca e águas), nos três anos de avaliações, não houve efeito direto desta característica para nenhuma das variáveis estudadas, uma vez que o valor de P nesta univariada foi maior que 0,2.

A literatura cita que doadoras de raças zebuínas produzem mais oócitos e são menos sensíveis a variações sazonais nos resultados da PIVE em regiões tropicais e subtropicais (Viana, 2005; Camargo *et al.*, 2007). Já doadoras de origem europeia, além de apresentarem menor eficiência no processo de multiplicação genética pela OPU-PIVE, também podem sofrer alterações de acordo com o clima, principalmente em regiões tropicais (Al-Katanani *et al.*, 2002).

Oliveira *et al.* (2013), analisando 1.349 aspirações foliculares de doadoras zebuínas Gir, Nelore, Brahman e Guzerá realizadas durante um ano na região sudoeste do estado de Minas Gerais, não observaram diferenças na produção de oócitos totais e viáveis ao longo do ano. No entanto, nos meses de maio e setembro (período da seca), a produção média de embriões foi inferior, decorrente de menor conversão de oócitos em embriões neste período. A queda de eficiência de doadoras zebuínas neste período pode estar relacionada a duas situações que agem simultaneamente:

possível estresse pelo frio (Hansen, 2004), decorrente de queda de temperatura neste período, e também efeito indireto pela redução na qualidade das pastagens (Turner, 1980).

Ao contrário do descrito em outros estudos (Edwards *et al.*, 1996; Camargo *et al.*, 2007), Fernandes *et al.* (2013) trabalhando com resultados de 960 aspirações foliculares de doadoras taurinas das raças Holandês, Simental, Angus e Jersey, realizadas em doze meses também na região sudoeste do estado de Minas Gerais, não observaram diferenças na produção de oócitos totais e na conversão de oócitos viáveis em embriões ao longo do ano, corroborando com os resultados do presente estudo.

## 5. CONCLUSÕES

- A sub-espécie da doadora de oócitos *Bos taurus indicus* apresenta maior quantidade e competência de desenvolvimento dos oócitos coletados, assim como maior produção dos embriões *in vitro*, quando comparada com doadoras *Bos taurus taurus*;
- Raças de mesma sub-espécie podem apresentar diferenças significativas tanto na quantidade como na competência de desenvolvimento *in vitro* dos oócitos coletados;
- O uso de sêmen sexado resulta em menor taxa de embriões produzidos *in vitro*, tanto em doadoras zebuínas quanto em taurinas, na comparação com o uso de sêmen não sexado (convencional);
- A época do ano (seca e águas) não influenciou as respostas das doadoras zebuínas e taurinas na quantidade de oócitos aspirados e na competência do

desenvolvimento embrionário *in vitro*, considerando um programa de PIVE comercial em larga escala.

vitro-matured oocytes selectively process X- or Y-sorted sperm differentially. *Biology of Reproduction*, v.79, p.594-597, 2008.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-KATANANI, Y.M.; DROST, M.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J.J.; KRININGER III, C.E.; BLOCK, J.; THATCHER, W.W.; HANSEN, P.J. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified *in vitro* produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. *Theriogenology*, 58, 171-182, 2002.

ALOMAR, M.; TASIAUX, H.; REMACLE, S.; GEORGE, F.; PAUL, D.; DONNAY, I. Kinetics of fertilization and development, and sex ratio of bovine embryos produced using the semen of different bulls. *Animal Reproduction Science*, v.107, p.48-61, 2008.

ASSEY, R.J.; HYTTEL, P.; ROCHE, J.F. *et al.* Infrequent structures in cattle oocytes. *Anat. Embr.*, v.190, p.263-271, 1994.

AVELINO, K.B.; ROSSETTO, M.; MARAIA, A.C.; LANDIM JR., L.P.; GARCIA, J.M. Produção *In vitro* de embriões: sêmen convencional vs. sexado, *Acta Scientiae Veterinariae*, 35(Supl. 3): 2007.

BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p.205-211, 2007.

BERMEJO-ÁLVAREZ, P.; RIZOS, D.; RATH, D.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ÁDAN, A. Can bovine in

BLASCHI, W.; ANDRADE, E.R.; NONATO, I.; PONTES, J.H.F.; ERENO, J.C.; UVO, S. *et al.* Pluset prior follicle aspiration: Impact on *in vitro* embryo production in *Bos indicus* cows. *Acta Scientiae Veterinariae*, 2004;32:186 (Abstract).

BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOURNIER, V.; MORIN, N.; CRAWFORD, L.; MADAN, P.; KING, W.A. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. *Theriogenology*, v.71, p.30-38, 2009.

BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Effects of needle tip bevel aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact *cumulus* oocyte complexes. *Theriogenology*, v.47, p.1221 – 1236, 1997.

BONI, R.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C.; KOGUT, J.; KRUIP, T.A.M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, v.48, p.277-289, 1997.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology*, v.51, p.58-70, 1999.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; SERAPIÃO, R.V.; DE SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; GUIMARÃES, M.F.M.; DO VALE FILHO, V.R. Developmental

- competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology*. v.68, p.626-632, 2007.
- CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; MACHADO, G.M.; MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in *in vitro* embryo production. *Theriogenology*, 74:1521-1530, 2010.
- CRAN, D.G., JOHNSON, L.A., POLGE, C. Sex preselection in cattle: a field trial. *Veterinary Record*, v.136, p. 495-496, 1995.
- CRUZ, F.B., MARTINS, L.T., MARINHO, L.S.R., FORELL, F., VIEIRA, A.D., MEZZALIRA, A. Aspiração folicular em vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* e vitrificação dos oócitos em condições de campo. *Revista de Ciências Agroveterinárias*. v. 8, n.2, p.184-187, 2009.
- DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 15 2000, Rio Quente: [Anais...]. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, Porto Alegre, v.28, n.1, p. 181 – 185, 2000. Suplemento.
- DOHOO, I.R.; MARTIN, W.; STRYHN, H. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2<sup>nd</sup> ed. VER Inc., PEI, Canada, p. 865, 2003.
- EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. *et al.* Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol. Reprod.* 55, 341–346, 1996.
- EGGAN, K.; JURGA, S.; GOSDEN, R.; MIN, I.M.; WAGERS, A.J. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. *Nature*. 2006;441:1109–1114.
- FABER, D.C.; MOLINA, J.A.; OHLRICH, C.L.; VANDER ZWAAG, D.F.; FERRÉ, L.B. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology*, v.59, p. 125-138, 2003.
- FERNANDES, C.A.C.; PEREIRA, A.; OLIVEIRA, E.R.; ROSSI, J.R.; PALHÃO, M.P.; FIGUEIREDO, A.C.S.; MAGALHÃES, P.C.M. Resultados da PIVE em doadoras de raças europeias (*Bos taurus taurus*) ao longo do ano em clima subtropical. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Praia do Forte, 2013. *Anais...* SBTE, p.341.
- FERREIRA, A.M, VIANA, J.H.M, CAMARGO, L.S.A., SÁ, W.F., PEREIRA, P.A.C. População Folicular Ovariana Durante o Ciclo Estral em Vacas da Raça Gir. *Revista Brasileira Zootecnia*. v.33, n.6, Supl. 1, p.1689-1694, 2004.
- FERREIRA, M.B.D.F., LOPES, B.C., PANETO, J.C.C., RIBEIRO, S.A., FERNANDES, L.O., BOEIRA, D.R., CUNHA, F.V., TETZNER, T.A.D., GARCIA, J.M. Parâmetros reprodutivos de doadoras *Bos indicus* da raça Gir leiteiro na produção *in vitro* de embriões no programa MOET da EPAMIG-UNIUBE. In: 8o Congresso Brasileiro de Zebu., Uberaba, MG. *Anais...Uberaba ABCZ*, 2008.
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v.47, p.1489-1505, 1997.

- FRIJTERS, A.C.J.; MULLAART, E.; ROELOFS, R.M.G.; VAN HOORNE, R.P.; MORENO, J.F.; MORENO, O.; MERTON, J.S. What affects fertility of sexed bull semen more, low sperm dosage or the sorting process? *Theriogenology*, v.71, p.64-67, 2009.
- GALINA, C.S.; ORIHUELA, A.; RUBIO, I. Reproductive physiology in zebu cattle, characteristics related to estrus expression and performance of bulls utilized in natural mating. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, XI, 1995, Belo Horizonte. *Anais...* CBRA, Belo Horizonte: 1995, p.46-61.
- GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, v.59, p.599-616, 2003.
- GONSÁLVES, J.; RAMIREZ, M.A.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, C.; CRESPO, F.; EVANS, K.M.; KJELLAND, M.E.; MORENO, J.F. Sex-sorted bovine spermatozoa and DNA damage: I. Static features. *Theriogenology*, 75:197-205, 2011.
- HANSEN, P.J. Physiological and cellular adaptations of zebu cattle to thermal stress. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 349-360. 2004.
- HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, v.43, p.141-152, 1995.
- HAYAKAWA, H., HIRAI, T., TAKIMOTO, A., IDETA, A., AOYAGI, Y. Superovulation and embryo transfer in Holstein cattle using sexed sperm. *Theriogenology*, v.71, p. 68-73, 2009.
- HOHENBOKEN, W.D. Applications of sexed semen in cattle production. *Theriogenology*, 52(8): p. 1421-1433, 1999.
- JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J.K.; TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*. 2004;428:145-150.
- JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H.J.; ADAMS, G.B.; NIKURA, Y. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*. 2005;122:303-315
- KRININGER, C.E.; BLOCK, A.J.; AL-KATANANI, Y.M.; RIVERA, R.M.; CHASE JR., C.C.; HANSEN, P.J. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. *Anim. Reprod. Sci.*, v.78, p.13-24, 2003.
- LEIVAS, F.G., BRUM, D.S., RUFINO, F.A., GUIMARÃES, A.V., BERNARD, M.L., SILVA, C.M., RUBIN, M.I.B. Response of the *Bos indicus* cow to aspiration per OPU session and *in vitro* produced blastocyst. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, p. 411, 2003.
- LIMA, V.F.M.H. Avanços metodológicos na seleção do sexo de espermatozoides bovinos para utilização no melhoramento genético e na produção animal. *Revista Brasileira Zootecnia*, v.36, *suplemento especial*, p.219-228, 2007.

- LIU, Y.; WU, C.; LYU, Q.; YANG, D.; ALBERTINI, D.F.; KEEFE, D.L. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. *Dev Biol.* 2007;306:112–120.
- LOONEY, C.R.; LINDSEY, B.R.; GONSETH, C.L.; JOHNSON, D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*, v. 41, p. 67-72, 1994.
- LU, K.H., CRAN, D.G., SEIDEL Jr., G.E. *In vitro* fertilization with flow cytometrically sorted bovine sperm. *Theriogenology*, v.52, p.1393-1405, 1999.
- LU, K.H.; SEIDEL JR, G.E. Effects of heparin and sperm concentration on cleavage and blastocyst development rates of bovine oocytes inseminated with flow cytometrically-sorted sperm. *Theriogenology*, v.62, p.819-830, 2004.
- MACHADO, S.A., REICHENBACH, H.D., WEPERT, M., MATOS, L.F., WOLF, E., GONÇALVES, P.B.D. Variability in ovum pick up and *in vitro* embryo production results of monozygotic twin cows. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 31, p. 443, 2003.
- MALHI, P.S., ADAMS, G.P., MAPLETOFF, R.J., SINGH, J. Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging. *Animal Reproduction Science*, v. 109, n. 1-4, p. 100-109, 2008.
- MÁRQUEZ, Y. C., GALINA, C. S., MORENO, N. T. I. Seasonal effect on Zebu embryo quality as determined by their degree of apoptosis and resistance to cryopreservation. *Reproduction Domestic Animal*, v. 40, p. 553-558, 2005.
- MERTON, J.S., HARING, R.M., STAP, J., HOEBE, R.A., ATEN, J.A. Effect of flow cytometrically sorted frozen thawed semen on success rates of *in vitro* bovine embryo production. *Theriogenology*, v. 47, p.295, 1997.
- MERTON, J.S.; ASK, B.; ONKUNDI, D.C.; MILLAART, E.; COLENBRANDER, B.; NIELEN, M. Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up- in vitro production embryo-production program. *Theriogenology*, v.72, p.885-893, 2009.
- MUNRO, R.K. The superovulatory response of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle following treatment with follicle stimulating hormone and progesterone. *Anim. Reprod. Sci.*, v.11, p.91-97, 1986.
- NONATO JR, I.; RUFINO, F.A.; SANCHES, B.V.; PONTES, J.H.F.; UVO, S.; ERENO JR., J.C.; SENEDA, M.M. Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, p.95, 2004.
- OLIVEIRA, E.R.; FERNANDES, C.A.C.; PEREIRA, A.; LUDGERO, B.F.A.; MIYAUCHI, T.M.; ROSSI, T.C.; PALHÃO, M.P.; VIANA, J.H.M.; VARAGO, F.C. Variação sazonal dos resultados da PIVE em doadoras de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Praia do Forte, 2013. *Anais...* SBTE, p.349.
- PALMA, G.A.; OLIVIER, N.S.; NEUMÜLLER, C.H.; SINOWATZ, F. Effects of sex-sorted spermatozoa on the efficiency of in vitro fertilization and ultrastructure of in vitro produced bovine blastocysts. *Anat Histol Embryol*, 37:67-73, 2008.

- PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods on the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v.71, p.690-697, 2009.
- PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P.H.S.; FAIFER, F.S.; STERZA, F.A.M.; SCHENK, J.L.; SENEDA, M.M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, 74:1349-1355, 2010.
- RANDEL, R.D. Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). *Theriogenology*, v.21, p.170-185, 1984.
- RHODES, F.M., FITZPATRICK, L.A., ENTWISTLE, K.W., DE'ATH, G. Sequential changes in ovarian follicular dynamics in *Bos indicus* heifers before and after nutritional anoestrus. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.104, n.1, p.41-49, 1995.
- RUBIN KCP, PONTES JHF, NONATO-JUNIOR I, ERENO-JUNIOR JC, PANSARD H, SENEDA MM. Influência do grau de sangue Nelore na produção in vivo de oócitos. *Acta Scientiae Veterinariae* 33:183, 2005.
- RUBIN KCP, RIGO AG, SCHROEDER RV, SILVA RCP, MARQUES MO, SENEDA MM. Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para obtenção in vivo de oócitos bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae* 2004; 32:121.
- RUVUNA, F.; TAYLOR, J.F.; WALTER, J.P.; TURNER, J.W.; THALLMAN, R.M. Bioeconomic evaluation of embryo transfer in beef production systems: I. description of a biological model for steer production. *Journal Animal Science*, 70: 1077-1083, 1992.
- SARTORELLI, E.S.; CARVALHO, L.M.; BERGFELT, D.R.; GINTHER, O.J.; BARROS, C.M. Morphological characterization of follicle deviation in Nelore (*Bos indicus*) heifers and cows. *Theriogenology*, v.63, p.2382 - 2394, 2005.
- SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA, J.M.; DE OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, v.67, p.37-43, 2001.
- SENEDA, M.M., ESPER; C.R., ANDRADE; E.R., GARCIA; J.M., OLIVEIRA; J.A. Shorter interval between fsh administration and follicle aspiration increases efficiency of oocyte recovery, *Theriogenology*, v. 57, p. 684, 2002. (Abstract).
- SENEDA, M. M., SANTOS, G. M. G., SILVA, K. C. F., SPEGIORIN, M. R., BLASCHI, W., PONTES, J. H. F. Situação atual da aspiração folicular e da fecundação *in vitro*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina. *Anais...* Londrina PR UEL, 2006. p. 172-180.
- SLENNING, B. D.; WHEELER, M.B. Risk evaluation for bovine embryo transfer services using computer simulation and economic decision theory. *Theriogenology*. v. 31(3), p.653- 673, 1989.



- SOUZA, J. A. T., MACEDO, N. A., CARTER, J. A. Eficiência de doadoras e receptoras de embriões segundo a época do ano, a categoria e genótipo das receptoras. *Acta Science Veterinary*, v. 35, p. 1235, 2007 (resumo).
- STINSHOFF, H.; KRIENKE, M.; EKHLASI-HUNDRIESERA, M.; WILKENING, S.; HANSTEDT, A.; FRESE, D.; RATH, D.; BOLLWEIN, H.; WRENZYCKI, C. Seminal plasma and seminal plasma proteins added to bulk sorted sperm do not alter the mRNA expression of in vitro produced bovine embryos. *Theriogenology*, 78:132-139, 2012.
- TAYLOR, J.F.; PHILLIPS, K.R.; TOMASZEWSKI, M.A. Net present value and economic merit of sexed semen and splitting units of semen for Australian Holsteins. *J. Dairy Science*. 71: 3100-3111. 1988.
- TRIBULO, H.; BO, G. A.; JOFRE, F. et al. The effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v. 35, p. 286 1991 (resumo).
- TURNER, J. W. Genetic and biological aspects of Zebu adaptability. *J. Anim. Sci.* 50:1201-1205, 1980.
- UNDERWOOD, S.L.; BATHGATE, R.; PEREIRA, D.C.; CASTRO, A.; THOMSON, P.C.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Embryo production after in vitro fertilization with frozen-thawed, sex-sorted, re-frozen-thawed bull sperm. *Theriogenology*, 73:97-102, 2010.
- VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constant evolução. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.32, n.2, p.100-109, 2008.
- VIANA, J.H.M. Punção folicular orientada por ultra-som em vacas da raça Gir. Tese (doutorado em Ciência Animal, área de concentração em Reprodução Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 124 p., 2002.
- VIANA, J. H. M. . Short intervals between ultrasonographically-guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed of cattle. *YAKHTEH*, v. 7, n.1, p. 26-27, 2005.
- VIANA J.H.M.; CAMARGO L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: Uma nova realidade. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35(Supl. 3): s915-s924. 2007.
- VIANA, J.H.M., FERREIRA, A.M., SÁ, W.F., CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in Zebu cattle. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.35, n.12, p.2501- 2509, 2000.
- VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A., FERREIRA, A.M., SÁ, W.F., FERNANDES, C.A.C., MARQUES JUNIOR, A.P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 84, p. 1-12, 2004.
- VISINTIN, J.A.; MARTINS, J.F.P.; BEVILACQUA, E.M. *et al.* Cryopreservation of *Bos taurus* vs *Bos indicus* embryos: are they really different? *Theriogenology*, v.57, p.345-359, 2002.
- WAGTENDONK-de LEEUW, A.M.

