

CENTRO UNIVERSITÁRIO BRASILEIRO
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MATEUS HENRIQUE LEAL CORRÊA
MATEUS JOSÉ GOMES DA SILVA
POLYANA MOURY FERNANDES MELLO

**SEXAGEM DE SÊMEN E TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES NA PRODUÇÃO DE VACAS
LEITEIRAS: REVISÃO DE LITERATURA**

Recife/2023

MATEUS HENRIQUE LEAL CORRÊA
MATEUS JOSÉ GOMES DA SILVA
POLYANA MOURY FERNANDES MELLO

**SEXAGEM DE SÊMEN E TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES NA PRODUÇÃO DE VACAS
LEITEIRAS: REVISÃO DE LITERATURA**

Monografia apresentada ao Centro
Universitário Brasileiro - UNIBRA, como
requisito parcial para a Obtenção do título
de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientadora: Dr^a. Sandra Silva Duarte

Recife/2023

Ficha catalográfica elaborada pela
bibliotecária: Dayane Apolinário, CRB4- 2338/ O.

C824s Corrêa, Mateus Henrique Leal.
Sexagem de sêmen e transferência de embriões na produção de vacas
leiteiras: revisão de literatura/ Mateus Henrique Leal Corrêa; Mateus José
Gomes da Silva; Polyana Moury Fernandes Mello. - Recife: O Autor, 2023.
40 p.

Orientador(a): Dra. Sandra Silva Duarte.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro Universitário
Brasileiro – UNIBRA. Bacharelado em Medicina Veterinária, 2023.

Inclui Referências.

1. Bovinos. 2. Leite. 3. Produção. 4. Sêmen. 5. Sexagem. I. Alves,
Rebecca Melo de Santana. II. Silva, Therumym Sued Souza da. III.
Centro Universitário Brasileiro. - UNIBRA. IV. Título.

CDU: 619

MATEUS HENRIQUE LEAL CORRÊA
MATEUS JOSÉ GOMES DA SILVA
POLYANA MOURY FERNANDES MELLO

**SEXAGEM DE SÊMEN E TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES NA PRODUÇÃO DE VACAS
LEITEIRAS: REVISÃO DE LITERATURA**

Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária, pelo Centro Universitário Brasileiro - UNIBRA, por uma comissão examinadora formada pelos seguintes professores:

Profa.º Drª Sandra Silva Duarte

Professor (a) Examinador (a)

Professor (a) Examinador (a)

Recife - PE, ___ de _____ de 2023

NOTA: _____

Dedicamos esse trabalho à Deus, que nos deu forças para atravessar esse caminho, aos nossos pais que foram nosso suporte, aos amigos que fizemos nessa caminhada. Sem cada um deles nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos primeiramente à Deus pelas oportunidades e por nunca ter nos dado um fardo maior do que o que poderíamos suportar. Gostaríamos de agradecer à família, em especial aos nossos pais. Prestamos ainda nossos agradecimentos à orientadora deste trabalho, Sandra Silva Duarte. Aproveitamos também para agradecer à todos que nos suportaram nessa fase, em especial aos bons amigos que fizemos nos anos de faculdade e amigos professores que nos auxiliaram no presente projeto, bem como os que permaneceram diante das dificuldades.

“Como todos os homens, por natureza, desejam saber a verdade, também neles é natural o desejo de fugir dos erros e de refutá-los quando têm essa faculdade.” (TOMÁS DE AQUINO)

SEXAGEM DE SÊMEN E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES NA PRODUÇÃO DE VACAS LEITEIRAS: REVISÃO DE LITERATURA

Mateus Henrique Leal Corrêa
Mateus José Gomes da Silva
Polyana Moury Fernandes Mello
Sandra Silva Duarte¹

Resumo: Este trabalho consiste em uma revisão de literatura sobre a sexagem de sêmen e de embriões na produção de vacas leiteiras. A presente pesquisa se justifica na importância e nos potenciais benefícios que essa técnica pode trazer para os produtores de leite. Em um contexto em que a eficiência e a produtividade são fundamentais para o sucesso da atividade leiteira, a seleção do sexo dos animais pode desempenhar um papel significativo na gestão do rebanho e no direcionamento da produção. Tendo como objetivo investigar informações sobre a biotecnologia da sexagem seminal, além de resultados de pesquisas já realizadas no Brasil com a utilização do sêmen sexado para inseminação artificial e superovulação em bovinos. Para tanto, foram realizadas buscas nas bases de dados Portal Capes, Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências da Saúde – LILACS via Biblioteca Virtual em Saúde – BVS, Cientific Electronic Library Online (SCIELO), além da revista eletrônica Pubvet, incluindo na pesquisa artigos entre 2005 a 2023. A sexagem de sêmen e embriões na produção de vacas leiteiras é uma técnica promissora que traz benefícios significativos para a indústria pecuária. Permite uma seleção precisa do sexo, melhoramento genético, planejamento reprodutivo eficiente e adaptação à demanda de mercado.

Palavras-chave: Bovinos. Leite. Produção. Sêmen. Sexagem.

¹Professora da UNIBRA, Doutora em Ciência Animal. Email: sandra.duarte@grupounibra.com

SEMEN SEXING AND EMBRYO TRANSFER IN DAIRY COW PRODUCTION: LITERATURE REVIEW

Mateus Henrique Leal Corrêa

Mateus José Gomes da Silva

Polyana Moury Fernandes Mello

Sandra Silva Duarte¹

ABSTRACT: This work consists of a literature review on the sexing of semen and embryos in the production of dairy cows. This research is justified by the importance and potential benefits that this technique can bring to milk producers. In a context where efficiency and productivity are fundamental for the success of the dairy activity, the selection of animal sex can play a significant role in herd management and production direction. Aiming to investigate information about the biotechnology of seminal sexing, in addition to research results already carried out in Brazil with the use of sexed semen for artificial insemination and superovulation in cattle. For that, searches were carried out in the portal CAPES, Latin American and Caribbean literature in health sciences - LILACS databases via the Virtual Health Library - BVS, Scientific Electronic Library Online (SciELO), in addition to the electronic journal PubVet, including in the search articles from 2005 to 2023. Semen and embryo sexing in dairy cow production is a promising technique that brings significant benefits to the livestock industry. It allows accurate sex selection, genetic improvement, efficient reproductive planning and adaptation to market demand.

Keywords: Cattle. Milk. Production. Semen. Sexing.

¹Professora da UNIBRA, Doutora em Ciência Animal. Email: sandra.duarte@grupounibra.com

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Top 10 dos países em produção de leite cru de gado	13
Figura 2 — Avaliação do momento ideal para inseminação.....	17
Figura 3 — Separação de espermatozoides em citômetro de fluxo	19

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	METODOLOGIA	12
3	DESENVOLVIMENTO	13
3.1	PRODUÇÃO LEITEIRA DE BOVINOS NO BRASIL.....	13
3.2	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM BOVINOS.....	14
3.3	ESPERMATOGÊNESE.....	17
3.4	DIFERENCIAÇÃO CROMOSSÔMICA.....	18
3.5	TÉCNICAS DE SEXAGEM DE ESPERMATOZÓIDES BOVINOS.....	19
3.5.1	CITOMETRIA DE FLUXO.....	19
3.5.2	SEXAGEM IMUNOLOGICA	21
3.5.3	CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE - PERCOLL.....	22
3.6	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS	23
3.6.1	SUPEROVULAÇÃO	26
3.6.2	SELEÇÃO DE DOADORAS	27
3.6.3	SELEÇÃO DE RECEPTORAS	27
3.7	SEXAGEM DE EMBRIÕES EM BOVINOS	28
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
	REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

A sexagem de sêmen e embriões são técnicas utilizadas para identificar o sexo dos gametas ou embriões, respectivamente, com o objetivo de selecionar aqueles do sexo desejado para a produção de descendentes ou para transferência em técnicas de reprodução assistida (SEIDEL, 2014).

O uso de sêmen sexado permite escolher o sexo dos descendentes antes do início da gravidez ou da produção de embriões utilizando técnicas de reprodução. Assim, torna-se possível planejar a proporção de nascimentos entre machos e fêmeas de acordo com as necessidades do rebanho e do mercado. Por exemplo, em rebanhos de corte é possível gerar animais machos com características desejadas, como crescimento e conversão de alimentos, enquanto em rebanhos de leite a melhoria genética das fêmeas é intensificada, programando a quantidade de novilhas de reposição anualmente (ZANON, 2016)

A implementação da sexagem de sêmen ou do embrião aumenta a produtividade, pois permite um avanço genético mais rápido com a seleção de animais do sexo desejado. Na bovinocultura, o sexo do bezerro é de suma importância para o tipo de produção a qual se destina o animal (VILLADIEGO *et al.*, 2018).

