

Figura 5.9B. Seqüência do procedimento de Inseminação Artificial. A) Introdução do aplicador; B) Passagem da cérvix; C-D) Deposição lenta do sêmen após o último anel cervical, no corpo uterino; E) Retirada do aplicador; F) Retirada da mão do reto e massagem do clitoris

PROCI-2008.00144

NIC
2008

SP-2008.00144

50

Biotécnicas da reprodução
2008 SP-2008.00144

18075-1

6. BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO ASSOCIADAS À INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

Simone Cristina Méo Niciura¹

6.1. Introdução

Neste capítulo, são descritas algumas biotécnicas da reprodução associadas à IA. Para a melhor compreensão dos conceitos aqui abordados, é necessário o estudo prévio do tópico Anatomia e Fisiologia da Reprodução de Fêmeas Bovinas (Capítulo III). Alguns termos aqui abordados, estão definidos abaixo.

Sincronização de cio ou de estro: tratamento hormonal que visa provocar a manifestação de cio (estro) em várias fêmeas simultaneamente.

Sincronização de ovulação: tratamento hormonal que visa provocar a ovulação num momento pré-determinado.

Superovulação (ou superestimulação): tratamento hormonal que visa provocar aumento, acima da quantidade fisiológica, no número de ovulações de uma fêmea, em um mesmo ciclo estral.

As biotecnologias da reprodução são ferramentas úteis para a multiplicação de animais geneticamente superiores, uma vez que favorecem o melhoramento genético, encurtam o intervalo entre gerações e aumentam a produtividade de rebanhos e a produção de alimentos de origem animal. Algumas biotecnologias favorecem a disseminação de material genético de machos, como a IA e a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), por meio da utilização do mesmo reprodutor por várias fêmeas, ao mesmo tempo, em diferentes rebanhos e a longas distâncias. Outras aproveitam o potencial genético das fêmeas, como a transferência de embriões

¹Pesquisadora Científica da Embrapa Pecuária Sudeste Rodovia Washington Luiz, km 234 Fazenda Canchim, Caixa postal 339, CEP 3560-970, São Carlos, SP, Brasil. E-mail: simone@cnpse.embrapa.br

(TE). Por outro lado, a associação dessas tecnologias à sexagem, principalmente de espermatozoides, permite o maior aproveitamento do potencial genético tanto de machos quanto de fêmeas.

6.2. Sexagem de Espermatozoides

Há muitos anos são buscados mecanismos para selecionar o sexo da progênie. Em humanos, há registros de tentativas de seleção do sexo, na Grécia, entre 500 a 428 a.C, baseados na errônea crença de que cada testículo produzia espermatozoides de um só sexo. A partir do conhecimento dos gametas, dos cromossomos, do DNA e da informação de que o espermatozoide portador do cromossomo X leva à concepção de fêmea (XX) enquanto que o de cromossomo Y origina macho (XY), estratégias passaram a ser utilizadas para a determinação do sexo antes do nascimento. A predição do sexo pode ser realizada de diversas maneiras, mas, em comparação à sexagem de embriões e fetos, a sexagem de espermatozoides é a técnica mais precoce, uma vez que permite a escolha do sexo desejado antes da fecundação, evitando o descarte de embriões ou a indução de aborto de conceitos do sexo não desejado.

A sexagem de espermatozoides baseia-se na diferença do conteúdo de DNA entre espermatozoides X e Y: o cromossomo X é maior e possui mais DNA que o Y. Devido a essa diferença, os espermatozoides X e Y podem ser separados por citometria de fluxo (após coloração do DNA) ou por centrifugação em gradiente de densidade (o espermatozoide X é mais pesado e deposita-se no fundo do tubo de centrifugação). Atualmente, a citometria de fluxo, que utiliza coloração, exposição a laser, mensuração do conteúdo de DNA e separação de espermatozoides X e Y (Figura 6.1.), é o método mais utilizado para a sexagem de sêmen, principalmente para fins comerciais. A citometria apresenta as seguintes vantagens: rapidez, eficiência, descarte de espermatozoides mortos e de

acrossoma não-intacto, facilidade de utilização, melhor relação custo-benefício e, principalmente, repetibilidade.

