PECUÁRIA DE LEITE NO BRASIL

Cenários e avanços tecnológicos

Duarte Vilela
Reinaldo de Paula Ferreira
Elizabeth Nogueira Fernandes
Fabrício Vieira Juntolli

Editores Técnicos

Embrapa

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

PECUÁRIA DE LEITE NO BRASIL

Cenários e avanços tecnológicos

Duarte Vilela
Reinaldo de Paula Ferreira
Elizabeth Nogueira Fernandes
Fabrício Vieira Juntolli

Editores Técnicos

Embrapa
Brasília, DF
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sudeste
Rod. Washington Luiz, km 234,
Caixa Postal 339
CEP 13560-970 São Carlos, SP
Fone: (16) 3411-5600
Fax: (16) 33615754
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Embrapa Informação Tecnológica
Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W3 Norte (final)
70770-901 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4236
Fax: (61) 3448-2494
www.embrapa.br/livraria
livraria@embrapa.br

Unidade responsável pelo conteúdo
Embrapa Pecuária Sudeste

Unidade responsável pela edição
Embrapa Informação Tecnológica

Comitê Local de Publicações

Presidente
Alexandre Berndt

Secretária-executiva
Simone Cristina Méo Niciura

Membros
Emilia Maria Pulcinelli Camarnado
Maria Cristina Campanelli Brito
Milena Ambrosio Telles
Mara Angélica Pedrochi

Coordenação editorial
Selma Lúcia Lira Beltrão
Lucilene Maria de Andrade
Nilda Maria da Cunha Sette

Normalização bibliográfica
Iara Del Fiaco Rocha
Mara Angélica Pedrochi

Projeto gráfico
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Capa
Paula Cristina Rodrigues Franco

1ª edição
1ª impressão (2016): 2.000 exemplares

Todos os direitos reservados.
A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Pecuária Sudeste

Pecuária de leite no Brasil : cenários e avanços tecnológicos / Duarte Vilela ... [et al.], editores técnicos. – Brasília, DF : Embrapa, 2016.
435 p. : il. color. ; 18,5 cm x 25,5 cm.

ISBN 978-85-7035-644-4

1. Pecuária leiteira. 2. Forrageiras e pastagens. 3. Inovações tecnológicas. 4. Transferência de tecnologia. I. Vilela, Duarte. II Ferreira, Reinaldo de Paula. III. Fernandes, Elizabeth Nogueira. IV. Juntolli, Fabrício Vieira. V. Embrapa Pecuária Sudeste.

CDD 636.2142

© Embrapa, 2016

CAPÍTULO 2

Avanços e inovações em biotécnicas da reprodução em bovinos de leite

Luiz Sergio de Almeida Camargo | Clara Slade Oliveira | Luiz Francisco Pfeifer | Rui Machado

INTRODUÇÃO

O Brasil tem aumentado gradativamente a sua produção de leite. Parte dessa expansão se deve ao uso de tecnologias que contribuem para melhorar a nutrição e a saúde dos animais, associadas ao melhoramento genético do rebanho. Apesar disso, o país ainda possui baixa média de produção de leite, salvo em algumas regiões onde a produção se iguala à de países grandes exportadores de produtos lácteos como Nova Zelândia, Estados Unidos e Argentina. A reprodução tem papel importante na elevação da produtividade e está associada aos aspectos nutricionais e sanitários do rebanho. Fêmeas inadequadamente alimentadas ou doentes demoram em ficar gestantes ou estão sujeitas a perdas embrionárias e abortos e, com isso, produzirão menos leite na sua vida produtiva. Além disso, o manejo reprodutivo inadequado, como má observação de cio e inseminação artificial em momento errado, leva não só à perda do sêmen pela falha na gestação, mas também ao aumento dos dias que o animal ficará no rebanho sem dar cria e, consequentemente, sem produzir leite. Várias regiões do Brasil ainda apresentam outro fator agravante para a reprodução: o estresse causado pela elevada temperatura e umidade do ambiente em grande parte do ano, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais. Esse estresse térmico aumenta a dificuldade da identificação do cio e reduz a qualidade de oócitos e embriões, levando à falha em se estabelecer a gestação.

As biotecnologias reprodutivas objetivam melhorar a reprodução, facilitar o manejo e disseminar o material genético de animais produtivos. A inseminação artificial (IA) com sêmen criopreservado foi uma das primeiras biotecnologias; surgiu na década de 1940. Apesar de seu uso ser estimado em apenas 11,9% dos animais aptos à reprodução no Brasil (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL, 2014), a IA permite que o produtor tenha acesso ao sêmen de touros que possuam comprovadamente alto valor genético em diferentes aspectos produtivos. Com isso o produtor pode aumentar a produtividade do seu rebanho usando sêmen de touros selecionados. Contudo, a IA exige um manejo diferenciado, como a observação de cios – rotina que por vezes o produtor não consegue manter. Para contornar esse tipo de problema, foi desenvolvido um procedimento chamado Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), que faz uso de hormônios para se preestabelecer o momento ideal de inseminação, mesmo que o cio não seja observado. A transferência de embriões convencional, ou produção in vivo, foi a segunda biotecnologia a surgir, porém orientada para aplicação

em fêmeas, possibilitando que uma doadora possa gerar vários embriões depois do procedimento de superovulação e inseminação artificial. Nesse procedimento, a vaca doadora recebe hormônios para induzir a superovulação e depois da inseminação artificial, os embriões são coletados diretamente do útero por meio de lavagens. Apesar de possibilitar maior disseminação do material genético da fêmea, a técnica esbarra em algumas limitações, como baixa resposta superovulatória.

Mais recentemente, a fecundação in vitro, ou produção in vitro, de embriões (Pive) surgiu como uma opção à produção in vivo para produzir muitos embriões a partir de uma mesma fêmea. Oócitos coletados diretamente da fêmea são maturados e fecundados in vitro e os embriões são cultivados em incubadora em laboratório por 7 dias, quando, então, são transferidos para as receptoras apropriadas. Com essa metodologia, é possível produzir um maior número de embriões comparado ao uso da biotécnica de produção in vivo. Por conta dessa capacidade de produzir mais descendentes, a Pive se expandiu no mercado de embriões, principalmente no Brasil. Em 2014, o país respondeu por pouco mais de 59% da produção mundial de embriões Pive, gerando mais de 348.000 embriões (INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2015).

A tecnologia de sexagem do sêmen surgiu no final da década de 80, mas somente na década de 2000 se tornou disponível comercialmente no Brasil. Com essa biotecnologia é possível separar o espermatozoide que carrega o cromossomo X (para fêmea) daquele que carrega o Y (para macho) e, assim, produzir mais bezerros fêmeas ou machos. O seu uso é direcionado para a IA, mas acabou sendo de grande valor na Pive, permitindo a produção de embriões fêmea para atender, principalmente, ao mercado de produtores de leite. A associação da produção de embriões in vitro com sêmen sexado para fêmea foi uma das principais responsáveis pela expansão da Pive nos últimos anos no Brasil. Em virtude de algumas restrições do sêmen sexado, como menor concentração de espermatozoides por dose do que o sêmen convencional, o seu uso na IA ainda é limitado e exige bom manejo reprodutivo para reduzir eventuais falhas de concepção que podem ocorrer em razão dos procedimentos de sexagem.

O estabelecimento de laboratórios para a Pive contribuiu para que outra biotecnologia fosse aplicada comercialmente. A transferência nuclear com células somáticas (TNCS), ou simplesmente clonagem, utiliza de várias etapas da Pive para produzir os embriões, com exceção da fertilização in vitro. Nessa técnica, os oócitos têm seu núcleo (material genético) removido e o núcleo de outra célula, coletada de outro animal, é transferido para esse oócito sem núcleo (enucleado). O exemplo mais conhecido de clone é a ovelha Dolly, nascida em 1996, mas o touro Bandido, personagem conhecido de uma novela no Brasil, também já foi clonado. Antes do touro bandido, o Brasil havia produzido a vaca Vitoria da Embrapa em 2001, porem utilizando a técnica de clonagem de embriões, um pouco diferente daquela usada para produzir a ovelha Dolly e o touro Bandido. A clonagem permite obter um animal geneticamente idêntico àquele que doou a célula (com exceção de genes mitocondriais). Apesar de ainda possuir inúmeras dificuldades que reduzem a sua eficiência em obter animais vivos, a clonagem é adotada comercialmente em países como Brasil, Argentina e Estados Unidos. Em algumas centrais, é possível encontrar sêmen de touros clones de raças de corte e de leite para inseminação artificial.

