

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

DRÚCILA SCHUSTS MELO

**FATORES QUE AFETAM A PERDA DE GESTAÇÃO DE
EMBRIÕES *IN VITRO* TRANSFERIDOS PARA
RECEPTORAS LEITEIRAS MISTIÇAS**

**Uberlândia - MG
2023**

DRÚCILA SCHUSTS MELO

**FATORES QUE AFETAM A PERDA DE GESTAÇÃO DE
EMBRIÕES *IN VITRO* TRANSFERIDOS PARA
RECEPTORAS LEITEIRAS MESTIÇAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial para
obtenção do título de bacharel em Medicina
Veterinária

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ricarda Maria dos Santos.

**Uberlândia - MG
2023**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

M528 2023	<p>Melo, Drúcila Schusts, 1991- FATORES QUE AFETAM A PERDA DE GESTAÇÃO DE EMBRIÕES IN VITRO TRANSFERIDOS PARA RECEPTORAS LEITEIRAS MISTIÇAS [recurso eletrônico] / Drúcila Schusts Melo. - 2023.</p> <p>Orientador: Ricarda Maria dos Santos. Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Medicina Veterinária. Modo de acesso: Internet. Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Veterinária. I. Santos, Ricarda Maria dos, 1972-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Medicina Veterinária. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 619</p>
--------------	--

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

DRÚCILA SCHUSTS MELO

**FATORES QUE AFETAM A PERDA DE GESTAÇÃO DE
RECEPTORAS DE EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO* EM FÊMEAS
LEITEIRAS MESTIÇAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Uberlândia, 22 de junho de 2023.

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Ricarda Maria dos Santos.
(Médica veterinária/Docente FAMEV-UFU)

Prof^a. Dr^a. Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva
(Médica veterinária/Docente FAMEV-UFU)

Amanda Oliveira Moura
(Médica veterinária/Membro Externo)

Dedico este trabalho aos meus sobrinhos
Icarus, Lucas e Gabrielly.

AGRADECIMENTOS

Minha profunda gratidão a todos aqueles que estiveram ao meu lado durante a minha caminhada acadêmica. Cada um de vocês teve um papel importante no meu sucesso, sou extremamente grata por todo o carinho, apoio e incentivo que recebi.

Primeiramente, agradeço a Deus, por me fortalecer e me dar fé, paciência e sabedoria para superar os obstáculos ao longo da minha jornada.

Aos meus amados pais, Edson dos Reis Melo e Noeli Lazara de Lima Melo, agradeço pela paciência, carinho, amor incondicional e constante incentivo.

À minha orientadora, professora Ricarda Maria dos Santos, sou imensamente grata pela oportunidade de realizar este trabalho. Com toda certeza o conhecimento compartilhado, a crença no meu potencial foi de suma importância para meu crescimento acadêmico e pessoal. Gratidão por me abrir novos horizontes!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ, pelo incentivo à pesquisa e por proporcionar recursos para a realização deste projeto.

Expresso meus agradecimentos aos contribuintes brasileiros, cujos impostos financiaram minha educação de qualidade de forma gratuita.

A todos os funcionários da UFU por tornaram a Universidade minha segunda casa.

A todos os professores por compartilhar o conhecimento, uma palavra amiga e auxiliar na minha caminhada acadêmica. Em especial à professora Kênia Carrijo, agradeço por não medir esforços em me ajudar em tantos esclarecimentos, sempre com empatia.

Meus agradecimentos a minha irmã, Dâmaris Melo, por sempre acreditar nos meus sonhos, oferecer palavras de conforto nos momentos difíceis e estar presente nas minhas conquistas.

À minha avó, Vicentina Maria de Lima (*in memoriam*), pelo carinho, amor, apoio imensurável e pelo melhor abraço.

Aos meus tios, Valdivino Pedrosa e Ireni Pedrosa, pelo carinho, hospitalidade e sábios conselhos.

Aos meus amigos, Diego Conceição, Gustavo Moreira, Iris Pedrosa, Soraya Oliveira e família, Maria Geralda, Renata Nunes e Valmor Rosa. Sua amizade, carinho, palavras de apoio e até mesmo puxões de orelha foram fundamentais para minha perseverança. Mesmo distantes, vocês sempre estiveram presentes.

Agradeço também ao meu amigo Carlos Henrique de Lima, por sua inestimável assistência em questões tecnológicas. Sua ajuda e alegria foram fundamentais para minha jornada.

Meus profundos agradecimentos a minha amiga Eligiane Priscila Meurer, pelas incansáveis horas de estudos, pela convivência, parceria e amizade.

A minha amiga Isabela Espinoza França, pela recepção na UFU, por estar sempre disposta a ajudar, pelas conversas e amizade.

Ao meu eterno amigo, Jonathan Lucas (*in memoriam*), pelo amor, carinho, parceria, risadas e por me ensinar que eu sou muito mais forte do que imagino.

Ao colega Matheus Eller Teixeira por auxiliar com os dados do trabalho.

Por fim, expresso minha gratidão a todos que de alguma forma contribuíram para esta conquista. Cada palavra de encorajamento e apoio emocional fizeram a diferença em minha caminhada.

Minha profunda gratidão a todos vocês que acreditaram em mim, quando nem eu mesma acreditei.

Hope when the moment comes
You'll say
I...I did it all
I...I did it all
I owned every second that this world could give
I saw so many places
The things that I did
Yeah, with every broken bone
I swear I lived

OneRepublic

RESUMO

A eficiência reprodutiva influencia na produção, taxa de reposição e melhoramento genético. Apesar de serem poucas as propriedades que utilizam as biotecnologias da reprodução, estas já provaram melhorar a eficiência reprodutiva do rebanho. Aproximadamente 80% da produção leiteira nacional advém de vacas mestiças (cruzamento de raça pura de origem europeia especializada em produção de leite, como Holandesa, Jersey e Pardo-suíço, e vacas zebu de origem Indiana, como Gir, Guzerá e Nelore). Assim, mesmo com o melhoramento genético, nutrição, manejo e biotecnologias da reprodução, de nada adianta se existem falhas ou grandes perdas de gestação, uma vez que, quando o animal perde uma gestação, perde-se genética, tempo e recursos econômicos. O estudo utilizou um banco de dados de uma fazenda leiteira comercial da região de Monte Alegre de Minas-MG, onde foi feita uma análise descritiva dos dados, quanto ao efeito da categoria da receptora (vaca vs. novilha) e do estágio de desenvolvimento do embrião (blastocisto vs. blastocisto expandido) sobre a P/TE (prenhez por transferência de embrião) e a perda até 210 dias de gestação. A categoria da receptora não influenciou a perda de gestação de embriões produzidos *in vitro*, sendo que a perda total de novilhas foi de 15% e vacas de 16,67%. Blastocistos expandidos resultam em uma maior taxa de prenhez (50,75%) e menor taxa de perda de gestação (11,76%) em relação a blastocistos (P/TE 45,45% e perda total de gestação 30%). A categoria da receptora não influencia na perda de gestação de produtos PIVE, entretanto blastocistos expandidos resultam em uma maior taxa de prenhez e menor taxa de perda de gestação.

Palavras-chave: Fertilização *in vitro*; Perda de gestação; Transferência de embrião; Vacas leiteiras mestiças.