No que se refere às vantagens obtidas através da sexagem de embriões em bovinos de leite acabam por tornar a técnica valiosa na reprodução, permitindo a seleção do sexo dos embriões e facilitando o melhoramento genético do rebanho. Essa abordagem oferece aos produtores a oportunidade de maximizar a produção leiteira e selecionar características desejáveis, contribuindo para o aumento da eficiência e rentabilidade da indústria leiteira (ROCHA; SANTOS; PICCININ, 2007).

Neste sentido, temos a utilização de algumas técnicas para determinar e/ou manipular o sexo do animal como a citometria de fluxo que é uma das técnicas mais precisas empregadas, na qual é possível separar os espermatozoides em duas populações, uma contendo espermatozoides com cromossomo X e outra com espermatozoides com cromossomo Y (GARNER; EVANS; SEIDEL, 2012).

O uso de estratégias de conservação *in situ* (manutenção e recuperação de populações viáveis no seu meio natural) permite a manutenção de populações

animais em ambientes adaptados. No entanto, às vezes, tais esforços não são suficientes para garantir a diversidade genética necessária para um ecossistema saudável. Para contornar essa limitação, foram desenvolvidas novas técnicas de conservação, como a criopreservação de gametas, sexagem seminal e inseminação artificial, entre outras formas de reprodução assistida (ART). (ANDRABI; MAXWELL, 2007).

No Brasil, a sexagem já se tornou relevante no âmbito comercial, pois diversos profissionais e empresas de biotecnologia da reprodução estão oferecendo serviços para realizar a sexagem a nível comercial (PASSAGLIA e CHAVES, 2007).

O controle do sexo nos bovinos é um assunto de grande valor comercial, pois os motivos da seleção dos sexos na produção de leite é evidente: a gestação e o nascimento de machos resultam em uma diminuição da produtividade e aumento nos custos de produção (THEDY, 2010).

Sendo assim, este trabalho visa explorar informações sobre a biotecnologia da sexagem seminal, especificamente o uso do sêmen sexado para inseminação artificial, além de discutir sobre a técnica de transferência e sexagem de embriões.

1 METODOLOGIA

O presente estudo trata-se de uma revisão de literatura, realizada no período de abril a julho de 2023.

Para compor a amostra, foram selecionados artigos provenientes de bases de dados como Portal Capes, LILACS via BVS, SCIELO e Pubvet, além de portais oficiais disponíveis do Governo Federal e órgãos relacionados, como EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) e MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

Os critérios de inclusão foram artigos disponíveis online e publicados entre os anos de 2006 e 2023, nas línguas inglesa, espanhola ou portuguesa, que utilizaram a sexagem de sêmen e embriões em bovinos leiteiros. Os descritores utilizados foram Bovinos, Leite, Produção, Sêmen e Sexagem.

2 DESENVOLVIMENTO

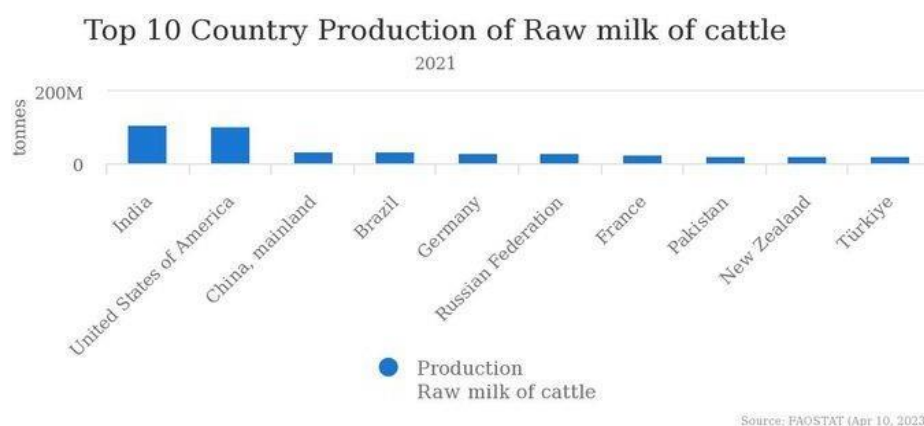
2.1 PRODUÇÃO LEITEIRA DE BOVINOS NO BRASIL

O leite é um dos alimentos de origem animal mais utilizados do mundo desde os tempos mais remotos, destacando-se como um produto versátil, com a capacidade de ser transformado em derivados como queijo, manteiga, iogurte e diversos outros (SIQUEIRA, 2019).

O leite desempenha um papel fundamental na alimentação humana e possui grande importância no ambiente produtivo e econômico mundial, especialmente em países em desenvolvimento e em sistemas de agricultura familiar. Nas últimas três décadas, houve um aumento significativo na produção global de leite, com um crescimento de mais de 50%, atingindo a marca de 769 milhões de toneladas em 2013. Esse aumento reflete a demanda crescente por produtos lácteos e a contribuição essencial do setor leiteiro para a segurança alimentar e a economia global (JUNG; MATTE JÚNIOR, 2017).

No cenário internacional, o Brasil vem se destacando na produção de insumos de origem agropecuária, em especial na produção de leite cru. Ocupando em 2021 a quarta posição no ranking mundial de produção leiteira, perdendo uma posição nos últimos anos para a China, que ocupa atualmente a terceira posição, de acordo com a Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO (FAOSTAT, 2021) (Figura 1).

Figura 1 — Top 10 dos países em produção de leite cru de gado.



Fonte: FAOSTAT (2021).

Com a necessidade em aumentar a produção de insumos de origem animal surgiram tecnologias desenvolvidas para aperfeiçoar a cadeia produtiva e facilitar a obtenção do produto final. Dentre essas técnicas, a sexagem espermática é uma biotecnologia que pode ser utilizada, pois possibilita a escolha do espermatozoide X, que vai gerar um embrião fêmea, mais desejável na cadeia de produção leiteira a qual se destina o animal (KHALAJZADEH; NEJATI-JAVAREMI; MEHRBANI YEGANEH , 2012).

Está técnica associada com técnicas reprodutivas como a inseminação artificial e a transferência de embriões permite um controle mais preciso na seleção do sexo dos descendentes, trazendo benefícios específicos para cada sistema de produção. Em rebanhos leiteiros, o uso do sêmen sexado na inseminação artificial aumenta a proporção de fêmeas, favorecendo a produção de leite pois garante a renovação do rebanho de novilhas, contribuindo assim para a produção de animais de maior valor zootécnico específico (MURTA; GOMES; MARTINEZ, 2013).

No que tange ao uso de sêmen convencional e sexado, a pecuária Brasileira vem registrando ano após ano, elevados índices de coletas de doses de sêmen bovino, sendo registrado o maior número de coleta no primeiro semestre de 2021, total de 10.788.006 doses de sêmen, em virtude de maior uso das biotécnicas de reprodução, as quais têm potencializado cada vez mais o mercado de melhoramento genético (ASBIA, 2021).

A utilização do sêmen sexado, juntamente com outras biotecnologias reprodutivas, tem sido sugerida como uma maneira de melhorar a eficiência produtiva de rebanhos, tanto em termos biológicos quanto econômicos. É importante destacar que a aplicação prática desse material biológico depende da relação custo- benefício, dos resultados de fertilidade, da eficiência e da facilidade de uso (DOMINGUEZ *et al.*, 2012).

2.2 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM BOVINOS

A inseminação artificial (IA) é uma técnica que consiste na deposição controlada do sêmen no aparelho genital feminino, por meio de instrumentos desenvolvidos com precisão. A IA é considerada uma das ferramentas mais eficazes no melhoramento genético animal, pois permite a dispersão dos genes dos animais comprovadamente superiores, garantindo assim a continuidade de suas raças. A IA

é uma poderosa biotecnologia da reprodução assistida, capaz de impactar positivamente vários programas do setor (SILVA, 2023).

Além disso o uso da (IA) ao longo da história desempenhou um papel fundamental na promoção da saúde e prevenção de doenças genitais em bovinos. Essa técnica tem sido utilizada como uma medida profilática para combater doenças como a brucelose, a tricomoníase e outras condições relacionadas (CENCI; BERTO, 2023).

A inseminação artificial se firmou como a primeira técnica de biotecnologia reprodutiva utilizada para o aprimoramento genético do gado bovino. Além da realização da seleção de touros com alto valor genético, a replicação de suas características para rebanhos comuns permite disseminar rapidamente os genes selecionados. É inegável que esses processos resultam em ganhos expressivos da genética em um período sensivelmente menor (BORGES *et al.*, 2022).

