

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

FATORES QUE INTERFEREM NA MANUTENÇÃO DA
GESTAÇÃO DE RECEPTORAS SUBMETIDAS A TETF *IN*
VITRO

SUSIANDRA KLOSTER MUNHOZ

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Zootecnia.

BOTUCATU – SP

Agosto - 2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

FATORES QUE INTERFEREM NA MANUTENÇÃO DA
GESTAÇÃO DE RECEPTORAS SUBMETIDAS A TETF *IN*
VITRO

SUSIANDRA KLOSTER MUNHOZ
Médica Veterinária

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia como parte das exigências
para obtenção do título de Mestre em
Zootecnia.

BOTUCATU – SP

Agosto - 2022

BIOGRAFIA DO AUTOR

Susiandra Kloster Munhoz, nascida em Ituiutaba – MG, em 20 de junho de 1992, filha de Nelson Munhoz e Rosilda Aparecida Kloster Munhoz. Criada em Uberlândia, ingressou no curso de Medicina Veterinária na Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Realizou graduação-sanduiche na University of Guelph – Canadá, realizando estágios na área de bovinocultura. Finalizou a graduação em 2016, e ingressou no programa de residência em Clínica e Cirurgia de Bovinos e Pequenos Ruminantes na USP/São Paulo. Em 2019, finalizou o programa de residência e participou de pesquisas na área de reprodução bovina, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos. Em 2020, ingressou no programa de pós-graduação em Zootecnia da FMVZ-UNESP/Botucatu – SP, sob orientação do Prof. Dr. José Luiz Moraes Vasconcelos, desenvolvendo o trabalho para apresentação e obtenção do título de mestre: Fatores que interferem na manutenção da gestação de receptoras submetidas a TETF *in vitro*.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que seja citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Munhoz, Susiandra Kloster.

Fatores que interferem na manutenção da gestação de
receptoras submetidas a TETF in vitro / Susiandra Kloster
Munhoz. - Botucatu, 2022

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Luiz Moraes Vasconcelos

Capes: 50405004

1. Bovinos. 2. Touro. 3. Transferência de embriões.
4. Fertilização in vitro. 5. Gravidez - Complicações.

Palavras-chave: Bos indicus; Embrião; Perda gestacional;
Touro.

DEDICATÓRIA

Aos meu pais **Nelson Munhoz** e **Rosilda Kloster**, e ao meu irmão, **Anderson Kloster**, por sempre estarem ao meu lado independente da escolha que fizesse, me dando apoio e estímulo para seguir meus objetivos e só parar quando alcança-los.

Dedico principalmente aos meus avós, vô Lorete (*in memoriam*), vô Vicente (*in memoriam*) e vó Olga. Obrigada por todos os ensinamentos de humildade, perseverança e amor. Esses dois últimos anos de perdas ressignificaram algumas escolhas e princípios. Sinto muito a falta de vocês no meu cotidiano!

Muito obrigada, eu amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por proporcionar momentos incríveis durante minha trajetória, com muito aprendizado, saúde e anjos que cruzaram meu caminho.

Ao meu orientador Zequinha, pelos ensinamentos, paciência, puxões de orelha e oportunidade de trabalharmos juntos. Agradeço a referência que o senhor é para mim, me auxiliando na direção das minhas escolhas nos momentos de dúvida. Só tenho a agradecer!

Ao meu irmão Anderson, pelos ensinamentos, oportunidades e por todas as histórias que já construímos juntos, seja no trabalho ou em algumas presepadas por aí. Agradeço por ter você na minha vida.

Aos meus pais, pela confiança em mim. Por acreditarem e me apoiarem sempre. Pela educação, princípios e valores. Por serem sempre meu porto seguro e os maiores incentivadores de qualquer escolha tomada.

Aos meus avós, pelos bons momentos juntos, os quais abdiquei muitas vezes para buscar meu sonho. Pela compreensão, humildade e amor.

À toda minha família, que sempre torce por mim, vibra comigo e me apoia.

A todos os antigos amigos, que mesmo tão ausente fisicamente, mantivemos a amizade e é sempre muito prazeroso o reencontro.

Aos novos amigos que encontrei nessa caminhada: Jovair, Eltinho, Paulo, Carolzinha, Rafael Marreta, Marcelo, Mateusão, Leandro, Pedro Neto e toda a turma que acompanhou minha trajetória e dedicação para concluir esse trabalho. Obrigada pela amizade e ajuda em todos os momentos.

A minha amiga e cunhada Camila, com quem cultivo enorme amizade. Obrigada pela gigantesca ajuda em obrigações do mestrado, em planilhas e por todo o companheirismo de sempre. Obrigada por ser esse presente que Deus colocou na minha vida!

À Fazenda Tulipa Agropecuária, agradeço por ter participado dessa escola e ter crescido tanto! Obrigada Rodrigo Bruner pelas cobranças e puxões de orelha, essenciais para o meu crescimento e desenvolvimento pessoal e profissional. Tenho grande admiração por você. Obrigada toda a equipe da fazenda que não mediu esforços para auxiliar nos projetos e coleta de dados.

À Fazenda Vertente, pela oportunidade de conhecer e acompanhar o maior projeto de transferência de embrião em gado de corte do Brasil. Obrigada pela receptividade e confiança nas informações coletadas. Obrigada pela paciência na coleta dos dados e contato com funcionários. Foi um prazer acompanhar esse projeto fenomenal de perto!!

À equipe da transferência dos embriões, muito obrigada pela paciência, compartilhamento de informações e pela parceria na resolução de problemas. Obrigada pela acessibilidade aos relatórios e auxílio em dúvidas. Agradeço em especial Douglas, Telcio, Ilana, Marquinhos e Marco Tulio.

Ao Izaias Claro Jr, pela oportunidade de participar do GERAR e aprender muito.

Aos meus amigos de Botucatu, obrigada pelos dias de distração, pelos favores e ajuda em missões aleatórias. Obrigada República Coxera e Boi na Zona pelo acolhimento, meu e da Pandoreca.

Obrigada aos estagiários que me ajudaram com tantas planilhas e dados. Em especial, Camila, Julia Oliveira, Caique, Jéssica e Julia Godoy. Obrigada por ajudar a decifrar os problemas nas fichas de controle e pelo esforço em sempre ajudar. Desejo muito sucesso pra vocês!

Obrigada ao meu amigo Guilherme, estagiário que me ajudou muito e logo alçou voo sozinho. Acompanhar seu crescimento e desenvolvimento profissional de perto foi um dos maiores presentes que esse período me proporcionou. Obrigada pela companhia nos momentos de distração e principalmente, pelos momentos de resolução de problemas.

Obrigada a minha amiga Barbara, irmã que conquistei em terras goianas. Pelos puxões de orelha no excesso de trabalho, por ter cuidado de mim e compartilhado tantos momentos juntas. Não consigo definir o vínculo que criamos vivendo em tantas situações adversas. Obrigada pela sua amizade.

À técnica da Seção de Pós-graduação da UNESP - Botucatu: Cláudia. Uma mãe no meu mundo acadêmico da pós, sempre disposta a ajudar e informar. Muito obrigada por tudo!!