ABSTRACT

Reproductive efficiency influences production, return rate and genetic improvement. Although there are few properties that use reproduction biotechnologies, they have already proven to improve the reproductive efficiency of the herd. Approximately 80% of national milk production comes from crossbred cows (crossbreeds of European origin specialized in milk production, such as Holstein, Jersey and Swiss Brown, and Indian zebu cows, such as Gir, Guzerá and Nellore). Thus, even with genetic improvement, nutrition, management, and reproduction biotechnologies, it is of no use if there are failures or large pregnancy losses. Since, when the animal loses a pregnancy, genetics, time, and resources are lost. The study used a database from a commercial dairy farm in the region of Monte Alegre de Minas-MG, a descriptive analysis of the data was carried out, regarding the effect of the recipient category (cow vs. heifer) and the stage of development of the embryo (blastocyst vs. expanded blastocyst) on P/ET (pregnancy/ embryo transfer) and loss up to 210 days of gestation. The category of the recipient did not influence the pregnancy loss of embryos produced *in vitro*, and the total loss of heifers was 15% and cows 16.67%. Expanded blastocysts result in a higher pregnancy rate (50.75%) and lower pregnancy loss rate (11.76%) relative to blastocysts (P/ET 45.45% and total pregnancy loss 30%). Recipient category does not influence pregnancy loss of *in vitro* embryo production products, however expanded blastocysts result in a higher pregnancy rate and lower pregnancy loss rate.

Keywords: *In vitro* fertilization; Pregnancy loss; Embryo transfer; Crossbred dairy cows.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Produção in vitro de Embriões Bovinos	14
2.2 Transferência de Embrião	16
2.3 Perda de Gestação de Produtos de PIVE	17
2.4 Métodos de Diagnóstico de Gestação.....	19
2.4.1 Palpação retal e ultrassonografia	19
2.4.2 Ultrassonografia Doppler	19
2.4.3 Concentração de progesterona circulante	19
2.4.4 Glicoproteínas associadas à gestação	19
2.4.5 MicroRNAs circulantes	20
2.4.6 Genes estimulados por interferon – ISG.....	20
3. METODOLOGIA.....	21
4. RESULTADOS	22
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS.....	27
Anexo 1	32

1. INTRODUÇÃO

De acordo com os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2021) e da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura – FAO (2021), em 2021 o Brasil foi o 5º maior produtor de leite do Mundo. Sendo Minas Gerais o estado que mais produziu, com uma participação de 27,2% da produção nacional (IBGE, 2021).

As vacas da raça Girolando (*Bos taurus x Bos indicus*), corroboram com 80% da produção nacional (CANAZA-CAYO et al., 2014). O cruzamento associa a rusticidade da raça Gir à alta capacidade de produção de leite do gado Holandês, sobressaindo assim com excelente produtividade e rusticidade (SILVA et al., 2021a). A raça girolando é o rebanho de escolha para países tropicais, como o Brasil (VASCONCELOS et al., 2019).

O sucesso da bovinocultura leiteira está diretamente relacionado à eficiência reprodutiva, fertilidade, melhoramento animal e nutrição do rebanho, uma vez que almeja-se um produto/vaca/ano. Para que isso ocorra é necessário que a vaca conceba em até 84 dias após o parto, resultando em um intervalo entre partos de 12 meses (VILELA, 2016; SILVA et al., 2018; SILVA et al., 2021b).

As biotecnologias da reprodução (inseminação artificial -IA, produção de embrião *in vitro* - PIVE e a transferência de embrião - TE) associadas a intensidade de seleção, têm acelerado o progresso genético da raça Girolando (CANAZA-CAYO et al., 2014; SILVA et al., 2021a). No ano de 2020 houve um crescimento na utilização da IA, porém ainda é um cenário pequeno, visto que apenas 10,7% do rebanho total foi inseminado. Ou seja, 19,6 milhões de vacas (ANUÁRIO LEITE, 2021). De acordo com Associação brasileira de inseminação artificial – ASBIA (2023), houve um crescimento de 14% nas vendas de sêmen de animais com aptidão para leite, quando comparado o primeiro trimestre de 2022 e 2023.

Já a transferência de embrião cresceu 20,6% no Brasil em 2021, colocando o Brasil em segundo lugar no *ranking* de países que mais realizaram TE no mundo. Número que pode ser subestimado, visto que há uma grande diferença entre o número de embriões relatados pelas associações de criadores e o número de bainhas de TE vendidas no país. A Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões – IETS, sugere que isso pode se dar devido ao crescente mercado de embriões de baixo custo, ou seja, não registrados (VIANA, 2022).

Viana (2022) prevê que países como Brasil, Argentina e Austrália irão expandir o mercado de embriões. Uma vez que juntos possuem quase 300 milhões de cabeças, 18.7% do

plantel mundial, com uma indústria de produção de embriões funcional, porém com baixo índice de intensidade.

A falha na concepção e a perda de gestação são fatores que influenciam diretamente e de forma negativa na fertilidade do rebanho leiteiro, impactando a produtividade do sistema (BORGES; GREGORY, 2003; VILELA, 2016). Ferraz et al. (2016) e Lobato et al. (2019) buscaram em seus trabalhos correlacionar a categoria da receptora e o estágio de desenvolvimento do embrião na prenhez por transferência de embrião e na perda de gestação, onde ambos encontraram que a categoria da receptora interfere na taxa de prenhez, assim como o estágio de desenvolvimento do embrião. Tendo em vista que a maioria dos trabalhos internacionais são referentes a rebanhos da raça Holandesa, o objetivo com este trabalho foi avaliar o efeito da categoria da receptora leiteiras mestiças (novilha vs. vaca) e o estágio de desenvolvimento do embrião (blastocisto vs. blastocisto expandido) na prenhez por transferência e na perda de gestação de embriões produzidos *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vitro* de Embriões Bovinos

Com o crescente aumento do uso de biotecnologias da reprodução na pecuária brasileira, destaca-se a técnica de Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE), que visa maximizar os índices produtivos e os resultados, sendo o Brasil o segundo maior produtor de embriões *in vitro* no mundo (DA SILVA, 2015; VIANA, 2022).

A técnica favorece a multiplicação da genética da fêmea, faz maior pressão de seleção do rebanho e possibilita a produção de animais provenientes de fêmeas de alto valor zootécnico que não estão aptas a reprodução, como é o caso de animais pré-púberes, senis, gestantes, fêmeas com patologias do trato reprodutivo e até mesmo mortas (PONTES et al., 2010; LUEDKE et al., 2019).

De acordo com Viana, Figueiredo e Siqueira (2017), em 2015, 57% dos embriões produzidos *in vitro* no Brasil foram de raças leiteiras, visto que a técnica possibilitou resultados positivos com a utilização de sêmen sexado. E além de resultar em uma maior produção de fêmeas, ainda possibilita que com apenas uma palheta de sêmen sexado seja possível fecundar ovócitos de até 10 doadoras (VIANA et al., 2018). Entretanto, Barrozo et al. (2022) relatam que o sêmen sexado apresenta uma menor conversão embrionária, quando comparado ao sêmen convencional, o que sugere maiores estudos para saber causas e melhor eficiência do sêmen sexado na PIVE.

Em 2017, a PIVE brasileira correspondeu a 34,8% da produção mundial, e ainda é utilizada em uma parcela pequena do rebanho nacional, tendo espaço para crescimento (VIANA et al., 2018). A técnica de PIVE é complexa e contempla várias etapas que vão desde a colheita de oócitos, maturação, fertilização, cultivo e classificação dos embriões viáveis (LUEDKE et al., 2019), e está integrada a vários procedimentos conectando o manejo reprodutivo das doadoras e receptoras, punção folicular guiada por ultrassom ou aspiração folicular, procedimentos laboratoriais a transferência embrionária (RIZOS, 2008).

A biotecnologia de punção folicular guiada por ultrassom – OPU, para obtenção de oócitos começou a ser implementada na década de 1990 (PIETERSE et al., 1991). O estudo de Pieterse et al. (1991) concluiu que era possível a coleta de oócitos imaturos para a PIVE, sem procedimentos cirúrgicos (laparoscopia). Além de ser uma técnica menos invasiva, apresentava uma opção a superovulação e coleta de embrião *in vivo*. Além de possibilitar a aspiração de fêmeas muito jovens, reduzindo assim o intervalo de gerações (JAINUDEEN; WAHID E HAFEZ, 2004). Desde então, a OPU vem sendo estudada, utilizada e aprimorada para cada vez

mais para obter melhores resultados, em relação a quantidade e qualidade de oócitos coletados (SENEDA et al., 2020).