A inseminação artificial alcançou um grande sucesso no Brasil, com utilização em 4.463 municípios. Uma evolução de 4,1% em relação ao último ano. Observa-se que 80,1% desses municípios já utilizaram essa tecnologia. A coleta de 23.919.732 doses de sêmen e a importação de 11.978.662 doses resultaram em um crescimento significativo de 76,9%. O total de 35.898.394 doses indica um aumento de 40,4% da utilização da (IA) em relação ao ano anterior. O avanço foi notável e é evidência do constante progresso na indústria de reprodução assistida (BORGES *et al.*, 2022).

Essa técnica apresenta diversas vantagens em relação à monta natural, como a possibilidade de utilizar sêmen de touros de alta qualidade genética e a redução dos riscos de acidentes e doenças transmitidas durante o processo de monta. Além disso, a inseminação artificial permite o controle mais preciso do momento da fertilização, possibilitando a programação de melhorias genéticas no rebanho (CENCI; BERTO, 2023).

Existem diferentes tipos de inseminação artificial (IA) em bovinos, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a inseminação artificial por transferência de embriões (IATF-TE), cada um com suas particularidades e indicações específicas. Esses diferentes tipos de IA oferecem opções aos

produtores, permitindo a escolha do método mais adequado de acordo com as características do rebanho e os objetivos de seleção (CAMARGO, 2022).

A inseminação artificial em tempo fixo (IATF) trata-se de uma biotecnologia reprodutiva que visa elevar a eficiência reprodutiva dos rebanhos por meio da indução e sincronização da ovulação das fêmeas através de protocolos hormonais. Para isso, as vacas são submetidas a um protocolo hormonal que visa sincronizar o estro e a ovulação. Esse protocolo inclui o uso de hormônios que induzem a maturação folicular e a ovulação em um período preestabelecido. A inseminação é realizada após o término do protocolo, geralmente dentro de uma janela de tempo específica. A IATF permite uma programação mais precisa e facilita o manejo reprodutivo, especialmente quando há um grande número de animais a serem inseminados (PEIXOTO JUNIOR; TRIGO, 2015).

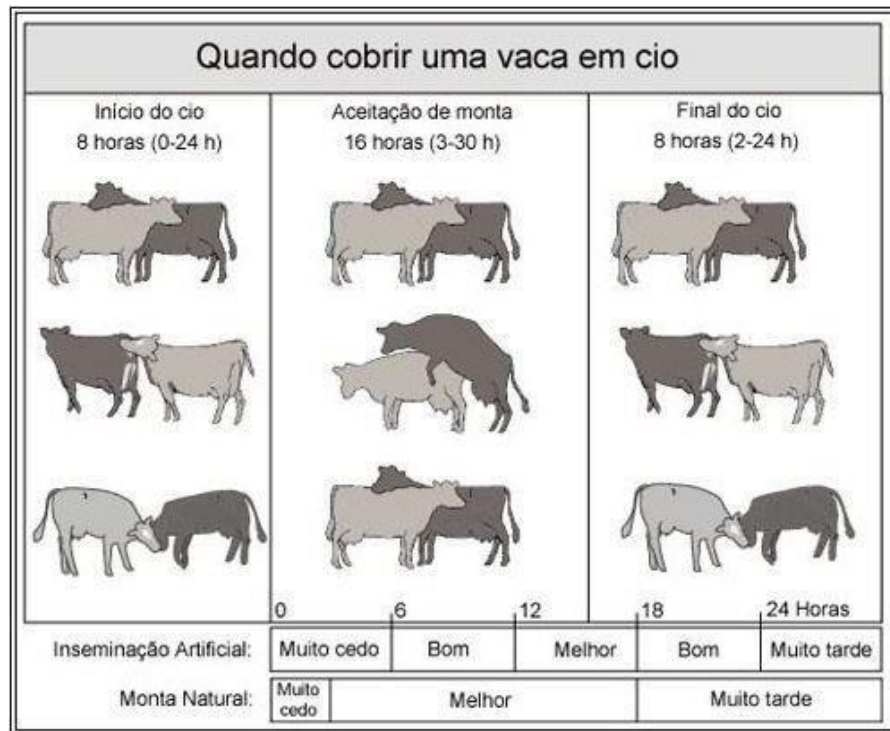
A IATF-TE é uma combinação da inseminação artificial com a transferência de embriões. Nesse método, além da inseminação propriamente dita, embriões de bovinos de alta qualidade genética são produzidos por meio de fertilização *in vitro* ou diretamente no aparelho reprodutivo da doadora e aspirados, posteriormente são transferidos para as receptoras. Primeiro, as doadoras são submetidas à estimulação hormonal para produzir múltiplos folículos ovarianos. Os óvulos podem ser coletados e fertilizados através de sêmen de touros selecionados *in vitro*. Os embriões resultantes são então transferidos para as receptoras, que podem ser vacas ou novilhas (LOBATO, 2016).

Os ovócitos são liberados dos ovários de 10 a 14 horas depois do fim do estro e podem sobreviver não fertilizados por 6 a 12 horas, todavia, os espermatozoides podem viver até 24 horas no trato reprodutivo da vaca. Uma técnica muito utilizada para aumentar a eficiência reprodutiva é a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF). No caso de monta natural, a vaca e o touro podem ser colocados juntos algumas horas depois que a vaca aceitou monta até quando ela não aceita mais ser montada (POLYCARPO, 2021).

Antes de realizar o processo de inseminação artificial em bovinos, é crucial avaliar a saúde geral e reprodutiva tanto das fêmeas quanto dos machos envolvidos.

É necessário verificar se a fêmea possui condições adequadas para uma gestação saudável, além de fazer a verificação correta do ciclo estral (Figura 2), enquanto os machos devem passar por exames andrológicos para garantir a qualidade dos espermatozoides (CENCI; BERTO, 2023).

Figura 2 — Avaliação do momento ideal para inseminação.



Fonte: Polycarpo (2021).

A detecção do estro é um dos maiores desafios nos programas de inseminação artificial. O uso de medicamentos para controlar o ciclo estral e a ovulação tem se mostrado extremamente eficaz e tem ganhado bastante popularidade na bovinocultura (SEVERO, 2009).

A Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF) oferece a possibilidade de realizar o procedimento em uma grande quantidade de animais em um único dia, eliminando o erro na hora de observar o momento ideal para a inseminação de acordo com o ciclo estral. Além disso, a IATF deve ser fundamentada sempre com base em argumentos técnicos e econômicos, levando em conta a relação custo-benefício e a realidade do produtor (DRESCH, 2018).

3.3 ESPERMATOGÊNESE

A espermatogênese é um processo responsável pela multiplicação e diferenciação das espermatogônias até a formação dos espermatozoides. Ocorre em três fases distintas, conhecidas como espermatocitogênese, meiogênese e espermiogênese. (AGUIAR; ARAÚJO; MOURA, 2006)

Durante a espermatocitogênese, as espermatogônias A1 passam por uma proliferação mitótica, resultando na geração de células mais especializadas, denominadas A2, A3, In, B1 e B2. Essa etapa é fundamental para o progresso do processo, fornecendo as bases necessárias para as fases subsequentes. (PELLEGRIN *et al*, 2009)

Na segunda fase, a meiogênese, as espermatogônias do tipo B2 se convertem em espermatócitos primários e, posteriormente, em espermatócitos secundários, por meio de duas divisões meióticas consecutivas. Essas divisões são cruciais para reduzir o número de cromossomos e garantir que os espermatozoides sejam células haploides, prontas para a fertilização. (PELLEGRIN *et al*, 2009)

Por fim, a terceira fase, a espermiogênese, desempenha um papel fundamental na maturação final dos espermatozoides. Nesse estágio, as espermatídes passam por aproximadamente 14 etapas bem definidas de diferenciação e remodelação. As espermatídes se transformam gradualmente em espermatozoides funcionais, com suas características distintas, como a formação da cauda flagelar e a reorganização dos componentes celulares. (PELLEGRIN *et al*, 2009)

Em síntese, a espermatogênese é um processo meticuloso, que envolve uma sequência precisa de eventos celulares e moleculares. Através das fases da espermatocitogênese, meiogênese e espermiogênese, as células germinativas masculinas são transformadas em espermatozoides maduros, prontos para desempenhar sua importante função reprodutiva.

3.4 DIFERENCIAÇÃO CROMOSSÔMICA

Algumas técnicas utilizam a diferença na quantidade de DNA e são baseadas na comprovação científica de que os espermatozóides dos mamíferos carregam o cromossomo X ou Y. Uma das principais diferenças entre esses cromossomos é o tamanho, pois o cromossomo X contém uma quantidade maior de DNA.