Finalmente, uma biotecnologia que não está disponível comercialmente, mas tem capacidade de trazer grandes mudanças na produtividade, é a engenharia genética associada às biotecnologias reprodutivas. A engenharia genética tem sido utilizada na produção de grãos como soja e milho em diversos países, incluindo o Brasil, trazendo um impacto positivo na produtividade e retorno econômico. Porém, em animais de produção, há dificuldade em se estabelecer métodos eficientes para produção em escala. Novos métodos de engenharia genética ainda em estudo permitem que o genoma de um embrião possa ser editado com precisão, isto é, permite que erros no genoma possam ser corrigidos ou que polimorfismos responsáveis por características desejáveis, que levariam décadas para serem disseminadas na população por meio de cruzamentos, possam ser inseridos no genoma, acelerando o ganho genético.

Portanto, o objetivo deste capítulo é relatar os avanços e as novidades das principais biotecnologias reprodutivas, como IATF, Pive, sêmen sexado, clonagem e engenharia genética em embriões bovinos.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF)

Todos os países produtores de leite que investem intensivamente no melhoramento genético do rebanho têm observado que as taxas de concepção do rebanho leiteiro têm diminuído nas últimas três décadas (WILTBANK et al., 2006). Essa tendência pode ser visualizada de forma mais acentuada em países que possuem rebanhos leiteiros altamente produtivos. A baixa fertilidade de vacas de alta produção (produção diária > 35 L de leite) tem origem multifatorial, onde a baixa concentração sanguínea de progesterona durante o período embrionário inicial e o estresse térmico têm sido relacionados como uma das principais causas (LONERGAN, 2011). Esses fatores podem levar ao aumento do intervalo parto-concepção (IPC), que é um dos índices que auxiliam o produtor a avaliar a eficiência reprodutiva do rebanho. Se o IPC médio de um rebanho excede 80 dias, o produtor pode se beneficiar de programas reprodutivos que, por meio do controle exógeno do ciclo estral, permitem que os animais possam ser submetidos à inseminação artificial em tempo-fixo (IATF), ou seja, sem a observação de cio.

Após o fim do período voluntário de espera (PVE), a taxa de prenhez é determinada pela taxa de submissão à inseminação (calculada pelo número de vacas inseminadas/número total de vacas elegíveis à IA) e pela prenhez por inseminação (P/IA). Uma das limitações que afeta diretamente a eficiência reprodutiva é a baixa taxa de detecção de cios que, consequentemente, leva à baixa taxa de submissão à IA, isto é, baixo número de animais inseminados. Quando o único sistema de acasalamento utilizado na fazenda leiteira é a detecção de cios seguida de IA, o número de animais submetidos à inseminação é muito inferior àquele de fazendas que utilizam programas de IATF. Além disso, rebanhos que possuem vacas de alta produção são os que mais apresentam redução da taxa de submissão à IA em razão da redução da atividade estral (cios mais curtos) causada pelo alto metabolismo desses animais (WILTBANK et al., 2006).

O manejo reprodutivo da fazenda de leite evoluiu muito nos últimos 20 anos, especialmente em virtude do desenvolvimento das técnicas de manipulação do ciclo estral que permitiram que os programas de IATF fossem inseridos nas rotinas das fazendas. Os programas de sincronização de ovulação que viabilizam a IATF envolvem o controle do desenvolvimento folicular ovariano e da duração do corpo lúteo (CL), com o objetivo de induzir o folículo dominante a ovular de forma que a IA possa ser realizada em momento predeterminado.

A maioria dos trabalhos científicos sobre os métodos de IATF em rebanhos leiteiros é oriunda dos Estados Unidos, onde mais de 90% do sêmen comercializado é destinado ao rebanho leiteiro. Em contraste, no Brasil, cerca de 40% do sêmen comercializado é oriundo de reprodutores leiteiros. Para melhorar esse índice, o país tem conduzido pesquisas para aprimorar e adaptar as técnicas de IATF para as suas condições, o que tem contribuído para aumentar o uso da inseminação artificial. De fato, a venda de sêmen para gado de leite cresceu 34% entre 2009 e 2014 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL, 2014), em parte pelo aumento do uso de protocolos de IATF.

PROTOCOLOS E RESULTADOS

Atualmente, vários métodos de IATF para gado leiteiro estão disponíveis no mercado; no entanto, restrições legais quanto ao uso de alguns hormônios tem limitado as opções de manipular o ciclo estral em alguns países, especialmente nos Estados Unidos (LANE et al., 2008). Apesar do uso de alguns hormônios, como os ésteres de estradiol, ser permitido no Brasil, atenção especial deve ser dada aos períodos de carência desses fármacos, pois não há consenso quanto ao tempo de descarte do leite e da carne de um mesmo princípio ativo entre diferentes fabricantes. Em uma simples busca nos compêndios veterinários e nas próprias bulas dos fármacos disponíveis no mercado brasileiro, foi possível detectar que os períodos de carência são altamente heterogêneos. O período de descarte para animais tratados com benzoato de estradiol (BE) é geralmente de 30 dias para o leite. Já para o cipionato de estradiol (ECP), há laboratórios que indicam período de carência 0 (zero), enquanto outros não indicam seu uso para animais de produção leiteira. Isso é ainda um assunto de pesquisa. Independentemente do protocolo, a prenhez por inseminação (P/IA) dos métodos hormonais mais utilizados dentro e fora do Brasil é de cerca de 25% a 45% (BISINOTTO et al., 2010; KASIMANICKAM et al., 2005; SAMPAIO et al., 2015; SOUZA et al., 2009).

Ovsynch e suas associações

Desde a primeira publicação do protocolo Ovsynch (PURSLEY et al., 1995), os programas de IATF que utilizam hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e prostaglandina F2α (PGF) têm sido refinados para melhorar o controle do crescimento folicular ovariano, o tempo de vida do CL e a sincronia da ovulação que deve ocorrer momentos antes da IA. Esse protocolo consiste basicamente na aplicação de uma injeção de GnRH no dia 0, uma de PGF no dia 7 e outra de GnRH no dia 9.

Apesar dos protocolos Ovsynch terem sido bastante utilizados em rebanhos leiteiros, especialmente nos Estados Unidos no final da década de 1990 e início dos anos 2000, dois fatores foram

detectados como limitantes: capacidade de ovulação à aplicação da primeira dose de GnRH e efetividade da PGF em causar lise do CL. Alguns programas de pré-sincronização têm sido estudados com o intuito de aumentar a fertilidade dos protocolos Ovsynch. O método mais comum para pré-sincronizar o ciclo estral de vacas antes da IA é através da injeção sequencial de duas doses de PGF em um intervalo de 14 dias, seguido pelo protocolo Ovsynch 11 a 14 dias depois (EL-ZARKOUNY et al., 2004; MOREIRA et al., 2001). Esse método (PGF-Ovsynch), além de melhorar consideravelmente a P/IA, permite ao produtor optar por inseminar as fêmeas que forem observadas em cio antes do protocolo Ovsynch (após as injeções de PGF). Apesar da pré-sincronização apresentar resultados adequados, a maior limitação desse programa de IATF é que as fêmeas só respondem se estiverem com atividade estral regular, pois necessitam ter CL para responder à pré-sincronização. Como a proporção de vacas em anestro após o PVE pode ser bastante expressiva em sistemas intensivos de produção de leite, a adoção de um método para pré-sincronizar o ciclo estral e também induzir a ovulação em vacas em anestro pode ser mais eficiente, como é o caso do uso do duplo Ovsynch (dois programas Ovsynch seguidos), que pode aumentar a P/IA quando comparado com PGF-Ovsynch (HERLIHY et al., 2012). Assim, se o objetivo for inseminar em tempo fixo todas as vacas ou ainda se a ocorrência de vacas em anestro for muito alta, o produtor pode optar por utilizar o programa duplo Ovsynch. Entretanto, se houver disponibilidade de detecção de cio e a taxa de anestro for baixa, ele pode optar por utilizar o protocolo PGF-Ovsynch.

Outra variação do protocolo Ovsynch pode ser obtida pela substituição da última injeção de GnRH pela injeção de 1 mg de ECP, 24h depois da injeção de PGF. Esses protocolos são conhecidos como Heatsynch, pois com a utilização do ECP ocorre maior incidência de cio do que com os protocolos que utilizam GnRH como indutor de ovulação. No Brasil, esse protocolo associado com a inserção de um implante de progesterona, nos dias entre a injeção de GnRH e PGF, tem sido muito utilizado nos rebanhos leiteiros. Uma prática comum é utilizar a detecção de cio para inseminação depois da injeção de PGF. Vacas que não demonstram cio até 48h depois da aplicação do ECP são inseminadas em tempo fixo depois desse período. Protocolos Heatsynch têm resultado, em média, 40% de P/IA (Tabela 1). O custo desse protocolo é mais baixo do que o do protocolo Ovsynch convencional em razão do custo do ECP ser cerca de 10x mais barato do que a dose de GnRH. Entretanto, o uso de ECP pode levar à indução de cio sem que este seja, necessariamente, seguido de ovulação.