Aos professores da banca de qualificação e de defesa, Zequinha, Marcos, José Buratini (Bura), Reinaldo Cooke, Leandro Cruppe. Muito obrigada pelas considerações e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil
(CAPES) - Código de Financiamento 001, pela importante bolsa concedida.

Muito obrigada a todos!!

SUMÁRIO DE FIGURAS

Capítulo 2

Figura 1 - Embriões em diferentes estágios de blastocistos. A. Blastocisto inicial; B. Blastocisto; C. Blastocisto expandido; D. Blastocisto eclodido. Fonte: Grazia, 2019.

Figura 2 – Diagrama esquemático do protocolo de sincronização das receptoras e manejos de avaliação do experimento: D-17: inserção de dispositivo de P4 e aplicação de 2 mg de BE (benzoato de estradiol); D-9: retirada do dispositivo de P4, aplicação de 1mg de CE (cipionato de estradiol), 300UI de eCG (gonadotrofina coriônica equina) e 150µg de PGF2α; D0: transferência de embrião e aplicação de 10,5mcg de GnRH (gonadotrofina); DG1: diagnóstico de gestação por ultrassonografia 25 ± 1,5 dias após a transferência; DG2: diagnóstico de gestação por ultrassonografia 83 ± 18,1 dias após a transferência; Parto: coleta de informação de parto das receptoras prenhas.

SUMÁRIO DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1 – Classificação dos embriões proposta pela IETS por códigos de acordo com o estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária. Fonte: adaptado de Stringfellow; Seidel (1998).

Tabela 2 – Média da produção de oócitos/OPU e proporção da participação das doadoras nas sessões de aspiração de acordo com a categoria.

Tabela 3 – Efeito da produção oocitária por doadora nos índices de manutenção da gestação.

Tabela 4 – Efeito da categoria da doadora nos índices de manutenção da gestação.

Tabela 5 – Efeito da taxa de produção de embriões nos índices de manutenção da gestação.

Tabela 6 – Efeito da dieta das receptoras nos índices de manutenção da gestação.

Tabela 7 – Efeito do ECC das receptoras nos índices de manutenção da gestação.

Tabela 8 – Efeito do peso das receptoras no dia da TE e os índices de manutenção da gestação.

Tabela 9 – Efeito dos touros nos índices de manutenção da gestação.

LISTA DE ABREVIATURAS

AMH Hormônio anti-mulleriano
BL blastocisto
BI blastocisto inicial
BN blastocisto eclodindo
BE blastocisto eclodido
BET betametasona
BNC células binucleadas
BX blastocisto expandido
CL corpo lúteo
CIV cultivo *in vitro*
COCs Complexo cumulus oocito
ECC escore de condição corporal
FSH Hormônio folículo estimulante
FIV fertilização *in vitro*
GnRH hormônio liberador de gonadotrofina
hCG gonadotrofina coriônica equina
IA Inseminação artificial
IATF Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IFNT interferon tau
IGF-1 Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 1
IVP *in vitro production*
IVD *in vivo derived*
MCI massa celular interna
MIV maturação *in vitro*
MOET *multiple ovulation embryo transfer*
OPU *Ovum pick up*
OPL hormônio lactogênico placentário
PAD Programa de acasalamento dirigido
PGF2 α prostaglandina F2 α
PGE₂ prostagladina E2
PIV Produção *in vitro* de embriões
P4 progesterona
TETF Transferência de Embrião em Tempo Fixo

TE Transferência de embrião

TO Trofoectoderma epitelial externo

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	14
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
1.1 Doadoras e produção de embriões.....	17
1.2 Receptoras de embriões	18
1.3 Touro e sua contribuição no desenvolvimento embrionário	21
1.4 Perdas gestacionais na TETF <i>in vitro</i>	24
2. HIPÓTESES	28
3. OBJETIVOS	28
4. REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO 2	39
FATORES QUE INTERFEREM NA MANUTENÇÃO DA GESTAÇÃO DE RECEPTORAS SUBMETIDAS A TETF <i>IN VITRO</i>	39
RESUMO.....	40
ABSTRACT	42
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 Localização e animais.....	45
2.2 Produção de embriões	46
2.2.1 Aspiração/Ovum Pick Up (OPU).....	46
2.2.2 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	46
2.2.3 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	47
2.3 Receptoras.....	49
2.4 Protocolo de sincronização	49
2.5 Transferência de embriões.....	50
2.6 Diagnóstico de gestação	50
2.7 Nascimento dos animais.....	50
3. ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
4. RESULTADOS.....	52
5. DISCUSSÃO	59
6. CONCLUSÃO	66

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

INTRODUÇÃO

As falhas reprodutivas se mostram como as principais responsáveis pela diminuição na eficiência reprodutiva do rebanho (SANTOS et al., 2004)., impactando diretamente o retorno econômico da atividade de cria. Em 2017, um estudo realizado nos Estados Unidos para monitoramento da atividade de cria, compilou informações de 87% das vacas de corte nos EUA, e verificou que as falhas reprodutivas são responsáveis por 56,1% dos descartes em operações de cria, independente do tamanho da propriedade (NAHMS, 2017).

Em busca de estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva, o uso de tecnologias reprodutivas assistidas tem aumentado expressivamente, como a transferência de embriões (TE) (VIANA, 2021; ASBIA, 2021). Em 2020, dados relacionados a embriões produzidos *in vitro* registraram mundialmente, pela primeira vez, mais de 1,5 milhões de embriões bovinos produzidos; crescimento de 12% em relação ao ano anterior (2019) (VIANA, 2020). No Brasil, o crescimento de embriões *in vitro* foi de 22% entre 2019 e 2020 (VIANA, 2020).

A TE permite a produção de bezerros com maior valor agregado, acasalando animais de superioridade genética e possibilitando que a fêmea doadora gere inúmeros embriões enquanto, ela geraria apenas um produto no ventre por ano (GRAZIA, 2019). Entre 2019 e 2020, o número de transferências realizadas na América do Sul cresceu 20,7%, e essa região é responsável pela transferência de 55,2% dos embriões *in vitro* do mundo (VIANA, 2021).

Mesmo com significativo crescimento na adoção de tecnologias, o desempenho reprodutivo na indústria bovina é indiscutivelmente inferior ao desejado (SUMMERS et al., 2004). As falhas reprodutivas prejudicam a produção de bezerros e impactam negativamente a lucratividade da atividade de cria (REESE et al., 2020). Os indicadores relacionados às perdas gestacionais são pouco explorados, e relatos que quantificam essas perdas gestacionais em bovinos de corte são inconsistentes (REESE et al., 2020).

O estabelecimento e a manutenção da gestação de receptoras de embriões são eventos multifatoriais, que envolvem interações hormonais (concentração de estradiol e progesterona pré-ovulatório) (POHLER et al., 2012), fisiológicas (manifestação de cio ou não) (PEREIRA et al., 2016) e genéticas (efeito da raça) (FRANCO et al., 2018). Adicionalmente, a identificação dos períodos que

ocorrem as perdas gestacionais é relevante para decisões e planejamentos das propriedades (REESE et al., 2020).