Ovum-pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*, v. 65, p. 914-925, 2006.

WHEELER, M.B., RUTLEDGE, J.J., BROWN, A.F., VANETTEN, T., MALUSKY, S., BEEBE, D.J. Application of sexed semen technology to *in vitro* embryo production in cattle.

*Theriogenology*, v. 65, p. 219–227, 2006.

ZHANG, M.; LU, K.H.; SEIDEL JR, G.E. Development of bovine embryos after *in vitro* fertilization of oocytes with flow cytometrically sorted, stained and unsorted sperm from different bulls. *Theriogenology*, v.60, p.1657-1663, 2003.

## CAPÍTULO 2 – ANÁLISE ECONÔMICA DO CUSTO LABORATORIAL DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS DE DOADORAS DE DIFERENTES GRUPOS GENÉTICOS

### RESUMO

Com a finalidade de avaliar os custos operacionais e alguns indicadores econômicos da PIVE dentro de um laboratório comercial de produção de embriões bovinos, foram utilizadas informações, de doadoras *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, obtidas de um banco de dados deste laboratório. Custos operacionais variáveis representaram 90,78% de todo o custo de produção do embrião em laboratório, sendo os custos de meios utilizados nos processos de maturação, fertilização e cultivo embrionário (55,34%) e de mão-de-obra (27,76%), os mais elevados. A melhor taxa de conversão de zigotos cultivados *in vitro* em embriões, obtida em doadoras zebuínas em relação à doadoras taurinas, representou um lucro médio por embrião de R\$34,18 contra R\$19,34, respectivamente. A atividade de PIVE dentro do laboratório teve uma receita acumulada (R\$2.572.430,00) superior aos custos operacionais (R\$1.351.287,65), determinando lucro operacional e grande capacidade do laboratório crescer economicamente.

**Palavras chave:** embriões, laboratório de PIVE, *Bos taurus taurus*, *Bos taurus indicus*, custos operacionais, receita, lucro operacional.

### ABSTRACT

*In order to evaluate operational costs and some economic indicators of IVP system from a commercial laboratory of IVP bovine embryos, database of Bos taurus indicus and Bos taurus taurus donors were collected. Variable operational costs accounted for 90.78% of the entire cost of IVP embryo in the lab, where the highest costs were the medias used in the process of maturation, fertilization and embryo culture (55.34%), and the laboratory labor (27.76%). The best convertin rate of in vitro culture zygotes to embryos, obtained in Zebu donors regarding Bos taurus taurus donors, represented an average profit per embryo of R\$34.18 against R\$19.34, respectively. The IVP lab activity had a higher accumulated revenue (R\$2,572,430.00) in relation of operational costs (R\$1,351,287.65), determining operational profit and a great economic capacity of the laboratory to grow.*

**Keywords:** *embryo, IVP laboratory, Bos taurus indicus, Bos taurus taurus, operational costs, revenue, operational profit.*

## 1. INTRODUÇÃO

A economia brasileira tem passado por rápidas transformações nos últimos anos. Neste contexto, ganham espaço novas concepções, ações e atitudes, em que produtividade, custo e eficiência se impõem como regras básicas de sobrevivência em um mercado cada vez mais competitivo e globalizado (IEL, CNA, SEBRAE, 2000). A conscientização dos pesquisadores, técnicos e produtores envolvidos nesse sistema, bem como o ajuste para este novo cenário, é primordial para a competitividade da atividade.

O conhecimento dos custos permite ao empresário e/ou técnico avaliar economicamente a atividade e, por meio dessa análise, conhecer com detalhes e utilizar, de maneira inteligente e econômica, os fatores de produção (terra, trabalho, capacidade gerencial e capital). Sendo assim, permite localizar os pontos de estrangulamento e atingir os seus objetivos de maximização de lucros ou minimização de custos (Lopes e Magalhães, 2005).

As pesquisas mostram que o uso de biotécnicas reprodutivas, bem como estratégias de suplementação nutricional, manejo de pastagens e adequado calendário sanitário e avaliações reprodutivas, aumentam a produtividade, entretanto, nem sempre é avaliado o retorno econômico direto e seus benefícios no sistema de produção global. Portanto, é fundamental mensurar o impacto da tecnologia nos custos (variáveis e fixos) e na eficiência econômica de diferentes sistemas pecuários.

A maior dificuldade no desenvolvimento de modelos para sistemas bioeconômicos é a falta de

dados, especialmente coeficientes e parâmetros biológicos, uma vez que o esforço da pesquisa tem se concentrado tradicionalmente em subsistemas parciais, isolados do resto do sistema (Gastal, 1980). É importante realizar a análise econômica do modelo para verificar sua viabilidade, e a análise de sensibilidade do mesmo, que consiste em verificar o comportamento dos resultados com valores médios e extremos das principais variáveis (Gastal, 1980).

As descobertas ocorridas em relação aos aspectos da fisiologia da reprodução em bovinos possibilitaram o desenvolvimento de tecnologias capazes de aumentar a velocidade e a eficiência da disseminação do material genético de fêmeas zootecnicamente superiores (Christiansen, 1991), promovendo assim uma maior contribuição das mesmas para o melhoramento genético da espécie. Essas novas biotécnicas foram viabilizadas na prática, tanto econômica quanto na forma de aplicação (Fortune *et al.*, 1991; Ginther *et al.*, 1997). A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma destas tecnologias. O uso dessa técnica desenvolve-se rapidamente na pecuária bovina brasileira. Com ela, o melhoramento genético pode ser efetuado com mais rapidez e eficiência, mesmo em pequenas populações de animais (Varago *et al.*, 2008).

A coleta de oócitos de doadoras, a produção de embriões em laboratório especializado e a transferência destes às receptoras, constituem a atividade básica de um programa de PIVE. Em consequência, uma boa equipe técnica de campo e laboratório e a seleção e o manejo de doadoras e receptoras, formam a parte mais importante de toda esta biotécnica. A primeira para maximizar a produção de embriões,

diretamente associada à produção oocitária de doadoras, e as receptoras para estarem disponíveis em um momento oportuno, com boa fertilidade, possibilitando redução da estimativa de custo final da biotécnica.

Embora várias descobertas envolvendo a fisiologia da reprodução, tenham sido realizadas nas últimas décadas, a PIVE, de uma maneira geral, apresenta relativa variabilidade nos índices de eficiência, gerando eventual risco em relação aos seus resultados (Beltrame *et al.*, 2003). Em um programa comercial de PIVE, geralmente, relegam-se os cuidados com o laboratório e receptoras em favor de uma atenção extremada às doadoras. Após a realização das etapas de maturação e fertilização *in vitro*, em média, apenas 30% a 40% dos oócitos podem se desenvolver até blastocisto; e após a transferência dos embriões classificados como morfologicamente viáveis, a taxa de gestação tem variado entre 20% e 60% (Varago *et al.*, 2008). Estas limitações da técnica acabam se traduzindo em um aumento nos custos de cada produto, influenciando negativamente o produtor na hora de decidir em adotar esta tecnologia.

A eficiência dos índices resultantes de biotécnicas reprodutivas em bovinos abrange aspectos econômicos, ambientais e sociais. A implantação de sistemas mais lucrativos é necessária, e depende do arsenal de recursos e tecnologias disponíveis e também da gerência eficiente das variáveis que afetam diretamente o sistema (Beltrame *et al.*, 2010).

O objetivo deste trabalho foi avaliar, dentro de um laboratório, os custos e indicadores econômicos da produção *in vitro* de embriões comerciais de diferentes raças zebuínas e taurinas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Metodologia

O estudo foi realizado por intermédio de uma abordagem descritiva, trabalhando com doadoras bovinas que participavam do programa comercial OPU-PIVE de uma central de produção de embriões, localizada no município de Funilândia, Minas Gerais. Foram realizadas e, posteriormente, analisadas aspirações foliculares e PIVE de janeiro de 2010 a dezembro de 2012 (veja capítulo 1). As doadoras de oócitos foram novilhas e vacas, de variadas idades, tendo sido analisadas três raças zebuínas (Nelore, Gir e Guzerá) e três raças taurinas (Holandês, Jersey e Pardo Suíço).

O laboratório de PIVE utilizado no estudo está equipado conforme normas vigentes do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA – Instrução Normativa nº 57, de 27/09/2006) e conforme sugestões de instituições internacionais, como a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Em conformidade com estas normas, foram criados módulos separados dentro do laboratório para preparo de sêmen e fertilização *in vitro*, revestidos com material de fácil higienização e protegidos contra a entrada de insetos e outros animais. O laboratório também apresenta uma anti-sala de recepção e manipulação, na qual possui um óculo com dupla porta para recepção do material coletado (oócitos e sêmen). O setor de lavagem e esterilização de material encontra-se mais afastado e sem comunicação direta com o laboratório, assim como a unidade administrativa (escritório).

O banco de dados trabalhado caracterizou-se por conter 2.585 sessões de OPU de um total de 10.086 fêmeas aspiradas e com uma produção de 36.749 embriões *in vitro*.

O levantamento das informações contidas no banco de dados foi dividido nas seguintes etapas:

- 1) Coleta de dados por intermédio de informações obtidas no laboratório de PIVE pelas anotações feitas pela equipe de embriologistas em fichas próprias e planilhas eletrônicas.
- 2) Esses dados foram processados utilizando planilhas eletrônicas para análise das informações técnicas e econômicas da produção *in vitro* de embriões.

## **2.2. Caracterização dos grupos genéticos de doadoras avaliadas no processo de OPU-PIVE**

Os grupos genéticos de doadoras bovinas envolvidas em procedimentos de OPU-PIVE foram classificados quanto às raças mais trabalhadas no período estudado em:

- 1) Grupo Taurino – caracterizado por doadoras *Bos taurus taurus* das raças Holandês, Jersey e Pardo Suíço.
- 2) Grupo Zebuino – caracterizado por doadoras *Bos taurus indicus* das raças Nelore, Gir e Guzerá.

Não houve conhecimento do escore da condição corporal, tratamentos hormonais para controle de onda folicular ou superovulação, e condição reprodutiva das doadoras. O manejo

nutricional e sanitário também não pôde ser controlado uma vez que a maioria dos animais, no momento da OPU, localizava-se nas diferentes propriedades dos clientes da empresa. Nenhuma das doadoras possuía manejo específico para realização das aspirações, que eram realizadas de acordo com a solicitação do proprietário. Entretanto, um período mínimo de 15 dias era estabelecido entre as sessões de aspiração. Todas as doadoras estavam alojadas em propriedades localizadas dentro do estado de Minas Gerais, sendo a maioria em um raio máximo de 400 km de distância do laboratório de produção *in vitro* de embriões bovinos.

## **2.3. Aspiração folicular, classificação e transporte dos oócitos imaturos**

Todas as sessões de OPU estudadas foram realizadas por uma equipe técnica, que enviaram os oócitos aspirados de fêmeas doadoras para a produção *in vitro* de embriões. Esta equipe era composta por um veterinário (autor), responsável pela OPU, e um técnico de laboratório, responsável pelo rastreamento e seleção dos oócitos recuperados. Por isso, a técnica e os equipamentos de OPU descritos abaixo, assim como a classificação dos oócitos recuperados, foram os utilizados pela mesma equipe técnica responsável pelas sessões de OPU estudadas no experimento.

As sessões de OPU foram realizadas com o auxílio de ultrassom (Aloka SSD 500, Japão) adaptado com transdutor microconvexo setorial de 5,0 MHz. Agulhas hipodérmicas descartáveis de 18 a 20 Gauge, conectadas a um tubo cônico de 50mL (Corning, Acton, MA, EUA) por mangueira de silicone de 2 mm de diâmetro interno. A OPU foi

conduzida com uso de uma bomba de vácuo (Cook Veterinary Products, Queensland, Australia) sob uma pressão negativa de 80 a 100 mmHg, e o meio de coleta foi constituído por solução tampão salina fosfatada - DPBS (Nutricell, Campinas, Brasil), acrescido de 20.000 UI/L de heparina sódica (Liquemine<sup>TM</sup>, Roche, SP, Brasil), mantido à 36°C durante a aspiração.

Imediatamente após a OPU, o material recuperado foi lavado em filtros para colheita de embriões (Nutricell, Campinas, Brasil ou WTA, Cravinhos, Brasil) com solução salina tamponada - DPBS (Nutricell, Campinas, Brasil) -, e depositado em placas de Petri descartáveis de 60mm ou 90mm x 15mm (TPP, Suécia). Sob estereomicroscópio, os oócitos recuperados foram lavados em três gotas de meio TCM-199 (Gibco BRL; Grand Island, NY, EUA) tamponado com HEPES, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL; Grand Island, NY, EUA), 0,20 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, RJ, Brasil).

Os oócitos foram classificados segundo a metodologia recomendada pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS, 2010) em:

- Viáveis: quando o citoplasma do oócito era homogêneo (sem sinais de degeneração) e circundado completamente por pelo menos uma camada de células do *cumulus oophorus*;
- Desnudos: quando a camada de células do *cumulus oophorus* ao redor do oócito era incompleta ou ausente;

- Degenerados: quando o citoplasma era irregular (heterogêneo), podendo ou não conter células do *cumulus oophorus* ao seu redor;
- Atrésicos: quando o citoplasma era irregular e escuro, com células do *cumulus oophorus* já expandidas.

Como metodologia utilizada pela equipe da OPU, os oócitos classificados como degenerados e atrésicos foram descartados.

Sessões de aspiração folicular ovariana nas doadoras que não produziram oócitos não foram informadas ao laboratório e, por isso, não entraram no estudo.

Em seguida, os oócitos foram transferidos para criotubos de 2,0 mL (TPP, Suécia) contendo meio de maturação *in vitro* (MIV), constituído por meio TCM-199 suplementado com 10% de SFB, 1 µg/mL FSH (Folltropin<sup>TM</sup>, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont., Canadá), 50 µg/mL hCG (Profasi<sup>TM</sup>, Serono, SP, Brasil) e estradiol (1 µg/mL), 0,20 mM de piruvato de sódio e 83,4 µg/mL de amicacina. Esses criotubos eram gaseificados utilizando uma mistura gasosa industrial contendo 5% de CO<sub>2</sub>, contida em um cilindro portátil, e então selados. Os mesmos permaneciam, durante o transporte até o laboratório, em incubadoras de transporte de oócitos (WTA, Cravinhos, Brasil) com temperatura controlada (37°C).

#### **2.4. Produção *in vitro* dos embriões (PIVE)**

Exceto quando mencionado, todos os demais reagentes foram adquiridos da empresa Sigma (St. Louis, MO, EUA).

#### **2.4.1. Maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos**

Logo após a recepção, os oócitos foram mantidos dentro de incubadora (38,5°C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima), sob óleo mineral, em gotas de 100 µL de meio de maturação *in vitro* (o mesmo do transporte) contendo, no máximo, 25 oócitos por microgota, por 22 a 26 horas.

#### **2.4.2. Preparo do sêmen e fertilização *in vitro* (FIV)**

Para a fertilização *in vitro* foi utilizado, exclusivamente, sêmen congelado de touros escolhidos por proprietários das doadoras. Apenas fertilizações *in vitro* realizadas com sêmen de touros de mesma raça da doadora foram incluídas no estudo. Antes da FIV, o sêmen foi descongelado em água aquecida a 35° C por 30 segundos e, em seguida, processado segundo protocolos do laboratório para a seleção dos espermatozóides vivos.

Os protocolos utilizados baseavam-se na centrifugação através de gradiente descontínuo de Percoll (45-90%), por cinco minutos a 2.900 rpm; ou centrifugação em tubo cônico de 15 mL (Corning, Acton, MA, EUA) contendo 2 mL de meio TALP suplementado com 0,2 mM de piruvato e 83,4 g/mL de amicacina, tamponado com 10 mM de Hepes por 5 minutos a 900 rpm. Em ambos os protocolos, após esta primeira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo os espermatozóides foi ressuscitado em

1 mL do mesmo meio da FIV, para que fosse novamente centrifugado por 5 minutos a 900 rpm.

Após processamento do sêmen, a concentração de espermatozóides vivos foi ajustada para 25x10<sup>6</sup> células móveis/mL e o volume de quatro microlitros de sêmen (10<sup>5</sup> espermatozóides) foi adicionado em cada gota de 90 µL de meio TALP-FIV (TALP suplementado com 10 g/mL de heparina, 18 M de penicilamina, 10 M de hipotaurina e 8 M de epinefrina), sob óleo mineral, já contendo os oócitos maturados. O co-cultivo dos oócitos e espermatozóides ocorreu durante 22-24 horas, em incubadora a 38,5° C com 5% CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima.

#### **2.4.3. Cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões**

Após a FIV os prováveis zigotos foram cultivados em grupo máximo de 25 por gota de 100 µL de meio de cultivo, constituído por meio SOF (Wells *et al.*, 1999) acrescido de 2,5% SFB e 0,5% de albumina sérica bovina (BSA), sob óleo mineral. Os mesmos foram mantidos em incubadora (38,5° C com 5% CO<sub>2</sub> e 5% O<sub>2</sub> em ar e umidade máxima), sem co-cultivo com células da granulosa. No dia três (D3) após a FIV, todos os embriões com quatro células ou mais foram considerados como clivados e, no dia cinco (D5) foi realizada a substituição de 50% do volume das gotas de cultivo por meio de cultivo novo.