Após a aspiração folicular guiada por ultrassom é realizado o rastreamento e seleção dos oócitos. Estes são classificados em quatro graus, a depender da presença de células do *cumulus* e das características do ooplasma. O grau I representa o melhor estágio, e o IV grau representa oócitos sem células do *cumulus* (LEAL, 2008). Sendo oócitos de grau I, II e III os selecionados para a PIVE (PETRY et al., 2019).

Os oócitos são transportados até o laboratório, adequadamente armazenados em temperatura de 38,5 °C, atmosfera com 5% de CO₂ e umidade de 95%, iniciando assim a fase de maturação *in vitro* (PETRY, et al., 2019; BARROZO et al., 2022). O sucesso na maturação *in vitro* (MIV) é essencial para capacitar o oócito para a fecundação. A MIV ocorre de 22 a 24 horas (BARROZO et al., 2022). Diversos estudos ainda estão sendo feitos para melhorar esta etapa, uma vez que envolve uma série de transformações com a célula e reflete no sucesso da PIVE (LUEDKE et al., 2019). Speckhart et al (2023), ressaltam a importância e necessidade do controle de temperatura durante todo o processo, sendo a temperatura ideal 38,5°C. Assim como o preparo dos meios, para que todo o processo seja feito em tempo adequado para manter a qualidade dos oócitos.

Na fecundação *in vitro* (FIV) são utilizados espermatozoides de sêmen congelado, previamente selecionados baseado na separação pelo gradiente Percoll, e capacitados através da adição de heparina e glicosaminoglicanas no meio de fecundação (VARAGO et al., 2008). É de suma importância que todo o processo seja feito concomitante a manipulação dos oócitos, e que seja seguido o protocolo para que a manipulação dos oócitos e espermatozoides seja feita no tempo correto, sem que haja tanta variação de temperatura e exposição desnecessária ao ambiente, o que pode resultar em piores resultados (SPECKHART et al., 2023). O sêmen é então colocado em uma placa junto com os oócitos para que ocorra a fecundação (GONÇALVES; FIGUEIREDO E FREITAS, 2002).

Após a fecundação, que pode variar em 12 a 24 horas, é realizado o desnudamento, que é a remoção das células do *cumulus* sem afetar a zona pelúcida, é feito através da pipetagem com força e velocidade continua (SPECKHART et al., 2023). Em seguida os zigotos são colocados em uma placa com meio específico que irá proporcionar o seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Este processo é denominado de cultivo *in vitro* – CIV, quando ocorre a ativação do genoma embrionário, clivagem e diferenciação (BARROZO et al., 2022).

Todas as etapas de maturação, fertilização e cultivo são realizadas em ambiente controlado na estufa, com temperatura de 38,5° C, nível de CO₂ a 5% e umidade controlada.

(GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2002). Cada fase consiste no uso de meios específicos (SPECKHART et al., 2023).

O desenvolvimento embrionário é avaliado no 6º dia, é observada a taxa de produção de blastocistos em relação ao número de oócitos selecionados, a compactação dos blastômeros e formação inicial da blastocele (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2002; BARROZO et al., 2022). No 7º dia é feita a classificação morfológica e então seleciona-se os embriões aptos a serem transferidos ou criopreservados (OLIVEIRA; SERAPIÃO; QUINTÃO, 2014; BARROZO et al., 2022)

A Sociedade Internacional de Transferência de Embrião criou um manual que classifica os estágios e qualidade de desenvolvimento do embrião. A classificação por estágio leva em consideração atributos relacionados à evolução do desenvolvimento embrionário, tais como o grau de compactação, tamanho e número das células embrionárias (blastômeros), formação da cavidade embrionária (blastocele), envoltório externo (embrião e zona pelúcida). Após a fertilização, espera-se que a cada dia o embrião esteja em um determinado estágio de desenvolvimento (BARFIELD; DEMETRIO, 2022) (Anexo 1).

De acordo com Oliveira et al. (2014) a criopreservação de embriões é um processo bastante complexo, uma vez que os embriões são compostos por cerca de apenas 90 células envoltas pela zona pelúcida, e a injúria ou perda dessas pode ser irreversível. A criopreservação dos embriões pode ser feita através do congelamento lento clássico ou vitrificação (DODE; LEME; SPRÍCIGO, 2013).

Grázia (2019) aponta que a PIVE contribui com diversas vantagens para bovinocultura, entretanto, a técnica apresenta numerosas variáveis que influenciam no resultado, como diversos protocolos laboratoriais, fatores relacionados ao campo, qualidade dos oócitos e diversos fatores relacionados à receptora. E que tais variáveis implicam diretamente nos índices de gestação, perdas gestacionais e nascimento, sugerindo assim maiores estudos nestas áreas.

2.2 Transferência de Embrião

Para que a transferência de embrião (TE) seja feita é imprescindível que a receptora seja apta para a reprodução, ou seja, tenha o trato reprodutivo sem alterações ou infecções, ciclo estral normal e escore de condição corporal adequado. Além disso, a receptora deverá estar sincronizada com o embrião (para ótimos resultados a diferença não deve passar de 24 horas do cio da receptora e da fertilização do embrião, podendo ser até 24 horas antes ou até 24 horas

depois), e ter um corpo lúteo (CL), ativo. Só assim ao receber o embrião ela poderá desenvolver a gestação (JAINUDEEN; WAHID E HAFEZ, 2004).

É realizada assepsia e anestesia epidural (lidocaína 2%). O aplicador é introduzido pela vagina, passa-se a cérvix e o embrião é depositado no terço final do corno, ipsilateral ao ovário com CL. Pessoas treinadas são mais bem qualificadas para este processo, a fim de evitar lesões no trato genital e o depósito do embrião no local inadequado (JAINUDEEN; WAHID E HAFEZ, 2004).

2.3 Perda de Gestação de Produtos de PIVE

De acordo com Ealy, Wooldridge e Mccoski (2019), a eficiência da produção de embriões provenientes da PIVE está longe de ser ideal, visto que somente 27% das gestações resultam em um produto vivo. Quando comparamos a PIVE com a produção *in vivo* de embriões, o resultado de P/TE dos embriões de PIVE são de 10% a 40% menores que a produção *in vivo*.

Anormalidades morfológicas são observadas em conceptos de PIVE, demonstrando que são menos propensos ao alongamento, têm diâmetro do disco embrionário reduzido e saco vitelino menos desenvolvido. Associado com o crescimento fetal alterado, apresenta maior risco e incidência da síndrome do bezerro grande (EALY; WOOLDRIDGE; MCCOSKI, 2019).

Aproximadamente 40% das vacas em que foram realizadas a TE entre 7 a 8 dias pós estro, não estão gestantes até o dia 21, a regressão do CL e perda do concepto, evidenciam o baixo nível de progesterona. Embora as falhas gestacionais da PIVE ocorram ao longo da gestação, 80% de todas as falhas gestacionais ocorre nas fases iniciais, até o 40º dia de gestação, sendo as 6 primeiras semanas as mais críticas. Posterior a esse período as perdas são de 5% entre 45 a 90 dias, e 7% até o final (EALY; WOOLDRIDGE; MCCOSKI, 2019).

Já o trabalho de Pohler et al. (2020), aponta que a perda gestacional ocorre principalmente nos 30 primeiros dias de gestação, diminuindo à medida que a prenhez avança. Wiltbank et al. (2016) contabilizaram a perda no primeiro mês de 44 a 50% nas gestações em bovinos de corte e leite.