O sucesso da gestação é afetado por fatores maternos (BARUSELLI et al., 2016), paternos (FRANCO et al., 2018; 2020; AMARAL et al., 2022) e do embrião (MARKUSFELD-NIR, 1997; O'CALLAGHAN et al., 2022). Com base nesse contexto, este estudo busca analisar fatores associados à categoria da doadora, manejo da receptora e genética paterna, que influenciam a manutenção da gestação de embriões Nelore em receptoras novilhas *Nelore x Angus*.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Doadoras e produção de embriões

Existe uma crescente demanda para multiplicar a genética superior de fêmeas *Bos indicus*, principalmente em países tropicais como o Brasil (BARUSELLI et al., 2006). Dessa forma, a escolha das doadoras de oócitos é feita principalmente de acordo com o mérito genético das matrizes, buscando utilizar a tecnologia da TETF para maximizar o uso de genética melhoradora, diminuir o intervalo entre gerações e produzir animais para reposição de elevado valor genético (PEIXER et al.; 2018; SAKODA; 2018).

A escolha de doadoras com maior número de oócitos recuperados/sessão de OPU podem apresentar melhor desempenho na PIV, tornando essa característica uma estratégia para seleção de doadoras (PONTES et al., 2011; MOROTTI et al., 2015). Pontes et al. (2011) observaram que dentre 317 doadoras Nelore, aquelas que produziram maior número de oócitos na OPU, também produziram maior número de embriões e prenhez, concordando com dados mostrados por Morotti et al. (2015), de 40 doadoras *Bos taurus-indicus*.

Além da quantidade de oócitos recuperados, grande importância é atribuída ao desenvolvimento folicular e qualidade oocitária, já que essas características contribuem altamente com o desempenho da PIV (SANTOS et al., 2008; BARUSELLI et al., 2012). Baruselli e colaboradores (2012) revisaram alguns fatores que impactam o fluido folicular, qualidade oocitária e desempenho na PIV, citando que dietas altamente energéticas (170% da energia de manutenção em vacas Gir) e estresse por calor (em vacas Holandesas) promoveram efeitos deletérios e impactaram negativamente as taxas de blastocisto.

O estado metabólico e nutricional de fêmeas ruminantes é sabidamente relacionado com a eficiência reprodutiva (DISKIN et al., 2003; SANTOS et al., 2006), sendo que a dieta pode influenciar a atividade ovariana através de mudanças nas concentrações plasmáticas de metabólitos (PONSART et al., 2014). Adicionalmente, o sucesso da produção *in vitro* de embriões também está diretamente relacionado com a qualidade do cumulus oócito coletados na OPU (BARUSELLI et al., 2012). Antes da ovulação, as células do cumulus são nutridas pelo fluido folicular, portanto alterações na composição do fluido folicular

podem afetar a competência oocitária e subsequente desenvolvimento do embrião (DISKIN et al., 2003; SANTOS et al., 2006; 2008).

O *status* metabólico da matriz também influencia a competência oocitária, sendo que o efeito da lactação é verificado na qualidade oocitária (SARTORI et al., 2002). Este fato é evidente em vacas de leite, sendo que diferenças importantes na qualidade do oócito são encontradas em animais de mérito genético alto ou baixo para produção de leite (BARUSELLI et al., 2016). Dessa forma, embriões derivados da fertilização de oócitos comprometidos possuem menor probabilidade de sucesso no desenvolvimento (HANSEN, 2002).

A competência oocitária é afetada por características como tamanho do folículo, puberdade, idade da matriz, exposição a estresses ambientais ou nutricionais, impactando o subsequente desenvolvimento embrionário e manutenção gestacional (VASCONCELOS et al., 2001; WARD et al., 2001; HANSEN, 2002; COOKE et al., 2011; BARUSELLI et al, 2016).

1.2 Receptoras de embriões

Os embriões são transferidos nas receptoras em fase de blastocisto, e nesse momento, eles são removidos do ambiente *in vitro* e alocados no ambiente uterino apto a recebê-los, sendo que quanto mais esse ambiente é compatível com a fase do blastocisto, maiores as chances dele prosseguir seu desenvolvimento. O desenvolvimento embrionário inicial até a implantação é definido como o período mais importante, o qual define o sucesso da gestação (HANSEN, 2002; DAVOODI et al., 2016).

Durante a fase de preparação do endométrio para fertilização e formação do embrião, alterações endócrinas que modificam o ambiente uterino são determinantes para o sucesso do desenvolvimento embrionário. O efeito das alterações nas concentrações de hormônios esteroides é crítico, pois afetam a capacidade do endométrio de manter o conceito (DAVOODI et al., 2016). O estradiol pré-ovulatório é responsável por coordenar diversos processos fisiológicos que contribuem para o estabelecimento e manutenção da gestação, envolvendo efeitos no oócito, transporte de gametas e principalmente, na preparação do ambiente uterino (POHLER et al., 2012).

Em fêmeas de corte, os oócitos de folículos pré-ovulatórios que apresentaram maiores concentrações de estradiol foram mais propensos a se desenvolver em blastocistos após a MIV e FIV (MERMILLOD et al., 1999). Além disso, vacas com maior duração de proestro (3 vs. 4) apresentam maiores taxas de concepção, já que a redução na exposição uterina pré-ovulação ao estradiol pode resultar em maior responsividade a ocitocina e maior liberação de prostaglandina (MANN, LAMMING, 2000; SANTOS et al., 2004).

Durante a fase de receptividade do endométrio, genes específicos relacionados à supressão do sistema imunológico materno e adesão entre o conceito e endométrio (MX1, MX2, MYL12A, MMP19, CXCL10, IGLL1 e SLPI) foram expressos em maior quantidade em multíparas da raça Nelore que sinalizaram cio próximo a inseminação, comparado àquelas que não demonstraram cio (DAVOODI et al., 2016). Adicionalmente, genes relacionados à apoptose e receptor de prostaglandina foram regulados negativamente (CYP11A, BAX e FPr) no tecido do CL de vacas que expressaram cio (DAVOODI et al., 2016).

Diante disso, as regulações comandadas pela concentração de estradiol pré-fertilização, e preparação do ambiente uterino e CL para a manutenção da gestação a ser estabelecida, mostram-se importantes para a sobrevivência do embrião. Ainda que, neste mesmo estudo foi observado aumento significativo no tamanho do conceito de vacas que expressaram cio ($38,3 \pm 2,8$ mm vs. $28,2 \pm 2,9$ mm) (DAVOODI et al., 2016).

Ainda no contexto dos efeitos benéficos da expressão de cio, Pereira e colaboradores (2016) verificaram incremento na P/TE em vacas que manifestaram cio, tanto ao diagnóstico de 30 dias (46,2% [645/1397] vs. 32,7% [193/606]) quanto aos 60 dias de gestação (37,5% [525/1397] vs. 25,1% [150/606]). Além disso, houve efeito da manifestação de cio nas perdas gestacionais, demonstrando maiores perdas aqueles animais que não manifestaram cio (18,6% [120/645] vs. 22,7% [43/193]) (Pereira et al., 2016).

Além de influências hormonais, efeitos nutricionais e metabólicos influenciam a manutenção da gestação (SARTORI et al., 2016). Receptoras recebendo embriões *in vitro*, que permanecem em balanço energético positivo após a TE, demonstraram melhores taxas de concepção aos 30 dias, à medida que o ganho médio diário (GMD) atingiu até 350 g/dia (FERNANDES et al.,

2015). Animais submetidos a estresses nutricionais e perda de ECC, apresentam maior perda gestacional, principalmente porque o *status* metabólico da vaca afeta a sobrevivência embrionária e fetal (SANTOS et al., 2004).