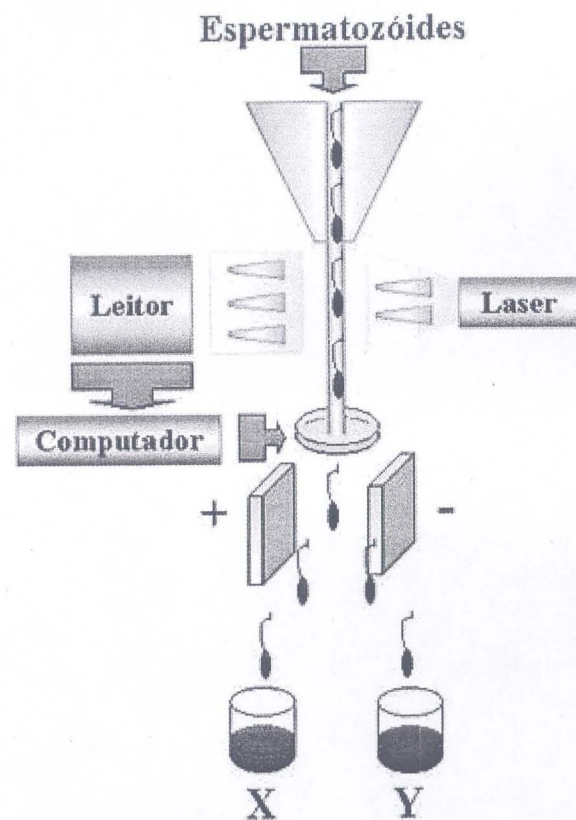


Figura 6.1. Esquema da sexagem de espermatozoides por citometria de fluxo

No Brasil, a comercialização de sêmen sexado por citometria de fluxo iniciou-se em agosto de 2004. Por citometria, é possível produzir 6 milhões de espermatozoides X e 6 milhões de espermatozoides Y por hora ou 11-15 milhões de espermatozoides

X por hora. Em média, para produzir uma dose inseminante para a IA de 2 milhões de espermatozoides são necessários 8 minutos. A citometria de fluxo separa os espermatozoides com 85 a 90% de pureza e permite, assim, o nascimento de 85-90% de bezerros do sexo desejado. As desvantagens da citometria são provocadas pelos insultos causados ao espermatozoide por coloração, aquecimento, mudanças de pressão, exposição ao laser, desaceleração abrupta e centrifugação. Esses fatores reduzem o rendimento (somente 30% da quantidade inicial de espermatozoides é aproveitada), afetam a viabilidade e a motilidade dos espermatozoides, induzem a capacitação precoce e diminuem os índices de fertilidade (queda de 10-20% da taxa de gestação, principalmente em novilhas).

Na produção animal, a sexagem é utilizada, principalmente, para a produção de fêmeas de reposição a partir das melhores vacas e de touros geneticamente superiores. Dessa maneira, a pré-seleção do sexo pode beneficiar os esquemas de manejo, pois permite o planejamento de acasalamentos para o sexo desejado e, além disso, leva ao progresso genético mais rápido. Além da produção animal, a sexagem pode ser utilizada para o controle de doenças genéticas sexo-específicas, a diminuição da incidência de distocias no parto de novilhas (fetos fêmeas, geralmente, são menores que machos), a conservação de espécies ameaçadas de extinção e em pesquisas (reduz o número de animais necessários por experimento).

No Brasil, há grande interesse e um mercado bastante promissor para a utilização de sêmen sexado, que pode ser utilizado tanto na IA quanto na TE e na FIV. Para evitar o aumento do número de inseminações durante a TE, recomenda-se a dose inseminante de sêmen sexado com um total de 5 milhões de espermatozoides, ao invés da dose de 2 milhões usada na IA. A FIV, em vantagem sobre a IA e a TE, permite a produção de mais bezerros por dose de sêmen. Entretanto, o sucesso da FIV é muito influenciado pela raça, pelo touro e pelos protocolos utilizados em cada laboratório.

6.3. Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF)

No Brasil, um dos fatores que prejudica o desempenho reprodutivo é a baixa taxa de serviço, provocada, principalmente, pela ausência de ciclicidade de fêmeas (anestro) e por falhas de detecção de cio. A detecção de cio dispense tempo e requer pessoal treinado. Além disso, fêmeas zebuínas apresentam estro de curta duração (cerca de 10-11 horas) e que, geralmente, é manifestado durante à noite, dificultando, ainda mais, a detecção e a utilização da IA tradicional. Entretanto, esses problemas podem ser contornados pela utilização da biotécnica de IATF.

Na IATF, são utilizados tratamentos hormonais que controlam o momento da ovulação e possibilitam que a inseminação seja realizada num momento pré-determinado (tempo fixo), sem a necessidade de observação de cio.

Uma vez que a fase luteínica é mantida pelo corpo lúteo, no ovário, e pela secreção de progesterona, pode-se antecipar um novo ciclo estral por meio da promoção de luteólise com a administração de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). Entretanto, o momento de ocorrência do cio após a aplicação da PGF_{2α} é variável e depende do estágio de crescimento folicular de cada fêmea.