No dia sete (D7) após a FIV, os embriões considerados excelentes (grau I) ou bons (grau II) (segundo manual da IETS, 2010) foram selecionados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento:



- Mórula compacta (Mc): embrião compacto, com distinto espaço perivitelino, e sem blastocele;
- Blastocisto inicial (Bi): blastocele presente e ocupando menos da metade do embrião;
- Blastocisto (BI): blastocele ocupando já metade do embrião e a zona pelúcida ainda mais espessa;
- Blastocisto expandido (Bx): embrião com diâmetro aumentado, blastocele ocupando mais da metade do embrião e a zona pelúcida de espessura mais delgada;
- Blastocisto eclodido (Be): embrião com zona pelúcida rompida ou ausente.

## 2.5. Componentes econômicos

Os desembolsos e as receitas foram registrados em planilhas eletrônicas de forma a gerar o fluxo de caixa sobre o qual foram calculados índices econômicos da PIVE. Foi avaliada a depreciação do laboratório de PIVE, anualmente, que, somada às despesas fixas constituíram os custos operacionais fixos. Portanto, foi possível quantificar os custos operacionais fixos e variáveis, e obter a participação percentual de cada item no custo.

As avaliações dos custos operacionais foram realizadas tomando-se como referência a quantidade de zigotos submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV) dos grupos zebuínos e taurinos nos três anos de estudo. A partir da manipulação laboratorial destes zigotos, considerando a taxa de conversão em

blastocistos, é que foram calculados todos os custos visando a produção final do embrião *in vitro*.

Os custos operacionais fixos foram representados pela infra-estrutura do laboratório de PIVE, tais como aluguel do imóvel (onde foi montado o laboratório), máquinas e equipamentos, além das despesas gerais fixas, como impostos e despesas (energia e telefone). Os custos com aquisição de materiais de consumo para PIVE, meios utilizados na PIVE (MIV, FIV e CIV), serviços de mão-de-obra permanente e temporária no laboratório de PIVE, e serviços de manutenção e reparos foram considerados como fatores variáveis.

Os custos operacionais totais foram calculados somando-se os custos operacionais fixos mais os operacionais variáveis. Os custos médios foram calculados dividindo o custo operacional total pela quantidade de embriões viáveis produzidos de acordo com cada grupo genético trabalhado.

Cabe ressaltar que os custos de doses de sêmen utilizadas nos procedimentos da PIVE, embora represente pouco, não entraram como desembolso do laboratório, mas sim do cliente.

As receitas do laboratório de PIVE, analisando um estudo diferenciado em doadoras dos grupos Taurino e Zebuino, foram caracterizadas pelo preço de venda do embrião viável multiplicado pela quantidade dos mesmos produzidos no laboratório em relação à cada doadora trabalhada nos dois grupos avaliados. A receita média foi calculada dividindo a receita total pelas quantidades de embriões produzidos (grupos Taurino e Zebuino) em determinado ciclo anual.

A avaliação da viabilidade econômica foi baseada na metodologia proposta por Frank (1978) e utilizada por Costa *et al.* (1986), Corrêa *et al.* (2000), Guimarães *et al.* (2005) e Barbosa *et al.* (2010), utilizando-se para isto os indicadores: margem bruta (receita total – custos operacionais variáveis); lucro operacional ou margem líquida (receita total – custos operacionais totais). Como indexador de preços foi utilizado o dólar oficial americano.

O retorno do capital investido (RCI) foi utilizado como parâmetro de avaliação de investimentos, assim definido:

- Retorno do capital investido (RCI) = é a proporção obtida pelos resultados gerados anualmente nesta atividade, apurada pela expressão: retorno do capital investido = lucro ÷ capital investido na atividade. O RCI foi avaliado pelo lucro operacional.

O cálculo do RCI foi determinado pela equação:

$$RCI = \frac{Lucro(operacional)}{Desembolso + Patrimônio} \times 100$$

em que:

- RCI = retorno do capital investido;
- Lucro(operacional) = receita total – custos operacionais totais;
- Desembolso = custos operacionais variáveis + fixos (sem depreciação);
- Patrimônio = materiais e equipamentos do laboratório.

O valor patrimonial foi calculado em função do total de bens, a cada ano, multiplicado pelo valor de mercado, segundo Nogueira (2004). As máquinas e equipamentos do laboratório receberam seus valores somando os

investimentos que foram realizados a cada ano e descontados os valores das depreciações. A variação patrimonial foi calculada pelo resultado do valor do patrimônio no ano subsequente em relação ao ano estudado.

Foram calculados outros indicadores econômicos na avaliação dos grupos genéticos estudados, a seguir:

- 1) Custo do embrião produzido (R\$) = custo operacional total (R\$/ano) ÷ embriões produzidos dentro de cada grupo genético;
- 2) Receita bruta/embrião (R\$) = receita bruta (R\$/ano) ÷ total de embriões produzidos dentro de cada grupo genético;
- 3) Margem bruta/embrião (R\$) = margem bruta (R\$/ano) ÷ total de embriões produzidos dentro de cada grupo genético;
- 4) Lucro operacional/embrião (R\$) = lucro operacional obtido ÷ total de embriões produzidos dentro de cada grupo genético;

O ponto de resíduo foi calculado como parâmetro de indicação do nível de produção no qual a atividade tem seu custo operacional igual à receita total (Reis, 2002). Auxilia na indicação do quanto a empresa, no caso o laboratório, tem que faturar para não trabalhar no prejuízo (Antunes e Ries, 2001; Reis, 2002; Correia Neto, 2007).

O cálculo do ponto de resíduo foi determinado pela equação:

$$Qr = \frac{COF_{anual}(R\$)}{RMédia - COV_{médio}}$$

em que:

- Qr = quantidade a ser vendida (ponto de resíduo);
- COF<sub>anual</sub> = custo operacional fixo anual
- RM<sub>média</sub> = receita média / embrião;
- COV<sub>médio</sub> = custo operacional variável / zigoto em CIV.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 – Caracterização do programa de OPU-PIVE estudado e respectiva competência do desenvolvimento embrionário *in vitro*

Nos três anos de avaliações, o grupamento genético *Bos taurus indicus*, composto por doadoras das raças Nelore, Gir e Guzerá, apresentou um total de 26.279 embriões produzidos em laboratório. Já com o Grupo Taurino (*Bos taurus taurus*), formado por doadoras das raças Holandês, Jersey e Pardo Suíço, obteve-se um total de 10.470 embriões *in vitro*.

Do total de 26.279 embriões produzidos e analisados no Grupo Zebuino, 15.442, 8.851 e 1.986 foram referentes às doadoras das raças Nelore, Gir e Guzerá, respectivamente. No Grupo Taurino, do total de 10.470 embriões, 9.136, 1.228 e 106 foram referentes às raças Holandês, Jersey e Pardo Suíço, respectivamente (Tabela 01).

**Tabela 01** - Número total e porcentagem dos embriões produzidos nos anos de 2010, 2011 e 2012 segundo a raça da doadora

Raça	Embriões produzidos	
	(n)	(%)
Nelore	15.442	42,0
Gir	8.851	24,1
Guzerá	1.986	5,4
Holandês	9.136	24,9
Jersey	1.228	3,3
Pardo-Suíço	106	0,3
<b>Total</b>	<b>36.749</b>	<b>100,0</b>

No ano de 2010, considerando o Grupo Zebuino, com 2.109 doadoras trabalhadas em 640 sessões de OPU-PIVE, foram colocados em cultivo *in vitro* 32.385 zigotos resultando na produção de 8.602 embriões viáveis; no Grupo Taurino, com 1.248 doadoras trabalhadas em 200 sessões de OPU-PIVE, foram colocados em cultivo

*in vitro* 16.517 oócitos resultando na produção de 3.500 embriões.

No ano de 2011, considerando o Grupo Zebuino, com 2.092 doadoras trabalhadas em 643 sessões de OPU-PIVE, foram colocados em cultivo *in vitro* 28.624 zigotos resultando na produção de 8.701 embriões; no Grupo Taurino, com 1.221

doadoras trabalhadas em 211 sessões de OPU-PIVE, foram colocados em cultivo *in vitro* 17.549 óocitos resultando na produção de 3.885 embriões.

No ano de 2012, considerando o Grupo Zebuino, com 2.237 doadoras trabalhadas em 666 sessões de OPU-PIVE, foram colocados em cultivo *in vitro* 28.546

zigotos resultando na produção de 8.976 embriões; no Grupo Taurino, com 1.179 doadoras trabalhadas em 225 sessões de OPU-PIVE, foram colocados em cultivo *in vitro* 13.404 zigotos resultando na produção de 3.085 embriões (Tabela 02).

**Tabela 02** - Número de sessões de OPU, doadoras aspiradas, zigotos em CIV e embriões produzidos segundo o grupo genético e a raça da doadora nos anos de 2010, 2011 e 2012

	2010				2011				2012			
	Sessão OPU	Doadoras	Zigotos CIV	Embriões produzidos	Sessão OPU	Doadoras	Zigotos CIV	Embriões produzidos	Sessão OPU	Doadoras	Zigotos CIV	Embriões produzidos
<b>Grupo Zebuino</b>	640	2.109	32.385 <sup>a</sup>	8.602 <sup>a</sup> (71,1%)	643	2.092	28.624 <sup>a</sup>	8.701 <sup>a</sup> (69,1%)	666	2.237	28.546 <sup>a</sup>	8.976 <sup>a</sup> (74,4%)
<b>.Nelore</b>	360	846	15.578	4.711	370	1.042	15.560	5.402	341	1.059	14.979	5.329
<b>.Gir</b>	208	1.037	13.300	3.065	199	883	10.428	2.606	232	1.058	11.907	3.180
<b>.Guzerá</b>	72	226	3.507	826	74	167	2.636	693	93	120	1.660	467
<b>Grupo Taurino</b>	200	1.248	16.517 <sup>b</sup>	3.500 <sup>b</sup> (28,9%)	211	1.221	17.549 <sup>b</sup>	3.885 <sup>b</sup> (30,9%)	225	1.179	13.404 <sup>b</sup>	3.085 <sup>b</sup> (25,6%)
<b>.Holandês</b>	158	883	12.620	2.622	177	1.109	16.520	3.730	157	1.000	11.730	2.784
<b>.Jersey</b>	35	350	3.701	852	29	101	949	135	58	152	1.440	241
<b>.Pardo Suíço</b>	7	15	196	26	5	11	80	20	10	27	234	60

<sup>a,b</sup> Valores com letras sobscritas distintas na mesma coluna diferem ( $P < 0,05$ ) entre si pelo Teste do Qui-quadrado.

Em 2010, do total de 32.385 zigotos em CIV do Grupo Zebuino, obteve-se uma taxa de conversão em blastocistos de 26,56% e no Grupo Taurino de 16.517 zigotos em CIV, a taxa de conversão em blastocistos foi de 21,19%.

Em 2011, do total de 28.624 zigotos em CIV do Grupo Zebuino, obteve-se uma taxa de conversão em blastocistos de 30,40% e no Grupo Taurino de 17.549 zigotos em CIV, a taxa de conversão em blastocistos foi de 22,14%.

Em 2012, do total de 28.546 zigotos em CIV do Grupo Zebuino, obteve-se uma taxa de conversão em blastocistos de 31,44% e no Grupo Taurino de 13.404 zigotos em

CIV, a taxa de conversão em blastocistos foi de 23,02% (Tabela 03).

**Tabela 03** – Taxas de conversão de zigotos no CIV em embriões viáveis segundo o grupo genético e a raça da doadora nos anos de 2010, 2011 e 2012

	2010	2011	2012	Média / Raça
<b>Grupo Zebuino</b>	26,56%	30,40%	31,44%	<b>29,47%<sup>a</sup></b>
.Nelore	30,24%	34,72%	35,58%	33,51%
.Gir	23,05%	24,99%	26,71%	24,91%
.Guzerá	23,55%	26,29%	28,13%	25,99%
<b>Grupo Taurino</b>	21,19%	22,14%	23,02%	<b>22,11%<sup>b</sup></b>
.Holandês	20,78%	22,58%	23,73%	22,36%
.Jersey	23,02%	14,23%	16,74%	17,99%
.Pardo Suíço	13,27%	25,00%	25,64%	21,30%
<b>Média anual</b>	<b>24,75%</b>	<b>27,26%</b>	<b>28,75%</b>	<b>26,92%</b>

<sup>a,b</sup> Porcentagens com letras sobrescritas distintas na mesma coluna diferem ( $P < 0,05$ ) entre si pelo Teste do Qui-quadrado.

Dentre as doadoras zebuínas analisadas nas sessões de OPU nos três anos de estudo, estas tiveram uma maior quantidade de zigotos submetidos ao cultivo *in vitro* e que, por fim, resultaram em mais embriões produzidos na comparação feita com doadoras taurinas.

O número de oócitos aspirados por sessão de aspiração folicular, assim como o montante de zigotos em CIV, está diretamente relacionado com a quantidade de folículos antrais presente nos ovários no momento da aspiração (Boni *et al.*, 1997; Viana, 2002), ou seja, fêmeas que possuem maior número de folículos antrais por onda de crescimento folicular produzem mais oócitos por sessão de aspiração, resultando na produção de mais zigotos que entrarão em cultivo. Este maior número de oócitos refletem em uma maior produção de embriões e prenhez. Características estas observadas em matrizes zebuínas,

particularmente as da raça Nelore (Nonato Jr. *et al.*, 2004; Pontes *et al.*, 2009; Pontes *et al.*, 2010).

### 3.2 – Análise dos custos de produção e de investimentos

Os resultados das análises econômicas apresentados a seguir destacam os principais indicadores econômicos da atividade de PIVE em um laboratório especializado, envolvendo respostas de embriões produzidos de doadoras zebuínas e taurinas avaliadas.

O custo operacional total de zigotos em CIV que resultaram em embriões viáveis durante os anos de 2010, 2011 e 2012 foi de R\$ 1.351.287,65, com maior participação para os meios de cultivo utilizados na PIVE (55,34%) e mão-de-obra do laboratório (27,76%) (Tabela 04). A participação

elevada destes dois itens determinaram uma maior participação dos custos operacionais variáveis na análise econômica realizada.

O custo operacional total (COT) médio por zigoto em CIV no laboratório, nos anos de 2010, 2011 e 2012, foi de R\$ 36,78. O custo operacional variável (COV) médio por zigoto em CIV foi de R\$ 33,39. Já o custo operacional fixo (COF) médio por zigoto em CIV foi de R\$ 3,39. Os custos operacionais médios por zigoto em CIV variaram em função dos anos avaliados. A melhor taxa de conversão de zigotos no CIV que resultou no aumento do número de blastocistos produzidos em 2010, 2011 e 2012, proporcionou menor custo operacional total médio/zigoto em CIV, R\$ 38,96, R\$ 36,03 e R\$ 35,35, respectivamente. Nessa situação, a maior produção de embriões em função da melhor conversão dos oócitos, proporcionou redução dos custos unitários variáveis pela maior escala (Tabela 04).

O maior número de sessões de OPU envolvendo um maior número de fêmeas aspiradas em cada um dos três anos do estudo foi de doadoras zebuínas, onde além de possuírem uma melhor taxa de conversão de oócitos em embriões, resultaram em maior quantidade de blastocistos produzidos. O preço médio de venda dos embriões (R\$/Emb.) manteve-se

constante nos três anos avaliados. A receita total aumentou de 2010 para 2011, com uma pequena redução no ano de 2012 decorrente de uma menor produção de embriões de doadoras do Grupo Taurino neste ano (Tabela 04).

A receita total acumulada conseguiu pagar todos os custos operacionais do laboratório nos três anos do estudo, determinando um lucro operacional acumulado de R\$ 1.221.142,35. O retorno do capital investido acumulado ficou em 211,37%, tendo uma média anual de 70,46% (Tabela 04). A atividade de PIVE avaliada neste estudo teve, então, uma receita superior aos custos operacionais, determinando grande capacidade do laboratório crescer economicamente no longo prazo.

O fato da receita total do laboratório ter possibilitado cobrir todos os custos operacionais nos três anos avaliados, apresentando lucros operacionais sempre positivos e com retorno do capital com elevada porcentagem, acabou determinando, dessa maneira, a permanência estável do preço de venda do embrião sem reajustes futuros. A própria margem líquida significativa obtida com a produção dos embriões e posterior venda, possibilitaria descontos em negociações comerciais realizadas para programas de PIVE em larga escala, por exemplo.