Pesquisas em busca de estratégias para o aumento da taxa de concepção na TETF tem sido desenvolvidas, como suplementação de P4 após a TE, uso de hCG (gonadotrofina coriônica humana) no momento da TE, aplicação de inibidores de PGF2 α , dentre outros (VASCONCELOS et al., 2011; YAN et al., 2016).

Em estudos de suplementação de P4 com objetivo de aumento nas taxas de concepção, de forma geral, o período crítico no qual a progesterona aumenta as taxas de desenvolvimento embrionário precoce é entre os dias 3 e 7 após a fertilização (BELTMAN et al., 2009). Entretanto, os resultados entre os estudos são muito variáveis, sendo que em determinadas pesquisas a suplementação é benéfica (BÓ et al., 2011), em outras indiferente (SUMMERS et al., 2004; BELTMAN et al., 2009) ou até mesmo prejudicial (SUMMERS et al., 2004). Dessa forma, a suplementação de P4 não promove resultados consistentes, e o momento fisiológico exato no qual o desenvolvimento embrionário é beneficiado por altas concentrações de P4, não é amplamente conhecido (BELTMAN et al., 2009; YAN et al., 2016).

Outra estratégia objetivando maiores taxas de concepções é o uso de hCG ou GnRH para indução da formação de CL acessório e consequentemente maior produção de P4. Vasconcelos et al. (2011) encontraram efeitos positivos entre a aplicação de gonadotrofinas e taxa de concepção de vacas holandesas submetidas a TE. Os autores observaram maior concentração sérica de progesterona 14 dias após a ovulação, e consequentemente melhores taxas de concepção aos 28 e 60 dias de gestação em vacas recebendo GnRH ou hCG, em relação ao grupo controle (52,4% [65/124]; 45,1% [55/122] para GnRH; 38,1% [48/126] para hCG aos 28 dias de gestação, e aos 60 dias de gestação 41,1% [51/124]; 38,5% [47/122] para GnRH; 32,5% [41/126] para hCG).

Os efeitos positivos promovidos pela aplicação de gonadotrofinas no momento da TE em vacas de leite, de acordo com Araujo et al. (2009) e Vasconcelos et al. (2011) se devem ao aumento da proporção de vacas com 3 ondas foliculares, caracterizadas por vida lútea mais prolongada e atraso no

desenvolvimento de potenciais folículos estrogênicos, favorecendo a sobrevivência inicial do embrião.

Outro importante aspecto que impacta os resultados reprodutivos é a sanidade do rebanho. Ao realizar levantamento de dados em 20 fazendas de corte, localizadas no Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, Aono (2012) observou que fazendas com programa sanitário e inclusão de vacinas reprodutivas apresentaram menor perda de gestação entre 30 e 120 dias de gestação, comparado àquelas que não vacinavam contra doenças reprodutivas (1,68% vs. 4,61%, respectivamente), sugerindo grande impacto de doenças infecciosas na manutenção da gestação de vacas de corte.

Essas observações se tornam ainda mais importantes ao observarmos os dados de perfil sorológico dos mesmos animais citados (vacas de corte criadas em regime extensivo), Aono (2012) detectou taxas de infecção por BoHV-1 (herpesvírus bovino 1), BVDV (vírus da diarreia viral bovina) e *Leptospiras* spp acima de 60%, demonstrando alta incidência de doenças infecciosas que exercem influência negativa na eficiência reprodutiva do rebanho nacional.

A escolha de receptoras previamente vacinadas, em boa condição de saúde e escore de condição corporal, bom temperamento e que tenham capacidade de gestar e alimentar um produto com boa qualidade e quantidade de leite, é fundamental para o sucesso da tecnologia aplicada, desde a implantação do embrião até o nascimento do bezerro (NOGA e LOONEY; 2021).

Atualmente, os maiores desafios na utilização de tecnologias reprodutivas é maximizar o estabelecimento da gestação e sobrevivência embrionária e/ou fetal (POHLER et al., 2012).

1.3 Touro e sua contribuição no desenvolvimento embrionário

O sucesso do estabelecimento e manutenção gestacional geralmente é atribuído a características maternas e fatores ambientais. O efeito paterno na manutenção da gestação ainda é pouco explorado.

É comum observarmos grande variação de fertilidade a campo entre touros utilizados na IATF e TE (FRANCO et al., 2018; AMARAL et al., 2022). Estudos indicam altas taxas de fertilização para fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*

inseminadas, atingindo até 90% (O'CALLAGHAN et al., 2021). Entretanto, ainda não é bem elucidado em que momento as diferenças de fertilidade se originam. No caso da produção *in vitro*, Farin et al. (2000) afirma que o limite superior na taxa de produção de blastocistos era de 30 a 50%, ou seja, dos oócitos totais inseminados, apenas 30 a 50% atingem o estágio de blastocisto (FARIN et al., 2000).

A produção de embriões a partir da utilização de sêmen convencional ou sexado apresenta diferenças, sendo que é relatada redução na taxa de produção de embriões a partir do sêmen sexado (23,6% [311.788/1.323.541] vs. 28,5% [242.259/848.939]) (SARTORI et al., 2016).

A exploração de propriedades cinéticas e morfológicas do sêmen são largamente estudadas na literatura, buscando marcadores de fertilidade. As mensurações de motilidade, integridade de membrana, composição proteica da membrana, mensurações de ATP, dentre outras, fornecem indicações de viabilidade espermática (WARD et al., 2001; SIQUEIRA et al., 2018). No entanto, nem sempre essas avaliações são refletidas como marcadores de fertilidade, ou seja, não conseguem prever os resultados de concepção subsequentes (WARD et al., 2001; ASSUMPCAO et al., 2019).

Assim como observado na variação da fertilidade de touros utilizados na IATF (POHLER et al., 2016; FRANCO et al., 2018), estudos demonstram que os touros possuem variabilidade acentuada no desempenho na FIV (SHI et al., 1990; WARD et al., 2001), demonstrando grande efeito na proporção de oócitos que se desenvolvem até o estágio de blastocisto (WARD et al., 2001; PALMA et al., 2004). As variações de desempenho englobam diferentes taxas de fertilização, clivagem e produção de embriões para cada touro utilizado (SHI et al., 1990; WARD et al., 2001), demonstrando distinta contribuição da genética paterna na fertilização e também no desenvolvimento embrionário (SHI et al., 1990; PALMA et al., 2004).

Poucos trabalhos contribuíram com a avaliação do efeito do touro ao longo da gestação, investigando a contribuição paterna na manutenção da gestação. Franco et al. (2020) encontraram efeito do touro utilizado na IATF no desempenho da manutenção da gestação, sendo a média de perda embrionária precoce (entre 24 e 31 dias de gestação) de acordo com o touro utilizado foi de 5,5%, com variação entre 1,8 a 11,7% entre touros. A média de perda

embrionária tardia (entre 31 e 60 dias gestação) foi de 6,7%, com variação entre 2,3 a 12,6% entre touros utilizados. Os autores não observaram padrão de perda nos intervalos avaliados, sendo que o ranqueamento de touros de acordo com a fertilidade pode variar de acordo com o período avaliado.