Ovsynch curtos (5 dias)

A redução da duração dos protocolos Ovsynch de 7 para 5 dias tem sido amplamente estudada e aplicada nos rebanhos norte-americanos (BISINOTTO et al., 2010) como alternativa, principalmente, para vacas de alta produção que possuem elevada depuração de hormônio esteroides graças ao alto metabolismo hepático. Vacas de alta produção possuem maior período de dominância folicular, pois os níveis de estradiol levam mais tempo para atingirem concentrações suficientes para estimular o pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH) e a consequente ovulação. Esse maior período de dominância tem sido relacionado a menores P/IA em vacas submetidas à IATF com protocolos Ovsynch tradicionais. A redução do intervalo entre a primeira injeção de GnRH e a injeção de PGF de 7 para 5 dias diminui o período de desenvolvimento do folículo em 2 dias, resultando aumento

de P/IA (SANTOS et al., 2010). Além disso, como o intervalo entre a primeira injeção de GnRH e a PGF é reduzido, para a completa regressão do CL há a necessidade de aplicação de outra injeção de PGF 24h depois da primeira. Em protocolos curtos de IATF em vacas de leite, a IA tem sido realizada 36 h (GARCIA-ISPIERTO; LOPEZ-GATIUS, 2014) ou 48 h depois da segunda injeção de PGF (BISINOTTO et al., 2010), em ambos casos juntamente com a aplicação de GnRH. Esses protocolos têm resultado em torno de 30% a 45% de P/IA. A Tabela 1 mostra a P/IA dos principais protocolos descritos anteriormente.

Protocolos à base de estradiol e progesterona

Os protocolos mais utilizados no Brasil apresentam algumas diferenças dos protocolos usados na América do Norte em razão da livre comercialização dos ésteres de estradiol e por serem eficientes e economicamente viáveis. Esses protocolos associam o uso dos ésteres de estradiol com implantes de progesterona para induzir a regressão do folículo dominante presente no ovário no início do procedimento. Além disso, no momento da remoção do implante de progesterona, é necessário a injeção de uma dose luteolítica de PGF e de um indutor de ovulação. Os dois principais ésteres utilizados nos sistemas de produção de leite no Brasil são o BE e o ECP, sendo cada qual utilizado em um momento diferente dentro do protocolo. O ECP é comumente utilizado no momento da retirada do implante intravaginal de progesterona e possui menor potencial de indução do pico pré-ovulatório de LH (SOUZA et al., 2009) e ovulação quando comparado ao BE ou ao GnRH. Apesar disso, seu uso tem registrado resultados adequados de P/IA (~ 40%) e elimina o manejo adicional para injeção de BE ou GnRH, tornando mais simples a execução dos protocolos.

Assim como ocorre em protocolos Ovsynch, programas de IATF à base de estradiol-progesterona podem ser melhorados para vacas de alta produção. Estudo recente demonstrou que os protocolos podem ser reduzidos para 6 dias de permanência do implante de progesterona. Nesse estudo, a PGF foi injetada 24 horas antes da retirada do dispositivo (Tabela 1). Esse programa de IATF atingiu P/IA de 30% a 35% de prenhez (SAMPAIO et al., 2015). Uma opção para vacas leiteiras de baixa condição corporal é o uso de gonadotrofina coriônica equina (eCG) nos protocolos à base de estradiol-progesterona. Souza et al. (2009) verificaram que o efeito do eCG foi benéfico somente em vacas com baixo escore da condição corporal (<2,75).

USO DE SÊMEN SEXADO NA IA E NA IATF EM REBANHOS LEITEIROS

Atualmente, os produtores podem optar pela utilização de sêmen sexado para fêmeas na inseminação artificial, ou mesmo em programas de IATF de vacas leiteiras, e com isso ter mais bezerras e novilhas para reposição e venda. Contudo, o seu uso tem sido restrito nos sistemas de produção do Brasil por conta, principalmente, do custo mais elevado e da redução na fertilidade das suas doses em relação ao sêmen convencional, seja pela baixa concentração espermática, seja pela menor viabilidade dos espermatozoides (SEIDEL, 2014). Estima-se que a fertilidade do sêmen sexado seja de aproximadamente de 70% a 80% da daquela observada com sêmen convencional em vacas de leite lactantes inseminadas com observação de cio (ANDERSSON et al., 2006; DEJARNETTE et al., 2009).

Tabela 1. Taxa de prenhez de vacas de leite submetidas a diferentes protocolos de IATF.

Protocolo de IATF[1]	Prenhez/IA	Referência
Ovsynch (GnRH D0/PG D7/GnRH D9)	37,8 %	Pursley et al. (1997)
Ovsynch (GnRH D0/PG D7/GnRH D9)	41,0%	Fricke et al. (1998)
Ovsynch + Progesterona	45,7%	McDougall (2010)
Heatsynch (GnRH D0/PG D7/ECP D8)	27,8%	Kasimanickam et al. (2005)
Duplo Ovsynch (Ovsynch - 7 d - Ovsynch)	46,3%	Herlihy et al. (2012)
Presynch (PG - 14 d - PG - 12 d -) + Ovsynch	41,7%	Souza et al. (2008)
Presynch (PG - 14 d - PG - 12 d -) + Ovsynch 5d	46,4%	Bisinotto et al. (2010)
Presynch (PG - 14 d - PG - 12 d -) + Cosynch 5d	45,5%	Bisinotto et al. (2010)
BE+CIDR D0/PG-CIDR D8/GnRH D10	28,9%	Souza et al. (2009)
BE+CIDR D0/PG+eCG-CIDR D8/GnRH D10	33,8%	Souza et al. (2009)
BE+CIDR D0/PG-CIDR D8/ECP D9	30,9%	Souza et al. (2009)
BE+CIDR D0/PG+eCG-CIDR D8/ECP D9	29,1%	Souza et al. (2009)
BE+CIDR D0/PG D5/ECP-CIDRD6	35,7%	Sampaio et al. (2015)
BE+CIDR D0/PG D5/ECP+eCG-CIDR D6	30,9%	Sampaio et al. (2015)

[1] A descrição detalhada dos protocolos e a metodologia utilizada podem ser acessadas através das respectivas referências.
BE, benzoato de estradiol; CIDR, do inglês *controlled internal drug release*; D, dia do protocolo; d, dias entre as injeções; ECP, cipionato de estradiol; GnRH, do inglês *Gonadrotrophin releasing hormone*; PG, prostaglandina F2 alfa.

Em razão dessa redução da fertilidade, o sêmen sexado tem sido mais indicado para novilhas, que geralmente apresentam melhor condição corporal e menor risco de infecção uterina. Em um amplo estudo com mais de 30.000 novilhas inseminadas com sêmen sexado em cio natural, Dejarnette et al. (2009) detectaram uma taxa de concepção de 47% e 53% para fêmeas das raças Holandesa e Jersey, respectivamente. Em outro estudo que comparou vacas lactantes inseminadas em cio ou em IATF com sêmen sexado, foi observado taxas de prenhez de 31,7% e 19,4%, respectivamente (SÁ FILHO et al., 2013).

O uso de sêmen sexado na IATF ainda é restrito e poucos estudos foram realizados. Entretanto, já se sabe que protocolos de IATF para sêmen convencional podem não funcionar adequadamente para sêmen sexado, exigindo modificações. Baruselli et al. (2007) observaram que a taxa de concepção depois da IATF em vacas de leite de alta produção inseminadas com sêmen sexado tendeu a ser menor do que aquela para fêmeas inseminadas com sêmen convencional (9,8% vs 21,3%).

Uma alternativa para melhorar os índices de P/IA é selecionar vacas de acordo com a resposta ovariana para utilização de sêmen sexado na IATF. Recentemente, Karakaya et al. (2014) induziram vacas de leite lactantes à IATF com protocolo Ovsynch e selecionaram somente vacas com folículos entre 12 mm e 18 mm de diâmetro e que apresentavam claros sinais de muco vaginal no momento da IATF. O índice de P/IA de vacas inseminadas com sêmen sexado (31,8%) tendeu a ser menor do

que o da IATF com sêmen convencional (40,9%), mas apesar disso é aceitável quando comparado à média geral de rebanhos de alta produção.

Algumas empresas que comercializam sêmen no Brasil já estão indicando protocolos de IATF específicos quando o sêmen sexado é utilizado. Uma delas sugere protocolo à base de progesterona e estradiol, que deve ser aplicado da seguinte forma: dia 0, BE + implante de progesterona; Dia 8, retirada do implante de progesterona + PGF + eCG; dia 9, BE; e dia 10, IATF (36 horas depois do BE). Apesar dessa sugestão, a empresa esclarece que o resultado dependerá do efeito individual do touro e que, para otimizar os resultados, as fêmeas observadas em cio depois da remoção do implante de progesterona devem ser inseminadas, ou ainda que as vacas podem ser avaliadas por ultrassonografia, onde apenas aquelas que apresentarem folículo dominante acima de 11 mm de diâmetro devem ser inseminadas.

PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES (PIVE)

A Pive compreende todo o processo de produção de embriões em laboratório, a partir de oócitos e espermatozoides (Figura 1). Os oócitos (Figura 2) são coletados de fêmeas de interesse zootécnico e transportados ao laboratório para serem preparados para fertilização – etapa de maturação in vitro. Depois disso, ocorre a fertilização desses oócitos pela coincubação com espermatozóides – etapa de fertilização in vitro, e os prováveis zigotos são cultivados por 7 dias, até alcançarem o estádio de blastocisto, fase mais utilizada para transferência de embriões em bovinos – etapa de cultivo in vitro. Os blastocistos obtidos são transferidos para receptoras de embriões, que são fêmeas selecionadas que tiveram seu estro previamente sincronizado.

A Pive foi desenvolvida em mamíferos a partir de experimentos com coelhos em 1959 (CHANG, 1959), mas sua projeção em bovinos foi especialmente importante depois de otimizações da aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU, *Ovum Pick-up*) para a espécie nos anos 1990 (BOLS et al., 1995). Antes da OPU, as aspirações eram realizadas por laparotomia, um procedimento cirúrgico invasivo que permite o acesso aos ovários e a aspiração dos folículos contendo oócitos. O sistema OPU possibilita que os oócitos sejam coletados da doadora sem cirurgia, em um procedimento de poucos minutos por animal. Para tanto, uma sonda de ultrassom intravaginal é acoplada ao sistema de punção, composto por agulha conectada a circuito de pressão negativa (vácuo), e através da imagem produzida pelo ultrassom , o médico veterinário acessa e aspira os folículos ovarianos.

Esse método revolucionou a Pive em bovinos, pois o custo, o tempo de realização do procedimento e o tempo de recuperação do animal foram reduzidos drasticamente. No Brasil, em 2000, já havia animais nascidos a partir de embriões produzidos com oócitos obtidos por OPU e fertilizados in vitro (VIANA et al., 2001). A partir de então, a Pive teve seu uso intensificado comercialmente no país, que se tornou o maior produtor de embriões Pive do mundo (INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY, 2015). Ao contrário do ocorrido no Brasil, a Pive não apresentou o mesmo crescimento em outros países que também possuem a pecuária como componente de destaque no produto interno bruto. Essa peculiaridade observada no cenário brasileiro se deve, em parte, a

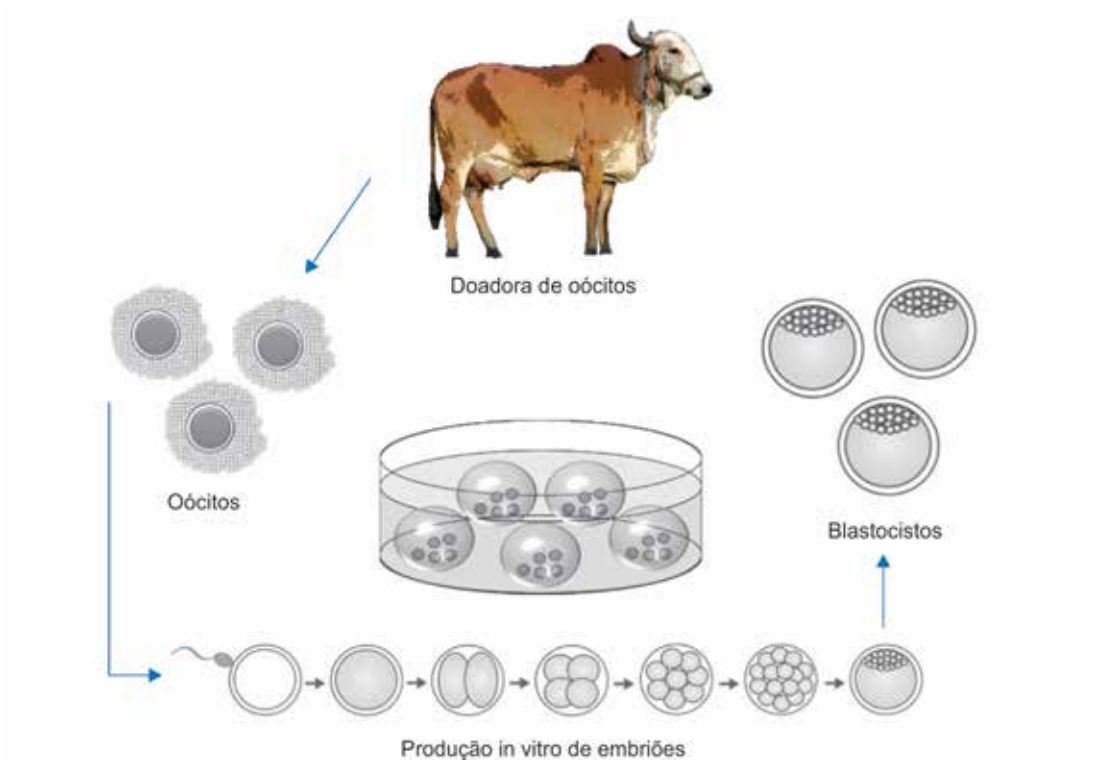

Figura 1. Esquema do processo de produção in vitro de embriões bovinos. Oócitos são coletados de doadoras e, no laboratório, ocorre a fertilização com espermatozoides e o desenvolvimento embrionário subsequente. No final do processo, são produzidos blastocistos que serão transferidos para receptoras de embriões.

características ovarianas de animais zebuínos e mestiços, que representam a maioria das doadoras de oócito no Brasil. Por exemplo, doadoras Gir e Girolando permitem a recuperação de grande número de oócitos por punção, resultando maior produção de embriões do que doadoras Holandesas (PONTES et al., 2010). Essas características tornam possível a produção de número elevado de embriões e prenhezes por bateria de PIVE. Outro fator importante para o avanço da Pive no Brasil foi o desenvolvimento científico dessa biotécnica, através de pesquisas em universidades e instituições científicas brasileiras, além dos laboratórios privados, que não somente aprimoraram a biotecnologia, mas também contribuíram para a formação de profissionais com alto nível de qualificação.

A Pive oferece grandes vantagens aos sistemas leiteiros. Primeiramente, confere grande dinamismo ao manejo reprodutivo de bovinos leiteiros. Por dispensar hormônios para o preparo das doadoras, permite o uso de animais pré-púberes, animais com patologias adquiridas sem origem genética, e animais gestantes. Assim, o preparo das doadoras é simples, sem que haja a necessidade de formar um lote estático de doadoras, pois elas podem ser identificadas de forma dinâmica em todo o sistema. Além disso, as doadoras podem ser utilizadas em intervalos curtos, já que não há necessidade de protocolo hormonal no preparo das fêmeas. Ainda, um grande número de descendentes pode ser produzido a partir de um animal utilizando-se essa técnica, assim, a Pive é uma ótima