Por outro lado, a administração de Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) é capaz de desencadear uma nova onda de crescimento folicular (após 2 a 3 dias da administração), independentemente da fase do ciclo estral da fêmea no momento da aplicação. Por esse motivo, 6 a 7 dias após a administração de GnRH, as fêmeas estarão no mesmo estágio do ciclo estral, responderão de maneira mais uniforme à PGF₂, de maneira a haver melhor sincronização do estro. Além disso, a administração de GnRH de 1 a 2 dias após a PGF_{2α} leva à sincronização da ovulação e permite a inseminação em tempo pré-determinado (20 a 24 h após a segunda aplicação de GnRH). Esse protocolo que utiliza GnRH-PGF_{2α}-GnRH (GPG) é denominado de "Ovsynch" (Figura 6.2.A).

Uma alternativa para redução de custos do protocolo “Ovsynch” é a substituição da segunda dose de GnRH por benzoato de estradiol (BE, 1 mg para vacas e 0,75 mg para novilhas), no protocolo denominado de GPE. No caso do protocolo GPE, a resposta é mais tardia e os animais devem ser inseminados em tempo fixo de 30 a 36 horas após o BE (Figura 6.2.B). Ambos os protocolos, GPG e GPE, são eficientes para vacas ciclando, mas promovem menores taxas de gestação em novilhas e não funcionam para vacas em anestro.

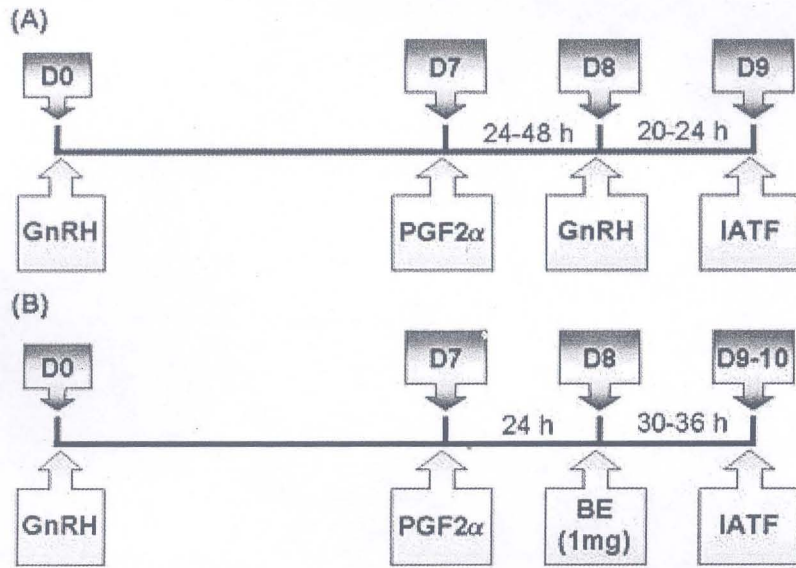


Figura 6.2. Protocolo “Ovsynch” de inseminação artificial em tempo fixo (IATF): (A) GPG e (B) GPE. D: dia, GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas, PGF2 α : prostaglandina F2 α , BE: benzoato de estradiol

Para vacas em anestro (e também para vacas ciclando), existe um protocolo de sincronização de estro que utiliza um implante de progestágeno subcutâneo, ou de progesterona (P4) intravaginal para simular a fase luteínica do ciclo estral. Para promover a regressão do corpo lúteo, é realizada a associação de estradiol, no início do tratamento com P4, e de PGF2 α , no momento da remoção do implante de P4. O protocolo mais comum é denominado de PEPE (progesterona- estradiol-prostaglandina-estradiol). O protocolo PEPE consiste na aplicação de BE e implante de P4 (no dia 0), remoção do implante após 8 dias e aplicação de PGF2 α , seguida pela aplicação de BE após 24 h, e pela IATF após 30-36 horas (Figura 6.3.). No protocolo PEPE, a Gonadotrofina Coriônica Equina (eCG; 200-500 UI) pode ser administrada logo após a PGF2 α para aumentar a eficiência da sincronização da ovulação.

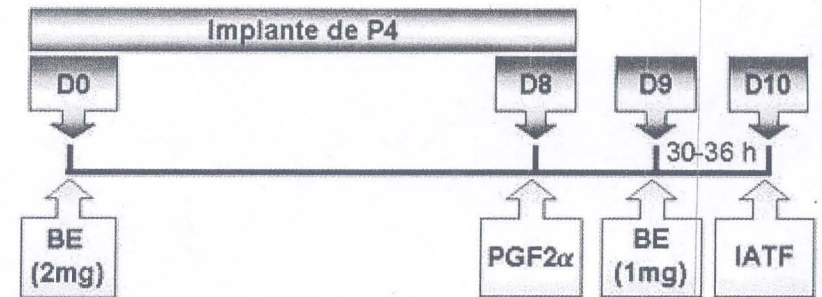


Figura 6.3. Protocolo PEPE de inseminação artificial em tempo fixo (IATF). D: dia, P4: progesterona, BE: benzoato de estradiol, PGF2 α : prostaglandina F2 α

Para vacas de corte, uma alternativa para aumentar a eficiência dos protocolos de IATF é a remoção temporária do bezerro (por 52-56 horas, entre a retirada do implante de P4 e a

IATF), que visa à diminuição do efeito inibitório da amamentação sobre a reprodução.