**Tabela 04** - Indicadores financeiros anuais de uma central comercial de PIVE com valor acumulado do período e a média dos anos de 2010, 2011 e 2012

	2010	2011	2012			
	Total R\$	Total R\$	Total R\$	Acumulado	Média	%COT
<b>Custos Oper. Variáveis - COV</b>	<b>430.771,25</b>	<b>412.411,74</b>	<b>383.497,75</b>	<b>1.226.680,74</b>	<b>408.893,58</b>	<b>90,78</b>
<b>COV / Zigoto em CIV</b>	<b>35,60</b>	<b>32,77</b>	<b>31,80</b>	<b>100,16</b>	<b>33,39</b>	<b>-</b>
Materiais de consumo do lab. e manutenção	35.544,23	28.106,85	40.093,59	103.744,67	34.581,56	7,68
Meios utilizados na PIVE	280.449,30	261.626,03	205.776,69	747.852,02	249.284,01	55,34
Mão-de-obra (lab.)	114.777,72	122.678,86	137.627,47	375.084,05	125.028,02	27,76
<b>Custos Oper. Fixos – COF</b>	<b>40.751,60</b>	<b>41.052,06</b>	<b>42.803,25</b>	<b>124.606,91</b>	<b>41.535,64</b>	<b>9,22</b>
<b>COF / Zigoto em CIV</b>	<b>3,37</b>	<b>3,26</b>	<b>3,55</b>	<b>10,18</b>	<b>3,39</b>	<b>-</b>
Despesas gerais	29.568,97	29.869,43	31.620,62	91.059,02	30.353,01	6,74
Depreciação	11.182,63	11.182,63	11.182,63	33.547,89	11.182,63	2,48
<b>Custo Oper. Total – COT</b>	<b>471.522,85</b>	<b>453.463,80</b>	<b>426.301,00</b>	<b>1.351.287,65</b>	<b>450.429,22</b>	<b>100</b>
<b>COT / Zigoto em CIV</b>	<b>38,96</b>	<b>36,03</b>	<b>35,35</b>	<b>110,34</b>	<b>36,78</b>	<b>-</b>
Receita bruta	847.140,00	881.020,00	844.270,00	2.572.430,00	857.476,67	-
Receita bruta / embrião	70,00	70,00	70,00	210,00	70,00	-
Margem bruta	416.368,75	468.608,26	460.772,25	1.345.749,26	448.583,09	-
Lucro operacional <sup>1</sup> – Lop	375.617,15	427.556,20	417.969,00	1.221.142,35	407.047,45	-
Lucro operacional/emb.	31,04	33,97	34,65	99,66	33,22	-
<b>Retorno capital – LOp</b>	<b>62,59%</b>	<b>73,46%</b>	<b>75,32%</b>	<b>211,37%</b>	<b>70,46%</b>	<b>-</b>
<b>Dólar oficial (US\$) – média<sup>2</sup></b>	<b>1,761</b>	<b>1,675</b>	<b>1,954</b>	<b>-</b>	<b>1,797</b>	<b>-</b>

<sup>1</sup> Lucro operacional = margem líquida

<sup>2</sup> Fonte: Finance One, 10 de outubro de 2013

O ponto de resíduo acumulado foi de 1.134 embriões produzidos por ano, o que indica o quanto de embriões o laboratório teria que vender para não trabalhar no prejuízo, isto é, receita igual ao custo (Antunes e Ries, 2001; Reis, 2002; Correia Neto, 2007).

No estudo realizado, considerando um cenário real de análises de dados gerados no laboratório de PIVE, a taxa de conversão média de zigotos no CIV em blastocistos de todas as raças juntas avaliadas, nos três anos de análise, foi de 26,92% (Tabela 02).

Ao analisar os dados separados, fazendo uso de uma simulação econômica, de acordo com a taxa de conversão de zigotos no CIV em embriões, os resultados apresentaram diferenças entre cada raça estudada.

A simulação proposta consistiu no uso da taxa de conversão de zigotos no CIV em embriões viáveis produzidos de cada raça estudada, possibilitando uma análise financeira ajustada semelhante à mostrada na Tabela 05. O custo operacional total médio por zigoto em CIV de doadoras do

Grupo Zebuino, na simulação feita, ficou em R\$ 35,82 contra uma média de R\$ 50,66 do Grupo Taurino. Essa diferença torna-se ainda mais acentuada quando a simulação foi realizada com fêmeas das raças que apresentaram a maior taxa de conversão – no caso, a raça Nelore com uma taxa de conversão média de zigotos no CIV em blastocistos de 33,51% - e com fêmeas das raças que tiveram a menor taxa de conversão – raça Jersey, com uma taxa de conversão média de 17,99%. O custo operacional total médio por zigoto em CIV de doadoras Nelore e doadoras Jersey foi de R\$ 29,58 e R\$ 57,21, respectivamente. Uma diferença de custo de R\$ 27,63 em cada embrião final produzido (Tabela 05).

Embora doadoras da raça Pardo Suíço (Grupo Taurino) tenha apresentado baixa recuperação de óocitos pela técnica de OPU em função da característica fisiológica

dessa raça de possuir baixa população folicular quando comparado a animais zebuínos, essas fêmeas mostraram uma boa conversão de zigotos no CIV em blastocistos produzidos, particularmente nos anos 2011 e 2012. Essa melhor taxa de conversão provavelmente teve influência no uso de diferentes touros no acasalamento das doadoras nestes dois anos em questão, em comparação ao ano de 2010. Situação esta que determinou um menor custo de embriões produzidos a partir destas doadoras em particular. Já fêmeas da raça Jersey apresentaram uma menor taxa de conversão de zigotos no CIV em embriões nos anos de 2011 e 2012, diferente da melhor taxa alcançada em 2010, caracterizando um maior custo na produção de blastocistos nos últimos dois anos (Tabela 05).

**Tabela 05** – Custos operacionais totais médios por zigoto em cultivo *in vitro* (R\$/ano) de acordo com a raça e o grupo genético das doadoras nos anos de 2010, 2011 e 2012

	2010	2011	2012	Média
	R\$ / Zig.CIV	R\$ / Zig.CIV	R\$ / Zig.CIV	R\$ / Zig.CIV
<b>Grupo Zebuino</b>	38,22	34,98	34,25	<b>35,82</b>
Nelore	31,88	28,29	28,56	<b>29,58</b>
Gir	41,84	39,30	38,05	<b>39,73</b>
Guzerá	40,94	37,36	36,12	<b>38,14</b>
<b>Grupo Taurino</b>	53,66	50,61	47,72	<b>50,66</b>
Holandês	46,41	43,50	42,82	<b>44,24</b>
Jersey	41,88	69,04	60,72	<b>57,21</b>
Pardo Suíço	72,69	39,28	39,63	<b>50,53</b>
<b>Média anual</b>	<b>45,94</b>	<b>42,79</b>	<b>40,98</b>	-

Zig.CIV = zigoto em cultivo *in vitro*

Na simulação feita com informações das taxas de conversão de zigotos no CIV em embriões produzidos de cada raça avaliada, foi possível definir os lucros operacionais por embrião produzido *in vitro*. Nas doadoras do Grupo Zebuino, o lucro operacional médio por produção de

blastocisto nos três anos de estudo foi de R\$ 34,18; doadoras do Grupo Taurino apresentaram um lucro operacional médio de R\$ 19,34. Analisando essa simulação separadamente nas raças que apresentaram maior e menor produção de embriões, observa-se na raça Nelore um lucro médio



por embrião de R\$ 40,42 contra R\$ 12,79 de embriões produzidos nas fêmeas da raça Jersey (Tabela 06).

Situações onde a produção de embriões foi mais baixa em decorrência da menor taxa de conversão de zigotos no CIV em blastocistos, como por exemplo nos anos de

2011 e 2012 para fêmeas da raça Jersey e em 2010 para fêmeas Pardo Suíça – onde foi obtido prejuízo (Tabela 06), acabam estabelecendo diretrizes na tomada de decisões para reajustes de preços de venda de embrião, no intuito de evitar prejuízos.

**Tabela 06** – Lucros operacionais por embrião produzido *in vitro* (R\$/ano) de acordo com a raça e o grupo genético das doadoras nos anos de 2010, 2011 e 2012

	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>Média</b>
	<b>R\$ / Emb.</b>	<b>R\$ / Emb.</b>	<b>R\$ / Emb.</b>	<b>R\$ / Emb.</b>
<b>Grupo Zebuino</b>	31,78	35,02	35,75	<b>34,18</b>
Nelore	38,12	41,71	41,44	<b>40,42</b>
Gir	28,16	30,70	31,95	<b>30,27</b>
Guzerá	29,06	32,64	33,88	<b>31,86</b>
<b>Grupo Taurino</b>	16,34	19,39	22,28	<b>19,34</b>
Holandês	23,59	26,50	27,18	<b>25,76</b>
Jersey	28,12	0,96	9,28	<b>12,79</b>
Pardo Suíço	(2,69)	30,72	30,37	<b>19,47</b>
<b>Média anual</b>	<b>24,06</b>	<b>27,21</b>	<b>29,02</b>	-

Valores numéricos entre parênteses são negativos  
Emb. = embrião

#### 4. CONCLUSÕES

- A exploração de doadoras zebuínas na PIVE aliada a uma prévia seleção daquelas com melhor resposta na recuperação de oócitos pela técnica de aspiração folicular, proporcionou alta produtividade de embriões quando comparadas com doadoras taurinas.

- A receita total do laboratório comercial de PIVE, analisada em 2010, 2011 e 2012, remunerou totalmente os custos do capital investido no negócio e teve margem líquida (lucro operacional).

- A margem de lucro obtida no laboratório de PIVE possibilita a flexibilização do preço de venda do embrião, podendo o mesmo ser submetido à descontos.

- A maior taxa de conversão de zigotos em cultivo *in vitro* na produção de embriões viáveis de doadoras zebuínas determinou menores custos operacionais de produção final do embrião em laboratório e, conseqüentemente, maiores lucros operacionais na comparação feita com doadoras taurinas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTUNES, L.M.; RIES, L.R. Gerência Agropecuária. Guaíba Agropecuária Ltda. 268p., 2001.
- BARBOSA, F.A.; GRAÇA, D.S.; ANDRADE, V.J. *et al.* Produtividade e

- eficiência econômica de sistemas de produção de cria, recria e engorda de bovinos de corte na região sul do estado da Bahia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.3, p.677-685, 2010.
- BELTRAME, R.T. Impacto bioeconômico da sexagem de espermatozoides em programas de transferência de embriões e fertilização *in vitro* em zebuínos. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes; 113p., 2010.
- BELTRAME, R.T.; BARIONI, L.G.; VELOSO, R.; SAUERESSIG, M.G. Número ótimo de receptoras em programas de transferência de embriões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Porto Seguro, v. 27, n. 3, p. 463-464, 2003.
- BONI, R.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C.; KOGUT, J.; KRUIP, T.A.M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, v.48, p.277-289, 1997.
- CHRISTIANSEN, L.G. Use of embryo transfer in future cattle breeding schemes. *Theriogenology*, v.35, n.1. p.141-149, 1991.
- CORRÊA, E.S.; VIEIRA, A.; COSTA, F.P. *et al.* Sistema semi-intensivo de produção de carne de bovinos nelores no Centro-Oeste do Brasil. Campo Grande: Embrapa/CNPGC, Documento 95, 2000.
- CORREIA NETO, J.F. Excel para profissionais de finanças: manual prático. Rio de Janeiro: Elsevier, 283p., 2007.
- COSTA, F.P.; PACHECO, J.A.C.; CORRÊA, E.S. *et al.* Estimativa do custo de produção da carne bovina para a região centro-oeste: setembro de 1986. Campo Grande: Embrapa/CNPGC, 1986 (Comunicado Técnico, 30).
- FERREIRA, I.C.; SILVA, M.A.; REIS, R.P. *et al.* Análise de sensibilidade da margem bruta da receita e dos custos do confinamento de diferentes grupos genéticos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.1, p. 93-103, 2005.
- FORTUNE, J.E.; SIROIS, J.; TURZILLO, A.M.; LAVOIR, M. Follicle selection in domestic ruminants. *Journal of Reproduction Fertility*. v.43, p.187-198, 1991.
- FRANK, R.G. Introducción al cálculo de costos agropecuarios. Buenos Aires: El Ateneo, 1978.
- GASTAL, E. *Enfoque de sistemas na programação da pesquisa agropecuária*. Brasília: IICA, 1980.
- GINTHER, O.J.; KOT, K.; KULIC, L.J.; WILTBANK, M.C. Emergence and deviation of follicles during the development of follicular waves in cattle. *Theriogenology*. v.48, p 75-87, 1997.
- GUIMARÃES, P.H.S. Comparação econômica entre produção de fêmeas F<sub>1</sub> Holandês X Gir e alternativas de produção de gado de corte por meio de simulação. 2003. 48p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GUIMARÃES, P.H.S.; MADALENA, F.E.; CEZAR, I.M. Simulação dos efeitos dos preços de produtos na avaliação econômica de três sistemas alternativos de bovinocultura de cria. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.227-230, 2005 (Suplemento 2).

- IEL, CNA, SEBRAE. Estudo sobre a eficiência econômica e competitividade da cadeia agroindustrial da pecuária de corte no Brasil. 2000. Disponível em <<http://www.cna.org.br/PublicacoesCNA/EstudosdasCadeiasProdutivas/pecuariadecorte>>.
- LOPES, M.A.; MAGALHÃES, G.P. Análise da rentabilidade na terminação de bovinos de corte em confinamento: um estudo de caso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, n.3, p.374-379, 2005.
- NEHMI FILHO, V.A. O IGP é o verdadeiro indexador do boi. In: FNP Consultoria & Comércio, Boviplan Consultoria Agropecuária. *Anualpec 2002: Anuário da pecuária brasileira*. São Paulo: Argos Comunicação, p.105-106, 2002.
- NOGUEIRA, M.P. Gestão de custos e avaliação de resultados: agricultura e pecuária. Bebedouro: Scot Consultoria, 219p., 2004.
- NONATO JR, I.; RUFINO, F.A.; SANCHES, B.V.; PONTES, J.H.F.; UVO, S.; ERENO JR., J.C.; SENEDA, M.M. Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, p.95, 2004.
- PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods on the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v.71, p.690-697, 2009.
- PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P.H.S.; FAIFER, F.S.; STERZA, F.A.M.; SCHENK, J.L.; SENEDA, M.M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, 74:1349-1355, 2010.
- REIS, R.P. Fundamentos de economia aplicada. Lavras: UFLA/FAEPE, 95p., 2002.
- RIBEIRO, A.C.; QUEIROZ, S.A.; McCALLISTER, A.J. Análise da sensibilidade da receita líquida vitalícia de bovinos da raça holandesa aos itens de receita e de custo. In: REUNIÃO ANNUAL DA SBZ, 38, 2001, Piracicaba, *Anais...*, Piracicaba: SBZ, CD-ROM, 2001.
- VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constant evolução. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.32, n.2, p.100-109, 2008.
- VIANA, J.H.M. Punção folicular orientada por ultra-som em vacas da raça Gir. Tese (doutorado em Ciência Animal, área de concentração em Reprodução Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 124 p., 2002.
- WELLS, D.N.; MISICA, P.M.; TERVIT, H.R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biology of Reproduction*, v.60, p.996-1005, 1999.

### **CAPÍTULO 3 – PRODUÇÃO *IN VITRO* EM LARGA ESCALA DE EMBRIÕES BOVINOS DE CORTE FERTILIZADOS COM SÊMEN SEXADO PARA MACHO: ANÁLISE COMPARATIVA EM SIMULAÇÃO COM IATF**

#### **RESUMO**

O investimento no setor de biotecnologia de reprodução animal, no intuito de intensificar o melhoramento genético de rebanhos de corte de alta produtividade, torna-se de grande valia. A produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) é uma biotécnica que, aliada ao uso de sêmen sexado, possibilita a multiplicação de fêmeas de alto valor genético. O estudo proposto, conduzido em uma estação de monta de uma fazenda comercial de bovinos de corte, teve como objetivo a análise técnica e econômica da produção em larga escala de machos de corte oriundos de embriões *in vitro*, produzidos a um baixo custo, fertilizados com sêmen sexado para macho, e inovulados pela técnica de transferência de embriões em tempo fixo (TETF). Foram sincronizadas 974 fêmeas Nelore e cruzadas para o experimento, obtendo uma taxa de aproveitamento de 84,4%. Objetivando reduzir o custo de produção de embriões *in vitro*, o processo de aspiração folicular de fêmeas vivas foi substituído pela coleta de ovários de fêmeas Nelore abatidas em frigorífico. Um total de 3.054 oócitos foram coletados de 500 ovários, resultando na produção de 1.050 embriões fertilizados com sêmen sexado para macho da raça Angus. 822 embriões foram transferidos, obtendo 345 prenhez (42%), sendo 328 (95,1%) machos e 17 (4,9%) fêmeas. Uma simulação, com dados da própria fazenda, utilizando a IATF com sêmen sexado, foi usada para estudo comparativo. Índice de 30% de prenhez foi obtido na IATF, resultando em 278 machos e 15 fêmeas. O projeto com embriões, após venda de bezerros desmamados, terá margem bruta de R\$135.382,00, contra U\$132.855,00 na simulação feita na IATF com sêmen sexado. A metodologia proposta de aspiração de ovários de fêmeas abatidas em projeto de produção de embriões machos em larga escala, com redução do custo da PIVE, representa nova alternativa de mercado em sistemas de produção de carne.

**Palavras chave:** embriões, produção *in vitro*, sêmen sexado, margem bruta, bovinos de corte.

#### **ABSTRACT**

*Investment on animal reproduction biotechnology, in order to improve high productivity of livestock, represent a great value. The in vitro production (IVP) bovine embryos is a biotech that, associated with use of sexed semen, allows the multiplication of females of high genetic value. This study, conducted in a breeding season from a commercial beef cattle farm, aimed to analyse, technically and economically, the large-scale production of male calves derived from IVP embryos, at a low cost, fertilized with sexed semen and using the fixed-time embryo transfer (FTET) technique. 974 Nelore and cross-breeding females were synchronized, achieving an utilization rate of 84.4%. In order to reduce the cost of IVP embryos, OPU technique was replaced by collecting ovaries of slaughtered Nelore cows. A total of 3054 oocytes were collected from 500 ovaries, resulting in production of 1050 embryos fertilized with male Angus sexed semen. 822 embryos were transferred, achieving 345 pregnancies (42%), with 328 (95.1%) males and 17 (4.9%) females. A simulation with data from the farm itself, using fixed-time artificial insemination (FTAI) with sexed semen, was used for a comparative study. 30%*

*pregnancy rate was obtained in the FTAI, resulting in 278 males and 15 females. The FTET project, after the sale of weaned calves, will have a gross margin of R\$135,382.00 against R\$132,855.00 from FTAI simulation with sexed semen. The proposed methodology of ovum pick-up of ovaries from slaughtered cows to realize a project of large-scale male embryos, reducing the cost of IVP, represent a new market alternative in beef cattle systems.*

**Keywords:** *embryos, IVP, sexed semen, gross margin, beef cattle.*

## 1. INTRODUÇÃO

No mercado mundial de carne bovina, o Brasil é o segundo maior produtor mundial, respondendo por 16% da produção do mundo, ficando atrás somente dos Estados Unidos. Destacou-se nos últimos anos como o maior exportador de carne, embora em 2011 tenha ocupado o 2º lugar deste ranking, ficando atrás da Austrália (United States, 2011a). Atualmente ocupa o 5º lugar no ranking da produção mundial de leite (United States, 2011b), destacando-se no cenário internacional como produtor de proteína animal.