Nos bovinos, essa diferença fica entre 3,5% a 4,2%, sendo em torno de 4,0% nos bovinos em geral. Vale salientar que essa diferença de DNA nos cromossomos

sexuais dos bovinos também está relacionada à estrutura dos cromossomos. Os touros da espécie *Bos taurus* possuem um pequeno submetacêntrico como cromossomo Y, enquanto nos *Bos indicus*, o cromossomo Y é um pequeno acrocêntrico. (AGUIAR; ARAÚJO; MOURA, 2006)

3.5 TÉCNICAS DE SEXAGEM DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS

Os primeiros estudos de separação dos espermatozoides remontam à década de 19. Na época, tentou-se sem sucesso utilizar a centrifugação de sêmen para separar as duas populações de espermatozoides. Com o avanço das ciências biológicas, surgiram estudos que se concentraram no melhoramento genético com o escopo de tornar a produção mais eficaz (VILLADIEGO *et al.*, 2018).

A descoberta e identificação dos cromossomos sexuais permitiu considerar os espermatozoides iguais em suas características, apesar de apresentarem pequenas diferenças, estas são exploradas nas técnicas de sexagem, tais como peso e densidade. Assim, o sexo é determinado pela diferença da informação cromossômica transportada pelos espermatozoides, o que possibilitou avanços nas técnicas de produção de prole de determinado sexo (VILLADIEGO *et al.*, 2018).

A sexagem em bovinos é utilizada em programas de melhoramento genético para selecionar animais de sexo específico para diferentes fins, como a produção de leite ou carne. Em fazendas leiteiras, a seleção de bezerras pode ser vantajosa para aumentar o número de vacas leiteiras e, portanto, a produção de leite. (DOMINGUEZ *et al.*, 2012).

É importante destacar que, embora a técnica de sexagem do sêmen seja bastante avançada, ainda existe uma pequena taxa de erro na determinação do sexo dos embriões resultantes. Portanto, os produtores devem estar cientes dessa possibilidade e considerar esse fator ao tomar decisões relacionadas à compra de palhetas de sêmen sexado (BRITO *et al.*, 2019).

3.5.1 CITOMETRIA DE FLUXO

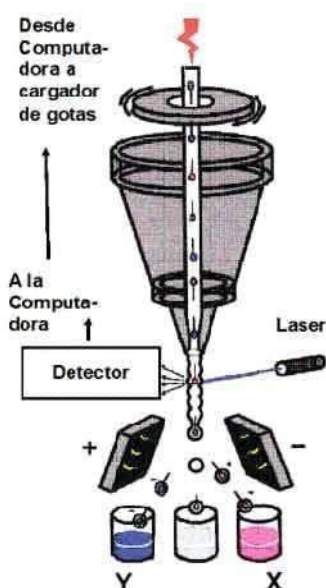
A citometria de fluxo é uma técnica que oferece uma acuidade de 90% para a

comercialização das doses sexadas (SHARPE E EVANS, 2009). A sexagem de sêmen é caracterizada pelo processo de separação de espermatozoides com cromossomo X do Y, devido à diferença de densidade de DNA. É considerada o mais reconhecido método físico de separação de espermatozoides, sendo amplamente aceito como um dos mais importantes avanços na tecnologia de reprodução. A pré-seleção de sexo tem o potencial de melhorar o manejo e a eficiência reprodutiva, assim como acelerar o progresso genético (ANTUNES, 2015)

A citometria de fluxo é uma das biotecnologias mais precisas empregadas nesse sentido e tem a patente licenciada, à nível mundial, para várias empresas através da Sexing Technologies, empresa americana de tecnologias reprodutivas. A separação dos espermatozoides machos e fêmeas tornou-se possível devido a diferença na quantidade de material genético entre eles, onde o espermatozoide X, que gera um animal fêmea, possui 4% a mais que o Y, que gera um animal macho (SEIDEL, 2014).

De acordo com Garner, Evans e Seidel (2012), a técnica consiste em passar o sêmen em mistura com uma substância fluorescente através do citômetro de fluxo. Assim, é emitido um feixe de luz no sêmen fluorescente em que é medida a intensidade de fluorescência de cada célula e são diferenciados em recipientes específicos. São separadas três amostras, onde o espermatozoide X é separado do espermatozoide Y por conter uma fluorescência mais intensa devido a sua densidade maior, restando ainda um recipiente para espermatozoides de descarte, que não foram detectados corretamente ou apresentam má qualidade (Figura 3).

Figura 3 — Separação de espermatozoides em citômetro de fluxo



Fonte: MOLINA, 2001.

Entretanto, a sexagem por citometria de fluxo ainda apresenta algumas limitações, como a possibilidade de redução na qualidade dos espermatozoides selecionados, a necessidade de um equipamento de alta tecnologia e a alta taxa de descarte de células durante o processo de separação. Além disso, o custo para a realização da sexagem por citometria de fluxo ainda é considerado elevado, o que pode limitar a sua aplicação em algumas regiões e produtores (VILLADIEGO *et al.*, 2018).

A Citometria de Fluxo, sendo a técnica mais usada, é dispendiosa e restrita, além de apresentar altos custos. Ela produz um número reduzido de espermatozoides sexados por hora e tem desvantagens, como a baixa eficiência e a necessidade de equipamento caro e profissionais qualificados. Esta baixa eficiência é devido ao fato de que, mesmo com todas as melhorias para acelerar o sistema, somente cerca de 6×10^6 espermatozoides de cada sexo por hora podem ser separados (MAIA, 2020).

3.5.2 SEXAGEM IMUNOLÓGICA

A sexagem imunológica se trata de um método alternativo para a determinação do sexo do espermatozoide. Thongkham *et al.* (2021) demonstraram a viabilidade da sexagem imunológica utilizando anticorpos monoclonais (Mab) direcionados a locais específicos presentes na membrana plasmática dos espermatozoides Y, com o objetivo de distinguir entre os espermatozoides X e Y. Essa abordagem é seguida por uma reação citotóxica que destrói seletivamente os espermatozoides Y, resultando em uma alta proporção de espermatozoides X no semên sexado.

Essa técnica de sexagem de semên imunológica não afeta adversamente a integridade do acrossoma dos espermatozoides nem a produção de semên sexado. Além disso, apresenta uma taxa de concepção semelhante à do smên convencional, com uma taxa de nascimento de bezerras superior a 74%, esses resultados fornecem uma prova de princípio para o uso de anticorpos monoclonais na sexagem imunológica de espermatozoides bovinos, mostrando que é possível selecionar espermatozoides de um sexo específico com eficácia e sem efeitos prejudiciais significativos (THONGKHAM *et al.*, 2021).

3.5.3 CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE - PERCOLL

Embora não seja uma técnica utilizada atualmente para sexagem, a centrifugação em gradiente de densidade de Percoll é a mais utilizada para seleção de espermatozoides em laboratório de Produção *In Vitro* (PIV) de bovinos. Isso se deve à alta recuperação celular e motilidade espermática proporcionada por esse método em comparação com outros. A técnica de Percoll consiste na formação de um gradiente de densidade gradual, no qual a camada superior é menos densa e, gradualmente, aumenta em direção à camada inferior (MISSIO, 2018).

Segundo explica Wilhelm (2014) utilizar Percoll torna o processo de sexagem mais simples, econômico e menos prejudicial para o gameta. Uma grande vantagem é que não é preciso avaliar cada célula individualmente, pois vários espermatozoides podem ser sexados simultaneamente. A diferença de peso e densidade entre os cromossomos sexuais X e Y proporciona uma oportunidade de separar os espermatozoides.

Os espermatozoides portadores do cromossomo X ou Y são separados por centrifugação em gradiente de Percoll com acuidade de até 75%, com taxa de recuperação dos espermatozoides de 25%. Os gradientes de Percoll separam os espermatozoides X ou Y com a mesma eficiência, em razão da diferença de densidade eram utilizados para sexagem de fêmeas, independentemente da subespécie (*Bos taurus taurus* ou *Bos taurus indicus*). A porcentagem média de espermatozoides portadores do cromossomo Y, nas frações superior e inferior, permite identificar gradientes de alta, média e baixa eficiência de sexagem, medindo a qualidade do semên (LIMA; et al, 2011).

A amostra de sêmen é depositada nessas camadas e, em seguida, centrifugada para obter pellets contendo os espermatozoides selecionados. Desde sua criação, essa técnica foi continuamente aprimorada para se adequar às características do sêmen sexado, visto que os protocolos de seleção espermática para sêmen convencional não são adequados para essa finalidade (MISSIO, 2018).