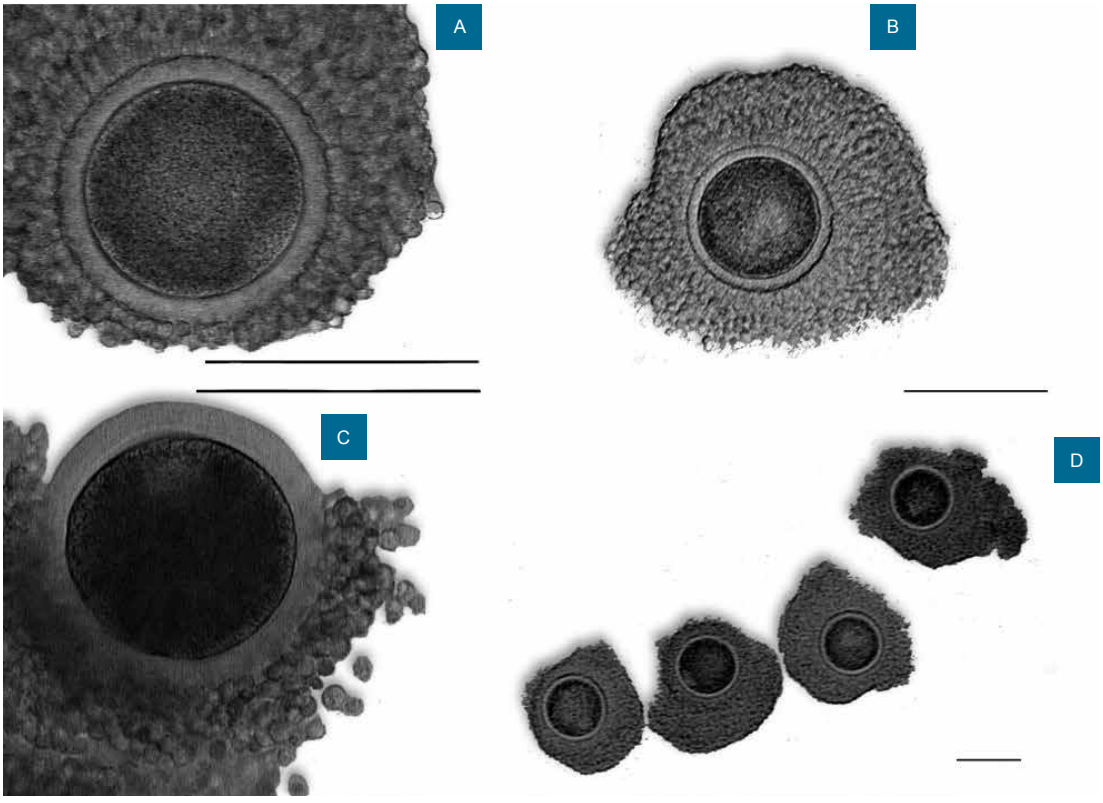

Figura 2. Imagens de oócitos bovinos. Os oócitos são células grandes, circundadas pela zona pelúcida e revestidos por camadas de células do cumulus. O conjunto forma os complexos cumulus-oócito (CCOs). De acordo com a qualidade do citoplasma do oócito e o número de camadas de células que o circundam, os CCOs são classificados qualitativamente. Oócito de boa qualidade circundado por uma a três camadas de células do cumulus (A). Oócito parcialmente desnudo, com parte da zona pelúcida exposta, sem células do cumulus (B). Oócito com mais de 3 camadas de células do cumulus (C). Exemplo de CCOs selecionados para a Pive (D). Barras em cada imagem representam aproximadamente 150 µm.

ferramenta para disseminar a genética de fêmeas superiores. Por outro lado, por a OPU se tratar de uma biotécnica invasiva, é importante que os animais sejam cuidadosamente acompanhados por médicos veterinários capacitados a fim de evitar patologias como aderências e fibroses nos ovários. Estas lesões podem ser ocasionadas pelo uso excessivo ou não adequado das doadoras de oócitos. Em algumas situações, são utilizados hormônios para o preparo de doadoras. Porém, o uso repetido e constante de hormônios pode causar disfunções no trato reprodutivo, portanto essa prática deve ser acompanhada por médico veterinário especializado.

AVANÇOS NOS SISTEMAS DE PIVE

Os sistemas de Pive estão em constante evolução. Entre as principais podemos apontar o aprimoramento dos meios de cultivo embrionário e de sistemas direcionados à produção de embriões

fêmea. Desde a década de 1990, no Brasil, programas de Pive foram delineados para zebuínos (OLIVEIRA et al., 1994) e, a partir de então, expressivo crescimento do uso da técnica no país foi alcançado, envolvendo o desenvolvimento de aparatos direcionados à aspiração folicular OPU em bovinos por empresas inovadoras brasileiras.

Com relação aos meios de cultivo, o primeiro avanço digno de nota diz respeito à redução ou à substituição do soro fetal bovino como suplemento. Na década de 1990, foi descrita uma síndrome relacionada à Pive que ocasionava crescimento excessivo dos fetos e, consequentemente, problemas de parto. O quadro foi denominado *large offspring sindrome*, ou síndrome do bezerro grande (YOUNG et al., 1998), caracterizada como síndrome de origem epigenética (CHEN et al., 2013) associada a componentes do meio de cultivo embrionário, entre eles o soro fetal bovino (SFB) (LAZZARI et al., 2002). Atualmente, os meios foram aprimorados e reduzidos níveis de SFB ou ausência de SFB são utilizados e, na prática, a maioria dos laboratórios produz embriões que se desenvolvem em bezerros com peso semelhante ao de bezerros produzidos por inseminação artificial ou monta natural. A remoção do SFB também foi um fator muito importante para o aumento da resistência dos embriões à criopreservação (RIZOS et al., 2003), uma excelente estratégia para otimização de doadoras e receptoras, cujo uso está em plena expansão.

Outras inovações apresentaram notável aplicação e continuam em processo de evolução. Suplementos que controlam níveis de radicais livres foram padronizados para adição nos meios de cultivo e indicados para o desenvolvimento in vitro de embriões em condições estressantes (MOSHKDANIAN et al., 2011). A adição de fatores de crescimento, que promovem aumento do número de células embrionárias (AHUMADA et al., 2013), também foi padronizada e incluída nos meios de cultivo embrionário. Ainda, a adição de agentes que reduzem teores lipídicos foi padronizada para aumento da tolerância dos embriões à criopreservação (DIEZ et al., 2001). Outro avanço foi o aprimoramento da produção de embriões fêmea in vitro. Inicialmente, os sistemas de cultivo embrionário incluíam glicose na sua formulação, como fonte de energia para os embriões. Nesses primeiros sistemas, foi detectado que embriões fêmea atrasavam seu desenvolvimento e formavam blastocistos com menor frequência (AVERY et al., 1992; XU et al., 1992). Depois disso, foi evidenciado que esse atraso era influenciado pela glicose e se devia ao sistema enzimático metabólico (pentose-fosfato), cujas enzimas são codificadas por genes presentes no cromossomo X (PEIPPO et al., 2001). Em embriões fêmea, por terem dois cromossomos X ativos no início do desenvolvimento embrionário, esses genes se apresentavam duas vezes mais expressos em comparação aos embriões macho (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2010). Assim, a glicose foi substituída por piruvato nos meios e essa condição ocasionou melhoria nos sistemas. Atualmente, a velocidade do desenvolvimento in vitro dos embriões fêmea e macho que formarão blastocistos é parecida (OLIVEIRA et al., 2016a).

Porém, existem outras diferenças no desenvolvimento inicial de embriões macho e fêmea. A partir da fase de transição de mórula para blastocistos, embriões fêmea apresentam índices elevados de morte celular (OLIVEIRA et al., 2016b), o que contribui para a formação de blastocistos com menor número de células e índices elevados de apoptose (OLIVEIRA et al., 2010; XU et al., 1992), sugerindo que o sistema de cultivo in vitro é ainda desafiador nesse sexo. Entretanto, os sistemas atuais permitem taxas altas de gestação, em torno de 40%, para embriões fêmea.

USO DE SÊMEN SEXADO NA PIVE

A disponibilidade de sêmen sexado para fêmea revolucionou novamente o mercado da PIVE. O sêmen sexado apresenta bons resultados na fertilização in vitro, pois, diferentemente da IA, antes da utilização do sêmen na fertilização in vitro, existe preparo do sêmen por centrifugação e remoção de fatores decapacitantes. Além disso, o contato do espermatozoide com o oócito é mecanicamente facilitado, pois os gametas são incubados juntos, em pequenas gotas de meio de fertilização. Dessa forma, com a possibilidade de uso rotineiro do sêmen sexado, a produção de machos é reduzida a 10% (BERMEJO-ALVAREZ et al., 2008; HAMANO, 2007). Em propriedades leiteiras, essa condição melhora muito a eficiência de produção de bezerras. Atualmente, a grande maioria dos clientes de laboratórios de Pive em bovinos adota a abordagem do uso de sêmen sexado, principalmente para as raças de aptidão leiteira.

Existe um fenômeno ainda não elucidado que envolve o desempenho de touros na Pive e determina que alguns touros tenham melhor produção de embriões do que outros. Esse fenômeno é conhecido como efeito touro (WARD, 2001; CAMARGO et al., 2002) e afeta também a velocidade de desenvolvimento dos embriões (OLIVEIRA et al., 2016b). Estudos recentes em animais de laboratório identificaram padrões de expressão gênica embrionária que sugerem influência genética paterna durante o desenvolvimento embrionário, que poderia afetar o desempenho desses touros (XUE et al., 2013).

CLONAGEM ANIMAL

A clonagem animal ficou conhecida a partir do nascimento da ovelha Dolly (WILMUT et al., 1997) e abriu uma oportunidade de gerar-se embriões sem a necessidade da fertilização e que fossem cópias de um animal adulto. De fato, os embriões clones podem ser gerados a partir da transferência de uma célula de um animal já nascido para um oócito sem núcleo e por isso possuem o mesmo genoma desse animal, com exceção de genes mitocondriais que são originados dos oócitos.

Com a clonagem, vislumbraram-se diversas aplicações como uso de células geneticamente modificadas para produzir o embrião clone; conservação do material genético de um animal vivo de alto valor por meio de cópias desse animal, ou formação de rebanhos clones idênticos originados de um ou poucos animais de alta produção. No último caso, a intenção seria obter animais de alta produção, mas que, por serem copias de um mesmo animal, teriam requerimentos nutricionais e sanitários semelhantes. As fêmeas clones dos rebanhos receberiam também embriões clones, com preferência para àqueles obtidos de animais superiores. Esse esquema facilitaria o manejo na fazenda, que normalmente enfrenta dificuldade em atender às diferentes exigências de cada animal de seu rebanho, principalmente para aqueles formados a partir de cruzamentos.