A causa da perda de gestação posterior ao dia 60 pode estar relacionada com o aumento de anormalidades genéticas e doenças infectocontagiosas, entre elas a BVD, BHV-1, *Leptospira*, *Campylobacter foetus*, *Neospora caninum*, *Brucella abortus* e *Tritichomonas foetus* (WILTBANK et al., 2016)

São muitas as variáveis independentes da PIVE que podem influenciar a concepção após a TE em bovinos, incluindo condições ambientais, nutricionais, predisposição a doenças, a

sincronicidade do embrião com o útero e os níveis de progesterona ideais para o reconhecimento materno e do embrião. Associado a variáveis dependentes da PIVE que abrange problemas conceptuais, placentário e fetais. Todos esses fatores tornam as gestações de PIVE propensas a perda de gestação e até mesmo a problemas após o nascimento (EALY; WOOLDRIDGE; MCCOSKI, 2019; POHLER et al., 2020).

Ealy, Wooldridge e Mccoski (2019) organizam as principais causas de perda de gestação em fases: nidação, desenvolvimento e função do saco vitelino, desenvolvimento e função do cório-alantoide, desenvolvimento do feto e resultados e desempenho do parto. As falhas que ocorrem durante o período nidação tem como principal causa erros de desenvolvimento na linhagem embrionária e extraembrionária. Deficiências que podem impedir o alongamento do concepto ou produzir conceptos alongados que contêm discos embrionários pequenos ou inexistentes ou sacos vitelinos pouco desenvolvidos. No período de implantação a falha pode ocorrer na formação precoce de células binucleadas e comprometer o desenvolvimento da placenta e do saco alantóide. Por fim, o desenvolvimento e a função placentária durante o meio e o final da gestação e a trajetória do crescimento fetal são alterados em gestações PIVE, e podem produzir bezerros com síndrome do bezerro grande com saúde neonatal precária.

Wiltbank et al. (2016) dividem as fases de perda de gestação do primeiro trimestre em 4 períodos cruciais. O período 1 corresponde a primeira semana de gestação, que contempla problemas relacionados a fertilização, ativação do genoma embrionário e desenvolvimento do blastocisto. O período 2 constitui do 8º ao 27º dias, e considera as seguintes situações: o alongamento embrionário, sinalização do interferon-tau (IFNT) e a manutenção do corpo lúteo. O período 3 retrata do 28º ao 60º dia, e compreende os processos de: desenvolvimento do placentoma, crescimento do embrião e perda inexplicada da prenhez. E por último, o período 4 do dia 60º ao 90º dia: crescimento do embrião e do placentoma.

A determinação da causa da morte embrionária tem sido difícil, devido a limitações em determinar com precisão a viabilidade dos embriões na fase inicial da gestação. Assim, Pohler et al. (2020) sugerem pesquisas para a criação de um método eficaz que seja capaz de determinar a campo e nas fases iniciais a prenhez em bovinos.

2.4 Métodos de Diagnóstico de Gestação

2.4.1 Palpação retal e ultrassonografia

O desenvolvimento do embrião no início da gestação, o acúmulo de líquido alantoide e amniótico, possibilita o diagnóstico de gestação em bovinos por pessoas treinadas através da ultrassonografia, que é o padrão ouro para diagnóstico de gestação, nos 30 a 35 dias de gestação, porém é mais preciso entre os 40 a 60 dias (EALY; SEEKFORD, 2019; POHLER et al., 2020).

2.4.2 Ultrassonografia Doppler

A manutenção da gestação em bovinos requer concentrações elevadas de progesterona e um corpo lúteo funcional (HAFEZ, 2004). A ultrassonografia Doppler permite o diagnóstico de gestação entre os dias 18 e 24 (EALY; SEEKFORD, 2019). Contudo, Motta et al. (2020), citam a possibilidade de diagnóstico de 20 a 22 dias, com precisão superior a 90%. O diagnóstico é feito através da perfusão sanguínea do CL (PUGLIESI et al., 2014).

2.4.3 Concentração de progesterona circulante

A diminuição da concentração de progesterona no leite é um método utilizado para diagnosticar a perda de gestação, entre os dias 20 e 24 após da IA diagnosticando corretamente de 60 a 100% dos casos (POHLER et al., 2016b). Contudo, Ealy e Seekford (2019), apontam que a alta circulação de progesterona é mais eficaz para predizer o sucesso de uma prenhez, em relação a baixa concentração para predizer a falha na gestação.

2.4.4 Glicoproteínas associadas à gestação

As glicoproteínas associadas a gestação (PAG) são produtos das células trofoblásticas gigantes do trofocotoderma na placenta. Pohler et al. (2016a), constataram que a determinação da concentração de PAG em amostras de soro, no dia 31 de gestação, são capazes de prever com acurácia de 95% a mortalidade embrionária tardia, sendo a mensuração de PAG um método viável de diagnóstico precoce da gestação e acompanhamento da vitalidade do embrião (**a diminuição da concentração de PAGs significa a perda de gestação**), o que pode auxiliar no manejo da reprodução, permitindo a ressincronização precoce de animais não gestantes visando encurtar o intervalo entre partos (BARBATO et al, 2022). Sendo assim, as PAGs podem ser um potencial biomarcador para diagnóstico de potencial falha de gestação em

bovinos na fase inicial da gestação, entretanto é necessário mais estudos para padronizar a concentração ideal (EALY; SEEKFORD, 2019; BARBATO et al., 2022).

2.4.5 MicroRNAs circulantes

Atualmente microRNAs, que são pequenos RNAs endógenos que regulam a expressão gênica pós-transcricionalmente (LU; ROTHENBERG, 2018), são o biomarcador mais promissor para detecção de gestação precoce, sugerindo que pode fornecer informações adicionais quanto a viabilidade do embrião, visto que vacas que têm perda de gestação tem quantidade aumentada significativa de microRNAs específicos nos dias 17 e 24 de gestação (POHLER et al., 2017; EALY; SEEKFORD, 2019).

2.4.6 Genes estimulados por interferon – ISG

A produção de interferon-tau (IFNT) e o alongamento do concepto é a forma de reconhecimento materno em ruminantes (ANTONIAZZI *et al.*, 2011). Esta proteína é produzida em grandes quantidades pelo concepto, entre o 14º e 21º dias de gestação. O IFNT desencadeia uma série de eventos que resultam na expressão de vários genes. A detecção destes genes estimulados por interferon (ISG) em leucócitos do sangue de bovinos por PCR está sendo utilizado para detectar ~~assim~~ a prenhez e no caso de uma possível falta de resposta por parte destes genes detecta-se a fêmea vazia. Os ISGs podem ser detectados utilizando PCR a entre 17 e 22 dias de gestação. Assim, a associação de todas as ferramentas, ou seja, PAG, microRNAs e ISG podem ser ferramentas para prever precocemente uma possível perda de gestação (POHLER et al., 2017; EALY; SEEKFORD, 2019).

Através desses biomarcadores que indicam uma potencial falha, Wiltbank et al. (2016), apontam que é mais eficiente e produtivo reiniciar uma prenhez de melhor qualidade, ao continuar com uma gestação com possibilidade de falhar. Deste modo, pesquisadores continuam na busca de novos marcadores de perda de prenhez para bovinos, ou a combinação das várias tecnologias existentes capazes de detectar perdas de gestação precocemente. É provável que identificar marcadores moderadamente fortes de mortalidade embrionária seja um objetivo alcançável, ao invés de identificar marcadores definitivos de mortalidade embrionária. Assim, podem ser desenvolvidas estratégias que indicam previamente o risco de falha na prenhez, possibilitando uma intervenção precoce (EALY; SEEKFORD, 2019).