Franco et al. (2018) encontrou variação nas perdas gestacionais entre 30 e 100 dias de gestação de acordo com a raça do touro utilizado na IATF de 1228 múltiparas nelore. Touros nelore promoveram maior concepção aos 30 dias quando comparado com touros angus ($65.53 \pm 3.23\%$ vs. $50.95 \pm 1.57\%$), entretanto a perda gestacional até os 100 dias foi mais evidente para touros da raça nelore ($10.39 \pm 2.46\%$ vs. $4.94 \pm 0.09\%$).

O efeito do touro na taxa de concepção aos 30 dias (Touro 1 50,2% [244/486] vs Touro 2 34,2% [264/773]), taxa de parto (Touro 1 57,6% [23/40] vs. Touro 2 21,7% [49/226]) e perdas gestacionais até o parto (Touro 1 8% [2/25] vs. Touro 2 41,7% [35/84]) foi observado por Amaral e colaboradores (2022), avaliando embriões produzidos *in vitro*. Os autores demonstraram o efeito do touro no desenvolvimento embrionário inicial e tardio, refletindo no período gestacional completo.

É importante enfatizar a participação da genética paterna na placentação (BARTON et al., 1985), a qual possui crucial importância no fornecimento nutricional e manutenção da gestação (BRAUN et al., 2007). Ao utilizar modelos de embriões com trofoectoderma partenogênicos e ginogênicos de ratos, Barton e colaboradores (1985) observaram que o desenvolvimento de anexos fetais foi comprometido pela ausência do genoma paterno. Ainda nesse sentido, Pohler e sua equipe (dados não publicados) transferiram embriões bovinos partenogênicos em receptoras no estágio de blastocisto, e monitoraram o desenvolvimento gestacional. Os pesquisadores observaram em dados preliminares que mesmo que os embriões consigam sobreviver até 40-45 dias de gestação, nenhum sítio de implantação e fixação ao endométrio foi observado, sugerindo que os tecidos trofoblásticos não são adequadamente formados na ausência de genes paternos (citado em Pohler et al., 2020).

Em busca de monitorar a função placentária e viabilidade embrionária, estudos tem investigado a correlação entre produção de PAGs (proteína associada a gestação – produzida pela placenta) e manutenção da gestação. Pohler et al. (2016) observaram que menores concentrações de PAGs por volta

de 30 dias de gestação foram correlacionadas com maiores perdas gestacionais até o 59º dia de gestação (média da concentração sérica de PAGs de vacas que mantiveram a gestação $8,61 \pm 1,53$ ng/mL vs. vacas que não mantiveram a gestação $3,78 \pm 0,58$ ng/mL). No mesmo sentido, Franco et al. (2018) observaram significativas diferenças na concentração de PAGs de acordo com o touro utilizado (variações de 9 ng/mL vs. 17 ng/mL). Adicionalmente, a variação na incidência de perda gestacional não pode ser prevista com avaliações padrão de fertilidade do sêmen (FRANCO et al., 2018).

1.4 Perdas gestacionais na TETF *in vitro*

As perdas gestacionais são consideradas principais causas de prejuízos econômicos para produtores de bovinos (BERG et al., 2010). Os trabalhos que retratam perdas gestacionais revelam índices elevados, reforçando a importância do impacto econômico quando um animal é mantido no rebanho ao longo de um ciclo completo, mas não gera um produto comercializável (REESE et al., 2020). Entretanto, as metodologias utilizadas para detecção de falhas reprodutivas em bovinos de corte não são padronizadas, principalmente pelas adaptações à rotina de manejo dos rebanhos comerciais, dificultando a identificação de intervalo mais preciso das perdas (falha na fertilização, perda embrionária tardia ou perda fetal).

Em busca de padronizar os termos utilizados na reprodução bovina, o Comitê de Nomenclatura Reprodutiva Bovina (1972) estabeleceu que o período entre a concepção e o fim do estágio de diferenciação (aproximadamente 42 dias de gestação) é classificado como período embrionário, e posteriormente, período fetal, estendendo do 42º dia de gestação até o nascimento do bezerro. Dessa forma, perdas gestacionais anteriores ao dia 24 indicam perdas embrionárias precoces, aquelas entre os dias 24 e 42-50 são consideradas perdas embrionárias tardias, e as perdas que ocorrem após o dia 50 são perdas fetais (SANTOS et al., 2004).

Estudos utilizando IA ou TE, indicam que as taxas de fertilização são relativamente altas, seja em vacas de leite ou de corte, sendo que, em média, 70% das vacas apresentam blastocisto em desenvolvimento sete dias após a

fertilização (WILTBANK et al., 2016). Entretanto, o estabelecimento da gestação aos 27-30 dias após ovulação decresce significativamente, constatando em torno de 76% em vacas de corte, as quais estabelecem gestação no primeiro mês (SPELL et al., 2001; SANTOS et al., 2004). Assim, nessa fase existem dois tipos de perdas: falha na fertilização ou perda embrionária (SANTOS et al., 2004).

Em vacas de corte, a viabilidade embrionária 5-6 dias após a inseminação para vacas paridas em lactação, paridas não-lactantes e novilhas foram de 57,5%, 79,5% e 77,6%, respectivamente (SANTOS et al., 2004). Dessa forma, a mortalidade embrionária pode ter dois tipos de influência: baixa qualidade do ambiente uterino ou inerente falta de viabilidade do embrião; e a identificação isolada desses fatores é dificultosa (BERG et al., 2010).

Berg e colaboradores (2010) desenvolveram um estudo na tentativa de identificar a importância relativa de receptoras e embriões em perda embrionária precoce. Os autores acompanharam a transferência de 2449 blastocistos produzidos *in vitro*, em receptoras *Bos taurus*, não-lactantes, divididas entre novilhas e vacas, as quais receberam no mínimo 8 embriões no dia da TE (entre 8 e 30 embriões/receptora) e os embriões foram recuperados com idade de 9 a 16 dias, através de lavagem ou após o abate. A taxa de prenhez não aumentou de acordo com o número de embriões transferidos, fato que não era esperado devido ao suposto aumento de secreção de fatores de reconhecimento materno derivados dos embriões; e não houve alteração na taxa de prenhez de acordo com a idade do embrião recuperado (9 a 16 dias de idade gestacional), sugerindo que o ambiente uterino da receptora sinalizou, no dia da TE, o estabelecimento de prenhez ou não.

Os autores concluíram através dos resultados encontrados, que na segunda semana de gestação, as perdas embrionárias ocorreram predominantemente devido a causas embrionárias, ao contrário de problemas com as receptoras (BERG et al., 2010). Destacando-se a recuperação embrionária que ocorreram entre os dias 9 e 16 do embrião (ou dias 2 a 9, após a TE), com taxa de recuperação de 53%, sendo levantada a discussão sobre as técnicas utilizadas para recuperação (após o abate foi 14% superior do que através da lavagem *in vivo*), número de embriões transferidos (afetaram a taxa de recuperação e alongamento dos embriões) e menor recuperação no dia 9 do

embrião (momento que o embrião contrai para posterior re-expansão e eclosão). Isto posto, a mortalidade embrionária ocorreu em maior proporção precocemente (BERG et al., 2010).