Além de facilitar o manejo por dispensar a observação deaios e concentrar, em um determinado período, as inseminações e as parições, a IATF apresenta as vantagens de aumentar a taxa de gestação (aumento de 8% em vacas Nelore submetidas à IATF em comparação à IA tradicional e à monta natural) e reduzir o intervalo entre o início da estação de monta e a concepção (em 22 dias) e, conseqüentemente, diminuir o intervalo entre partos. Por outro lado, a eficiência da IATF depende de vários fatores, como condição corporal da fêmea, efeito da amamentação, ciclicidade e qualidade do sêmen utilizado na inseminação.

6.4. Transferência de Embriões (TE)

Dados de 2004 demonstram a participação da América do Sul em 21,6% das Transferências de Embriões (TE) realizadas no mundo. Dentre os países da América do Sul, o Brasil destaca-se como o principal produtor de embriões bovinos, pela realização de 102.100 TEs, nesse mesmo ano. A biotécnica de Transferência de Embriões (TE) consiste na superovulação (ou superestimulação), inseminação, produção e coleta de embriões de uma fêmea doadora, de elevado mérito genético, seguida pela transferência desses embriões para fêmeas receptoras, previamente sincronizadas, que levam a gestação a termo. Assim, uma fêmea torna-se capaz de produzir um número muito maior de descendentes do que produziria naturalmente durante toda sua vida reprodutiva.

Para os tratamentos hormonais das doadoras (sincronização e superovulação) e receptoras (sincronização) e realização da TE, é importante o conhecimento da fisiologia da reprodução das fêmeas bovinas. As vacas, geralmente, apresentam 2 ou 3 ondas de crescimento folicular por ciclo estral. Em cada onda, mais de 20 pequenos folículos começam a crescer, mas só um folículo é selecionado para continuar o crescimento (folículo dominante),

enquanto os demais tornam-se atresicos e regridem (folículos subordinados). Essas ondas foliculares permanecem anovulatórias durante a fase luteínica, em que há secreção de progesterona pelo corpo lúteo. Somente após a luteólise é que o folículo dominante torna-se capaz de ser ovulado.

Assim, para que a fêmea doadora produza vários embriões, ao invés de um só, como normalmente acontece, é necessário realizar a superovulação ou superestimulação. Além disso, para assegurar que as coletas de embriões de várias fêmeas sejam realizadas num único dia e para aumentar a eficiência da superovulação, é necessário que várias doadoras apresentem cio num mesmo momento (sincronização do cio).

A superovulação é definida como um tratamento hormonal da fêmea na qual seus ovários são estimulados a realizar ovulações acima da quantidade fisiológica. A superovulação permite que os folículos subordinados, que entrariam em atresia, continuem a crescer e tenham o potencial para ovular. Isso é assegurado pela administração exógena de Hormônio Folículo Estimulante (FSH) ou de Gonadotrofina Coriônica equina (eCG). Para a superovulação, o FSH é aplicado duas vezes ao dia, durante 4 dias (8 aplicações), em doses decrescentes, totalizando 100-130 mg ou 200-300 UI para raças zebuínas e 160-200 mg ou 300-500 UI para raças européias. Por outro lado, a eCG é utilizada em dose única, na concentração de 2.000 UI.

Para que o tratamento de superovulação funcione, ele deve ser iniciado no momento da emergência de uma onda folicular, antes do desenvolvimento do folículo dominante. Assim, além da administração de FSH ou eCG, outras estratégias devem ser adotadas para controlar a emergência folicular, promover a sincronização e a aumentar a eficiência da superovulação, como a utilização de prostaglandina F₂ α (PGF₂ α), progesterona (P₄) + estradiol (BE), Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) e Hormônio Luteinizante (LH) ou Gonadotrofina Coriônica humana (hCG).

Na superovulação tradicional, há necessidade de observação de cio e início do tratamento com FSH 8 a 12 dias após o cio. No quarto dia de aplicação do FSH, a PGF2 α é administrada para promover luteólise. Após a injeção de PGF2 α , o cio deve ser observado, pois as fêmeas manifestam cio em 48 a 72 horas e devem ser inseminadas duas vezes: após 12 e 24 horas do início do cio. Os embriões são coletados das doadoras após 7 a 8 dias.