Assim sendo, foi imprescindível realizar ajustes meticulosos, que contemplassem o acréscimo de gradientes e o aumento de sua intensidade, ao mesmo tempo em que se encurtava o tempo de centrifugação. O aprimoramento desses procedimentos de seleção espermática para o sêmen sexado reverbera por

múltiplos aspectos, não só pela diminuição do lapso de execução, mas por elevar a taxa de recuperação e conseqüentemente o número de oócitos inseminados/palhaeta, somado à economia de gastos (MISSIO, 2018).

Lima *et al.* (2011) fizeram um estudo usando o gradiente de densidade Percoll para separar espermatozoides X e Y revelaram resultados positivos. A técnica apresentou acuidade de 75% e 25% de taxa de recuperação de espermatozoides, embora seja menor do que a citometria de fluxo. O gradiente de densidade é um método mais rápido e que garante maior porcentagem de motilidade.

Porém, segundo Scott *et al.* (2018) a centrifugação por gradiente de densidade apresenta resultados promissores, mas ainda não se mostrou suficientemente precisa para ser aplicada no mercado. Embora a motilidade final seja boa, ela ainda não atingiu a acurácia necessária para atender às expectativas.

Rezende (2007) acrescenta que o desvio para 62% de espermatozoides femininos obtido no gradiente de Percoll permite uma seleção mais intensa, reduzindo a necessidade de reposição, o que não acontece em técnicas com maior acuidade na seleção (90%), pois isso acarreta danos aos espermatozoides.

Entretanto, Araujo *et al.* (2014) enfatizaram que a preparação e a manipulação do sêmen antes e após a sexagem podem afetar a qualidade do esperma e, conseqüentemente, a fertilidade, pois resultam em taxas de desenvolvimento embrionário menores se comparado ao sêmen não sexado.

3.6 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS

A transferência de embriões é uma biotecnologia reprodutiva que envolve a obtenção de embriões de uma fêmea doadora e sua transferência para fêmeas receptoras, com o propósito de completar a gestação. O principal objetivo dessa técnica é permitir que uma fêmea produza um número de descendentes muito maior do que seria possível fisiologicamente ao longo de sua vida reprodutiva (SANTOS *et al.*, 2015).

A técnica tem como finalidade a obtenção de embriões de uma doadora, com características genéticas desejáveis, e transferir para receptoras, que devem estar no mesmo momento do ciclo estral da doadora, para que o bezerro se desenvolva durante o período da gestação (SANTOS *et al.*, 2015).

A transferência de embriões possibilita o desenvolvimento de animais

geneticamente superiores em comparação com os resultados que seriam alcançados de forma natural. Além disso, fornece um fundamento técnico para o crescimento de outras biotecnologias da reprodução animal, como a criação de clones e animais transgênicos. Estas técnicas têm sido exploradas com o objetivo de aprimorar ainda mais o melhoramento genético e a produção animal (FREITAS *et al.*, 2021).

A Transferência de Embriões em por objetivo estimular, através de hormônios que atuam no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal, a produção de vários óvulos em sincronia de um animal de qualidade elevada no interior de uma população específica, seguida da inseminação artificial para se obter vários embriões que serão transferidos para fêmeas receptoras ou criopreservados. Esta técnica permite obter diversos embriões a partir de uma única fêmea doadora por ano, sem que esta última tenha que passar por uma gestação e parto (SANTOS, 2012).

A transferência do embrião é fundamental para as altas taxas de prenhez, mas os técnicos têm pouca liberdade na seleção. A receptora também tem um grande impacto nas taxas de prenhez: em raças européias, as vacas e novilhas de corte, bem como as novilhas leiteiras, apresentam taxas de prenhez similares, enquanto as vacas leiteiras têm taxas de prenhez significativamente mais baixas. (ALVAREZ, 2008)

Em bovinos, normalmente uma fêmea produz em média uma cria por ano ao longo de sua vida reprodutiva, o que resulta em cerca de oito a dez produtos ao total. Por outro lado, nos machos, esse número pode chegar a quinze a vinte produtos por ano. No entanto, ao utilizar a técnica de transferência de embriões em combinação com a inseminação artificial, é possível obter ganhos genéticos em larga escala nos programas de melhoramento animal (HOLDEN; BUTLER, 2018).

O processo de transferência de embriões em bovinos envolve várias etapas. Primeiramente, é necessário induzir a superovulação na fêmea doadora por meio da administração de hormônios. Isso estimula o desenvolvimento de múltiplos folículos ovarianos, aumentando assim a produção de embriões. Após a superovulação, a fêmea doadora é inseminada artificialmente com sêmen de um touro de alta qualidade genética ou pode ter s (PAZZIM, 2021).

Após a inseminação, os embriões são coletados da fêmea doadora. Esse processo pode ser feito por meio de lavagem uterina, utilizando-se soluções fisiológicas para remover os embriões presentes no útero. Os embriões são então examinados microscopicamente para avaliar sua qualidade e estágio de

desenvolvimento (PASA, 2008).

Em seguida, os embriões são transferidos para fêmeas receptoras sincronizadas com o ciclo reprodutivo da fêmea doadora. A transferência pode ser realizada por via transcervical, utilizando-se um cateter para inserir os embriões no útero da receptora (PASA, 2008).

Pazzim (2021) explica que a transferência de embriões traz uma série de vantagens significativas no contexto da seleção zootécnica, como a obtenção de várias bezerras de uma mesma vaca excepcional na produção de leite, passando essa característica genética à progênie sem que tenha que gestar, gerando um impacto positivo na produção animal e melhoramento genérico. Deste modo, fazendo com que a doadora possa ter mais descendentes que da forma natural sem que precise gestar todos eles.

Embora a transferência de embriões ofereça vantagens, ela também tem suas limitações. De acordo com Honorato *et al.* (2013) estas podem ser relacionadas às doadoras de embriões, que podem ter respostas diferentes aos tratamentos hormonais, bem como às receptoras. A seleção e o manejo adequado das receptoras de embriões são fundamentais para o sucesso da TE, pois a mortalidade após a transferência ainda é significativa e limita muito a eficiência desse método.

O principal objetivo do programa de Transferência de Embriões (TE) é a superovulação. Esta técnica envolve a administração de hormônios exógenos para

estimular a liberação de oócitos, aumentando assim o número de embriões viáveis por doadora. Os embriões obtidos após a inseminação artificial então são transferidos para o trato reprodutivo de receptoras para completar a gestação. (RUMPF et al., 2000).

3.6.1 SUPEROVULAÇÃO

A superovulação em bovinos é uma técnica muito útil para o aumento e melhoria dos rebanhos brasileiros. Com essa técnica, é possível emprenhar um maior número de vacas em um intervalo de tempo menor, pois é possível alterar os ciclos dos animais para alcançar melhores resultados através do conhecimento da técnica e da fisiologia (OLIVEIRA ET AL., 2007)

A superovulação é a produção de um número maior de ovulações fisiológicas de uma espécie, devido ao uso de gonadotrofinas. No caso dos bovinos, se considera que houve uma resposta positiva ao tratamento quando se produzem mais de duas ovulações. Para otimizar o resultado da superovulação, é necessário utilizar uma técnica de inseminação artificial, combinada com sêmen de alta qualidade (CABODEVILA & TORQUATI, 2001).

De acordo com Carvalho *et al.* (2008) os procedimentos de superovulação são implementados com o objetivo de estimular o desenvolvimento e liberação de todos os folículos selecionados. É necessário sincronizar a onda folicular e administrar altas doses de Hormônio Folículo Estimulante antes da dominância ser estabelecida. Isso evita os efeitos inibitórios do folículo dominante sobre os demais folículos, e previne a perda de qualidade dos oocistos ovulados através da atresia.

O principal objetivo dos Tratamentos Superovulatórios (TSOV) na vaca é obter o maior número de embriões transferíveis com altas chances de induzir gestações. Através da alteração hormonal do ciclo reprodutivo da fêmea bovina, é possível gerar embriões de fêmeas geneticamente superiores, que podem ser transferidos para receptoras com menor mérito genético (MOORE & THATCHER, 2006).

Através de níveis elevados de FSH, é possível promover o crescimento simultâneo de várias seleções de folículos fisiologicamente similares, impedindo a

divergência folicular e proporcionando um melhor destino aos folículos que entrariam em atresia e seriam inúteis no processo reprodutivo (CARVALHO *et al.*, 2008).