As falhas de fertilização e perdas embrionárias precoces são os principais fatores que comprometem o sucesso de programas reprodutivos, tanto em vacas de leite como em vacas de corte (SANTOS et al., 2004). Alguns estudos sugerem que o período de maior perda embrionária precoce ocorre entre os dias 14 e 18 da gestação, contudo, a metodologia para identificação de perdas nesse período é invasiva, resultando em interrupção da gestação e, dessa forma, torna esse tipo de pesquisa de considerável complexidade (FRANCO et al., 2020).

A variação entre perdas gestacionais encontradas na literatura é verdadeira tanto para fêmeas de leite, quanto para fêmeas de corte, visto que não há padrão para o momento do diagnóstico, dessa forma as perdas podem englobar diferentes períodos do desenvolvimento embrionário, podendo variar de 12 a 45% (INSKEEP, DAILEY, 2005).

Ao realizar uma meta-análise referente a perdas gestacionais, Reese et al. (2020) observaram que as falhas reprodutivas entre dias 27 e 32, foram muito variáveis, sendo que fatores como grau de sangue, paridade e tecnologia reprodutiva adotada influenciaram os dados encontrados. A biotecnologia reprodutiva utilizada impactou as perdas, sendo menores em fêmeas inseminadas após expressão natural de cio (32,2%), seguido pela utilização da IATF (49,5%) e, por último, na transferência de embrião (54,6%) (REESE et al., 2020).

Através dessa meta-análise, Reese e colaboradores (2020) contabilizaram mais de 56.000 registros de diagnóstico, e observaram taxas de falha reprodutiva durante primeiro mês de gestação de 47,9%: 28,4% na primeira semana (até o dia 7), 3,9% entre os dias 7 e 16, e 15,6% entre os dias 16 e 32.

Em estudo de Pereira e colaboradores (2016), o fator mandatório para melhor desempenho na concepção aos 32 dias em vacas de leite, foi a expressão de cio, independente da tecnologia utilizada (IA ou TE), sendo que independente da presença de CL no início do protocolo, as vacas que expressaram cio próximo ao momento da fertilização, tiveram maior concepção aos 32 dias e menores perdas gestacionais entre 32 e 60 dias.

Os mecanismos que levam a mortalidade embrionária nesse período são pouco compreendidos, e podem estar relacionados com o desenvolvimento embrionário por si só ou formação inadequada das membranas embrionárias, uma vez que o período coincide com a implantação no útero e início da placentação (FRANCO et al., 2020).

As perdas fetais geralmente são menos prevalentes do que as perdas embrionárias (precoce ou tardia), e as causas da morte fetal são usualmente indeterminadas (SANTOS et al., 2004). Mesmo numericamente menor do que outros estágios de desenvolvimento, a perda fetal causa sérios prejuízos econômicos aos produtores, e quando ocorrem, geralmente não é conveniente para o sistema elaborar nova tentativa de concepção (DISKIN, MORRIS, 2008).

Na meta-análise de Reese et al. (2020), diagnósticos realizados entre o período de 60 a 100 dias de gestação, promoveram perda de, em média, 5,8%, valor semelhante para ambas as subespécies (*Bos indicus* e *Bos taurus*). Ainda assim, a paridade e tecnologia utilizada impactou esse índice, sendo que novilhas nulíparas apresentaram maiores índices (8,1%), seguidas de primíparas (5,4%) e multíparas (5,1%). Prenhez resultantes de TE tiveram maiores perdas (10,2%), quando comparadas com perdas de IATF (4,9%).

Morotti et al. (2014) reportaram prenhez de 41% (986 prenhez/2404 embriões transferidos) aos 60 dias de gestação, em estudo retrospectivo de embriões provenientes de doadoras Holandês, Gir e Nelore. Os autores reportam também 966 nascimentos, ou seja, perda de gestação no intervalo de 60 dias de gestação até o parto de 2%. Vale ressaltar que o estudo contemplou maior proporção de embriões *Bos taurus*, e menor proporção *Bos indicus*.

2. HIPÓTESES

Doadoras múltiparas produzem embriões com maior capacidade de desenvolvimento e manutenção da gestação do que doadoras novilhas precoces.

Touros possuem efeitos individuais na manutenção da gestação de receptoras de embrião, e esse efeito é persistente até o nascimento do embrião.

Receptoras mantidas em diferentes sistemas de manejo promovem diferentes resultados de concepção.

3. OBJETIVOS

O capítulo 2 descreve o trabalho intitulado “Fatores que interferem na manutenção da gestação de receptoras submetidas a TETF *in vitro*”. Este estudo teve como objetivos gerais avaliar a manutenção da gestação de receptoras de embriões FIV nelore provenientes de doadoras múltiparas e novilhas; identificar o período no qual ocorre efeito do touro durante a gestação; avaliar a manutenção da gestação de receptoras de acordo com o manejo ela foi submetida.

4. REFERÊNCIAS

ALVAREZ, P.; SPICER, L. J., CHASE JR., C. C., PAYTON, M. E., HAMILTON, T. D., STEWART, R. E., ... & WETTEMANN, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during an estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. *Journal of animal science*, v. 78, n.5, p. 1291-1302, 2000.

ALMEIDA, T. G. et al. Paternal effect does not affect in vitro embryo morphokinetics but modulates molecular profile. *Theriogenology*, v. 178, p. 30-39, 2022.

AONO, F. H., COOKE, R. F., ALFIERI, A. A., & VASCONCELOS, J. L. M. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of beef cows submitted to fixed-timed AI in Brazilian cow-calf operations. *Theriogenology*, v.79, n.2, p.242-248. 2013.

AMARAL, T.F. et al. Actions of CSF2 and DKK1 on bovine embryo development and pregnancy outcomes are affected by composition of embryo culture medium. *Scientific reports*, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2022.

ARAUJO, R. R., O. J. GINTHER, J. C. FERREIRA, M. M. PALHÃO, M. A. BEG, M. C. WILTBANK. 2009. Role of follicular estradiol-17beta in timing of luteolysis in heifers. *Biol. Reprod.* 81:426–437.

AROSH, Joe A.; BANU, Sakhila K.; MCCracken, John A. Novel concepts on the role of prostaglandins on luteal maintenance and maternal recognition and establishment of pregnancy in ruminants. *Journal of dairy science*, v. 99, n. 7, p. 5926-5940, 2016.

ASBIA, Associação Brasileira de Inseminação Artificial. Index Asbia, 1º semestre, 2022. p.1-37.

ASSUMPCAO, M. E. O. et al. Bull individual effect is determinant to in vitro embryo production regardless of seminal profile. *Animal Reproduction*, v. 16, n. 3, p. 604, 2019.

BAARENDS, W.M.; UILENBROEK, J.T.; KRAMER, P.; HOOGERBRUGGE, J.W.; VAN LEEUWEN, E. C.; THEMME, A. P.; GROOTEGOED, J. A. Anti-mullerian hormone and anti-mullerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle, and gonadotropin-induced follicle growth. *Endocrinology*; v. 136, p. 4951–4962, 1995

BATISTA, E. O. S., MACEDO, G. G., SALA, R. V., ORTOLAN, M. D. D. V., SÁ FILHO, M. F., DEL VALLE, T. A., ... & BARUSELLI, P. S. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in Bos indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) heifers. *Reproduction in Domestic Animals*, v.49, n.3, p. 448-452. 2014.

BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; NASSER, L. F.; NOGUEIRA, M. F.; BARROS, C. M.; & BÓ, G. A. Superovulation and embryo transfer in Bos indicus cattle. *Theriogenology*, v. 65, n. 1, p. 77-88. 2006.

BARUSELLI, P. S. et al. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 134-141, 2012.

BARUSELLI, P. S. et al. Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. *Animal Reproduction (AR)*, v. 13, n. 3, p. 264-272, 2018.

BARUSELLI, P. S., ELLIFF, F. M., SILVA, L. G., CATUSSI, B. L., & BAYEUX, B. M. Estratégias para aumentar a produção de embriões em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 43, n.2, p.315-326. 2016.

BARTON, S. C., ADAMS, C. A., NORRIS, M. L., & SURANI, M. A. H. Development of gynogenetic and parthenogenetic inner cell mass and trophectoderm tissues in reconstituted blastocysts in the mouse. 1985.

BELLOWS, D., S. Ott, and R. Bellows. 2002. Review: Cost of Reproductive Diseases and Conditions in Cattle. *The Professional Animal Scientist* 18: p.26-32.

BELTMAN, M. E., LONERGAN, P., DISKIN, M. G., ROCHE, J. F., & CROWE, M. A. Effect of progesterone supplementation in the first week post conception on embryo survival in beef heifers. *Theriogenology*, v.71, n.7, p.1173-1179. 2009.

BERG, D. K.; VAN LEEUWEN, J.; BEAUMONT, S.; BERG, M.; & PFEFFER, P. L. Embryo loss in cattle between Days 7 and 16 of pregnancy. *Theriogenology*, v. 73, n. 2, p. 250-260. 2010.

BLASCHI W., ANDRADE E.R., NONATO JR. I., PONTES J.H.F., ERENO JR. J.C., UVO S.; SENEDA, M.M. Utilização prévia do Pluset na aspiração folicular: Impacto na produção in vitro de embriões em vacas *Bos indicus*. *Acta Scientiae Veterinariae*; v.32, p. 186. 2004.

BÓ, G. A.; PERES, L. C.; CUTAIA, L. E.; PINCINATO, D.; BARUSELLI, P. S., & MAPLETOFT, R. J. Treatments for the synchronisation of bovine recipients for fixed-time embryo transfer and improvement of pregnancy rates. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 24, n.1, p. 272-277. 2011.

CHEBEL, R.C., DEMÉTRIO, D.G., METZGER, J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. *Theriogenology*, v. 69, p. 98-106. 2008.

COOKE, R. F. et al. Effects of temperament on pregnancy rates to fixed-timed AI in *Bos indicus* beef cows. *Livestock science*, v. 142, n. 1-3, p. 108-113, 2011.

DAVOODI, S., COOKE, R. F., FERNANDES, A. C. D. C., CAPPELLOZZA, B. I., VASCONCELOS, J. L. M., & CERRI, R. L. A. Expression of estrus modifies the gene expression profile in reproductive tissues on day 19 of gestation in beef cows. *Theriogenology*, v. 85, n.4, p. 645-655. 2016.

DISKIN, M. G. et al. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal reproduction science*, v. 78, n. 3-4, p. 345-370, 2003.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 260-267, 2008.

FRANCO, G. A. et al. Sire contribution to pregnancy loss and pregnancy-associated glycoprotein production in Nelore cows. *Journal of animal science*, v. 96, n. 2, p. 632-640, 2018.

FRANCO, G., REESE, S., POOLE, R., RHINEHART, J., THOMPSON, K., COOKE, R., & POHLER, K. Sire contribution to pregnancy loss in different periods of embryonic and fetal development of beef cows. *Theriogenology*, v. 154, p.84-91. 2020.

FERES, L. F., SIQUEIRA, L. G. B., PALHAO, M. P., DOS SANTOS, L. L., BRANDAO, F. Z., & VIANA, J. H. M. Likelihood of pregnancy after the transfer of embryos derived from follicle aspiration and in vitro embryo production sessions with different relative efficiencies. *Animal reproduction science*, v.193, p.165-170. 2018.

FERNANDES, C. A. C., PALHAO, M. P., FIGUEIREDO, A. C. S., RIBEIRO, J. R., E SILVA, F. F., & VIANA, J. H. M. Weight gain potential affects pregnancy rates in bovine embryo recipients raised under pasture conditions. *Tropical animal health and production*, v.48, n.1, p.103-107. 2016.

GARCIA, S. M., MARINHO, L. S. R., LUNARDELLI, P. A., SENEDA, M. M., & MEIRELLES, F. V. Developmental block and programmed cell death in *Bos indicus* embryos: effects of protein supplementation source and developmental kinetics. *PLoS One*, v.10, n.3. 2015.

GUIMARÃES, A. S. B., ROCHA, L. F., JESUS, R. D. L. D., VASCONCELOS, G. L., ANGHINONI, G., SANTANA, A. L. A., & BARBOSA, L. P. In vitro performance of Zebu (*Bos indicus*) and Taurus (*Bos taurus*) donor cow embryos. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.21. 2020.

GRAZIA, J. G. V. Produção in vitro de embriões (PIVE) na bovinocultura de leite e de corte. 2019. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais.

HAFEZ, Elsayed Saad Eldin; HAFEZ, B. (Ed.). *Reproduction in farm animals*. John Wiley & Sons, 2013.

HANSEN, P. J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. *Journal of Animal Science*, v. 80, n. E-suppl_2, p. E33-E44, 2002.

HANSEN, P. J. Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. In: Current and future reproductive technologies and world food production. *Springer*, New York, NY, p. 1-22, 2014.

INSKEEP, E. K., & DAILEY, R. A. Embryonic death in cattle. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, v.21, n.2, p.437-461. 2005.

MALTAU, J. M., STOKKE, K. T., & MOE, N. Effects of betamethasone on plasma levels of estriol, cortisol and hcs in late pregnancy. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, v. 58, n.3, p.235-238. 1979.

MARKUSFELD-NIR, O. Epidemiology of bovine abortions in Israeli dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 31, n. 3-4, p. 245-255, 1997.

MANN, G.E., LAMMING, G.E. The role of sub-optimal preovulatory estradiol secretion in the aetiology of premature luteolysis during the short oestrus cycle in the cow. *Anim. Reprod. Sci.* v.64, p.171–180. 2000.

MERMILLOD P, OSSAID B, COGNIE Y Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl* v.54, p.449–460, 1999.

MONTEIRO, F. M., BATISTA, E. O. S., VIEIRA, L. M., BAYEUX, B. M., ACCORSI, M., CAMPANHOLI, S. P., ... & BARUSELLI, P. S. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology*, v. 90, p.54-58. 2017.

MOROTTI, F., SANTOS, G. M. G., JÚNIOR, C. K., SILVA-SANTOS, K. C., ROSO, V. M., & SENEDA, M. M. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. *Theriogenology*, v.91, 21-26, 2017.

MOROTTI, F., BARREIROS, T. R. R., MACHADO, F. Z., GONZÁLEZ, S. M., MARINHO, L. S. R., & SENEDA, M. M. Is the number of antral follicles an interesting selection criterium for fertility in cattle?. *Animal Reproduction (AR)*, v.12, n.3, p.479-486. 2018.