Existem protocolos que não requerem a observação de cio antes do tratamento de superovulação e podem ser iniciados em qualquer fase do ciclo estral. Um desses, envolve a ablação folicular (por aspiração folicular guiada por ultra-sonografia) e tratamento com FSH após 1-2 dias. Outro (Figura 6.4.), utiliza a combinação de BE + P4 e início do FSH após 4 dias. Em ambos os casos, procede-se a injeção de PGF2 α , seguida pela detecção de cio, pela IA (duas vezes) e pela coleta de embriões.

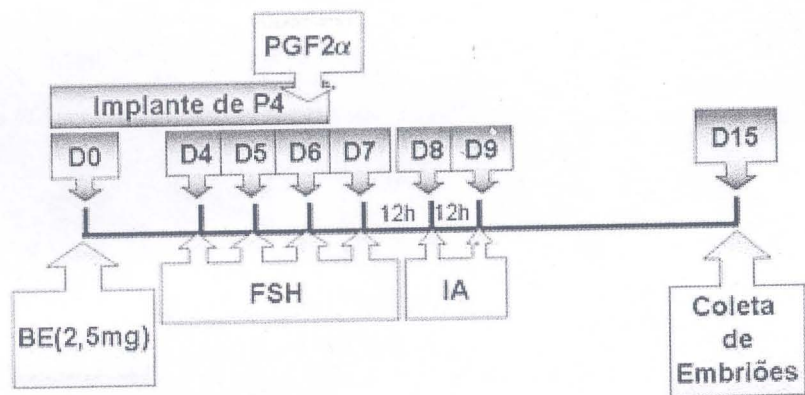


Figura 6.4. Protocolo de superovulação de doadoras, iniciado em qualquer fase do ciclo estral. D: dia, BE: benzoato de estradiol, P4: progesterona, FSH: hormônio folículo estimulante, PGF2 α : prostaglandina F2 α , IA: inseminação artificial

Além desses, há também protocolos que não requerem a detecção de cio nem para o início do tratamento de superovulação, nem para as IA, que passam a ser realizadas em tempo fixo (IATF). Esses protocolos envolvem a utilização de progesterona (P4) + estradiol (EB), FSH e LH e apresentam diferenças para as raças zebuínas e européias, quanto ao momento de administração de LH, após a última dose de FSH: 12 horas para raças zebuínas e 24 horas para raças européias (Figura 6.5.).

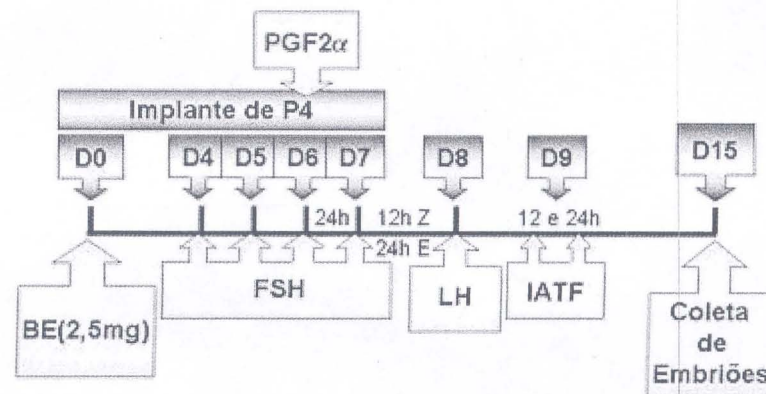


Figura 6.5. Protocolo de superovulação de doadoras de raças zebuínas (Z) e européias (E), iniciado em qualquer fase do ciclo estral, para inseminação artificial em tempo fixo (IATF). D: dia, BE: benzoato de estradiol, P4: progesterona, FSH: hormônio folículo estimulante, PGF2 α : prostaglandina F2 α , LH: hormônio luteinizante

Há grande variação de resposta à superovulação entre doadoras devido a fatores como: estado nutricional, estágio do ciclo estral, raça, idade e tratamento hormonal utilizado. Entretanto,

o índice médio de recuperação é de 5 embriões transferíveis. Devido aos tratamentos hormonais, as superovulações não devem ser realizadas a intervalos inferiores a 60 dias.