A superovulação é a fase menos previsível no processo de transferência de embriões, pois são vários os fatores que influenciam seus resultados. Mesmo quando nenhuma mudança ocorreu entre uma superovulação e outra em um mesmo animal, os resultados podem ser diferentes (OLIVEIRA ET AL.,2007)

Importa destacar que protocolos para superovulação não são completamente aperfeiçoados, mas os resultados são estáveis entre diferentes raças, idade e manejo das doadoras. Para obter melhores resultados, os protocolos devem ser adaptados de acordo com as necessidades individuais de cada animal (OLIVEIRA ET AL.,2007).

3.6.2 SELEÇÃO DE DOADORAS

Quanto à seleção das vacas doadoras, segundo explica Baruselli *et al.* (2006) as vacas selecionadas para participar de programas de superovulação devem apresentar uma combinação de superioridade genética e adequado estado nutricional. Além da técnica de produção *in vitro* de embriões, em que todo o processo acontece em laboratório, a superovulação pode utilizar o sistema reprodutivo da doadora para produzir os embriões.

Por isso, é importante que a vaca tenha ciclos estrais regulares e seja submetida a um exame reprodutivo minucioso para descartar defeitos anatômicos e distúrbios reprodutivos que podem prejudicar a coleta, desenvolvimento e transporte adequado dos gametas e embriões. Doenças de origem genética também devem ser evitadas para que elas não afetem os descendentes. Isso garante o sucesso do procedimento de superovulação (BARUSELLI *et al.*, 2006).

3.6.3 SELEÇÃO DE RECEPTORAS

Conforme explicam Oliveira, Sarapião e Quintão (2014) a seleção das receptoras é uma tarefa de extrema importância no processo de transferência de embriões. A aquisição de fêmeas é uma tarefa delicada e dispendiosa, razão pela qual é recomendável utilizar animais do próprio rebanho, a fim de prevenir

problemas infecciosos. Os animais escolhidos para a transferência devem ser animais jovens, com peso e altura adequados à raça da doadora e condições reprodutivas favoráveis.

Os animais que passam pela avaliação de escore corporal com êxito são alvos de inspeção para verificação de infestação por endo/ectoparasitas e exame clínico. Além disso, eles também são submetidos a exames de palpação retal com recurso a ultrassonografia. Apenas aqueles que preencherem todos os requisitos serão aceitos como receptoras e prosseguirão com o protocolo hormonal de sincronização estabelecido (DANTAS; NUNES; DANTAS, 2018).

As receptoras devem apresentar ciclos regulares, sem sinais de distúrbios nutricionais ou na pelve, e ter um útero saudável, sem sinais de assimetria ou endometrite, além de estar com o ciclo estral em sincronia com a doadora. Escolher as receptoras certas é crucial para o sucesso do processo de transferência de embriões, pois qualquer problema pode levar à perdas de produção, tais como reabsorção embrionária ou abortamento (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014).

Segundo Beltrame *et al.* (2007) embora várias descobertas envolvendo a fisiologia da reprodução, tenham sido realizadas nas últimas décadas, a aplicação da TE e PIVE, ainda permanecem à mercê dos efeitos decorrentes da variabilidade dos índices que influenciam os resultados e do alto risco de sua execução. Nestas biotécnicas, geralmente, pouca atenção é destinada às receptoras em comparação às doadoras.

3.7 SEXAGEM DE EMBRIÕES EM BOVINOS

A utilização de sêmen sexado em fazendas leiteiras e de corte é uma ótima maneira de garantir a produção de animais do sexo desejado, resultando em economia de custos e melhoria da sustentabilidade ambiental. A sexagem de espermatozoide é atualmente realizada por meio de diversas técnicas inovadoras. (QUELHAS *et al.*, 2021).

Segundo Rocha, Santos e Piccinin (2007), a sexagem de embriões bovinos é uma técnica relativamente recente que apresenta vantagens como a possibilidade de escolha do sexo com maior precisão e a obtenção de descendentes do sexo

desejado em maior número. Além disso, a sexagem de embriões permite a produção de vacas de alta produção de leite, um atributo muito valorizado na indústria leiteira.

A identificação do sexo de embriões é uma técnica eficiente, atingindo taxas superiores a 95%. A supracitada técnica não afeta a qualidade dos embriões e não causa danos ao sistema reprodutivo das receptoras. Porém, existem algumas desvantagens como, o alto custo e a redução a taxa de prenhez (ROCHA; SANTOS; PICCININ, 2007).

A produção de embriões com sêmen sexado é a opção mais comumente adotada, embora apresente alto custo e manejo tecnológico. Nesse processo, o sêmen já sexado é utilizado para fertilizar óvulos coletados de fêmeas doadoras, em sua maioria, *in vitro*, embora também possa utilizar o sistema reprodutivo da própria doadora. Os embriões resultantes são então transferidos para fêmeas receptoras. Essa técnica é preferida porque oferece maior facilidade e controle na obtenção de embriões com o sexo desejado (CARVALHO *et al.*, 2010).

Ao produzir embriões com sêmen sexado, os produtores têm a vantagem de selecionar fêmeas doadoras de alta qualidade genética e garantir que sejam obtidos embriões com o sexo desejado, no caso de bovinos leiteiros, filhotes fêmeas para girar a cadeia produtiva. Além disso, essa abordagem também permite uma distribuição mais eficiente dos embriões para as fêmeas receptoras, facilitando o manejo e aumentando o potencial de multiplicação genética (THEDY, 2010).

Entretanto, as técnicas utilizadas ainda apresentam algumas limitações, em exemplo a sexagem por citometria de fluxo, como a possibilidade de redução na qualidade dos espermatozoides selecionados, a necessidade de um equipamento de alta tecnologia e a alta taxa de descarte de células durante o processo de separação. Além disso, o custo para a realização da sexagem por citometria de fluxo ainda é considerado elevado, o que pode limitar a sua aplicação em algumas regiões e produtores (THEDY, 2010).

Para tornar o sêmen sexado viável para o uso comercial, é necessário criar um método que minimize a perda de espermatozoides durante o processo e que não afete a sua capacidade de fecundação. Além disso, para países como o Brasil, onde custos podem ser um fator limitante, desenvolver metodologias de baixo custo que,

mesmo com menor acuidade na sexagem, possam oferecer índices satisfatórios de fertilidade é a melhor opção (HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2011)

Para Araújo et al. (2014) a utilização de sêmen sexado oferece grandes benefícios, pois permite a produção de animais de um determinado sexo em maior quantidade e a realização de estudos sobre as diferenças no desenvolvimento embrionário entre machos e fêmeas. No entanto, as taxas de fertilização tanto in vivo quanto in vitro ainda não são melhores do que aquelas obtidas com o sêmen não sexado.

Corroborando Betteridge (2003) e enfatiza que o emprego de técnicas de biotecnologia de reprodução tem contribuído significativamente para o aumento da produção e da produtividade na pecuária bovina, permitindo de forma mais eficaz a exploração de animais com maior valor genético.

Além disso, graças a essas biotecnologias, é possível obter uma grande quantidade de descendentes em um curto espaço de tempo, o que foi essencial para aprimorar os rebanhos. Estes avanços têm sido extremamente importantes para a pesquisa de reprodução animal, fornecendo modelos experimentais para estudar o desenvolvimento folicular, ovulação, fertilização, reconhecimento da gravidez e sobrevivência embrionária, o que tem sido refletido pelo grande desenvolvimento da embriologia nos últimos trinta anos (BETTERIDGE, 2003).

Entretanto, Fernandes e Rodrigues (2015) mencionam algumas desvantagens em relação à sexagem de sêmen e de embriões na produção de vacas leiteiras. Segundo os autores, devido à sua tecnologia relativamente nova, a produção de doses por ejaculado é baixa e requer touros com altíssima qualidade de sêmen.

Além disso, a fertilidade do sêmen sexado é menor quando comparado ao convencional, principalmente devido à sua baixa concentração espermática por dose. Em vacas de leite, a taxa de prenhez das que são inseminadas com sêmen sexado é significativamente menor em comparação com aquelas inseminadas com sêmen convencional (FERNANDES E RODRIGUES, 2015).

A adoção cada vez maior do sêmen sexado exige cuidados redobrados, pois trata-se de um produto mais delicado e dispendioso. Casos de fracassos não são incomuns e podem acarretar em consequências mais sérias para a economia do sistema. Assim, o valor econômico de se recorrer ao sêmen sexado em vacas e

novilhas deve ser avaliado de maneira individualizada de acordo com cada mercado pretendido (FERNANDES E RODRIGUES, 2015).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conclui-se dessa forma que, a sexagem de sêmen e embriões são técnicas cada vez mais utilizadas na produção de vacas leiteiras, pois é possível aumentar a produção de leite resultando em maiores lucros para os produtores.