3. METODOLOGIA

Os dados foram fornecidos por uma fazenda comercial localizada no município de Monte Alegre de Minas – MG, com um rebanho leiteiro composto por 60 vacas em lactação, produção média de 18 litros de leite/dia, em duas ordenhas diárias. O rebanho leiteiro da fazenda é composto de vacas Gir e Girolando, sendo que 80% do rebanho são animais da primeira geração do cruzamento entre as raças Holandesa e Gir. O sistema de produção da fazenda é totalmente à pasto. Os animais foram divididos em lotes de vacas em lactação e lotes de novilhas.

O protocolo vacinal da propriedade constitui de vacinas reprodutivas (campilobacter, leptospirose, LBR BVB, brucelose, parainfluenza bovina e vírus sinicial respiratório bovina) de 6 em 6 meses, clostridiose de 12 em 12 meses, raiva de 8 em 8 meses, vacina pré-parto (Rotatec-J5, possui antígenos para rotavírus e *Escherichia coli entérica*) em duas doses, 60 dias e 30 dias pré-parto, e é feita vermifugação de 7 em 7 meses dos animais do rebanho.

Foram analisados os dados coletados de agosto de 2021 a maio de 2023. A coleta de ovócitos foi realizada por aspiração folicular guiada por ultrassom nas doadoras selecionadas (vacas e novilhas do rebanho da própria fazenda), essas foram selecionadas de acordo com a produção, estrutura corporal, precocidade, musculosidade, umbigo, características raciais, aprumos, características sexuais e docilidade. A produção *in vitro* dos embriões foi realizada por empresas comerciais da região.

No laboratório, os embriões foram classificados de acordo com a qualidade e estágio desenvolvimento no dia 7 após a fertilização. Para as transferências os embriões (TE) frescos foram envasados individualmente em palhetas de 0,25ml, e mantidos em um transportador de embriões à 36° C até o momento da transferência. Como receptoras foram utilizadas vacas e novilhas do próprio rebanho leiteiro. Foi feita a palpação retal para identificação da presença e qualidade de corpo lúteo (CL), foi administrado anestesia epidural (lidocaína 2%), só então foi realizado a deposição do embrião no corno uterino ipsilateral ao CL, com o auxílio de um inovulador próprio para TE.

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia transretal no dia 30 após a TE. A taxa de prenhez foi calculada pelo número de prenhez dividido pelo número de embriões transferidos, multiplicado por 100. A viabilidade das gestações foi acompanhada aos 60, 90, de 120 a 150 e 210 dias por palpação retal. Foram consideradas perdas gestacionais os casos em que na avaliação a fêmea anteriormente gestante apresentou-se vazia. Os dados foram expressos em porcentagem de acordo com a razão [(número de perdas/ número de prenhes no último diagnóstico) X100].

4. RESULTADOS

O trabalho foi realizado com os dados de 89 transferências de embriões, realizadas entre agosto de 2021 a maio de 2023. Levando em consideração o número de animais, foi feita a análise descritiva dos dados, onde foi analisado o efeito da categoria da receptora (vaca vs. novilha) e do estágio de desenvolvimento do embrião (blastocisto vs. blastocisto expandido) sobre a prenhez/transferência de embrião (P/TE) e a perda até 210 dias de gestação (Tabela 1 e Tabela 2).

Na categoria receptora novilha, obteve-se 52.63% de taxa de prenhez (de 38 animais, 20 foram confirmadas prenhes). Já na categoria receptora vaca, a taxa de prenhez foi de 47,06% (de 51 animais, 24 foram confirmadas prenhes) (Tabela 1).

Em relação a perda de gestação, a categoria de receptoras novilha teve perda apenas aos 60 dias (P1), totalizando taxa de perda de gestação de 15%. Enquanto, que na categoria de receptoras vacas, houve 8,33% de perda de gestação aos 60 dias, 4,54% de perda aos 90 dias e 4,76% de perda de 120 a 150 dias, totalizando 16,67% de perda (Tabela 1).

Tabela 1 - Efeito categoria receptora sobre a prenhez por transferência de embrião e perda de gestação até 210 dias.

Categoria da Receptora	P/TE*	P1**	P2#	P3##	P4+	Perda total
Novilha	20 (38) 52,63%	3 (20) 15%	0 (17) 0,0%	0 (17) 0,0%	0 (17) 0,0%	3 (20) 15%
Vaca (n)	24 (51) 47,06%	2 (24) 8,33%	1 (22) 4,54%	1 (21) 4,76%	0 (20) 0,0%	20 (24) 16,67%

*P/TE – prenhez/transferência de embrião; **P1 – Perda de gestação aos 60 dias; #P2 – Perda de gestação aos 90 dias; ##P3 – Perda de gestação de 120 a 150 dias; +P4 – Perda de gestação aos 210 dias.

Observou-se que não houve diferença numérica entre receptoras vacas e novilhas em relação a P/TE e perda de gestação até 210 dias (Tabela 1).

Foram realizadas 22 TE com blastocitos (BL), e 67 com blastocisto expandido (BX). que resultaram em 45,45% e 50,75% P/TE, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 - Efeito estágio do embrião (blastocistos vs. blastocisto expandido) sobre a prenhez por transferência de embrião e perda de gestação até 210 dias.

Estágio	P/TE*	P1**	P2#	P3##	P4+	Perda total
Embrionário						
BL (n)	10 (22) 45,45%	2 (10) 20%	0 (8) 0,0%	1 (8) 12,5%	0 (7) 0,0%	3 (10) 30%
BX (n)	34 (67) 50,75%	3 (34) 8,33%	1 (31) 3,22%	0 (30) 0,0%	0 (30) 0,0%	4 (34) 11,76%

*P/TE – prenhez/transferência de embrião; **P1 – Perda de gestação aos 60 dias; #P2 – Perda de gestação aos 90 dias; ##P3 – Perda de gestação de 120 a 150 dias; +P4 – Perda de gestação aos 210 dias; BL – blastocistos; BX – blastocisto expandido.

As gestações de TE provenientes de blastocistos apresentaram 20% de perda aos 60 dias e 12,5% de perda de 120 a 150 dias, resultando em uma taxa de perda de gestação total de 30%. Já as gestações advindas de blastocisto expandido resultaram em perda de gestação de 8,33% aos 60 dias e 3,22% aos 90 dias, totalizando uma taxa de perda de gestação de 11,76% (Tabela 2).

Assim, detectou-se que blastocistos expandidos resultam em uma maior taxa de prenhez e menor taxa de perda de gestação.

5. DISCUSSÃO

A taxa de prenhez por TE, leva em consideração fatores além da qualidade embrionária, como a habilidade do técnico, sincronia entre o ciclo da receptora e o estágio de desenvolvimento embrionário, condição sanitária, nutricional e escore de condição corporal das receptoras, criteriosa classificação dos embriões, qualidade do corpo lúteo, entre outros. Todos esses fatores devem ser levados em consideração ao analisar resultados da TE (VIANA, 2009; DEMETRIO *et al.*, 2020).

Ealy, Wooldridge e Mccoski (2019), relatam que apenas 27% da PIVE resultam no nascimento de um produto. Entretanto, no presente trabalho 41,57% dos embriões resultaram em um produto PIVE, mostrando que há uma melhor eficiência reprodutiva na propriedade do que comparado com outros estudos, o que possivelmente pode ter ocorrido visto que neste trabalho utilizou-se dados de uma única fazenda que tem um controle nutricional e sanitário muito eficiente.

Wiltbank (2016), Ealy, Wooldridge e Mccoski (2019) e Pohler et al. (2020) relatam a maior perda de gestação do primeiro mês até a 6ª semana de gestação. O que também é comprovado no presente trabalho, onde o maior número de perda de gestação ocorreu entre 30 e 60 dias de gestação. No trabalho de Ealy, Wooldridge e McCoski (2019) foi descrito que o momento das perdas de gestação de embriões PIVE é semelhante às perdas de gestação por IA em vacas leiteiras e de corte. Entretanto, a ocorrência dessas perdas é menos severa em gestações de IA. Vacas inseminadas apresentam de 10 a 20% de falha na fertilização, e dentre os zigotos fertilizados, apenas 50% a 60% são viáveis e atingem os estágios adequados de desenvolvimento no dia 7.