Diante da perspectiva do aumento do consumo mundial de carne, aliada a necessidade de se adotar manejos mais eficientes e sustentáveis na pecuária, que vem progressivamente recebendo a forte influência do elevado custo da terra e da escassez de mão-de-obra qualificada para o campo, a bovinocultura de corte brasileira ainda usufrui de condições que a favorece. Dentre elas, pode-se citar a competitividade dos sistemas de produção à pasto, o clima tropical, a grande variabilidade de subprodutos agrícolas e empresas, principalmente do segmento de nutrição e reprodução animal, existentes no mercado e a genética adaptada às condições brasileiras. A pecuária brasileira deverá incorporar algumas tendências mundiais para continuar competitiva,

que incluem o associativismo a fim de negociar melhor seus produtos, a adoção de padrões internacionais de qualidade em escala para atingir melhores mercados e a adoção de práticas sustentáveis, exigência do consumidor de maior poder aquisitivo (Barbosa e Souza, 2007).

Para se manter nessa posição, o investimento em biotécnicas reprodutivas e a melhoria dos índices reprodutivos do rebanho brasileiro são de grande importância, uma vez que a multiplicação de indivíduos geneticamente superiores pode possibilitar um incremento na produtividade dos rebanhos, reduzindo assim custos unitários de produção, ou ainda aumentar a receita total da atividade.

A indústria da produção de embriões bovinos tem sido constantemente aprimorada durante a última década, e atualmente, o Brasil ocupa posição de destaque, como sendo um dos maiores produtores de embriões bovinos do mundo, particularmente pela produção *in vitro* de embriões (PIVE) associada à técnica de aspiração folicular ovariana guiada por ultrassonografia (OPU), sendo responsável por aproximadamente 26% do total de transferências realizadas em todo o mundo (Viana, 2012). Segundo Viana (2012), em 2011 foi comunicada a produção de mais de 350.000 embriões bovinos no Brasil, 90,7% dos quais

produzidos em laboratório. Comparado a outros países, existe um cenário único da tecnologia de PIVE hoje no Brasil, com uma forte tendência para a substituição da técnica de superovulação, colheita e transferência de embriões (MOET) pela OPU-PIVE (Pontes *et al.*, 2009). Uma importante razão para explicar esta situação está na maior produção natural de folículos/oócitos de fêmeas *Bos taurus indicus* em relação às fêmeas *Bos taurus taurus* (Pontes *et al.*, 2009).

Além da situação referente às raças zebuínas, o cenário da PIVE nacional pode ser compreendido por algumas outras particularidades: a grande quantidade de laboratórios privados com domínio da técnica e os altos preços, por vezes especulativos, alcançados por bovinos de elite (Pontes *et al.*, 2009). Embora nos últimos anos a situação de mercado tenha se estabilizado, tais aspectos em muito contribuíram para a consolidação da técnica no Brasil. A partir destes aspectos, profissionais brasileiros estabeleceram em outros países o sucesso obtido aqui, e atualmente há laboratórios comerciais com tecnologia nacional em países da América Central, do Norte, do Sul e mesmo em outros continentes.

Mesmo com toda a tecnologia referente à produção *in vitro* de embriões em larga escala no Brasil, uma grande lacuna refere-se à escassez de informações sobre grandes programas de PIVE particularmente em animais *Bos taurus indicus*, pois a maior parte dos relatos e levantamentos decorre de informações pessoais ou dados de associações, condições que não permitem uma análise mais detalhada dos aspectos técnicos do processo.

Considerando a crescente eficiência do

uso de sêmen sexado na PIVE, permitindo a produção, por exemplo, de um grande número de machos para a indústria de carne em um período curto, o objetivo deste estudo foi analisar de maneira técnica e econômica dentro de uma estação de monta de uma fazenda comercial de bovinos, a viabilidade na produção em larga escala de machos de corte oriundos de embriões fertilizados com sêmen sexado, produzidos, a um baixo custo, em laboratório, associando o uso da técnica de transferência de embriões em tempo fixo (TETF). Uma análise comparativa com resultados obtidos no mesmo período com o uso de sêmen sexado na inseminação artificial em tempo fixo (IATF) também foi realizada.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Local e Animais Experimentais

O experimento foi realizado na Fazenda Primavera, do Grupo Quagliato, localizada no município de Xinguara, sul do Pará, durante o período de estação de monta de novembro de 2011 à fevereiro de 2012.

Um total de 974 vacas primíparas e múltíparas mestiças ( $\frac{1}{2}$  Angus x  $\frac{1}{2}$  Nelore) e Nelore, foram usadas como receptoras de embriões. Estas fêmeas foram selecionadas de acordo com uma adequada condição corporal, com escore de condição corporal (ECC) entre 2,5 e 4 (escala 1-5) e ciclo estral normal.

### 2.2. Preparo dos animais

Um protocolo de TETF foi usado para a sincronização do estro das receptoras.

Estas fêmeas foram previamente submetidas a uma avaliação ginecológica, onde somente aquelas que estavam ciclando é que foram protocoladas. Cada receptora recebeu um implante intravaginal de progesterona (CIDR, Zoetis, Hamilton, Nova Zelândia) e 2 mg de benzoato de estradiol (Estrogin, Farmavet, São Paulo, SP, Brasil) no Dia 0. Os implantes de progesterona foram retirados no Dia 8, quando essas fêmeas também receberam 300 UI de eCG (Novormon, Syntex, Buenos Aires, Argentina), 150 µg de d-cloprostenol (Preloban, Intervet, São Paulo, SP, Brasil) e 1 mg de cipionato de estradiol (ECP, Zoetis, Guarulhos, SP, Brasil). Não foi realizada a detecção visual de estro dos animais; o Dia 10 foi considerado como o dia do estro. Os embriões foram transferidos no Dia 17. Antes de cada procedimento de transferência de embrião (TE), realizava-se uma breve avaliação ginecológica por palpação retal para confirmação da presença e da localização do corpo lúteo, juntamente a um prévio exame do diâmetro e tônus uterino. Para redução dos movimentos peristálticos e o menor desconforto do animal, eram injetados 4 ml de lidocaína a 2% (Anestésico L, Pearson, São Paulo, SP, Brasil) no espaço epidural.

A Fazenda Primavera, onde foram realizados os procedimentos de TETF, está localizada a aproximadamente 40 km de distância do laboratório de PIVE, na cidade de Xinguara (PA), onde foram produzidos os embriões.

### **2.3. Colheita de Ovários e Aspiração Folicular**

Ovários de um total de 250 fêmeas Nelore abatidas no Frigorífico Rio

Maria, localizado na cidade de Rio Maria, à 25 km de Xinguara (PA), foram utilizados para a realização dos experimentos.

Mesmo aproveitando ovários de fêmeas Nelore comuns abatidas, o processo de escolha não foi aleatório. Para reduzir o risco de se multiplicar animais de baixa qualidade genética, um veterinário da equipe acompanhou o abate e selecionou o material genético após seguir alguns critérios zootécnicos, como qualidade de carcaça, profundidade de costelas, idade de abate e peso. Cabe ressaltar que a maioria das fêmeas abatidas para este experimento foram do próprio criador, o que facilitou o processo de escolha.

Após o abate do animal, era realizada abertura do abdômen e os ovários eram retirados assepticamente, sendo colocados em saco plástico estéril. Foram coletados 500 ovários, que foram retirados aleatoriamente independente da idade, prenhez ou ciclo reprodutivo. Foram transportados rapidamente para o laboratório de PIVE em solução salina tamponada (D-PBS; Gibco Laboratories, Grand Island, NY, EUA) em temperatura ambiente.

No laboratório, os ovários eram colocados sobre um campo estéril, sob o fluxo laminar. Folículos foram aspirados com seringa descartável de 10 ml conectada as agulhas 25X7 (22G). O líquido folicular obtido era transferido para tubos de 15 ml e mantidos em estufa a 38,5°C, por 20 minutos, para a sedimentação dos oócitos.

### **2.4. Seleção e Maturação *In Vitro* (MIV)**

Após o período de sedimentação, o sobrenadante foi descartado e o material decantado colocado em placas de Petri descartáveis de 90 x 15 mm (TPP<sup>®</sup>, Suécia). Sob estereomicroscópio os oócitos recuperados foram lavados em três gotas de meio TCM-199 (Gibco BRL; Grand Island, NY, EUA) tamponado com Hepes, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco BRL; Grand Island, NY, EUA), 0,20 mM de piruvato de sódio (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA) e 83,4 µg/mL de amicacina (Instituto Biochimico, Rio de Janeiro, Brasil).

Foram utilizados como critérios de avaliação dos oócitos, os aspectos do citoplasma quanto a cor, homogeneidade e integridade, presença, número de camadas e grau de expansão das células do *cumulus oophorus*. Foram definidas categorias de classificação dos complexos *cumulus oophorus* segundo Costa *et al.* (1997), conforme descrito na Tabela 01. Foram considerados adequados para o cultivo *in vitro* os complexos *cumulus oophorus* de graus I e II.

**Tabela 01** – Critérios para a classificação morfológica dos complexos *cumulus oophorus* recuperados

<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>
Grau I	Complexos <i>cumulus oophorus</i> compactos apresentando três ou mais camadas de células do <i>cumulus</i> ; oócitos com citoplasma escuro e homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades.
Grau II	Complexos <i>cumulus oophorus</i> compactos apresentando menos de três camadas de células do <i>cumulus</i> ; oócitos com citoplasma escuro e homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades.
Parcialmente desnudos	Oócitos apresentando áreas inferiores a um terço de sua superfície sem células da granulosa.
Desnudos e/ou degenerados	Oócitos apresentando a maior parte ou a totalidade de sua superfície sem células da granulosa e/ou apresentando sinais evidentes de degeneração, como vacuolização intensa ou desintegração do citoplasma.
Expandidos	Complexos <i>cumulus oophorus</i> apresentando expansão das células do <i>cumulus</i> , com aumento de volume total e aspecto gelatinoso.
Zona pelúcida	Zona pelúcida rompida, sem o conteúdo citoplasmático.

(Fonte: Costa *et al.*, 1997)

Na sequência, grupos de 15 a 25 oócitos foram transferidos para placas de Petri de 60 x 15 mm (TPP<sup>®</sup>, Suécia) mantidos

dentro de incubadora (Thermo Forma, EUA) (38,5°C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima), sob óleo mineral



(D'Altomare, Santo Amaro, SP, Brasil), em gotas de 100 µL de meio de maturação *in vitro* (MIV), constituído por meio TCM-199 suplementado com 10% de SFB, 1 µg/mL FSH (Folltropin™, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont., Canadá), 50 µg/mL hCG (Profasi™, Serono, São Paulo, Brasil) e 1 µg/mL estradiol (estradiol 17-β, Sigma E-8875), 0,20 mM de piruvato de sódio (Sigma P-4562) e 83,4 µg/mL de amicacina, durante 24 horas.

## 2.5. Preparo do sêmen e Fertilização *In Vitro* (FIV)

Após a maturação *in vitro* (MIV), os oócitos foram colocados em gotas de 90 µL de meio Tyrodes (TALP), suplementado com 0,6 % de albumina sérica bovina (BSA - Fraction V, Sigma, EUA), 50 µg/mL de gentamicina, 22 µg/mL de piruvato, e 10 µg/mL de heparina (Parrish *et al.*, 1986). A heparina foi utilizada para capacitar os espermatozóides bovinos. Dois touros da raça Aberdeen Angus com doses de sêmen sexado para macho foram utilizados. Estes dois touros apresentavam índice a desmama (composto por 50% para DEP ganho de peso ao nascimento a desmama e os outros 50% subdivididos para as DEPs nas características visuais – conformação, precocidade e musculatura) de 31,41 e 29,14 kg, enquadrando-se na categoria Top 10 para índice a desmama, segundo o sumário do PROMEBO® (Programa de Melhoramento de Bovinos de Carne). As palhetas foram descongeladas por 20 segundos em água aquecida à 35°C, depositadas em tubo cônico de 15 mL e centrifugadas através de gradiente descontínuo de Percoll 45-90% (Sigma, EUA), por cinco minutos a 2.900 rpm. Após esta primeira centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o “*pellet*” contendo os espermatozóides foi re-suspendido em 1 mL do mesmo meio da fecundação *in vitro*, para que fosse novamente centrifugado por 5 minutos a

900 rpm.

Após processamento do sêmen, a concentração de espermatozóides vivos foi ajustada para 25x10<sup>6</sup> células móveis/mL e o volume de quatro microlitros de sêmen (10<sup>5</sup> espermatozóides) foi adicionado em cada gota de 90 µL de meio TALP-FIV (meio de fecundação), sob óleo mineral, já contendo os oócitos maturados. O co-cultivo dos oócitos e espermatozóides ocorreu durante 20-22 horas, em incubadora a 38,5° C com 5% CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima.

## 2.6. Cultivo *In Vitro* (CIV)

Após a FIV os prováveis zigotos foram cultivados (grupo máximo de 25 por microgota) em gotas de 100 µL de meio de cultivo, constituído por meio SOF (Wells *et al.*, 1999) acrescido de 2,5% SFB e 0,5% de albumina sérica bovina (BSA), livre de ácido graxo e 1 mM de glutamina, sob óleo mineral. A osmolaridade foi mantida em 270 – 280 mOsmol e o pH em 7,4. Os mesmos foram mantidos em incubadora (38,5° C com 5% CO<sub>2</sub> e 5% O<sub>2</sub> em ar e umidade máxima), sem co-cultivo com células da granulosa. No dia três (D3) após a FIV, todos os embriões com quatro células ou mais foram considerados como clivados e, no dia cinco (D5) foi realizada a substituição de 50% do volume das gotas de cultivo por meio de cultivo novo.

No dia sete (D7) após a FIV, os embriões considerados excelentes (grau I) ou bons (grau II), segundo manual da IETS (1998), foram selecionados e classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento: Mórula compacta (Mo); embrião compacto, com distinto espaço perivitelino, e sem blastocèle); Blastocisto inicial (Bi); blastocèle presente e ocupando menos da metade do embrião); Blastocisto (Bl); blastocèle ocupando já metade do embrião e zona pelúcida com espessura ainda grossa); Blastocisto expandido (Bx);

embrião com diâmetro aumentado, blastocite ocupando mais da metade do embrião e zona pelúcida de espessura mais fina); e Blastocisto eclodido (**Be**; embrião com zona pelúcida rompida ou ausente).

### **2.7. Transferência dos Embriões (TE)**

Os embriões obtidos, todos no estágio de blastocisto e blastocisto expandido, foram transferidos para receptoras, livres de doenças infecciosas e reprodutivas, previamente sincronizadas e preparadas como descrito no item 2.2. Os embriões foram transferidos através de inováção transcervical no corno uterino ipsilateral ao ovário com corpo lúteo.

Os serviços de TETF foram realizados em apenas quatro dias e com um intervalo pequeno entre as datas (dias 21 e 22 de dezembro de 2011 e dias 27 e 28 de janeiro de 2012).

### **2.8. Diagnóstico de gestação e identificação do sexo fetal**

O diagnóstico de gestação e a identificação do sexo fetal foram realizados com o auxílio de ultrassom (Aloka SSD 500, Tokyo, Japão), utilizando transdutor linear de 5,0 MHz. De acordo com a localização do tubérculo genital foi verificado o sexo fetal. Buscava-se uma imagem ventral do feto, quando o tubérculo genital era visualizado próximo ao umbigo, o feto era identificado como do sexo masculino e quando localizava-se próximo à cauda, era identificado como do sexo feminino. O

diagnóstico de gestação foi realizado juntamente com a sexagem fetal aos 60 dias de gestação.

### **2.9. Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)**

Uma simulação para este experimento foi feita utilizando a tecnologia da IATF com sêmen sexado para análise comparativa com a técnica de TETF. Foram utilizados índices reais de concepção obtidos, na própria fazenda, em outros lotes de fêmeas do plantel durante a estação de monta analisada.

### **2.10. Componentes econômicos**

Os desembolsos e as receitas foram computados em planilhas eletrônicas para estimar os custos do experimento, permitindo o cálculo de indicadores econômicos de rentabilidade. O intuito desse cálculo foi de verificar as variações de eficiência na utilização de recursos decorrentes de mudanças de biotécnicas da reprodução adotadas em um sistema de produção de bovinos machos para abate.

As avaliações dos custos operacionais variáveis do experimento foram definidas de acordo com os gastos realizados nas biotecnias da IATF com sêmen sexado (Tabela 02) e da TETF (Tabela 03), onde foi considerada a compra de novilhas de 10@ para serem incorporadas tanto no trabalho de IATF quanto no de TETF.

**Tabela 02** – Custos operacionais dos serviços de IATF, utilizando sêmen sexado para macho, com respectivos valores numéricos em projeto realizado na Fazenda Primavera, Pará.