A sexagem de sêmen e embriões tem se mostrado uma ferramenta promissora na produção de vacas leiteiras, permitindo uma maior eficiência na utilização dos recursos e uma maior produtividade do rebanho. Portanto, as supracitadas técnicas podem contribuir para o melhoramento genético do rebanho e para a produção de vacas leiteiras mais produtivas e lucrativas, promovendo a sustentabilidade econômica da produção de leite.

Cada técnica tem suas vantagens e desvantagens em termos de precisão, custo e facilidade de aplicação. É importante consultar profissionais especializados para determinar qual método é mais adequado às necessidades específicas de reprodução e melhoramento genético do rebanho leiteiro.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, G. V.; ARAÚJO, A. A.; MOURA, A. de A. A. **Desenvolvimento testicular, espermatogênese e concentrações hormonais em touros Angus**. Revista Brasileira de Zootecnia, [s. l.], ano 2009, v. 35, ed. 4, p. 1629-1638, ago. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-35982006000600008>. Acesso em: 10 jul. 2023.

ALVAREZ, R.H. Fatores determinantes do sucesso de um programa de transferência de embriões em bovinos. 2008. **Artigo em Hypertexto**. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2008_1/embrioes/index.htm>. Acesso em: 17/6/2023

ARAUJO M. S.; VOLPATO R.; LOPES M. D. **Produção de embriões bovinos in vitro com sêmen sexado** / Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP / Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP. São Paulo: Conselho Regional de Medicina Veterinária, v. 11, n. 3 (2013), p. 08–15, 2013
<https://www.revistamvez-crmvsp.com.br/index.php/recmvz/article/view/17370/18214>
Acesso em 16 jun. 2023

ASBIA. **Coleta de sêmen** bovino no Brasil cresceu mais de 100% no primeiro semestre, revela ASBIA. [S. l.], 18 set. 2021. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/coleta-de-semen-bovino-no-brasil-cresceu-maisde-100-no-primeiro-semester-revela-asbia/>. Acesso em: 15 jun. 2023

ANTUNES, B. L. DE S. R. **Sexagem de espermatozoides bovinos revisão de literatura**. Faculdades Integradas De Ourinhos. Ourinhos – SP. 2015. Trabalho de Conclusão de Curso. Disponível em:
<http://fio.edu.br/biblioteca/tcc/Veterin%C3%A1ria/2015/BRUNA%20LUIZA%20DE%20SOUZA%20ROCHA%20ANTUNES%20Sexagem%20de%20Espermatoz%C3%B3ide%20Bovinos.pdf>. Acesso em 12 jun. 2023

ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 99, n. 3-4, p. 223–43, June 2007.

BARUSELLI, Pietro S. *et al.* Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 77-88, 7 jan 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X05004358?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jun. 2023.

BETTERIDGE, K.J. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques. **Animal Reproduction Science**, Werribee, v. 79, p. 203-244, 2003.

BORGES, Murilo Silva *et al.* A inseminação artificial em bovinos de corte no brasil. **Enciclopédia Biosfera**, Jandaia, v. 19, n. 42, p. 257-262, 30 dezembro 2022. DOI: 10.18677/EnciBio_2022D2. Disponível em: <https://www.conhecer.org.br/enciclop/2022D/a%20inseminacao.pdf>. Acesso em: 6

jun. 2023.

- BRITO, L. *et al.* Bovine sexed semen production and utilization . **Clinical Theriogenology**, Novasota, v. 11, n. 3, p. 297-315, set 2019.
- CABODEVILA, J. & TORQUATRI, S. **Superovulação de Fêmeas bovinas**. In: PALMA, G.A Biotecnologia de la reproducción 1ª edição INTA, Argentina, 2001. p. 79-108
- CAMARGO, A. S. Aspectos gerais da inseminação artificial em tempo fixo no brasil: revisão . *Ceres*, 2022. 27 p **Trabalho de Conclusão de Curso** (Bacharelado em Zootecnia) - Instituto Federal Goiano, Ceres, 2022. Disponível em: https://repositorio.ifgoiano.edu.br/bitstream/prefix/3267/1/tcc_Andr%C3%A9%20de%20Sousa%20Camargo.pdf. Acesso em: 9 jun. 2023.
- CARVALHO, J. O. *et al.* Quality assessment of bovine cryopreserved sperm after sexing by flow cytometry and their use in in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 9, n. 7, p. 1521-1530, dezembro 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X10003481>. Acesso em: 6 jun. 2023.
- CARVALHO, J.B.P *et al.* Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in Bos indicus, Bos indicus x Bos taurus, and Bos taurus heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 167-175, 15 jan 2008. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X07005420?via%3Dihub>. Acesso em: 10 jun. 2023.
- CENCI, J. P. G. ; BERTO, V. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO (IATF) E SUAS VANTAGENS . **Revista Ibero- Americana de Humanidades, Ciências e Educação- REASE**, São Paulo, v. 9, n. 5, p. 3666-3673, maio 2023. doi.org/10.51891/rease.v9i5.10094.
- CIC. **Inseminação artificial coloca rebanho de Estrela no alto da eficiência da produção leiteira**. Câmara da Indústria, Comércio e Serviços do Vale do Taquari. 2014. Disponível em: <https://cicvaledotaquari.com.br/inseminacao-artificial-coloca-rebanho-de-estrela-no-alto-da-eficiencia-da-producao-leiteira/>. Acesso em: 15 mai. 2023.
- DANTAS, K.S. de A.r; NUNES, C.C. C.; DANTAS, R. A. de. A. seleção de receptoras em um programa de transferência de embriões (pive) em bovinos no nordeste do Brasil. **Ciência Animal**, Fortaleza, n. 28, p.1-14, 2018.
- DOMINGUEZ, J.H.E *et al.* Análise marginal dos custos da utilização de sêmen sexado macho para produção de touros Nelore. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 61, n. 233, mar 2012. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922012000100012> . Acesso em: 10 jun. 2023.
- FAOSTAT. **Top 10 Country Production of Raw milk of cattle**. Food and Agriculture Organization. 2021. Disponível em: https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em: 3 mai. 2023.

FERNANDES, J. R.C. RODRIGUES, P. Sexagem de sémen. Revista Agronegócios. 2015. Disponível em: <http://www.agronegocios.eu/noticias/sexagem-de-semen/>. Acesso em 15 jun. 2023

FREITAS, V. J. F. *et al.* **Transgênese e clonagem adotadas como biotécnicas reprodutivas em pequenos ruminantes.** *In: XXIV Congresso Brasileiro De Reprodução Animal (CBRA-2021) E VIII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BIOLOGY OF REPRODUCTION – JOINT MEETING.* 2021. Anais [...] Belo Horizonte: DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2021.022, 2021.

GARNER, D. L.; EVANS, K. M.; SEIDEL, G. E. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. **Spermatogenesis. Methods in Molecular Biology**, v. 972. 279–295 p, 09 agosto 2012. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-038-0_26.

HOLDEN, S. A; BUTLER, S. T. Review: Applications and benefits of sexed semen in dairy and beef herds. **Cambridge University Press**, v. 12, n. 1, p. 97-103, 10 04 2018. doi:10.1017/S1751731118000721. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/animal/article/review-applications-and-benefits-of-sexed-semen-in-dairy-and-beef-herds/C094C511C7C6C859A540D9ADD699F66C#article>. Acesso em: 6 jun. 2023.

HONORATO, M.T. *et al.* **Importância da escolha de receptoras em um programa de transferência de embriões em bovinos.** PUBVET, v. 7, n. 19, 2013.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. *et al.* Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de Percoll. Revista Brasileira de Zootecnia, v.40, p.1680-1685, 2011.

JUNG, C. F. ; MATTE JÚNIOR, A. A . Produção leiteira no Brasil e características da bovinocultura leiteira no Rio Grande do Sul. **Ágora**, Santa Cruz do Sul, v. 19, n. 1, p. 34-47, janeiro 2017. Disponível em: <https://online.unisc.br/seer/index.php/agora/article/view/8446>. Acesso em: 2 mai. 2023.

KHALAJZADEH , S.; NEJATI-JAVAREMI , A.; MEHRBANI YEGANEH , H. Effect of widespread and limited use of sexed semen on genetic progress and reproductive performance of dairy cows. **Animal**, v. 6, n. 9, p. 1398-1406, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S1751731112000651>. Acesso em: 9 jun. 2023.

LIMA V. F. M. H.; FILHO C. A. M.; LUCIO A. C.; RESENDE M. V. **Sexagem de espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente descontínuo de densidade de percoll®.** R. Bras. de Zootec., v.40, n.8, p.1680-1685,2011.