Baruselli et al. (2020) fizeram uma análise com vários trabalhos e evidenciaram que embriões produzidos *in vitro* são menos eficazes para manter uma prenhez em relação a embriões produzidos por IA ou de múltipla ovulação e transferência de embrião – MOTE. Apesar da perda de gestação de TE proveniente de embriões de PIVE ocorrer ao longo da gestação, 80% ocorrem até o dia 40 da prenhez. E concluem que mesmo que a TE seja usada principalmente para animais de alto valor genético, ela também pode ser utilizada como ferramenta para superar os problemas reprodutivos decorrentes do estresse térmico, principalmente em vacas leiteiras em lactação, em que os oócitos e embriões são intensamente danificados pela hipertermia. Assim, a TE nos estágios de mórula ou blastocisto ajuda a

restabelecer a fertilidade durante a época de estresse térmico, uma vez que após esses estágios, os embriões são mais resistentes a temperaturas elevadas.

Ferraz et al. (2016) concluíram que múltiparas da raça Holandesa obtiveram maior número e porcentagem de embriões não fertilizados e menor porcentagem de embriões viáveis em relação as primíparas e nulíparas, o que não condiz com os resultados obtidos no presente trabalho, visto que não foi encontrado diferença numérica entre as categorias da receptora (vaca vs. novilha). Além disso, eles encontraram que a paridade da receptora (nulípara, primípara ou múltipara), tipo de embrião, estágio do embrião, qualidade do embrião, dia do ciclo estral na TE e o índice médio de temperatura e umidade nas coletas de embrião em TE influenciou o índice de P/TE. Ainda, a P/TE foi maior para nulípara do que primípara e maior para primípara do que múltipara, maior para embriões frescos do que outros, maior para blastocisto expandido do que outros, maior para qualidade 1 do que 2 e maior para qualidade 2 do que 3, no presente trabalho também foi encontrado que blastocisto expandido resultam em maior P/TE do que blastocistos. Ferraz et al. (2016), relatam ainda que a P/TE foi maior para TE no dia 7 e 8 do ciclo estral do que 6. Lobato et al. (2019), também concluíram que embriões em estágios de desenvolvimento mais avançado resultam em melhor eficiência reprodutiva por TE em vacas girolando, o que condiz com os resultados obtidos no presente trabalho. Entretanto, eles também concluíram que a categoria da receptora influencia a P/TE e que novilhas devem ser priorizadas na escolha da receptora. Os autores justificam a possibilidade da categoria da receptora influenciar a P/TE, tendo em vista que vacas e novilhas têm produção de hormônios diferentes. Já em relação ao estágio de desenvolvimento do embrião, todos foram fertilizados no mesmo dia, e os que se desenvolveram mais rapidamente, provavelmente tem maior capacidade de implantação e manutenção da gestação em relação aos que se desenvolveram mais lentamente.

Na busca por marcadores que identifiquem uma possível falha de gestação por parte do embrião, Sang et al. (2020), concluíram que o peptídeo C-natriurético (CNP), a interleucina 8 (IL-8), a interleucina 6 (IL-6), o fator inibidor de leucemia (LIF), e a proteína morfogenética bovina 4 (BMP-4) poderiam modificar o desenvolvimento embrionário, afetando as características do blastocisto resultante. E que a BMP-4 foi a única molécula de sinalização celular que inibiu o desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto. Porém sugerem mais pesquisas para entender como as mudanças nas características do blastocisto afetariam a competência do embrião em estabelecer e manter a gestação.

6. CONCLUSÃO

A categoria da receptora não influencia na perda de gestação de produtos PIVE, entretanto blastocistos expandidos resultam em uma maior taxa de prenhez e menor taxa de perda de gestação.

REFERÊNCIAS

ANTONIAZZI, A. Q. *et al.* Função do interferon-tau durante o reconhecimento materno da gestação em ruminantes. **Ciência Rural**, v. 41, n. 1, p. 176-185, 2011. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782011000100029>.

ANUÁRIO leite 2021: Saúde Única e Total. São Paulo: Texto Comunicação Corporativa, 2021. 102 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/224371/1/Anuario-Leite-2021.pdf>. Acesso em: 20 de junho 2022.

ASBIA - Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Index ASBIA 1° TRI. 2023. 2023. Disponível em: https://asbia.org.br/wp-content/uploads/Index/Index_ASBIA_1Tri_2023.pdf. Acesso em: 22 maio 2023.

BARBATO, O. *et al.* Using Pregnancy-Associated Glycoproteins (PAGs) to Improve Reproductive Management: from dairy cows to other dairy livestock. **Animals**, v. 12, n. 16, p. 2033, 10 ago. 2022. MDPI AG.. <http://dx.doi.org/10.3390/ani12162033>

BARFIELD, J.; DEMETRIO, D.. Volume 2 Appendix 3: Considerations for evaluating *in vitro*-produced bovine embryos. **Manual of the International Embryo Transfer Society**, 5th Edition. IETS. Dezembro 2022.

BARUSELLI, P. S. *et al.* Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. **Theriogenology**, v. 155, p. 1-11, out. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.028>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X20302570?via%3Dihub>. Acesso em: 27 maio 2023.

BARROZO, E. L. S. *et al.* Produção de embriões *in vitro* com sêmen sexado de touros nelore. **Revista Agraria Acadêmica**, v. 5, n. 3, p. 49-58, maio 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.32406/v5n3/2022/49-58/agrariacad>. Acesso em: 22 de maio 2023.

BORGES, J. B. S.; GREGORY, R. M. Indução da atividade cíclica ovariana pós-parto em vacas de corte submetidas à interrupção temporária do aleitamento associada ou não ao tratamento com norgestomet-estradiol. **Ciência Rural**, v. 33, n. 6, p. 1105-1110, dez. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782003000600016>.

CANAZA-CAYO, A. W. *et al.* Estrutura populacional da raça Girolando. **Ciência Rural**, v. 44, n. 11, p. 2072-2077, nov. 2014. FapUNIFESP (SciELO). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20131307>. Acesso em: 22 maio 2023.

DA SILVA, J.S. *et al.* Aspectos comerciais da transferência de embriões e fertilização *in vitro* em bovinos – revisão. **Nutritime Revista Eletrônica**. Vol. 12, Nº 05, set/out de 2015. Disponível em: < <https://nutritime.com.br/wp-content/uploads/2020/02/Artigo-332.pdf> >. Acesso em: 10 jun. 2022.

DEMETRIO, D. G. B. *et al.* How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced *in vitro*? (12 years of practical results at a California dairy farm). **Animal Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 1-13, 2020. FapUNIFESP (SciELO).

<http://dx.doi.org/10.1590/1984-3143-ar2020-0053>. Disponível em:
<https://www.scielo.br/j/ar/a/Hjvd8WnCwFGM3BtgvBqmpxF/?lang=en>. Acesso em: 27 maio 2023.

DODE, M.A.N.; LEME, L. O.; SPRÍCIGO, J.F.W. Criopreservação de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.37, n.2, p.145-150, abr./jun. 2013.

EALY, A. D.; SEEKFORD, Z. K. Symposium review: predicting pregnancy loss in dairy cattle. **Journal Of Dairy Science**, v. 102, n. 12, p. 11798-11804, dez. 2019. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2019-17176>.

EALY, A. D.; WOOLDRIDGE, L. K.; MCCOSKI, S. R. BOARD INVITED REVIEW: post-transfer consequences of *in vitro*-produced embryos in cattle. **Journal Of Animal Science**, v. 97, n. 6, p. 2555-2568, 10 abr. 2019. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jas/skz116>.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Dairy Market Review: Emerging trends and outlook**. 2021. Disponível em:
<https://www.fao.org/3/cb7982en/cb7982en.pdf>. Acesso em: 22 maio 2023.