Apesar dos inúmeros estudos com clonagem animal desde a década de 1990, a eficiência da técnica em produzir animais vivos saudáveis continua baixa: na maioria dos casos não alcança 10% de nascimentos (PANARACE et al., 2007; POWELL et al., 2004). Na tentativa de melhorar a eficiência,

foram testados agentes que pudessem aumentar a viabilidade do embrião clone, entre esses verificou-se que a tricostatina, um inibidor de histonas deacetilases, pode melhorar a qualidade do embrião. A taxa de gestão observada foi de 64,2% contra 45,4% dos embriões não tratados com a tricostatina, com o nascimento de um (7,1%) bezerro Gir, mas seguido de morte depois de alguns dias (CAMARGO et al., 2011). Essa baixa taxa de nascimento seguida de alta incidência de morte pós-nascimento limita a produção em escala e encarece o processo de clonagem. Com isso, o uso dessa biotecnologia ainda não é viável para a produção de rebanhos clones objetivando a produção com manejo homogêneo. Contudo, a clonagem tem sido demandada pelo mercado de animais de elevado mérito genético, no qual os indivíduos a serem clonados têm maior valor econômico e não exigem produção em quantidade, de modo que empresas de produção in vitro de embriões no Brasil, China e Estados Unidos têm oferecido esse serviço. Assim, animais de várias raças já foram clonados e é possível encontrar sêmen de touros clones de Angus e Gir, por exemplo, sendo comercializados por centrais de inseminação artificial. Animais clones devem ser registrados nas associações das respectivas raças. Para as raças zebuínas, exige-se que tanto o doador da célula como a doadora do oócito sejam animais registrados e que ao nome do animal clone seja acrescido a expressão "TN" (transferência nuclear), além da marcação a fogo da sigla "TN" na perna esquerda até a desmama.

Uma questão recorrente é se animais clones teriam alguma diferença na qualidade da carne ou do leite produzido. Em 2008, foi definido pelo Departamento de Alimentos e Medicamentos Norte-Americano (U. S. Food and Drug Administration – FDA), depois de intensivas avaliações de segurança do alimento e ensaios de riscos à saúde, que a carne e o leite de bovinos, cabras e porcos clones e de seus filhos são tão seguros quanto o alimento que se come no dia-dia (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2008). Apesar disso e devido ao alto valor de um animal clone, ainda não se encontram no mercado leite e carne de animais clones, sendo usados somente como animais portadores e disseminadores de genética. Por outro lado, em setembro de 2015, o Parlamento Europeu votou por banir animais clones, seus descendentes e a comercialização de produtos de clones e descendentes nos países da comunidade europeia (EP WANTS..., 2015). A principal justificativa foi o bem-estar animal, relatando a baixa eficiência da clonagem em produzir animais vivos saudáveis. No entanto, o banimento não proíbe pesquisas com clonagem ou seu uso em animais em risco de extinção. Ao prevalecer o banimento para comercialização, poderá haver algum impacto em exportações de leite e carne bovina e suína para a Comunidade Europeia a partir de países que possuem animais clones como doadores de genética. Além disso, está em estudo na Comissão Europeia a necessidade de rotular os animais e produtos de clones e descendentes, o que poderia exigir que todos os animais e produtos, mesmo não clones, fossem rastreados individualmente, aumentando os custos de produção.

ENGENHARIA GENÉTICA EM EMBRIÕES

A engenharia genética é uma ferramenta usada na agricultura desde a década de 1990. Sementes geneticamente modificadas de soja e milho são comercializadas em diferentes países e têm contribuído para aumentar a produtividade e o retorno financeiro para os produtores (BROOKES; BARFOOT,

2015). Apesar disso, ainda há algum embate ideológico entre defensores de produtos convencionais e os de produtos geneticamente modificados. Na pecuária, o uso da engenharia genética tem se limitado à pesquisa, pois além da modificação gênica em si, é também necessário manipular gametas e zigotos para gerar embriões que darão origem aos animais geneticamente modificados. Soma-se a isso o longo intervalo entre gerações, que inclui o tempo de gestação, crescimento e início da produção, para que haja certeza do sucesso da modificação desejada. A exceção é a produção de animais geneticamente modificados capazes de secretar medicamentos recombinantes de utilidade para a saúde humana (biofábricas), onde poucos indivíduos são capazes de produzir grande quantidade de medicamentos. Um bom exemplo são cabras geneticamente modificadas que secretam no leite antitrombina recombinante que, depois de extraída e purificada, é comercializada com o nome de ATryn® (KLING, 2009) e recomendada para prevenção de tromboembolia em pacientes com deficiência dessa proteína.

Apesar das restrições atuais, a engenharia genética possui grande potencial para revolucionar a produção de alimentos de origem animal. Recentes processos biotecnológicos permitem a manipulação do embrião e de seu genoma, abrindo novas perspectivas para aplicação na produção em escala de animais mais saudáveis e produtivos. Em nossos estudos, confirmamos que é possível gerar embriões e animais nascidos geneticamente modificados através da simples injeção perivitelínica de vetores lentivirais contendo o gene de interesse em oócitos bovinos. Com esse procedimento, obtivemos um bovino recém-nascido com a inserção do gene de uma proteína verde fluorescente (CAMARGO et al., 2016), mas que veio a óbito no mesmo dia.

Mais recentemente, surgiram novos métodos de manipulação gênica que permitem editar o genoma com maior precisão e segurança e, por isso, são chamados de 'edição do genoma'. Tais métodos fazem uso de enzimas intracelulares (nucleases) que cortam o DNA e que orientadas por guias genômicos, sejam proteínas ou pequenos RNA, são capazes de quebrar o DNA em local especifico e remover ou inserir uma sequencia gênica (GAJ et al., 2013). Um dos métodos mais recentes é denominado sistema *Clustered Regularly-interspaced Short Palindromic Repeats associated to Cas9 Endonuclease* (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014), ou Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas associadas à Endonuclease Cas9. A eficiência desse sistema tem sido mostrada em diferentes tipos de células de animais e plantas (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; SAMANTA et al., 2016). Em bovinos, os estudos são ainda incipientes, mas devem também permitir a edição do genoma de um embrião com mais segurança e precisão.

A expectativa é que essas biotecnologias possam aumentar a frequência de alelos favoráveis a características produtivas. Em uma simulação, foi mostrado que a edição de 20 nucleotídeos associados a características quantitativas (QTN) poderia dobrar o ganho genético em bovinos ao longo de gerações quando vinculado à seleção genômica (JENKO et al., 2015). Como características quantitativas podem ser influenciadas por um grande numero de QTNs, somente procedimentos que permitam múltiplas edições do genoma embrionário, como o sistema CRISPR/Cas9, teriam sucesso. Espera-se que no futuro, com a descoberta de QTNs associados a diferentes características quantitativas, possa-se editar o genoma de acordo com o fenótipo desejado. Exemplo hipotético seria

promover características de tolerância ao estresse térmico ou resistência a carrapatos, presentes em zebuínos, para bovinos de origem europeia.

Sistemas de edição gênica poderão também ser usados para impedir que genes letais ou não desejados sejam expressos pelo animal. Nesse caso, uma mutação é induzida com precisão no genoma embrionário e impede o gene em questão de ser expresso. Esse modelo geralmente depende de apenas um gene e por isso é mais fácil de ser alcançado, de modo que existem diferentes grupos de pesquisa usando sistemas de edição gênica para a inibição da expressão de genes. Um exemplo do uso na pecuária leiteira é a inibição da expressão do gene da beta-lactoglobulina. Essa proteína é responsável por boa parte da alergia ao leite de vaca na população (FIOCCHI et al., 2010) e com a inibição de seu gene nos embriões será possível gerar vacas que produzam leite hipoalergênico para atender a um nicho no mercado de lácteos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As biotecnologias reprodutivas têm tido papel de destaque no desenvolvimento da pecuária de leite e devem continuar sendo importantes à medida que novas tecnologias surgem. Um exemplo é a seleção genômica, onde por meio da PIVE, poderá ser usada para selecionar embriões ao invés de animais, reduzindo o custo com receptoras e aumentando o nascimento de animais de alto valor genético.

A IATF tem sido uma ferramenta fundamental para manter os índices de fertilidade do gado leiteiro. Entretanto, um maior entendimento das razões das falhas na concepção pode melhorar esses índices, pois, dadas suas causas multifatoriais, o estudo aprofundado do complexo fertilidade ainda é necessário. O uso de sêmen sexado em programas de IATF tem crescido nos últimos anos, apesar de ainda estar restrito a poucos rebanhos no Brasil. Para que ocorra uma maior disseminação de seu uso na IATF entre os produtores de leite, é necessário melhorar a fertilidade espermática e adequar os protocolos para uso na rotina das fazendas e obter-se ganho genético considerável no rebanho brasileiro.