<b>Custos IATF sex</b>	<b>Unit.</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Total</b>
Compra novilhas	R\$ 830,00	974	R\$ 808.420,00
Mão de obra	R\$ 10,00	974	R\$ 9.740,00
Sêmen	R\$ 45,00	974	R\$ 43.830,00
Material IA	R\$ 1,50	974	R\$ 1.461,00
Diárias DG	R\$ 622,00	2	R\$ 1.244,00
Protocolo	R\$ 16,00	974	R\$ 15.584,00
<b>Total</b>			<b>R\$ 880.279,00</b>

**Tabela 03** – Custos operacionais dos serviços de TETF, utilizando sêmen sexado para macho, com respectivos valores numéricos em projeto realizado na Fazenda Primavera, Pará.

<b>Custos TETF sex</b>	<b>Unit.</b>	<b>Quantidade</b>	<b>Total</b>
Compra novilhas	R\$ 830,00	974	R\$ 808.420,00
Protocolo	R\$ 16,00	974	R\$ 15.584,00
Embrião	R\$ 60,00	822	R\$ 49.320,00
<b>Total</b>			<b>R\$ 873.324,00</b>

A avaliação da viabilidade econômica foi baseada na metodologia proposta por Frank (1978) e utilizada por Costa *et al.* (1986), Corrêa *et al.* (2000), Guimarães *et al.* (2005) e Barbosa *et al.* (2010), utilizando-se para isto o indicador margem bruta (receita total – custos operacionais variáveis).

A partir deste experimento, foi desenvolvida uma linha comercial de projetos em larga escala de produção de embriões bovinos de corte para abate com o uso de ovários coletados em frigoríficos, onde o valor cobrado por receptora gestante, confirmada e sexada aos 60 dias de gestação, é de R\$ 150,00 ou R\$ 60,00 por embrião produzido. Em cada um desses dois valores estão incluídos os serviços de aspiração folicular dos ovários, fecundação, transferência de embrião, diagnóstico de gestação e sexagem fetal utilizando a ultrassonografia. Soma-se o valor do protocolo de sincronização das receptoras (fármacos), que, no caso da Fazenda Primavera, foi de R\$ 16,00/receptora

(Tabela 04).

**Tabela 04** – Valores numéricos definidos do projeto em larga escala de produção de embriões produzidos com sêmen sexado para macho realizado na Fazenda Primavera, Pará.

<b>Itens</b>	<b>Valor (unid.)</b>
Protocolo	R\$ 16,00
Embriões <i>in vitro</i>	R\$ 60,00
Prenhez PIVE	R\$ 150,00

## 2.11. Análise estatística

O número de receptoras múltiparas e primíparas que tiveram ovulação confirmada após o protocolo de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) e suas respectivas taxas de prenhez, foram comparadas pelo teste de Qui quadrado.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1. Características de resposta ao protocolo hormonal de sincronização e índices reprodutivos alcançados

Um total de 3.054 oócitos foram coletados de 500 ovários provenientes de 250 fêmeas Nelore abatidas em frigorífico, média de 12 oócitos totais por par de ovários. Deste montante, 2.008 (65,7%) foram considerados viáveis e selecionados para MIV, sendo 638 (31,8%) Grau I e 1.370 (68,2%) Grau II. O número de embriões obtido, utilizando sêmen sexado para macho, foi de 1.050, média de 4,2 embriões por par de ovários, o que caracterizou uma conversão de 35% do número total de oócitos em embriões. O índice de conversão de oócitos viáveis em embriões foi de 52,3%.

Léga e Agostinho (2009), trabalhando com 50 ovários provenientes de fêmeas bovinas de diferentes raças e idades abatidas em frigorífico, nos quais foram realizadas aspirações foliculares com auxílio de seringas de 20ml e agulha de 18G, obtiveram um total de 197 oócitos. Dos oócitos obtidos, apenas 30 (15,22%) foram classificados em Grau I e 51 (25,88%) em Grau II. Considerando-se a melhor eficiência na coleta de oócitos provenientes da aspiração de ovários de fêmeas zebuínas (Boní *et al.*, 1997) que está diretamente ligada ao maior número de folículos antrais presente nos ovários dessas fêmeas (Viana, 2002), deve estar relacionada, pelo menos em parte, a essa maior recuperação de oócitos no presente estudo. Além de produzirem mais oócitos por sessão de aspiração, doadoras de grupo genético zebuino também apresentam significativamente maior taxa de oócitos viáveis (Camargo, 2005).

Existiu também uma ampla diferença na eficiência da produção de embriões entre os

achados do presente estudo e dados de literatura. Kruip *et al.* (1994) relataram uma variação entre as doadoras de 9% a 26% e Hasler *et al.* (1995) observaram variação entre 4% a 33% de embriões produzidos por oócitos coletados. Posteriormente, Watanabe *et al.*, (2002) observaram que esta variação não estava relacionava com a idade das doadoras e sim com a diferença de resposta entre animais, resultando em uma variação de 0,3% a 54%.

Foram sincronizadas 974 receptoras, sendo 390 fêmeas mestiças (½ Angus x ½ Nelore) e 584 fêmeas Nelore. No lote das fêmeas mestiças, 156 eram primíparas e 234 multíparas. Já no lote das Nelore, foram trabalhadas 234 fêmeas primíparas e 350 multíparas. Após realização do protocolo de sincronização descrito no item 2.2, observou-se que 822 ovularam e todas estas receberam embrião, determinando uma taxa de aproveitamento de 84,4%. Os demais 228 embriões excedentes não foram utilizados por falta de receptoras disponíveis e foram descartados.

Avaliando a associação entre as raças das receptoras sincronizadas, não foi observada diferença na resposta ovulatória ao protocolo de sincronização utilizado entre os grupamentos raciais utilizados (Mestiças X Nelore). Considerando os dois grupamentos raciais separados não houve diferença no índice de fêmeas ovuladas entre as primíparas e nem entre as multíparas ( $P > 0,50$ ). No lote das fêmeas mestiças, um maior número de multíparas (204; 87,2%) responderam ao protocolo ( $P < 0,05$ ), quando comparado à resposta das primíparas (124; 79,5%). Já com as receptoras Nelore, 191 (81,6%) primíparas e 303 (86,6%) multíparas tiveram a ovulação detectada, sem diferença na resposta ao protocolo ( $P > 0,10$ ). Do total de 822 receptoras que responderam ao protocolo de sincronização e, conseqüentemente, receberam embrião, 61,7% (507) foram fêmeas multíparas e

38,3% (315) primíparas (Tabela 05).

**Tabela 05** - Número de fêmeas múltiparas e primíparas que responderam ao protocolo de transferência de embriões em tempo fixo (TETF).

<b>Categorias</b>	<b>Primíparas</b>	<b>Múltiparas</b>	<b>Total</b>
MESTIÇAS	79,5% <sup>aA</sup> (124/156)	87,2% <sup>bB</sup> (204/234)	84,1% <sup>a</sup> (328/390)
NELORE	81,6% <sup>aA</sup> (191/234)	86,6% <sup>bA</sup> (303/350)	84,6% <sup>a</sup> (494/584)
TOTAL	80,8% <sup>A</sup> (315/390)	86,8% <sup>B</sup> (507/584)	-

Porcentagens com letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo Teste de Qui quadrado.

No lote das mestiças, foi obtido um maior número de prenhez em fêmeas múltiparas (46,1%) em relação às prenhez de primíparas (34,7%) ( $P < 0,05$ ). No lote das Nelore, 64 prenhez foram obtidas em primíparas (33,5%) e 144 prenhez em múltiparas (47,5%) ( $P < 0,003$ ). Avaliando a associação entre as raças mestiças e Nelore, quanto a taxa de prenhez, não houve diferença entre os lotes das primíparas e entre as múltiparas ( $P > 0,70$ ).

Foram obtidas, nas fêmeas mestiças e Nelore, 238 prenhez no lote das múltiparas (46,9%) e 107 prenhez nas primíparas (34,0%) ( $P \leq 0,0002$ ) (Tabela 06).

O experimento encerrou com uma taxa de prenhez aos 60 dias de 42% (345/822), com a confirmação do sexo de 328 machos (95,1%) e 17 fêmeas (4,9%) (Tabela 07).

**Tabela 06** – Taxas de prenhez em vacas primíparas e múltiparas por categoria racial.

<b>Categorias</b>	<b>Prenhez Primíparas</b>	<b>Prenhez Múltiparas</b>	<b>Total</b>
MESTIÇAS	34,7% <sup>aA</sup> (43/124)	46,1% <sup>bB</sup> (94/204)	41,8% <sup>a</sup> (137/328)
NELORE	33,5% <sup>aA</sup> (64/191)	47,5% <sup>bB</sup> (144/303)	42,1% <sup>a</sup> (208/494)
TOTAL	34,0% <sup>A</sup> (107/315)	46,9% <sup>B</sup> (238/507)	-

Porcentagens com letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna e letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo Teste de Qui quadrado.

**Tabela 07** – Produção de oócitos, embriões e prenhez obtidos a partir de ovários de fêmeas Nelore abatidas, e proporção de fetos machos e fêmeas diagnosticados após fertilização com sêmen sexado.

Doadoras	Ovários coletados	Oócitos viáveis/totais (%)	Embriões/oócitos totais (%)	Embriões transferidos	Prenhez 60 dias (%)	Sexagem fetal	
						Macho (%)	Fêmea (%)
250	500	2.008 / 3.054 (65,7)	1.050 / 3.054 (34,4)	822	345 (42)	328 (95,1)	17 (4,9)

A taxa de aproveitamento de receptoras foi estabelecida pelo número de receptoras consideradas aptas em relação a todas que foram submetidas ao protocolo de TETF, e a taxa de prenhez foi obtida a partir da relação entre as fêmeas gestantes e as fêmeas aptas à inovulação. Alguns pesquisadores (Tríbulo *et al.*, 2000; Baruselli *et al.*, 2000a, 2000b e 2001; Bó *et al.*, 2002) demonstraram que essas taxas de aproveitamento são maiores em receptoras submetidas a protocolos de TETF do que naquelas tratadas com uma ou duas administrações de PGF-2 $\alpha$  e posterior detecção do estro. Como as taxas de concepção de tais protocolos são similares àquelas obtidas em receptoras tratadas exclusivamente com PGF-2 $\alpha$ , o resultado final é o aumento das taxas de prenhez dos programas de TETF, além da vantagem de possibilitarem a programação do dia da inovulação e de evitarem o trabalho com a detecção do estro.

As taxas de aproveitamento de receptoras aptas à inovulação obtidas no presente experimento foram semelhantes às encontradas por Marques *et al.* (2003), Reis (2004) e Nasser *et al.* (2008), quando o protocolo TETF usado pelos pesquisadores fazia uso do eCG. A boa resposta em relação ao índice de concepção nas receptoras obtida no presente estudo pode estar ligado ao fato do uso do eCG no protocolo de TETF. A possibilidade de promover um maior crescimento folicular

após o uso do eCG, como nas receptoras do experimento, permite a obtenção de folículos com diâmetro compatível com melhor resposta à onda pré-ovulatória do LH. Ainda, esse maior folículo pré-ovulatório dará origem a um corpo lúteo com maior tamanho e capacidade de produzir maiores concentrações de progesterona (Perry *et al.*, 2005), corroborando com estudos que demonstraram uma correlação positiva entre concentração plasmática de progesterona e taxa de concepção (Binelli *et al.*, 2001; Thatcher *et al.*, 2001, 2002; Reis *et al.*, 2004).

A taxa de prenhez das receptoras múltiparas foi superior a das primíparas, sendo 46,9% e 34,0% respectivamente, demonstrando resultados similares aos estudos de Vieira *et al.* (2005) e Oliveira *et al.* (2011). Essa taxa inferior de prenhez nas primíparas em relação às múltiparas foi devida, provavelmente, ao fato da primípara ser mais exigente em relação ao manejo, já que necessitam de maior atenção quanto aos requerimentos nutricionais, pois precisam de maior ingestão de energia para atender as necessidades de crescimento, lactação e reprodução (Spitzer *et al.*, 1995).

Um manejo nutricional adequado foi estabelecido na fazenda, uma vez que as fêmeas analisadas neste estudo apresentaram um bom escore de condição corporal (ECC). Foi demonstrado que os

resultados com o uso de protocolos hormonais são satisfatórios em induzir ovulação em animais em anestro, desde que as fêmeas estejam com condição corporal de moderada a boa (Meneghetti *et al.*, 2005).

Trabalhos já mostraram que a avaliação do ECC no início, tanto dos programas de TETF quanto de IATF, influencia a prenhez (Spell *et al.*, 2001; Sá Filho *et al.*, 2010). Menores valores de ECC no início do protocolo hormonal estão associados com redução na taxa de prenhez de vacas submetidas à inseminação artificial e/ou inovulação de embrião. Logo, vale salientar que a minimização das perdas de peso corporal no início da lactação e a melhoria da nutrição durante os períodos pré e pós-parto, com o objetivo de alcançar maior ECC na preparação de receptoras de embriões, é altamente benéfica para favorecer o aumento da prenhez.

As taxas de prenhez obtidas a partir de embriões produzidos *in vitro* podem ser bastante variáveis. Esta variação está associada à qualidade do embrião, o que, por sua vez, depende das condições de produção de cada laboratório. Além disso, o estado reprodutivo e nutricional das receptoras também interfere nos resultados. Os índices de gestação aos 60 dias têm variado entre 20 e 60% de acordo com o laboratório de produção (Garcia *et al.*, 2004; Varago *et al.*, 2008).

A taxa de prenhez com embriões PIVE obtida neste experimento (42%) foi maior do que a obtida em um estudo similar usando a PIVE em larga escala (33,5%) (Pontes *et al.*, 2009), e muito semelhante à obtida em outros estudos com sêmen sexado (40 e 41%) (Xu *et al.*, 2006). Considerando o grande número de embriões transferidos, no presente estudo, em apenas quatro dias, convém se ponderar que os resultados alcançados podem ser considerados plenamente satisfatórios.

Parte do sucesso pode ser devido à utilização do protocolo de transferência de embriões em tempo fixo. Recentes estudos usando os protocolos de TETF têm mostrado um incremento considerável nos resultados de prenhez de embriões transferidos no Brasil (Rodrigues *et al.*, 2010).

Atualmente, são escassas as publicações que disponibilizam dados de taxas de concepção após o uso de sêmen sexado em vacas de corte sincronizadas e inseminadas em tempo fixo. Porém, é sabido que uma das possíveis razões da diminuição dos índices de fertilidade após o uso de sêmen sexado é o menor tempo de viabilidade, associado à diferentes padrões de motilidade espermática (Schenk *et al.*, 2006). Com relação aos procedimentos de múltipla ovulação e transferência de embrião (MOET), a viabilidade e a concentração de sêmen são muito importantes, pois animais submetidos à tratamentos superovulatórios apresentam, em geral, menores taxas de fertilização de oócitos que animais não superovulados (Newcomb, 1980; Page *et al.*, 1985). Portanto, existem muitas dúvidas quanto ao uso do sêmen sexado em animais superovulados, principalmente devido aos distúrbios relacionados ao transporte espermático no trato genital feminino (Saacke *et al.*, 1998).

A técnica de PIVE em conjunto com o sêmen sexado apresenta-se, atualmente, como a associação de biotecnias mais aconselhável para a geração de descendentes com sexo pré-determinado (Faber *et al.*, 2003). Isso se deve ao fato da PIVE otimizar o aproveitamento do sêmen sexado em relação à quantidade de embriões produzidos, por permitir que doses comerciais de sêmen sexado, mesmo apresentando um número limitado de espermatozoides viáveis, possam ser compartilhadas entre oócitos provenientes de mais de uma doadora (Dell'Aqua *et al.*,

2006). Tal característica acaba tornando a opção mais atrativa ao pecuarista, atestando assim a viabilidade do sêmen sexado na PIVE mesmo em escala comercial (Wilson *et al.*, 2006).

Enquanto na IATF utiliza-se uma dose de sêmen sexado por vaca e nos procedimentos de superovulação são usadas pelo menos duas doses, a PIVE permite otimizar o uso do sêmen, pois neste experimento uma única dose do sêmen sexado foi capaz de fertilizar até 140 oócitos (equivalente à aspiração de sete fêmeas; média de 20 oócitos por vaca), que, neste exemplo, resultaria na produção de cerca de 50 embriões (35% de produção de blastocistos). Considerando uma taxa de prenhez ao redor de 40-50% (o experimento

alcançou uma média de 42%), a transferência de 50 embriões fertilizados com uma dose de sêmen sexado resultaria, teoricamente, em 12 a 15 prenhez. Na IATF, ao ser considerada a mesma taxa de prenhez de 40-50%, para se obter apenas uma única prenhez seria necessário utilizar de 2 a 2,5 doses de sêmen.

Em uma simulação feita para este experimento, usando a IATF com sêmen sexado, a quantidade de fêmeas inseminadas foi o total das sincronizadas, no caso 934 cabeças (não há taxa de aproveitamento, todos os animais são inseminados, sem observação de estro) (Tabela 08).

**Tabela 08** – Taxa de aproveitamento das vacas trabalhadas no estudo comparativo entre serviços de IATF e TETF no projeto em larga escala de produção de embriões realizado na Fazenda Primavera.

Serviço	Nº total vacas	% aproveitamento	Embriões transferidos
IATF sexado	974	100,0	-
TETF sexado	974	84,39	822

Aproveitando informações colhidas em outros lotes de fêmeas trabalhadas com IATF com sêmen sexado na mesma estação de monta da fazenda do experimento, o

percentual de prenhez desta biotécnica girou em torno de 30%, ante a taxa de 42% registrada na Fazenda Primavera com o uso da TETF (Tabela 09).

**Tabela 09** – Resultados obtidos nos serviços de IATF e TETF com sêmen sexado para estudo comparativo no projeto em larga escala de produção de embriões realizado na Fazenda Primavera.