FERRAZ, P.A. *et al.* Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. **Theriogenology**, v. 86, n. 7, p. 1834-1841, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.032>. Disponível em:
https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0093691X16302333?fr=RR-2&ref=pdf_download&rr=7d7219c408471f84. Acesso em: 10 jun. 2023.

GRÁZIA, J. G. V. **Produção *in vitro* de embriões (pive) na bovinocultura de leite e de corte**. 2019. 163 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciência Animal, Reprodução Animal, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção Pecuária Municipal 2021**, Rio de Janeiro, v. 49, p. 1-12, 2021. Disponível em:
https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2021_v49_br_informativo.pdf. Acesso em: 22 maio 2023.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 1.ed. São Paulo, Brasil: Varela, 340p, 2002.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E.. Indução da Ovulação, Produção e Transferência de Embriões. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B.. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole, 2004. Cap. 29. p. 409-434.

LEAL, L. S. Estudo morfofisiométrico de ovários e maturação ovocitária *in vitro* em bubalinos e bovinos nas diferentes fases da atividade reprodutiva. 2008. 178 f. Tese (doutorado) - **Universidade Estadual Paulista**, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008.

LOBATO. M. D. *et al.* Fatores que influenciam a taxa de concepção e perda gestacional de embriões produzidos *in vitro* na raça girolando. **Ciência Animal**, v.29, n.3, p.50-58, 2019.

Disponível em: <https://revistas.uece.br/index.php/cienciaanimal/article/view/10065/8366>. Acesso em: 27 maio 2023.

LU, T. X.; ROTHENBERG, M. E.. MicroRNA. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, v. 141, n. 4, p. 1202-1207, abr. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>.

LUEDKE, F. E. et al. Aspectos da produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil – revisão. **Pesquisa agropecuária gaúcha**, v. 25, n. 1/2, p. 120-132, 2019. Disponível em: <http://revistapag.agricultura.rs.gov.br/ojs/index.php/revistapag/article/view/41/32>. Acesso em: 20 jun. 2022.

MOTTA, I. G. et al. Increased pregnancy rate in beef heifers resynchronized with estradiol at 14 days after TAI. **Theriogenology**. 2020; 147:62-70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.02.009>. PMID:32097817.

NOWICKI, A. Embryo transfer as an option to improve fertility in repeat breeder dairy cows. **Journal Of Veterinary Research**, v. 65, n. 2, p. 231-237, 23 abr. 2021. <http://dx.doi.org/10.2478/jvetres-2021-0018>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8256464/>. Acesso em: 27 maio 2023.

OLIVEIRA, C.S.; SERAPIÃO, R.V.; QUINTÃO, C.C.R. Biotécnicas da reprodução em bovinos: minicursos ministrados durante o 3o Simpósio “Biotécnicas da Reprodução em Bovinos” no Laboratório de Reprodução Animal do Campo Experimental Santa Mônica – Juiz de Fora: **Embrapa Gado de Leite**, 52 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 175). 2014.

PETRY, J. C. *et al.* **Boletim Técnico 52**: aspiração folicular ovariana e classificação de oócitos bovinos. Descalvado, Sp: Produção Animal Universidade Brasil, 2019. Disponível em: https://universidadebrasil.edu.br/portal/_biblioteca/uploads/20210414205046.pdf. Acesso em: 15 abr. 2023.

PIETERSE, M.C. *et al.* Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, n. 4, p. 857-862, abr. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90426-e](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691x(91)90426-e). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0093691X9190426E?via%3Dihub>. Acesso em: 07 jun. 2023.

POHLER K.G. et al. Use of bovine pregnancy- associated glycoproteins to predict late embryonic mortality in postpartum Nelore beef cows. **Theriogenology**. 2016a. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.01.026>. PMID:26928645.

POHLER, K.G. *et al.* Circulating concentrations of bovine pregnancy-associated glycoproteins and late embryonic mortality in lactating dairy herds. **Journal Of Dairy Science**, v. 99, n. 2, p. 1584-1594, fev. 2016b. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2015-10192>. Disponível em: [https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302\(15\)00928-5/fulltext](https://www.journalofdairyscience.org/article/S0022-0302(15)00928-5/fulltext). Acesso em: 20 abr. 2022.

POHLER K.G. et al. Circulating microRNA as candidates for early embryonic viability in cattle. **Mol Reprod Dev**. 2017. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.22856>. PMID:28643872.

POHLER, K. G. et al. New approaches to diagnose and target reproductive failure in cattle. **Animal Reproduction**, v. 17, 2020. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-AR2020-0057>.

PONTES, J. H. et al. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, 74 (8): 1349-1355, 2010.

PUGLIESI, G. et al. Conceptus-induced changes in the gene expression of blood immune cells and the ultrasound-accessed luteal function in beef cattle: how early can we detect pregnancy? **Biol Reprod**. 2014; 91(4):95. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod.114.121525>. PMID:25210129.

RIZOS, D. et al. Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 43, Suppl. 4, p. 44-50, 2008.

SANG, L. et al. Actions of putative embryokines on development of the preimplantation bovine embryo to the blastocyst stage. **Journal Of Dairy Science**, v. 103, n. 12, p. 11930-11944, dez. 2020. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2020-19068>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8022257/>. Acesso em: 27 maio 2023.

SENEDA, M. M. et al. Follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 150, p. 180-185, jul. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.01.024>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X20300303?via%3Dihub>. Acesso em: 01 jun. 2023.

SILVA, M. V. G. B. et al. **Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando. Sumário de Touros. Resultado do Teste de Progênie (Avaliação Genética/Genômica). Julho 2021.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2021a. 79 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 255). Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1132959/1/DOC-255-Sumario-Touros-Girolando-2021.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2022.

SILVA, R. R. C. et al. Avaliação dos índices reprodutivos em bovinos leiteiros no Acre por meio de simulação computacional. In: Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Zootecnia, 55. Congresso brasileiro de zootecnia, 28, 2018, Goiânia. **Construindo saberes, formando pessoas e transformando a produção animal: anais.** Goiânia: SBZ: ABZ, 2018. 5 p. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1104707/1/26769.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2022.

SILVA, S. de S. et al. **Núcleo de Produção Animal: Saúde uterina de vacas Girolando no pós-parto.** XI Encontro De Iniciação A Pesquisa Da Embrapa Rondônia E VI Encontro De Pós-Graduação, 2021. Rondônia: Embrapa, 2021b. 7 p. Disponível em: <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/bitstream/doc/1139637/1/cpafro-18703.pdf>. Acesso em: 20 maio 2023.

SPECKHART, S. L. et al. An updated protocol for *in vitro* bovine embryo production. **Star Protocols**, v. 4, n. 1, p. 101924, mar. 2023. Elsevier BV. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101924>. Acesso em: 22 de maio 2023.

VARAGO, F. C. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, p. 100-109, abr. 2008. Disponível em: <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB152%20Varago%20pag100-109.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2022.

VASCONCELOS, A. M. de *et al.* Adaptive profile of dairy cows in a tropical region. **International Journal Of Biometeorology**, v. 64, n. 1, p. 105-113, 4 set. 2019. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00484-019-01797-9>. Acesso em: 22 maio 2023.

VIANA, J. H. M. **Comunicado Técnico 59**: Classificação De Embriões Bovinos Produzidos In Vivo. Juiz de Fora: Embrapa, 2009. 4 p. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/65449/1/COT-59-Classificacao-de-embrioes.pdf>. Acesso em: 27 maio 2023.

VIANA, J. H. M. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more *in vitro*-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. **Embryo Transfer News**, v.36(4), p.8-25, 2018.