A coleta dos embriões é feita entre 6-8 dias após a primeira IA das doadoras. Nessa fase, os embriões, em estágio de mórula e blastocisto, estão localizados no interior dos cornos uterinos e podem ser recuperados por meio de lavagem do útero. A coleta é realizada no animal em estação, pelo método transcervical, com auxílio de um catéter de borracha ou de plástico flexível, contendo um balão inflável em sua extremidade. Guiado por palpação retal, o catéter é introduzido em um dos cornos uterinos (a, aproximadamente, 5cm da bifurcação uterina) e o balão é inflado com 10 a 20mL de ar. Para a coleta, utilizam-se 500mL de PBS (com antibióticos e soro fetal bovino) à temperatura de 25 a 30°C. A lavagem se dá pela injeção de PBS no interior do útero e remoção do líquido injetado, pelo catéter, com o auxílio de uma seringa. Posteriormente, o líquido removido do útero é levado ao microscópio para a visualização e a recuperação dos embriões. Após a lavagem de um corno uterino, o procedimento é repetido no outro corno. Após a lavagem dos dois cornos uterinos, as doadoras são tratadas com PGF2 α para promover luteólise e dar início a um novo ciclo estral e, também, para evitar a ocorrência de gestações múltiplas, caso alguns embriões tenham permanecido no interior do útero.

Os embriões recuperados são avaliados, classificados e, imediatamente, transferidos para as receptoras ou submetidos à congelação e ao armazenamento para posterior utilização. Para a transferência, os embriões são envasados em palhetas e transferidos por via transcervical para o corno uterino ipsilateral ao ovário que apresentar o corpo lúteo na receptora. Entretanto, para que as receptoras estejam no momento correto do ciclo estral para receberem o embrião, é necessário a realização da sincronização do estro.

As receptoras podem ser sincronizadas pelo encurtamento

proposital (administração de PGF2 α) ou prolongamento (implante de progesterona) da fase luteínica, que resultam em indução de estro e ovulação em cerca de 4 dias após o tratamento. A PGF2 α , como já mencionado para a IATF, desencadeia a ovulação em momento variável e dependente do estágio de crescimento folicular de cada fêmea. Assim, para uma sincronização mais uniforme, a PGF2 α deve ser administrada em duas doses, a intervalos de 11 a 14 dias, enquanto os implantes de progesterona (auricular ou intravaginal) devem ser mantidos nas fêmeas por 7 a 12 dias. Esses protocolos requerem a observação de cio após os tratamentos de sincronização.

Por outro lado, o protocolo “Ovsynch” pode ser utilizado nas receptoras para que a transferência de embriões seja realizada em tempo fixo (TETF; Figura 6.6.). Nesse caso, a única observação que deve ser feita é a da presença de corpo lúteo no ovário das receptoras, no momento da TETF.

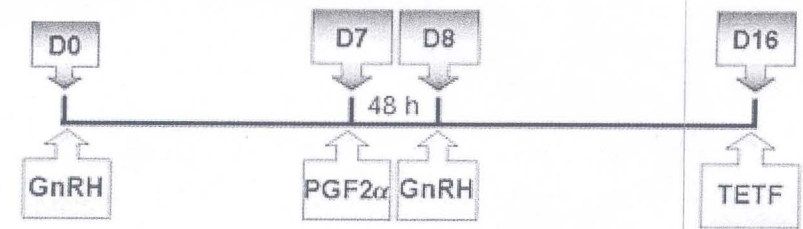


Figura 6.6. Protocolo de sincronização de receptoras para transferência de embriões em tempo fixo (TETF). D: dia, GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas, PGF2a: prostaglandina F2

Entretanto, resultados do protocolo “Ovsynch” em novilhas nem sempre são satisfatórios, pois a porcentagem de novilhas que

ovulam de maneira sincronizada é significativamente menor do que a de vacas. Portanto, é mais aconselhável que, em novilhas, empreguem-se protocolos de sincronização nos quais se utilizem os implantes de progesterona/progestágenos (semelhante ao protocolo PEPE de IATF).

6.5. Posologia e Nomes Comerciais (Laboratórios) de Hormônios Utilizados em IATF, TE e TETF

BE (benzoato de estradiol): utilização de 1 e 2mg para IATF e de 2,5-3mg para TE, via subcutânea (SC) ou intramuscular (IM). Produtos comerciais (1mg mL⁻¹ de BE): Cronibest[®] (Biogenesis), Estrogin[®] (Farmavet) e Ric-BE (Tecnopec).

ECP (cipionato de estradiol): utilização de 0,5-1mg em substituição à segunda dose de benzoato de estradiol, em protocolo de IATF, via IM. Produto comercial: ECP[®] (Pfizer; 2mg mL⁻¹ de ECP).

eCG (gonadotrofina coriônica equina ou PMSG): utilização de 200-500 UI para sincronização de ovulação e de 2.000 UI para superovulação (em dose única, no dia 4 do protocolo de TE). Produtos comerciais: Folligon[®] (Intervet; 200 ou 500 UI/mL de eCG) e Novormon[®] (Tecnopec; 200 UI/mL de eCG).

FSH (hormônio folículo estimulante): utilização de 100-130 mg ou 200-300 UI para raças zebuínas e 160-200 mg ou 300-500 UI para raças européias. Produtos comerciais: Folltropin-V[®] (Bioniche; 20 mg/mL de FSH) e Pluset[®] (Calier; 25 UI/mL de FSH).

GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas): utilização de 100 µg de gonadorelina (IM, IV ou SC), 25 ou 50 µg de lecirelina

(IM), ou 8 ou 10 µg de acetato de buserelina (IM ou IV). Produtos comerciais: Fertagyl[®] (Intervet; 100 µg/mL de gonadorelina), Gestran Plus[®] (Tecnopec; 25 µg/mL de lecirelina), Profertil (Tortuga; 100 µg/mL de gonadorelina) e Conceptal[®] (Intervet; 4 µg/mL de acetato de buserelina).

hCG (gonadotrofina coriônica humana): utilização de 1.500-3.000 UI, em substituição ao LH, em protocolo de TE, via IM. Produtos comerciais: Chorulon[®] (Intervet; 1.000 UI/mL de hCG), Ovusyn[®] (Syntex; 500 UI/mL de hCG) e Vetecor[®] (Calier).

LH (hormônio luteinizante): utilização de 12,5 ou 25mg de LH. Produto comercial: Lutropin-V[®] (Bioniche; 25mg de LH por frasco).

Progestágeno- implante auricular: utilização de 1 implante de norgestomet. Produto comercial: Crestar[®] (Intervet; 3mg de norgestomet).

Progesterona - implante intravaginal: utilização de 1 implante de progesterona. Produtos comerciais: CIDR[®] (Pfizer; 1,9g de progesterona), Cronipres[®] (Biogenesis; 1 g progesterona), DIB[®] (Syntex; 1 g progesterona), PRID[®] (Ceva; 1,55g de progesterona) e PRIMER[®] (Tecnopec; 1 g de progesterona).

Progesterona - injetável: uso (opcional) de 50mg no momento de aplicação de BE e de colocação do implante de P4, em protocolo de TE. Produtos comerciais: Progesterona injetável (Index Farmacêutica; 25mg/mL de progesterona) e Afisterone[®] (AFI Azienda).

PGF2a (prostaglandina F2a): utilização de 25mg de PGF2a, 530 mg de cloprostenol sódico, 150mg de D-cloprostenol, ou 12,5

ou 25mg de dinoprost, via IM. Produtos comerciais: CiosinÒ (Schering Plough; 265mg/mL de cloprostenol sódico), CronibenÒ (Biogenesis; 75mg/mL de D-cloprostenol), EurosinÒ (Pearson; 265 mg/mL de cloprostenol sódico), LutalyseÒ (Pfizer; 5 mg/mL de dinoprost), PrelobanÒ (Intervet; 75mg/mL de D-cloprostenol), ProliseÒ (Tecnopec; 75mg/mL de D-cloprostenol), Prostaglandina (Tortuga; 75mg/mL de D-cloprostenol), SincrocioÒ (Ouro Fino; 265mg/mL de cloprostenol sódico), SincrosinÒ (Vallée; 265mg/mL de cloprostenol sódico), VeteglanÒ (Calier; 75mg/mL de D-cloprostenol) e Cioprostinn® (Innovare; 265µg/mL de cloprostenol sódico).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARTHUR, G. H. **Reprodução e obstetrícia em veterinária**. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. 573 p.

ARTHUR, G. H. **Veterinary reproduction & obstetrics**. 7.ed. London: W.B. Saunders Company, 1996. 72 6p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. **Manual de Inseminação Artificial**. Uberaba: ASBIA, 2005. 46 p.

BARRINGTON, G. M.; GAY, J. M.; EVERMANN, J. F. Biosecurity for neonatal gastrointestinal diseases. **Veterinary Clinics of North America**, v. 18, n.1, p. 7-34, 2002.

BARROS, C. M.; ERENO, R. L. Avanços em tratamentos hormonais para a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos de corte. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 23-34, 2004.

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H. **Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**. São Paulo: Fundação da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, 2000. 332 p.

BARUSELLI, P. S. et al. Protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em *Bos indicus*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 31-38, 2006.

BARUSELLI, P. S. et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 77-88, 2006.

BÓ, G. A. et al. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 89-101, 2006.

BÓ, G. A. et al. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 1-22, 2004.

BRUM, D. S. et al. Espermatozóides sexados na produção *in vitro* de embriões (PIV) bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 348, 2005.

COELHO, S. G. Criação de bezerros. **II Simpósio Mineiro de Buiatria**, Belo Horizonte, 2005. Disponível em: <<http://www.ivis.org/proceedings/abmg/2005/pdf09.pdf?LA=7>>.

COMPÊNDIO DE PRODUTOS VETERINÁRIOS – SINDAN. Disponível em: <http://www.cpv.com.br> - acesso em 21 setembro 2006.