	IATF sex	TETF sex / Embrião
	974	822
% prenhez	30	42
Bezerros (n)	293	345
Macho* (n)	278	328
Fêmea* (n)	15	17

\* Sêmen conv: 50% macho ; 50% fêmea  
Sêmen sex: 95% macho ; 5% fêmea



Em um estudo realizado no Texas (EUA), Crepaldi *et al.* (2009) trabalhando com novilhas Jersey cíclicas sincronizadas e inseminadas em tempo fixo, procuraram avaliar o efeito do atraso de 6 horas no momento da IATF com sêmen sexado. Este estudo verificou que, para o sêmen sexado, ocorreu aumento na taxa de concepção quando a IATF foi realizada 60 horas da retirada do dispositivo de progesterona. No entanto, os resultados ainda foram muito baixos em comparação com o grupo trabalhado com sêmen convencional (sexado IATF 54h = 16,2%; sexado IATF 60h = 31,4%; convencional IATF 54h = 50,5%; convencional IATF 60h = 51,8%). Interessante ressaltar que nesse experimento citado foram empregados três touros. Verificou-se diferença na taxa de concepção entre os touros utilizados, indicando que pode haver diferenças entre reprodutores quando da utilização de sêmen sexado, com resultados variando de 14,7% à 34,9% de concepção. Meirelles *et al.* (2008), avaliando a eficiência da inseminação artificial convencional com sêmen sexado, obtiveram uma taxa de nascimento de bezerros de apenas 23,0%, significativamente inferior à do sêmen não sexado (46,45%;  $P < 0,05$ ).

### 3.2. Análise econômica do projeto com projeções financeiras

A inovação do estudo proposto está na possibilidade de mudar o uso restrito da produção *in vitro* de embriões bovinos à pecuária de elite, levando esta biotecnia aos rebanhos comerciais a um custo acessível.

Neste experimento, os embriões foram produzidos a partir de oócitos aspirados de ovários de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico. Esta economia se faz presente uma vez que os ovários no frigorífico são produtos de graxaria, ou seja, não apresentam valor comercial algum para a indústria.

O uso de oócitos de vacas comuns neste experimento, sem devido aprimoramento genético, provavelmente acabará sendo compensado pela utilização na fecundação de um touro da raça escolhida, no caso Angus, de elevada DEP (diferença esperada na progênie), ou seja, essa diferença se diluirá no ganho genético. Considerando que os bezerros deste experimento nasceram nos meses de outubro e novembro de 2012, estudos envolvendo avaliação de peso à desmama, peso ao sobreano (550 dias) e avaliação de rendimento de carcaça ao abate serão realizados posteriormente para confirmar se o aprimoramento genético desejado foi alcançado pelos touros utilizados.

O que permitiu decrescer o custo de produção de embriões *in vitro* fertilizados com sêmen sexado neste experimento foi a não execução da etapa de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) de doadoras vivas. Ela representa uma das etapas que mais encarece todo o sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos, desde a OPU até a TE, caracterizando em média aproximadamente 40% dos custos comerciais de produção (Tabela 10).

**Tabela 10** – Valores comerciais de OPU/PIVE simulando aspiração de uma doadora zebuína (tabela de preço dez/2012 – empresa comercial)

	Nº	Valor (R\$)	Total (R\$)	%
OPU	1	300,00	300,00	38,5
Embriões	4*	70,00	280,00	35,9
TE	4	50,00	200,00	25,6
TOTAL			780,00	100,0

\* Média de 20 oócitos aspirados produzindo 4 embriões.

Fazendo uma projeção sobre comercialização de bezerros desmamados, considerando valores de mercado segundo a Associação Brasileira de Angus, com uso da técnica de TETF, a Fazenda Primavera teria uma receita de R\$ 292.250,00. Na simulação feita com a técnica de IATF com sêmen sexado, a receita cairia para R\$ 262.150,00 - uma diferença de R\$ 30.100,00. O maior número de bezerros machos obtidos na TETF proporcionaria uma maior receita à propriedade. Cabe ressaltar, que foram consideradas perdas em estádios mais tardios da gestação para embriões *in vitro* transferidos (dia 42 a 280), menores do que no período inicial, mas ainda mais altas do que as observadas para embriões *in vivo*, variando de 7% a 13% (Hasler *et al.*, 2000; van Wagtenonk *et al.*, 2000). Na IATF foi considerada uma taxa de perda fetal na ordem de 5%, segundo Grunert (2005). No entanto, na análise econômica do projeto proposto, a

venda daquelas fêmeas que não tiveram a ovulação induzida ao protocolo hormonal na TETF e as que foram diagnosticadas como não gestantes após transferência do embrião (TETF) ou após a inseminação (IATF), foram incorporadas no valor da receita. Dessa maneira, na simulação feita com a técnica de IATF com sêmen sexado, a receita desta subiria para R\$ 1.013.134,00 ante R\$ 1.008.706,00 da TETF – uma diferença de R\$ 4.428,00. O maior número de fêmeas descartadas na IATF proporcionaria uma maior receita à propriedade; entretanto, o maior custo operacional da IATF com sêmen sexado (R\$ 880.279,00) resultaria em uma menor margem bruta (R\$ 132.855,00) (Tabela 11) em comparação com a TETF (R\$ 135.382,00) (Tabela 12) – uma diferença de R\$ 2.527,00.

**Tabela 11** – Parâmetros de preço, receita e margem bruta estabelecidos para bezerros e bezerras na execução da biotécnica de IATF com sêmen sexado realizado na Fazenda Primavera, Pará.

Receita IATF sex	Unit.	Quantidade <sup>1</sup>	Total
Bezerro	R\$ 950,00	265	R\$ 251.750,00
Bezerra	R\$ 800,00	13	R\$ 10.400,00
Vacas descarte	R\$ 1.079,00	696	R\$ 750.984,00
<b>Total</b>			<b>R\$ 1.013.134,00</b>
<b>Margem bruta</b>			<b>R\$ 132.855,00</b>

<sup>1</sup> Considerando 5% de perda fetal

**Tabela 12** – Parâmetros de preço, receita e margem bruta estabelecidos para bezerros e bezerras na execução do projeto em larga escala de produção de embriões realizado na Fazenda Primavera, Pará.

Receita TETF sex	Unit.	Quantidade <sup>1</sup>	Total
Bezerro	R\$ 950,00	295	R\$ 280.250,00
Bezerra	R\$ 800,00	15	R\$ 12.000,00
Vacas descarte	R\$ 1.079,00	664	R\$ 716.456,00
<b>Total</b>			<b>R\$ 1.008.706,00</b>
<b>Margem bruta</b>			<b>R\$ 135.382,00</b>

<sup>1</sup> Considerando 10% de perda fetal

O custo variável da TETF deste experimento, não considerando o valor de compra de novilhas, foi de R\$ 64.904,00, ou seja, R\$ 15.584,00 com protocolo para 974 fêmeas (R\$ 16,00 cada) mais R\$ 49.320,00 pela transferência de 822 embriões (R\$ 60,00 cada), obtendo um índice de 42% de prenhez, o que geraria 345 bezerros. No entanto, foi considerado 10% de perda fetal na TETF, resultando no nascimento de 310 bezerros machos e fêmeas. O custo por bezerro nascido com a técnica de TETF, portanto, ficaria em R\$ 209,37. Na simulação feita com o uso da IATF (sêmen sexado), foi considerado 5% de perda fetal, totalizando 278 bezerros machos e fêmeas nascidos, tendo seu custo em R\$ 258,49 – onde também foi desconsiderado o valor de compra de novilhas.

É interessante ponderar neste experimento, que a TETF representa uma alternativa de negócio. Em nenhum momento deve-se concluir que a IATF é melhor ou pior do que a TETF. Com relação ao uso da IATF, deve-se considerar no cálculo todas as categorias de fêmeas na fazenda, pois a IATF é muito pouco usada em novilhas e primíparas, por apresentar taxas de concepção que normalmente não chegam a 40%. Em relação ao aproveitamento das categorias trabalhadas tanto com IATF quanto com TETF, deve-se avaliar o resultado final financeiro.

Neste estudo foi usado o cálculo de embriões produzidos no sistema TETF para análise comparativa entre biotecnias da reprodução. Considerando o método comercial tradicional para produção de animais de elite com uso da PIVE, o valor cobrado eleva-se para aproximadamente R\$ 500,00 por prenhez confirmada aos 60 dias. Porém, cabe ressaltar, que ficou definido, no intuito de viabilizar estes projetos em larga escala, a realização de contratos a partir de 1.000 embriões. Pagar por gestação confirmada ou embrião seria de

escolha do cliente.

Uma das maiores vantagens da TETF associando o uso do sêmen sexado na PIVE, além da possibilidade da produção de embriões em larga escala, é a possibilidade de escolha do sexo dos bezerros. No experimento realizado, por exemplo, com o incremento na produção de machos, o investimento na tecnologia obteve expressivo retorno financeiro. Para compreender esse retorno financeiro do projeto deve-se considerar que a diferença de peso de um boi gordo em relação à vaca gorda abatida com a mesma idade pode chegar a até 7@, ou seja, 210 kg de carcaça. Além disso, o mercado pode pagar uma diferença próxima a 10% a mais pela arroba do boi.

#### 4. CONCLUSÕES

- A metodologia de aspiração de folículos de ovários de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico em substituição à técnica convencional de aspiração de doadoras vivas, além da realização da produção de embriões em grande escala associada ao trabalho de TETF, determina redução do custo da PIVE, possibilitando a obtenção de bezerros gerados por essa biotécnica a um menor custo.

- A estratégia de produção em larga escala de embriões meio-sangue (Angus X Nelore) fertilizados com sêmen sexado para macho e posteriormente transferidos em tempo fixo, analisada dentro de uma estação de monta de uma fazenda de gado de corte comercial, proporciona uma maior margem bruta quando comparada com o uso da IATF com sêmen sexado em uma mesma situação.

- A utilização de sêmen sexado para macho na produção de embriões de raças de corte em laboratório é eficiente para a produção

de um grande número de machos, resultando em menor custo por bezerro nascido em comparação à IATF com sêmen sexado.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBOSA, F.A.; GRAÇA, D.S.; ANDRADE, V.J. *et al.* Produtividade e eficiência econômica de sistemas de produção de cria, recria e engorda de bovinos de corte na região sul do estado da Bahia. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.3, p.677-685, 2010.
- BARBOSA, F.A.; SOUZA, R.C.; Administração de fazendas de bovinos – leite e corte. Viçosa: Aprenda Fácil, 342p., 2007.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; MADUREIRA, E.H.; COSTA NETO, W.P.; GRANDINETTI, R.R.; BO, G.A. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices. *Theriogenology*, v. 55, p. 355, 2001.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; VALENTIM, R.; BERBER, R.C.A.; CARVALHO FILHO, A.F.; MADUREIRA, E.H.; COSTA NETO, W.P. Dinâmica folicular em novilhas receptoras de embrião bovino submetidas à sincronização da ovulação para inovulação em tempo fixo. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v.28, p.217, 2000a.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; VALENTIM, R.; BERBER, R.C.A.; CARVALHO FILHO, A.F.; MADUREIRA, E.H.; COSTA NETO, W.P. Aumento da taxa de prenhez em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo “Oovsynch” com inovulação em tempo fixo. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v.28, p.216, 2000b.
- BINELLI, M.; THATCHER, W.W.; MATTOS, R.; BARUSELLI, P. S. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*, v.56, p.1451-1463, 2001.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, v.57, p.53-72, 2002.
- BONI, R.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C.; KOGUT, J.; KRUIP, T.A.M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology*, v.48, p.277-289, 1997.
- CAMARGO, L.S.A. Produção *in vitro* e expressão gênica em embriões bovinos. 2005. 86f. Tese (doutorado em Ciência Animal, área de concentração em Reprodução Animal) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- CORRÊA, E.S.; VIEIRA, A.; COSTA, F.P. *et al.* Sistema semi-intensivo de produção de carne de bovinos nelores no Centro-Oeste do Brasil. Campo Grande: Embrapa/CNPQC, Documento 95, 2000.
- COSTA, E.P.; VALE FILHO, V.R.; NOGUEIRA, J.C.; SÁ, W.F.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, A.H.A. Cultivo *in vitro* de ovócitos bovinos em diferentes sistemas: Capacidade de desenvolvimento após fecundação *in vitro*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.49, n.5, p.575-581, 1997.
- COSTA, F.P.; PACHECO, J.A.C.;

- CORRÊA, E.S. *et al.* Estimativa do custo de produção da carne bovina para a região centro-oeste: *setembro de 1986*. Campo Grande: Embrapa/CNPQC, 1986 (Comunicado Técnico, 30).
- CREPALDI, G.A.; SALES, J.N.S.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E.P.; BARUSELLI, P.S. Momento da ovulação e taxa de prenhez de novilhas Jersey submetidas à inseminação artificial em tempo fixo com sêmen sexado em diferentes momentos. *VIII Simposio Internacional de Reproduccion Animal (IRAC)*, Córdoba, Argentina 2009 : 16 (abstr).
- DELL'AQUA JR, J.A.; PAPA, F.O.; ARAÚJO JR, J.P.; FREITAS, C.P.; PONCHIROLLI, C.B.; FIGUEIREDO, A.S.; MELO, C.M.; ALBERTI, K.; CRESPILO, A.M.; SIQUEIRA FILHO, E.R.; ORLANDI, C. Aplicação do sêmen sexado na produção de embriões. In: a XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 346 (supl 1), 2006, Araxá. *Anais... Araxá: Acta Scientiae Veterinariae*, p. 205-212, 2006.
- FABER, D.C.; MOLINA, J.A.; OHLRICH, C.L.; VANDER ZWAAG, D.F.; FERRÉ, L.B. Commercialization of animal biotechnology. *Theriogenology*, v.59, p. 125-138, 2003.
- FRANK, R.G. Introducción al cálculo de costos agropecuarios. Buenos Aires: El Ateneo, 1978.
- GARCIA, J.M.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R. Estado da arte da fecundação *in vitro* em bovinos. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 1, 2004, Londrina, PR. *Anais... São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnica*, Universidade de São Paulo, p. 223-230, 2004.
- GUIMARÃES, P.H.S.; MADALENA, F.E.; CEZAR, I.M. Simulação dos efeitos dos preços de produtos na avaliação econômica de três sistemas alternativos de bovinocultura de cria. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, p.227-230, 2005 (Suplemento 2).
- GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H.; VALE, W.G.; JUNIOR, H.B. Patologia e clínica da reprodução dos animais domésticos – ginecologia. 1ª ed. São Paulo: Varela, 2005; p. 468-470.
- HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; MCCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, v.43, p.141-152, 1995.
- HASLER, J.F. In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61: 81-91, 2000.
- KRUIP, T.A.M.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*, v. 42, p.675 – 684, 1994.
- LÉGA, E.; AGOSTINHO, M.A. Índice de recuperação de óocitos bovinos obtidos de ovários adquiridos em abatedouro como contribuição para os estudos de fecundação e produção de embriões *in vitro*. *Nucleus Animalium*, v.1, n.1, p.102-114, 2009.
- MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; CAMPOS

- FILHO, E.P.; BARUSELLI, P.S. Efeitos da administração de eCG e de Benzoato de Estradiol para sincronização da ovulação em vacas zebuínas no período pós-parto. In: *Proceedings 5º Simposio Internacional de Reproducción Animal*, Córdoba, Argentina: p. 392, 2003.
- MEIRELLES, C.; FARIA, V.R.; SOUZA, A.B.; WEISS, R.R.; SEGUI, M.S.; KOZICKI, L.E. Eficiência da inseminação artificial com sêmen sexado bovino: aspectos de viabilidade reprodutiva e econômica. *Archives of Veterinary Science*, v.13, n.2, p.98-103, 2008.
- MENEGHETTI, M.; JUNIOR MARTINS, A.P.; VILELA, E.R.; LOSI, T.C.; VASCONCELOS, J.L. Uso de protocolo de sincronização da ovulação como estratégia reprodutiva para maximizar o número de vacas gestantes por IA em 37 dias de estação de monta. *A Hora Veterinária*. 147: 25-27, 2005.
- NASSER, L.F.; REZENDE, L.F.; BÓ, G.A.; BARTH, A. Induction of parturition in Zebu-cross recipients carrying in vitro-produced *Bos indicus* embryos. *Theriogenology*, v.69, p.116-23, 2008.
- NEWCOMB, R. Investigation of factors affecting superovulation and non-surgical embryo recovery from lactating British Friesian cows. *Vet Rec*, v.106, p.48-52, 1980.
- NONATO JR, I.; RUFINO, F.A.; SANCHES, B.V.; PONTES, J.H.F.; UVO, S.; ERENO JR., J.C.; SENEDA, M.M. Produção de embriões em vacas Nelore com a utilização associada de FIV e TE. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, p.95, 2004.
- OLIVEIRA, V.S.A.; BONATO, G.L.; SANTOS, R.M. Eficiência reprodutiva de vacas primíparas da raça Nelore. *Acta Scient. Vet.*, v.39, n.2, p.963, 2011.
- PAGE, R.D.; JORDAN, J.E.; JOHNSON, S.K. Superovulation of Holstein heifers under heat stress with FSH-P or Folltropin. *Theriogenology*, v.31, p.236, 1985.
- PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; LEIBFRIEDGE-RUTHEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; EYESTONE, W.H.; FIRST, N.L. Bovine in vitro fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology*, v.25, p.591-600, 1986.
- PERRY, G.A. *et al.* Relationship between follicle size at insemination and pregnancy success. *PNAS*, v.102, n.14, p.5268-5273, 2005.
- PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO, S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods on the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v.71, p.690-697, 2009.
- PONTES, J.H.F.; SILVA, K.C.F.; BASSO, A.C.; FERREIRA, C.R.; SANTOS, G.M.G.; SANCHES, B.V.; PORCIONATO, J.P.F.; VIEIRA, P.H.S.; FAIFER, F.S.; STERZA, F.A.M.; SCHENK, J.L.; SENEDA, M.M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, 74:1349-1355, 2010.
- REIS, E.L.; NASSER, L.F.T.; MENEGATTI, J.A.; RESENDE, L.F.; MANTOVANI, A.P.; BARUSELLI, P.S. Effect of time and dose of eCG treatment in *Bos indicus* × *Bos taurus* recipients treated with progesterone for