VIANA, J. H.M. **2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals**: a new milestone has been reached: transfers of IVP embryos were over one million worldwide. **Embryo Technology Newsletter**, São Paulo, v. 40, n. 4, p. 1-19, dez. 2022. Disponível em: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2021.pdf. Acesso em: 22 maio 2023.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 476-481, 2017. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-ar989>.

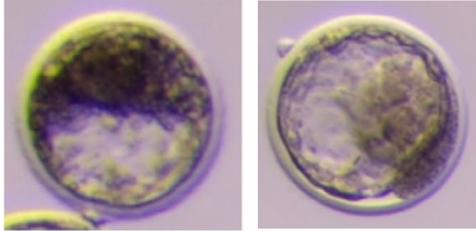
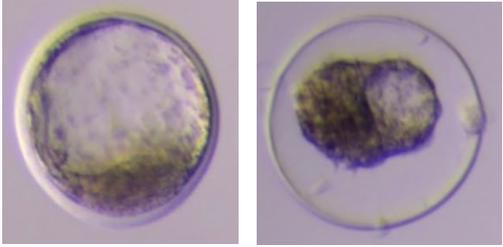
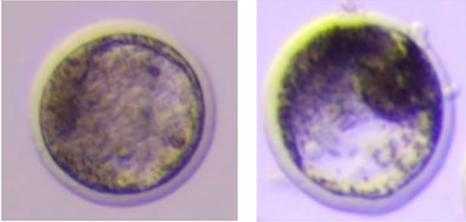
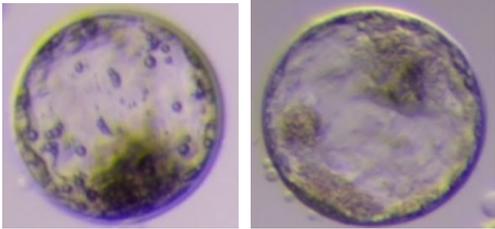
VILELA, D. et al. **Pecuária de leite no Brasil: cenários e avanços tecnológicos**. Embrapa, 2016. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/164236/1/Pecuarria-de-leite-no-Brasil.pdf>. Acesso em: 22 de maio 2023.

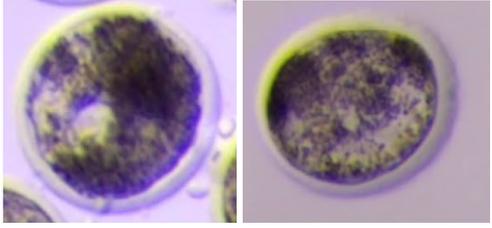
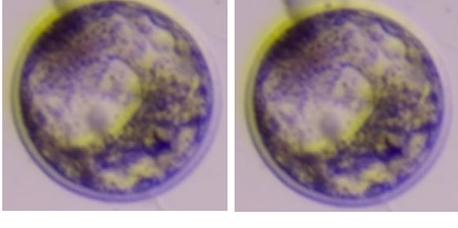
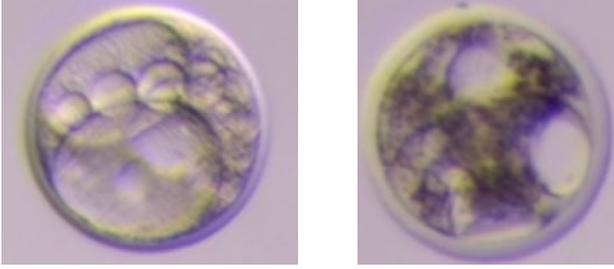
WANI, N. A. *In vitro* maturation an *in vitro* fertilization of sheep oocytes. **Small Rumin Res**, v.44, p.89-95, 2002.

WILTBANK, M. C. et al. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 239-253, 2016.

Anexo 1

Classificação morfológica de embriões segundo o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (BARFIELD; DEMETRIO, 2022), adaptação da autora (2023).

Códigos de qualidade do embrião	Blastocistos	Blastocistos Expandidos
<p>Código I – Excelente ou bom</p>	<p>Poucas ou nenhuma imperfeição no trofotoderma ou na massa celular interna (ICM). Pequenas extrusões e poucos vacúolo. A morfologia do ICM varia ligeiramente, mas é facilmente diferenciável e geralmente compacta.</p> 	<p>ICM clara com pequenas variações no tamanho e morfologia celular. o trofotoderma pode ou não ter poucas células anormais, sendo a maioria de tamanho e cor semelhantes (preferencialmente claras a transparentes). Os embriões podem ter algumas extrusões, mas 85% do embrião é de alta qualidade. Pode ser observado colapso, mas as bordas do embrião ainda devem ser nítidas e poucas células extrusadas observadas</p> 
<p>Código II – Razoável</p>	<p>A ICM é perceptível, mas pode ser menos compacta ou conter vacúolos. Células maiores do que o normal no trofotoderma podem ser vistas ou quantidades moderadas de células extrusadas, o que pode obscurecer a visualização do ICM.</p> 	<p>Pode ser observada ICM desorganizada (forma anormal ou estendendo-se por uma porção do embrião) ou pequena anormal. O trofotoderma pode ter rupturas evidentes devido a células grandes ou escuras, bem como níveis moderados de vacuolização. As células extrudadas podem ser confundidas com uma ICM.</p> 
<p>Código III – Ruim</p>	<p>A ICM é difícil de diferenciar. Muitas células escuras e irregulares estão no próprio embrião e/ou extrudadas no espaço perivitelino. Grandes imperfeições no trofotoderma ou grandes vacúolos também podem estar presentes.</p>	<p>A massa celular interna não é compacta e difícil de distinguir de células extrusadas ou células trofotodermáticas anormais. A aparência granulada ou escura das células pode obscurecer a visualização da massa celular interna ou a morfologia da cavidade de blastocele. Desorganização geral do embrião.</p>

		
<p>Código IV – Degenerado</p>	<p>Grandes vacúolos na cavidade de blastocele. Borda lisa dos vacúolos em comparação com a aparência irregular de células vivas ou blastômeros. Massa celular interna ou trofotoderme não são diferenciável.</p> 	

Classificação de qualidade dos embriões de acordo com a 5ª edição do Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (BARFIELD; DEMETRIO, 2022)

Código 1: Excelente ou bom – Massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros (células) uniformes em densidade, cor e tamanho. As irregularidades devem ser relativamente menores. As células do trofotoderma devem ter cor clara e tamanho uniforme. A ICM deve ser cada vez mais compacta à medida que o desenvolvimento do embrião progride. Embriões com pequenas deformidades da ZP que não tenham outras deficiências podem ser classificados como grau 1.

Código 2: Razoável – Irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade de células individuais. Pelo menos 50% do material celular deve fazer parte de uma massa embrionária intacta e viável. Defeitos menores da ICM ou trofotoderma podem ser aceitáveis, mas não em ambos. Os defeitos do ICM podem incluir má organização, má compactação ou aparência salpicada/densa de células individuais. Os defeitos da trofotoderma podem incluir células de tamanho irregular, células excessivamente densas agrupadas ou dispersas ou irregularidades na forma da cavidade da blastocele.

Código 3: Ruim – Grandes irregularidades na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade de células individuais são observadas. Pelo menos 25% do material celular deve fazer parte da massa embrionária intacta e viável. Observam-se defeitos importantes tanto na ICM quanto na trofotoderma. Embriões de baixa qualidade podem não ter uma ICM facilmente diferenciável ou ter poucas células de densidades variadas que compõem uma ICM mal organizada. A trofotoderma pode ter poucas células com muitas tendendo a ser maiores que o normal.

Código 4: Degenerado – Óvulos não fertilizados e embriões que pararam de se desenvolver nos estágios de clivagem são considerados inviáveis se as avaliações forem feitas 7 dias após a fertilização *in vitro*. Os blastômeros podem parecer granulados e o citoplasma pode estar se afastando da membrana plasmática. Nenhuma massa embrionária viável é identificável.