A Pive vem sendo amplamente utilizada em sistemas leiteiros como ferramenta para programas de melhoramento genético. O crescimento do uso dessa biotécnica é esperado em razão do grande dinamismo que ela confere às diferentes categorias animais, que podem ser novilhas, vacas lactantes ou prenhes e ainda permanecerem como doadoras de oócitos. O uso do sêmen sexado, com maior taxa de nascimento de fêmeas, é uma grande vantagem para os produtores de leite, ainda que não esteja disponível no momento para todas as raças. Em algumas propriedades, embriões Pive fertilizados com sêmen sexado já têm sido usados para gestar vacas em lactação, o que resulta aumento no número de bezerras nascidas com maior mérito genético. Essa estratégia permite aumentar a intensidade de seleção através da disponibilidade de maior número de novilhas de reposição com genética elevada, com reflexo direto no ganho genético do rebanho. A expectativa é que, com a eficiência da Pive e de processos relacionados como a criopreservação de embriões, mais propriedades leiteiras possam adotar essa estratégia focando o melhoramento genético. Porém, é importante

ressaltar a necessidade de um programa eficiente de seleção genética dos animais superiores, para que bons resultados sejam alcançados e para que haja efetivo melhoramento do rebanho.

A clonagem animal deverá continuar a ser utilizada para gerar clones cópias de animais de alto valor genético, mas poderá futuramente ser associada a programas de seleção genômica onde embriões ou fetos selecionados genomicamente poderão ser clonados, gerando rebanhos homogêneos. Contudo, isso dependerá também do aumento da eficiência da clonagem. Por outro lado, o avanço da engenharia genética poderá, em médio a longo prazo, contribuir para o aumento da produtividade na pecuária de leite. Aspectos genéticos relacionados à melhoria da saúde do animal, como resistência a doenças e tolerância ao estresse térmico, poderão ser manipulados pela edição gênica e refletirem positivamente na produção e na qualidade do leite. Outras possibilidades envolvem a produção de leite enriquecido com nutrientes benéficos à saúde humana, como o ômega 3, ou a geração de vacas leiteiras que possuam maior capacidade de aproveitamento de dietas de baixa digestibilidade, seja pela modificação de genes do animal ou dos microrganismos de seu rúmen, aumentado a capacidade de digestão ruminal. Esse aspecto pode ter maior importância em regiões tropicais, onde pastagens de alta digestibilidade são menos comuns.

REFERÊNCIAS

AHUMADA, C. J.; SALVADOR, I.; CEBRIAN-SERRANO, A.; LOPERA, R.; SILVESTRE, M. A. Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on in vitro embryo development and quality. **Animal**, v. 7, n. 3, p. 455-462, 2013.

ANDERSSON, M.; TAPONEN, J.; KOMMERI, M.; DAHLBOM, M. Pregnancy rates in lactating Holstein–Friesian cows after artificial insemination with sexed sperm. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. 2, p. 95-97, 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. **Index ASBIA mercado 2014**. Uberaba, 2014. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2014.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2016.

AVERY, B.; JORGENSEN, C. B.; MADISON, V.; GREVE, T. Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 32, n. 3, p. 265-270, 1992.

BARUSELLI, P. S.; SOUZA, A. H. S.; MARTINS, C. M.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. S.; AYRES, H.; ANDRADE, A. F. C.; RAPHAEL, C. F.; ARRUDA, R. P. Sêmen sexado: inseminação artificial e transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 3, p. 374-381, 2007.

BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; RATH, D.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Can bovine in vitro-matured oocytes selectively process X- or Y-sorted sperm differentially? **Biology of Reproduction**, v. 79, n. 4, p. 594-597, 2008.

BERMEJO-ALVAREZ, P.; RIZOS, D.; RATH, D.; LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A. Sex determines the expression level of one third of the actively expressed genes in bovine blastocysts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 8, p. 3394-3399, 2010.

BISINOTTO, R. S.; RIBEIRO, E. S.; MARTINS, L. T.; MARSOLA, R. S.; GRECO, L. F.; FAVORETO, M. G.; RISCO, C. A.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. Effect of interval between induction of ovulation and artificial insemination (AI) and supplemental progesterone for resynchronization on fertility of dairy cows subjected to a 5-d timed AI program. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 12, p. 5798-5808, 2010.

BOLS, P. E.; VANDENHEEDE, J. M.; SOOM, A. van; KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v. 43, n. 3, p. 677-687, 1995.

BROOKES, G.; BARFOOT, P. Global income and production impacts of using GM crop technology 1996-2013. **GM Crops Food**, v. 6, n. 1, p. 13-46, 2015.

CAMARGO, L. S. A. QUINTÃO, C. C. R.; DENICOL, A. C.; IGUMA, L. T.; CARVALHO, B. C.; SIQUEIRA, L. G. B.; VIANA, J. H. M. Effect of trichostatin on production of bovine embryos produced by somatic cel nuclear transfer and subsequent gestations. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, supl. 1, p. 442, 2011.

CAMARGO, L. S. A.; GONÇALVES, F. S.; PEREIRA, M. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; TOLEDO, J. R.; PARRA, N. C.; QUINTÃO, C. C. R.; VIANA, J. H. M. Pregnancy and birth of calves derived from in vitro-matured oocytes injected with lentiviral vector carrying GFP gene. **Transgenic Research**, v. 25, n. 1, p. 118-119, 2016.

CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VIANA, J. H. M.; ARAÚJO, M. C. C. Efeito de concentração espermática e período de incubação oócito-espermatozóide na fecundação *in vitro* em bovinos da raça Gir. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 709-715, 2002.

CHANG, M. C. Fertilization of rabbit ova in vitro. **Nature**, v. 184, n. 7, p. 466-467, 1959.

CHEN, Z.; ROBBINS, K. M.; WELLS, K. D.; RIVERA, R. M. Large offspring syndrome: a bovine model for the human loss-of-imprinting overgrowth syndrome Beckwith-Wiedemann. **Epigenetics**, v. 8, n. 6, p. 591-601, 2013.

DEJARNETTE, J. M.; NEBEL, R. L.; MARSHALL, C. E. Evaluating the success of sex-sorted semen in US dairy herds from on farm records. **Theriogenology**, v. 71, n. 1, p. 49-58, 2009.

DIEZ, C.; HEYMAN, Y.; LE BOURHIS, D.; GUYADER-JOLY, C.; DEGROUARD, J.; RENARD, J. P. Delipidating in vitro-produced bovine zygotes: effect on further development and consequences for freezability. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 923-936, 2001.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1258096, 2014.

EL-ZARKOUNY, S. Z.; CARTMILL, J. A.; HENSLEY, B. A.; STEVENSON, J. S. Pregnancy in dairy cows after synchronized ovulation regimens with or without presynchronization and progesterone. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 1024-1037, 2004.

EP WANTS animal cloning ban extended to offspring and imports. **European Parliament News**, Sep. 2015. Disponível em: <http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?type=IM-PRESS&reference=20150903IPR91517&format=XML&language=EN>. Acesso em: 19 abr. 2016.

FIOCCHI, A.; BROZEK, J.; SCHÜNEMANN, H.; BAHNA, S. L.; BERG, A. von; BEYER, K.; BOZZOLA, M.; BRADSHER, J.; COMPALATI, E.; EBISAWA, M.; GUZMÁN, M. A.; LI, H.; HEINE, R. G.; KEITH, P.; LACK, G.; LANDI, M.; MARTELLI, A.; RANCÉ, F.; SAMPSON, H.; STEIN, A.; TERRACCIANO, L.; VIETHS, S. World Allergy Organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines. **Pediatric Allergy and Immunology**, v. 21, n. 21, p. 1-125, 2010.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Animal cloning and food safety. **FDA Consumer Health Information**, Jan. 2008. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/ForConsumers/ConsumerUpdates/UCM203337.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2016.

FRICKE, P. M.; GUENTHER, I. J. N.; WILTBANK, M. C. Efficacy of decreasing the dose of GnRH used in a protocol for synchronization of ovulation and timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 50, n. 8, p. 1275-1284, 1998.

GAJ, T.; GERSBACH, C. A.; BARBAS, C. F. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 397-405, 2013.

GARCIA-ISPIERTO, I.; LOPEZ-GATIUS, F. Effects of different five-day progesterone-based fixed-time AI protocols on follicular/luteal dynamics and fertility in dairy cows. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 60, n. 6, p. 426-432, 2014.

HAMANO, K. Sex preselection in bovine by separation of X- and Y-chromosome bearing spermatozoa. **The Journal of Reproduction Development**, v. 53, n. 1, p. 27-38, 2007.