- timed embryo transfer. In: *Abstracts of the 15th International Congress of Animal Reproduction*, 2004, Porto Seguro, BA, Brazil. Porto Seguro: ICAR, 2004, p. 395.
- RODRIGUES, C.A.; RANIERI, A.L.; VIEIRA, L.M.; SILVA, P.R.L.; BARUSELLI, P.S. Aplicação prática das técnicas de reprodução em vacas de leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 4, 2010, Londrina, PR. *Anais...* São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, p. 143-156, 2010.
- SÁ FILHO, M.F.; AYRES, H.; FERREIRA, R.M.; NICHI, M.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E.P.; BARUSELLI, O.S. Strategies to improve pregnancy per insemination using sexed semen in dairy heifers detected in estrus. *Theriogenology*, v.74, n.9, p.1636-1642, 2010.
- SAACKE, R.G.; DEJARNETTE, J.M.; BAME, J.H.; KARABINUS, D.S.; WHITMAN, S.S. Can spermatozoa with abnormal heads gain access to the ovum in artificially inseminated super- and single-ovulating cattle? *Theriogenology*, v.50, p.117-128, 1998.
- SCHENK, J.L.; SUH, T.K.; SEIDEL, G.E. Embryo production from superovulated cattle following insemination of sexed sperm. *Theriogenology*, v.65, p.299-307, 2006.
- SPELL, A.R.; BEAL, W.E.; CORAH, L.R.; LAMB, G.C. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, v. 56, p. 287-297, 2001.
- SPITZER, J.C.; MORRISON, D.G.; WETTERMAN, R.P.; FAULKNER, L.C. Reproductive responses and calf birth and weaning weights as affected by body condition at parturition and postpartum weight gain in primiparous beef cows. *Journal of Animal Science*. 73(5): 1251-1257, 1995.
- THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.A.; SANTOS, J.E.P.; MATTOS, R.C.; LOPES, F.L.; PANCARCI, S.M.; RISCO, C.A. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 55: 75-89, 2001.
- THATCHER, W.W.; MOREIRA, F.; PANCARCI, S.M.; BARTOLOME, J.A.; SANTOS, J.E.P. Strategies to optimize reproductive efficiency by regulation of ovarian function. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.23, p. 243-254, 2002.
- TRÍBULO, H.; BO, G.A.; GATTI, G.; TEGLI, J.C.; CUTAIA, L.; MORENO, D.; BRITO, M.; TRÍBULO, R. Pregnancy rates in embryo recipients treated with estradiol benzoate and CIDR-B vaginal devices to eliminate the need for estrus detection. In: *14th International Congress on Animal Reproduction*, Stockholm, Sweden, 2:115; 2000.
- UNITED STATES. Department of Agriculture - USDA. *Livestock and Poultry: World Markets and Trade*. [S.l.]: Foreign Agricultural Service. Oct. 2011a. 28p.
- UNITED STATES. Department of Agriculture - USDA. *Dairy: World Markets and Trade*. [S.l.]: Foreign Agricultural Service. Dec. 2011b. 27p.
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; MULLAART, E.; DE ROOS,

- A.P.; MERTON, J.S.; DEN DAAS, J.H.; KEMP, B.; DE RUIGH, L. Effects of different reproduction techniques: AI MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*, 53: 575-597, 2000.
- VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constant evolução. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.32, n.2, p.100-109, 2008.
- VIANA, J.H.M. Punção folicular orientada por ultra-som em vacas da raça Gir. Tese (doutorado em Ciência Animal, área de concentração em Reprodução Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 124 p., 2002.
- VIANA, J.H.M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. *O Embrião*, ano XVI, edição 51, p.6-10, 2012.
- VIEIRA, A.; LOBATO, J.F.P.; JUNIOR, R.A.A.T.; CEZAR, I.M.; CORREA, E.S. 2005. Fatores determinantes do desempenho reprodutivo de vacas Nelore na região dos cerrados do Brasil Central. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 34(6): 2408-2416.
- XU, J.; GUO, Z.; SU, L.; NEDAMBALE, T.L.; ZHANG, J.; SCHENK, J.; MORENO, J.F.; DINNYES, A.; JI, W.; TIAN, X.C.; YANG, X.; DU, F. Developmental potential of vitrified holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. *J. Dairy Sci.*, v. 89, p.2510- 2518, 2006.
- WELLS, D.N.; MISICA, P.M.; TERVIT, H.R. Production of cloned calves following nuclear transfer with cultured adult mural granulosa cells. *Biology of Reproduction*, v.60, p.996-1005, 1999.
- WILSON, R.D.; FRICKE, P.M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; RUTLEDGE, J.J.; PENFIELD, C.M.S.; WEIGEL, K.A. In vitro production of bovine embryos using sex-sorted sperm. *Theriogenology*, v.65, p.1007-1015, 2006.
- WATANABE, Y.F.; SCHWARZ, K.L.; MERIGHE, G.K.; CAETANO, A.R.; MEIRELLES, F.V. Developmental potential and DNA damage of IVP bovine embryos with fast and slow development. *Theriogenology*, v. 57, n.1, p. 509, 2002.



#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) é uma biotécnica de interesse econômico, que aliada a utilização de sêmen sexado possibilita a obtenção de fêmeas de valor genético superior. O desenvolvimento da metodologia da PIVE para maximizar o ganho genético e a produção animal a um custo baixo é um desafio de pesquisa científica há vários anos, e a produção em escala comercial de embriões a partir de oócitos aspirados dos folículos ovarianos pode aumentar os benefícios do progresso genético entre gerações e contribuir para os programas de melhoramento genético ou produção animal.

As fêmeas zebuínas produzem mais oócitos que as raças taurinas. Este maior número de oócitos se reflete em uma maior produção de embriões e de prenhez, justificando a substituição da produção *in vivo* de embriões pela técnica *in vitro* ocorrida nos últimos anos no Brasil. Este dado deve ser considerado como positivo para a aplicação comercial em larga escala da técnica de fertilização *in vitro*. Promovendo uma prévia seleção de doadoras e de touros, consegue-se atingir índices de produtividade elevados que traduzem em custos mais baixos, viabilizando então o uso da PIVE em escala comercial.

Na literatura consultada são escassos os estudos sobre análise econômica de biotécnicas reprodutivas. É importante ressaltar a importância do estudo realizado em trabalhos com produção de embriões bovinos e deve ser projetado como uma nova linha de pesquisa a ser desenvolvida.

Apesar da escassez de trabalhos similares na vasta bibliografia consultada, acredita-se que é necessária a integração com outros pesquisadores, para que mais estudos relacionados à análise econômica sejam executados na tentativa de quantificar

benefícios e prejuízos biológicos e econômicos de biotécnicas reprodutivas aplicadas ao melhoramento genético animal.

O Brasil continuará liderando, pelo menos por mais alguns anos, a produção de embriões *in vitro* e passará a fornecer cada vez mais genética a países interessados. Existe uma tendência de que a produção de embriões comerciais aumente nos próximos anos, contemplando grandes projetos – no Brasil e no exterior. Para isso a cadeia em si terá de se adequar, desde seus custos até a remuneração por qualidade e padronização, valorizando o investimento em biotécnicas feito pelo produtor. Neste caso, o ganho terá uma relação direta com o volume produzido e dependerá de um crescimento mais agressivo nos primeiros anos. Países importadores de carne podem ser os primeiros a se interessarem por esta tecnologia que oferece ganho em produtividade, entre outros valores agregados que podem ser complementados. É o caso, por exemplo, do emprego de marcadores moleculares, que podem destacar quais características o animal possui, direcionando sua utilização para cada mercado específico, além de permitir um rastreamento mais completo.

O conceituado progresso da técnica da PIVE no Brasil viabilizou grandes projetos de exportação de genética, principalmente das raças zebuínas e seus cruzamentos, para países de clima tropical localizados na América Latina, África e Ásia. Nas décadas de 80 e 90 vários países buscavam genética bovina na América do Norte e Europa, agora existe uma grande possibilidade de ver o Brasil sendo usado como fonte de tecnologia e genética pecuária para as futuras gerações. Isto mostra que as biotecnias de produção de embriões têm o grande potencial de inserir o Brasil como um difusor de tecnologia pecuária no cenário internacional.

## 5. ANEXOS – CAPÍTULO 1

**Tabela 01** – Número e média de oócitos totais, viáveis, clivados e embriões produzidos por fêmea em sessão de aspiração folicular, segundo o grupo genético da doadora

<b>Grupo genético</b>		<b>Oócitos totais</b>	<b>Oócitos viáveis</b>	<b>Clivados</b>	<b>Embriões produzidos</b>
<b><i>Bos indicus</i></b>	Nº fêmeas	6.438	6.438	6.438	6.438
	Sessão OPU	1.949	1.949	1.949	1.949
	Somatório total	107.164	58.348	45.987	26.279
	Somatório/fêmea	35.566,97	19.878,79	15.534,09	9.117,74
	Média/fêmea	18,25	10,20	7,97	4,68
	Erro padrão	0,29	0,17	0,14	0,10
<b><i>Bos taurus</i></b>	Nº fêmeas	3.648	3.648	3.648	3.648
	Sessão OPU	636	636	636	636
	Somatório total	56.779	30.829	23.800	10.470
	Somatório/fêmea	10.054,02	5.411,73	4.131,95	1.749,78
	Média/fêmea	15,81	8,51	6,50	2,75
	Erro padrão	0,38	0,23	0,19	0,10
<b>Total</b>	Nº fêmeas	10.086	10.086	10.086	10.086
	Sessão OPU	2.585	2.585	2.585	2.585
	Somatório total	163.943	89.177	69.787	36.749
	Somatório/fêmea	45.620,99	25.290,52	19.666,04	10.867,52
	Média/fêmea	17,65	9,78	7,61	4,20
	Erro padrão	0,24	0,14	0,12	0,08

**Tabela 02** – Número e média de oócitos totais, viáveis, clivados e embriões produzidos por fêmea em sessão de aspiração folicular, segundo o ano de avaliação

<b>Ano</b>		<b>Oócitos totais</b>	<b>Oócitos viáveis</b>	<b>Clivados</b>	<b>Embriões produzidos</b>
<b>2010</b>	Nº fêmeas	3.357	3.357	3.357	3.357
	Sessão OPU	891	891	891	891
	Somatório total	55.385	30.533	24.711	12.102
	Somatório/fêmea	16.579,41	9.252,50	7.375,80	3.711,48
	Média/fêmea	18,61	10,38	8,28	4,16
	Erro padrão	0,46	0,28	0,23	0,14
<b>2011</b>	Nº fêmeas	3.556	3.556	3.556	3.556
	Sessão OPU	928	928	928	928
	Somatório total	57.767	32.500	25.405	13.707
	Somatório/fêmea	16.258,80	9.315,70	7.285,12	4.179,29
	Média/fêmea	17,52	10,04	7,85	4,50
	Erro padrão	0,36	0,21	0,18	0,13
<b>2012</b>	Nº fêmeas	3.173	3.173	3.173	3.173
	Sessão OPU	766	766	766	766
	Somatório total	50.791	26.144	19.671	10.940
	Somatório/fêmea	12.782,81	6.722,32	5.005,11	2.976,76
	Média/fêmea	16,69	8,78	6,53	3,89
	Erro padrão	0,41	0,24	0,19	0,14
<b>Total</b>	Nº fêmeas	10.086	10.086	10.086	10.086
	Sessão OPU	2.585	2.585	2.585	2.585
	Somatório total	163.943	89.177	69.787	36.749
	Somatório/fêmea	45.621,00	25.290,52	19.666,04	10.867,52
	Média/fêmea	17,65	9,78	7,61	4,20
	Erro padrão	0,24	0,14	0,12	0,08

**Tabela 03** – Número e média de oócitos totais, viáveis, clivados e embriões produzidos por fêmea em sessão de aspiração folicular, segundo a raça da doadora

<b>Raça</b>		<b>Oócitos totais</b>	<b>Oócitos viáveis</b>	<b>Clivados</b>	<b>Embriões produzidos</b>
<b>Nelore</b>	Nº fêmeas	2.947	2.947	2.947	2.947
	Sessão OPU	1.071	1.071	1.071	1.071
	Somatório total	54.581	30.684	24.780	15.442
	Somatório/fêmea	21.445,40	12.244,24	9.736,85	6.048,85
	Média/fêmea	20,02	11,43	9,10	5,65
	Erro padrão	0,44	0,26	0,22	0,14
<b>Gir</b>	Nº fêmeas	2.978	2.978	2.978	2.978
	Sessão OPU	639	639	639	639
	Somatório total	43.505	22.725	17.462	8.851
	Somatório/fêmea	9.894,83	5.354,31	4.089,22	2.148,90
	Média	15,48	8,38	6,40	3,36
	Erro padrão	0,37	0,21	0,18	0,13
<b>Guzerá</b>	Nº fêmeas	513	513	513	513
	Sessão OPU	239	239	239	239
	Somatório total	9.078	4.939	3.745	1.986
	Somatório/fêmea	4.226,75	2.280,23	1.708,02	920,00
	Média/fêmea	17,68	9,54	7,15	3,85
	Erro padrão	0,67	1,32	0,33	0,23
<b>Holandês</b>	Nº fêmeas	2.992	2.992	2.992	2.992
	Sessão OPU	492	492	492	492
	Somatório total	49.039	26.731	20.563	9.136
	Somatório/fêmea	8.322,94	4.489,52	3.425,02	1.485,22
	Média/fêmea	16,92	9,12	6,96	3,02
	Erro padrão	0,46	0,28	0,23	0,12
<b>Jersey</b>	Nº fêmeas	603	603	603	603
	Sessão OPU	122	122	122	122
	Somatório total	7.141	3.761	2.990	1.228
	Somatório/fêmea	1.506,15	792,44	613,55	231,17
	Média/fêmea	12,34	6,50	5,03	1,90
	Erro padrão	0,61	2,60	0,29	0,17
<b>Pardo-Suíço</b>	Nº fêmeas	53	53	53	53
	Sessão OPU	22	22	22	22
	Somatório total	599	337	247	106
	Somatório/fêmea	224,93	129,77	93,40	33,40
	Média/fêmea	10,22	5,90	4,24	1,52
	Erro padrão	1,21	0,66	0,56	0,30
<b>Total</b>	Nº fêmeas	10.086	10.086	10.086	10.086
	Sessão OPU	2.585	2.585	2.585	2.585
	Somatório total	163.943	89.177	69.787	36.749
	Somatório/fêmea	45.621,00	25.290,52	19.666,04	10.867,52
	Média/fêmea	17,65	9,78	7,61	4,20
	Erro padrão	0,24	0,14	0,12	0,08

**Tabela 04** – Número e média de oócitos totais, viáveis, clivados e embriões produzidos por fêmea em sessão de aspiração folicular, segundo tipo de sêmen

Sêmen		Oócitos totais	Oócitos viáveis	Clivados	Embriões produzidos
<b>Convencional</b>	Nº fêmeas	4.733	4.733	4.733	4.733
	Sessão OPU	1.477	1.477	1.477	1.477
	Somatório total	80.508	44.185	35.469	20.557
	Somatório/fêmea	27.639,82	15.552,18	12.293,00	7.323,19
	Média/fêmea	18,71	10,53	8,32	4,96
	Erro padrão	0,35	0,20	0,17	0,12
<b>Sexado</b>	Nº fêmeas	5.353	5.353	5.353	5.353
	Sessão OPU	1.108	1.108	1.108	1.108
	Somatório total	83.435	44.992	34.318	16.192
	Somatório/fêmea	17.981,17	9.738,34	7.373,04	3.544,32
	Média/fêmea	16,23	8,79	6,65	3,20
	Erro padrão	0,31	0,18	0,15	0,09
<b>Total</b>	Nº fêmeas	10.086	10.086	10.086	10.086
	Sessão OPU	2.585	2.585	2.585	2.585
	Somatório total	163.943	89.177	69.787	36.749
	Somatório/fêmea	45.620,99	25.290,52	19.666,04	10.867,52
	Média/fêmea	17,65	9,78	7,61	4,20
	Erro padrão	0,24	0,14	0,12	0,08

**Tabela 05** – Número e média de oócitos totais, viáveis, clivados e embriões produzidos por fêmea em sessão de aspiração folicular, segundo época do ano

Período		Oócitos totais	Oócitos viáveis	Clivados	Embriões produzidos
<b>Águas (novembro - abril)</b>	Nº fêmeas	4.565	4.565	4.565	4.565
	Sessão OPU	1.180	1.180	1.180	1.180
	Somatório total	73.677	40.650	31.368	16.669
	Somatório/fêmea	20.635,63	11.507,83	8.905,95	4.944,47
	Média/fêmea	17,49	9,75	7,55	4,19
<b>Seca (maio - outubro)</b>	Nº fêmeas	5.521	5.521	5.521	5.521
	Sessão OPU	1.405	1.405	1.405	1.405
	Somatório total	90.266	48.527	38.419	20.080
	Somatório/fêmea	24.985,36	13.782,69	10.760,09	5.923,05
	Média/fêmea	17,78	9,81	7,66	4,22
<b>Total</b>	Nº fêmeas	10.086	10.086	10.086	10.086
	Sessão OPU	2.585	2.585	2.585	2.585
	Somatório total	163.943	89.177	69.787	36.749
	Somatório/fêmea	45.620,99	25.290,52	19.666,04	10.867,52
	Média/fêmea	17,65	9,78	7,61	4,20
	Erro padrão	0,24	0,14	0,12	0,08