LOBATO, B. **Fertilização in vitro pode acelerar melhoramento genético de rebanhos leiteiros.** EMBRAPA. 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/16489290/fertilizacao-in-vitro-pode-acelerar-melhoramento-genetico-de-rebanhos-leiteiros>. Acesso em: 9 jun. 2023.

MAIA, L. C. P. Imunossexagem E Criopreservação Espermática Em Meio À Base De Água De Coco Em Pó (ACP102c) Na Espécie Ovina Fortaleza – Ceará. 2020 Dissertação .Disponível em:
<https://ppgbiotec.com/sisac/files/defesas/p9/F173268363585.pdf> acesso em 16 jun. 2023

MISSIO, D. Redução do volume de percoll para seleção espermática de sêmen sexado na produção in vitro de embriões bovinos. Uruguaiana, 2018. 70 p **Dissertação** (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal) - Universidade Federal do Pampa, 2018. Disponível em:
<https://cursos.unipampa.edu.br/cursos/ppgca/files/2017/03/daniele-missio.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2023.

MOLINA, I. J. H. V. **El sexaje del semen de toro**. Genetica Pecuaria C.A. 2003. Disponível em: <https://geneticapecuaria.es.tl/%2ASexaje-del-Semen.htm>. Acesso em: 11 mai. 2023.

MOORE, K. & THATCHER, W. W. Major Advances Associated with Reproduction in Dairy Cattle.2006. **Journal of Dairy Science** , 89, pp. 1254-1266.

MURTA, D. V. F.; GOMES, V. C. L.; MARTINEZ, L. C. R. Uso de sêmen sexado em bovinos. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, Garça, n. 20, janeiro 2013. ISSN: 1679-7353. Disponível em:
http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/f1r4xgZGq2ph2AV_2013-6-21-15-50-37.pdf. Acesso em: 9 jun. 2023.

OLIVEIRA, J. L. S. SOARES, R. D. ROCHA, F. A. ROMERO, V.L. PRADO, F. R. de A. Superovulação em bovinos. Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária - Issn 1679-7353 **Publicação Científica Da Faculdade De Medicina Veterinária E Zootecnia De Garça/Famed** Ano Iv, Número, 08, Janeiro De 2007. Periodicidade: Semestral
http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/EhldbsfwrovARYX_2013-5-21-16-57-24.pdf Acesso em 16 jun. 2023

OLIVEIRA, C. S.; SARAPIÃO, R. V.; QUINTÃO, C. C. R. **Biotécnicas da Reprodução em Bovinos**. In: “Biotécnicas Da Reprodução Em Bovinos” No Laboratório De Reprodução Animal Do Campo Experimental Santa Mônica, n. III. 2014. Tópico Temático [...] Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2014. 52 p. Disponível em:
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/124201/1/Biotecnicas-para-Producao-em-Bovinos.Documentos-175.pdf>. Acesso em: 9 jun. 2023.
 PASA, C. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM BOVINOS. **Biodiversidade**, v. 7, n. 1. 9 p, 2008. Disponível em:
<https://periodicoscientificos.ufmt.br/ojs/index.php/educacaopublica/article/view/49>. Acesso em: 12 jun. 2023.

PASSAGLIA, P.G. CHAVES , A. H. **Sexagem de embriões bovinos : Atualidades sobre a aplicação da técnica de Sexagem aliada ao PCR (Polymerase Chain**

Reaction), desde o campo até a comercialização de embriões sexados. Centro De Ensino Superior De Uberaba Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento - nº 37 Disponível em: <http://www.biologia.seed.pr.gov.br/arquivos/File/sexagem.pdf> Acesso em 16 jun. 2023

PAZZIM, L. V. L. Transferência De Embriões Em Bovinos: Revisão De Literatura. Curitiba, 2021. 50 p **Trabalho de Conclusão de Curso** (Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/229535>. Acesso em: 9 jun. 2023.
PEIXOTO JUNIOR, K. C.; TRIGO, Y. . Inseminação artificial em tempo fixo. **PUBVET**, Maringá, v. 9, n. 1, p. 45-51, jan 2015. ISSN: 1982-1263. Disponível em: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v9n1.45-51>. Acesso em: 9 jun. 2023.

PELLEGRIN, A. O. *et al.* Fertilidade, Funcionalidade e Genética de Touros Zebuínos. **EMBRAPA PANTANAL**, Corumbá, ano 2009, n. 21, p. 216, 17 maio 2009. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CPAC-2010/31913/1/amaral-01.pdf>. Acesso em: 11 jul. 2023.

POLYCARPO, R. C. **Inseminação Artificial em bovinos: como ter sucesso?** MILKPOINT. 2021. Disponível em: <https://www.milkpoint.com.br/artigos/producao-de-leite/inseminacao-artificial-em-bovinos-como-ter-sucesso-226023/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

QUELHAS, J. *et al.* Bovine semen sexing: Sperm membrane proteomics as candidates for immunological selection of X- and Y-chromosome-bearing sperm. **Veterinary Medicine and Science**, v. 7, n. 5, p. 1633–1641, 2021.

RESENDE, M. V. **Sexagem de espermatozóides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade contínuo de percoll e optiprep.** Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho” Jaboticabal - São Paulo - BRASIL .2007. Tese Mestrado. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/download/pgtrabs/ra/d/2095.pdf> Acesso em: 17/6/2023

ROCHA, J. R. *et al.* AS VANTAGENS DA SEXAGEM DE EMBRIÕES EM BOVINOS. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, n. 8, 08 janeiro 2007. Disponível em: http://faef.revista.inf.br/imagens_arquivos/arquivos_destaque/leZL6WMzKZHdtKq_2013-5-24-14-55-58.pdf. Acesso em: 6 jun. 2023.

RUMPF, R., BEM, D. E., PEIXER, M. A. S., SOUZA, R.V. **Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e eqüina.** Brasília: EMBRAPA – Recursos genéticos e biotecnologia, 2000.p.71-103.

SANTOS, K. J. G. *et al.* Biotecnologias reprodutivas e fisiologia reprodutiva da fêmea bovina – conhecimento para o sucesso. **PUBVET**, Londrina, v. 6, n. 36, ago 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.22256/pubvet.v6n36.1483>. Acesso em: 9 jun. 2023.

SANTOS, G.M. dos. **Transferência de embriões**. Viçosa: Cpt, 2012.

SHARPE JC, EVANS KM. Advances in flow cytometry for sperm sexing. **Theriogenology**. 2009;71:4-10

SEIDEL, G.E. Update on sexed semen technology in cattle. **Animal**, Fort Collins, v. 8, n. 1, p. 160-164, 8 mar 2014. <https://doi.org/10.1017/S1751731114000202>.

SEVERO, N. C. Impactos da inseminação na indústria bovina no Brasil e no mundo. **Revista Veterinária e Zootecnia em Minas**. v. 101, n. 28, p. 16-22, 2009.

SILVA, T. M. A. **Histórico da Inseminação artificial em bovinos**. Ilha Solteira, 2023. 35 p Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Ilha Solteira, 2023. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/239154/silva_tma_tcc_ilha.pdf?sequence. Acesso em: 9 jun. 2023.

SIQUEIRA, K.B. **O Mercado Consumidor de Leite e Derivados**. EMBRAPA. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1110792/o-mercado-consumidor-de-leite-e-derivados>. Acesso em: 4 mai. 2023.

THEDY, D. X. **Determinação Do Sexo De Bovinos**. 2010. 30 p Monografia (Medicina veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/39013/000792152.pdf?sequence=1>. Acesso em: 9 jun. 2023.

THONGKHAM, M. *et al.* Spermatological parameters of immunologically sexed bull semen assessed by imaging flow cytometry, and dairy farm trial. **Reproductive Biology**, v. 21, n. 2, jun 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2021.100486>. Acesso em: 10 jun. 2023.

VILLADIEGO, F. A. C. *et al.* Sêmen sexado através de citometria de fluxo e centrifugação por gradiente de concentração. **Revista de Medicina Veterinaria**, Bogotá, n. 36, jan 2018. ISSN 0122-9354. Disponível em: <https://doi.org/10.19052/mv.5178>. Acesso em: 10 jun. 2023.

WILLHELM, B. R. Sexagem de sêmen por citometria de fluxo e sua aplicabilidade em animais selvagens. Porto Alegre 2014.45 FLS. Trabalho de Conclusão de Curso . Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/183554/000952061.pdf?sequence=1> Acesso em 15 jun. 2023

ZANON, J. E. O. Uso de aptâmeros na sexagem de sêmen bovino. Araçatuba, 2016. 64 p **Tese** (Faculdade De Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016. Disponível em: https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/135901/zanon_jeo_dr_araca_int.pdf?sequ. Acesso em: 9 jun. 2023.