HERLIHY, M. M.; GIORDANO, J. O.; SOUZA, A. H.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; KESKIN, A.; NASCIMENTO, A. B.; GUENTHER, J. N.; GASKA, J. M.; KACUBA, S. J.; CROWE, M. A.; BUTLER, S. T.; WILTBANK, M. C. Presynchronization with double-ovsynch improves fertility at first postpartum artificial insemination in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 12, p. 7003-7014, 2012.

INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY. Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 33, n. 4, p. 9-18, 2015.

JENKO, J.; GORJANC, G.; CLEVELAND, M. A.; VARSHNEY, R. K.; WHITELAW, C. B. A.; WOOLLIAMS, J. A.; HICKEY, J. M. Potential of promotion of alleles by genome editing to improve quantitative traits in livestock breeding programs. **Genetic Selection Evolution**, v. 47, n. 1, p. 55, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4487592/>. Acesso em: 22 abr. 2016.

KARAKAYA, E.; YILMAZBAS-MECITOGLU, G.; KESKIN, A.; ALKAN, A.; TASDEMIR, U.; SANTOS, J. E.; GUMEN, A. Fertility in dairy cows after artificial insemination using sex-sorted sperm or conventional semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 2, p. 333-337, 2014.

KASIMANICKAM, R.; CORNWELL, J. M.; NEBEL, R. L. Fertility following fixed-time AI or insemination at observed estrus in Ovsynch and Heatsynch programs in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 63, n. 9, p. 2550-2559, 2005.

KLING, J. First US approval for a transgenic animal drug. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 4, p. 302-304, 2009.

LANE, E. A.; AUSTIN, E. J.; CROWE, M. A. Oestrous synchronisation in cattle – current options following the EU regulations restricting use of oestrogenic compounds in food producing animals: a review. Animal Reproduction Science, v. 109, n. 1-4, p. 1-16, 2008.

LAZZARI, G.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; DUCHI, R.; KRUIP, T.; NIEMANN, H.; GALLI, C. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. Biology of Reproduction, v. 67, n. 3, p. 767-775, 2002.

LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. Theriogenology, v. 76, n. 9, p. 1594-1601, 2011.

MCDOUGALL, S. Effects of treatment of anestrous dairy cows with gonadotropin-releasing hormone, prostaglandin, and progesterone. Journal of Dairy Science, v. 93, n. 5, p. 1944-1959, 2010.

MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C. A.; MATTOS, R.; LOPES, F.; THATCHER, W. W. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. Journal of Dairy Science, v. 84, n. 7, p. 1646-1659, 2001.

MOSHKDANIAN, G.; NEMATOLLAHI-MAHANI, S. N.; POUYA, F.; NEMATOLLAHI-MAHANI, A. Antioxidants rescue stressed embryos at a rate comparable with co-culturing of embryos with human umbilical cord mesenchymal cells. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, v. 28, n. 4, p. 343-349, 2011.

OLIVEIRA, C. S.; SARAIVA, N. Z.; LIMA, M. R.; OLIVEIRA, L. Z.; SERAPIÃO, R. V.; GARCIA, J. M.; BORGES, C. A.; CAMARGO, L. S. Cell death is involved in sexual dimorphism during preimplantation development. Mechanisms of Development, v. 139, n. 1, p. 42-50, 2016a.

OLIVEIRA, C. S.; SARAIVA, N. Z.; LIMA, M. R.; OLIVEIRA, L. Z.; SERAPIÃO, R. V.; BORGES, C. A. V.; GARCIA, J. M.; CAMARGO, L. S. A. Kinetics data from bovine sex-specific embryo development from three diferente bulls. Data in Brief, v. 7, n. 1, p. 1211-1216, 2016a.

OLIVEIRA, C. S.; SARAIVA, N. Z.; SOUZA, M. M.; TETZNER, T. A.; LIMA, M. R.; GARCIA, J. M. Effects of histone hyperacetylation on the preimplantation development of male and female bovine embryos. Reproduction Fertility and Development, v. 22, n. 6, p. 1041-1048, 2010.

OLIVEIRA, E. B.; WATANABE, Y. F.; GARCIA, J. M. Establishment of an IVF program for zebu cattle (Bos indicus) in Brazil. Theriogenology, v. 41, n. 1, p. 188, 1994.

PANARACE, M.; AGÜERO, J. I.; GARROTE, M.; JAUREGUI, G.; SEGOVIA, A.; CANÉ, L.; GUTIÉRREZ, J.; MARFIL, M.; RIGALI, F.; PUGLIESE, M.; YOUNG, S.; LAGIOIA, J.; GARNIL, C.; PONTES, J. E. F.; ERENO JUNIO, J. C.; MOWER, S.; MEDINA, M. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. Theriogenology, v. 67, n. 1, p. 142-151, 2007.

PEIPPO, J.; KURKILAHTI, M.; BREDBACKA, P. Developmental kinetics of in vitro produced bovine embryos: the effect of sex, glucose and exposure to time-lapse environment. Zygote, v. 9, n. 2, p. 105-113, 2001.

PONTES, J. H.; SILVA, K. C.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P.; VIEIRA, P. H.; FAIFER, F. S.; STERZA, F. A.; 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, v. 74, n. 8, p. 1349-1355, 2010.

POWELL, A. M.; TALBOT, N. C.; WELLS, K. D.; KERR, D. E.; PURSEL, V. G.; WALL, R. J. Cell donor influences success of producing cattle by somatic cell nuclear transfer. Biology of Reproduction, v. 71, n. 1, p. 210-216, 2004.

PURSLEY, J. R.; KOSOROK, M. R; WILTBANK, M. C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. Journal of Dairy Science, v. 80, n. 2, p. 301-306, 1997.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2alpha and GnRH. Theriogenology, v. 44, n. 7, p. 915-923, 1995.

RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PÉREZ-GARNELO, S.; FUENTE, J. de la; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 1, p. 236-243, 2003.

SÁ FILHO, M. F.; MENDANHA, M. F.; SALA, R. V.; CARVALHO, F. J.; GUIMARÃES, L. H.; BARUSELLI, P. S. Use of sex- sorted sperm in lactating dairy cows upon estrus detection or following timed artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 143, n. 1-4, p. 19-23, 2013.

SAMANTA, M. K.; DEY, A.; GAYEN, S. CRISPR/Cas9: an advanced tool for editing plant genomes. **Transgenic Research**, Mar. 2016. Disponível em: <http://link.springer.com/article/10.1007/s11248-016-9953-5/fulltext.html>. Acesso em: 22 abr. 2016.

SAMPAIO, P. C.; ALVES, N. G.; SOUZA, J. C.; SALES, J. N.; CARVALHO, R. J.; LIMA, R. R.; TEIXEIRA, A. A.; NOGUEIRA, G. P.; ASCARI, I. J. Comparative efficacy of exogenous eCG and progesterone on endogenous progesterone and pregnancy in Holstein cows submitted to timed artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 162, n. 1, p. 88-94, 2015.

SANTOS, J. E. P.; NARCISO, C. D.; RIVERA, F.; THATCHER, W. W.; CHEBEL, R. C. Effect of reducing the period of follicle dominance in a timed AI protocol on reproduction of dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 7, p. 2976-2988, 2010.

SEIDEL, G. E. Update on sexed semen technology in cattle. **Animal**, v. 8, n. 1, p. 160-164, 2014.

SOUZA, A. H.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; WILTBANK, M. C. A new presynchronization system (Double-Ovsynch) increases fertility at first postpartum timed AI in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 70, n. 2, p. 208-215, 2008.

SOUZA, A. H.; VIECHNIESKI, S.; LIMA, F. A. Effects of equine chorionic gonadotropin and type of ovulatory stimulus in a timed-AI protocol on reproductive responses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 72, n. 1, p. 10-21, 2009.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Nascimento de bezerra gerada com auxilio das técnicas de punção folicular e fertilização *in vitro* no Estado de Minas Gerais. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 4, p. 1-3, 2001.

WARD, F. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 1, p. 47-55, 2001.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385, n. 6619, p. 810-813, 1997.

WILTBANK, M. C.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 17-29, 2006.

XU, K. P.; YADAV, B. R.; KING, W. A.; BETTERIDGE, K. J. Sex-related differences in developmental rates of bovine embryos produced and cultured in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, n. 4, p. 249-252, 1992.

XUE, Z.; HUANG, K.; CAI, C.; CAI, L.; JIANG, C. Y.; FENG, Y.; LIU, Z.; ZENG, Q.; CHENG, L.; SUN, Y. E.; LIU, J. Y.; HORVATH, S.; FAN, G. Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. **Nature**, v. 500, n. 7464, p. 593-597, 2013.

YOUNG, L. E.; SINCLAIR, K. D.; WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Reviews of Reproducion**, v. 3, n. 3, p. 155-163, 1998.