Conservação de espécies Brasileiras. Disponível em: www.cincyzoo.org/Conservation/GlobalConservation/OcelotTigrina/ - acesso em 27 julho 2006.

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 579 p.

Dicas: conservar doses de sêmen tem macetes; descongelar exige agilidade e precisão. **DBO Genética**, ago., p. 78, 2003.

DOMINGUES, P. F; LANGONI, H. Manejo sanitário de bovinos. In: _____. **Manejo Sanitário Animal**. 1 ed. Rio de Janeiro: EPUB, 2001, p. 212.

DYCE, K. M.; SACK, M. O.; WENSING, C. J. G. **Tratado de anatomia veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 813 p.

EAGLESOME, M. D.; GARCIA, M. M. Microbial agents associated with bovine genital tract infections and semen. Part I. *Brucella abortus*, *Leptospira*, *Campylobacter fetus* and *Tritrichomonas foetus*. **Veterinary Bulletin**, v.62, n.8, 743-775, 1992.

GONSALVES, P. B. D; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Ed.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 340 p.

GORDON, H. Ancient ideas about sex differentiation. In: VALLET, H. L.; PORTER, I. H. (Ed.) **Genetic mechanisms of sexual development**. Academic Press, New York, 1979. p. 1-32

GRUNERT, E.; GREGORY, R. M. **Diagnóstico e terapêutica da infertilidade na vaca**. Porto Alegre: Sulina, 1984. 174 p.

HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7.ed.. São Paulo: Manole, 2004. 513 p.

HASLER, J. F. Current status and potencial of embryo transfer

and reproductive technology in dairy cattle. **Journal Dairy Science**, v. 75, p. 2857-2879, 1992.

Histórico da Inseminação Artificial. Disponível em: www.saudeanimal.com.br/imagens/repropig - acesso em 19 julho 2006.

Inseminação Artificial em Panda Gigante. Disponível em: www.chinasnippets.com/feed/ - acesso em 27 julho 2006.

JACKSON, P. G. G. **Obstetrícia veterinária**. 2.ed.. São Paulo: Roca, 2006. 328 p.

JOHNSON, L. A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 93-107, 2000.

KNOBIL, E.; NEILL, J. D. **The physiology of reproduction**. 2.ed.. New York: Raven Press, 1992. 1390 p. v.1

LUCCI, C. O colostro e a imunidade de bezerras. In: _____. **Bovinos Leiteiros Jovens**. 1. ed. São Paulo: Nobel/Universidade de São Paulo, 1989. p. 110-151.

MADUREIRA, E. H. et al. A IATF possui custo benefício favorável? **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 141-143, 2005.

MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A.; ADAMS, G. P. Avanços na manipulação do ciclo estral de doadoras e receptoras nos programas de TE em bovinos. **Arquivos Faculdade Veterinária Universidade Federal Rio Grande do Sul**, v. 28, p. 24-51, 2000.

MARQUES, D.C. Instalações para pecuária de leite. In: _____. **Criação de Bovinos**. 7. ed. Belo Horizonte: Consultoria Veterinária e Publicações, 2006. p.104-119.

MAXWELL, W. M. C. et al. Integration of sperm sexing technology into the ART toolbox. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 79-95, 2004.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. 5.ed.. Porto Alegre: Sulina, 1982. 783 p. v. I e II.

NODEN, D. M.; De LAHUNTA, A. **The embryology of domestic animals**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1985. 274 p.

Programa de conservação de espécies com uso de Inseminação Artificial. Disponível em: www.cincyzoo.org/Conservation/- acesso em 27 julho 2006.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na Agropecuária**. 3. ed. Lavras: UFLA, 2004. 472 p.

SEIDEL Jr., G. E. Sexing mammalian sperm – intertwining of commerce, technology, and biology. **Animal Reproduction Science**, v. 79, p. 145-156, 2003.

SWENSON, M. J. **DUKES Fisiologia dos animais domésticos**. 11.ed.. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 856 p.

TONIOLLO, G. H.; VICENTE, W. R. R. **Manual de obstetrícia veterinária**. São Paulo: Livraria Varela, 1995. 124 p.

VASCONCELOS, J. L. M.; MENEGHETTI, M.; SANTOS, R. M. Inseminação artificial em tempo fixo (IATF) em bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 9-16, 2006.

VIANA, J. H. M. A produção mundial de embriões em 2004. **O Embrião**, p. 4-5, 2006.

Ficha de controle de IA (Adaptada de ASBIA, 2005, com exemplo de registro de animal inseminado)

Primeira Inseminação							
Nome ou número da fêmea	Data do cio	Hora do cio	Data da Inseminação	Hora da inseminação	Nome ou número do touro	Partida do sêmen	Nome do inseminador
678	08/04/06	7:00	08/04/06	17:00	Sapirão	IZ-304	Sebastião Frizone