MOSCHINI, G. A. et al. Comparison between in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 7, p. e38810716712-e38810716712, 2021.

NAHMS, 2017. Beef Cow-calf Health and Management Practices in the United States, 2017. Acessado em <<http://usda.gov>> .

NOGA, N., & LOONEY, C. Embryo Transfer and Embryo Collection. *Bovine Reproduction*, p.1041-1060. 2021.

LEMLEY, C. O., CAMACHO, L. E., & VONNAHME, K. A. Maternal recognition and physiology of pregnancy. *Bovine reproduction*, p.324-338. 2021

LONERGAN, P.; FORDE, N. Maternal-embryo interaction leading up to the initiation of implantation of pregnancy in cattle. *Animal*, v. 8, n. s1, p. 64-69, 2014.

ORTEGA, M. et al. Influences of sire conception rate on pregnancy establishment in dairy cattle. *Biology of reproduction*, v. 99, n. 6, p. 1244-1254, 2018.

O'CALLAGHAN, E. et al. Sire contribution to fertilization failure and early embryo survival in cattle. *Journal of Dairy Science*, v. 104, n. 6, p. 7262-7271, 2021.

PALMA, G. A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. *Anatomia, histologia, embryologia*, v. 33, n. 5, p. 257-262, 2004.

PEIXER, P. F.; SANTOS, K. J. G.; SANTOS, A.P. P.; BACKES, C.; SANTOS, J. F. D.; CASTRO, C. S. Produção in vitro de embriões bovinos. *Espacios*, v. 39, n. 16, p. 2, 2018.

PEREIRA, M. H. C., WILTBANK, M. C., & VASCONCELOS, J. L. M. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. *Journal of dairy science*, v.99, n.3, p.2237-2247. 2016.

POHLER, K. G., GEARY, T. W., ATKINS, J. A., PERRY, G. A., JINKS, E. M., & SMITH, M. F. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. *Cell and tissue research*, v. 349, n.3, p.649-664. 2012.

POHLER, K. G., REESE, S. T., FRANCO, G. A., OLIVEIRA, R. V., PAIVA, R., FERNANDEZ, L., ... & POOLE, R. K. New approaches to diagnose and target reproductive failure in cattle. *Animal Reproduction*, v.17. 2020.

PONTES, J. H. F. et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v. 71, n. 4, p. 690-697, 2009.

PONTES, J. H. F., STERZA, F. M., BASSO, A. C., FERREIRA, C. R., SANCHES, B. V., RUBIN, K. C. P., & SENEDA, M. M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, V. 75, n.9, p.1640-1646. 2011.

PONSART, C. et al. Nutritional status of donor cows: insulin related strategies to enhance embryo development. *Animal Reproduction (AR)*, v. 11, n. 3, p. 195-198, 2018.

REESE, S. T., FRANCO, G. A., POOLE, R. K., HOOD, R., MONTERO, L. F., OLIVEIRA FILHO, R. V., ... & POHLER, K. G. Pregnancy loss in beef cattle: A meta-analysis. *Animal reproduction science*, v. 212, 2020.

SAKODA, J. N. Caracterização e controle da população de oócitos em bovinos Nelore baseados na configuração da cromatina. 2018. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

SANTOS, J. E. P., Thatcher, W. W., Chebel, R. C., Cerri, R. L. A., & Galvao, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal reproduction science*, v. 82, p.513-535. 2004.

SANTOS, J. E. P., Thatcher, W. W., Chebel, R. C., Cerri, R. L. A., & Galvao, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal reproduction science*, v. 82, p.513-535. 2004.

SANTOS-BIASE, W. K. F. Identificação de SNPs e associação com número de oócitos colhidos por aspiração folicular em bovinos da raça Nelore. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

SANTOS, J. E. P.; CERRI, R. L. A.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. *Theriogenology*, v. 69, n. 1, p. 88-97, 2008.

SARTORI, R. et al. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. *Animal Reproduction (AR)*, v. 13, n. 3, p. 300-312, 2018.

SIQUEIRA AFP, CASTRO LS, ASSIS PM, BICUDO LdC, MENDES CM, NICHIM, et al. Sperm traits on in vitro production (IVP) of bovine embryos: Too much of anything is good for nothing. *PLoS ONE* V.13, N.7, p. e0200273. 2018.

SHI, D. S. Effects of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. *Theriogenology*, v. 30, p. 324 (abstr), 1990.

SPELL, A. R. et al. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*, v. 56, n. 2, p. 287-297, 2001.

SUMMERS, R. N., PETERSON, C. A., LOCK, T. F., POLLACK, C., IRELAND, F. A., FAULKNER, D. B., & KESLER, D. J. The effect of exogenous progesterone administered intravaginally, via CIDR, on embryo survival in beef cattle. *Illini BeefNet, University of Illinois. Published on <http://traill.outrreach.uiuc.edu/beefnet>*. 2004.

VASCONCELOS, J. L. M., SARTORI, R., OLIVEIRA, H. N., GUENTHER, J. G., & WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, v.56, n.2, p.307-314. 2001.

VASCONCELOS, J. L. M. et al. Effects of postbreeding gonadotropin treatments on conception rates of lactating dairy cows subjected to timed artificial insemination or embryo transfer in a tropical environment. *Journal of dairy science*, v. 94, n. 1, p. 223-234, 2011.

VIANA JHM, FIGUEIREDO ACS, SIQUEIRA LGB. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Anim. Reprod.*, v.14, n.3, p.476-481, 2017.

VIANA, J. H.; FIGUEIREDO, ACS. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, v. 38, n. 4, 2020.

VIANA, J. H. 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, v. 39, n. 4, 2021.

WATANABE, Y. F., DE SOUZA, A. H., MINGOTI, R. D., FERREIRA, R. M., BATISTA, E. O. S., DAYAN, A., ... & BARUSELLI, P. S. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. *Animal Reproduction (AR)*, v.14, n.3, p.635-644. 2017.

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

WILTBANK, M. C., SOUZA, A. H., GIORDANO, J. O., NASCIMENTO, A. B., VASCONCELOS, J. M., PEREIRA, M. H. C., ... & SARTORI, R. Positive and negative effects of progesterone during timed AI protocols in lactating dairy cattle. *Animal Reproduction (AR)*, v.9, n.3, p.231-241. 2018.

YAN, L. et al. Efficacy of progesterone supplementation during early pregnancy in cows: A meta-analysis. *Theriogenology*, v. 85, n. 8, p. 1390-1398. e1, 2016.

CAPÍTULO 2

FATORES QUE INTERFEREM NA MANUTENÇÃO
DA GESTAÇÃO DE RECEPTORAS SUBMETIDAS
A TETF *IN VITRO*

Fatores que interferem na manutenção da gestação de receptoras submetidas a TETF *in vitro*

RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar fatores relacionados à categoria das doadoras de oócitos e efeito do touro na manutenção da gestação de receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus*, submetidas a transferência de embrião em tempo fixo (TETF) de embriões Nelore produzidos *in vitro*. Foram utilizadas 463 doadoras Nelore e 6 touros Nelore para a produção *in vitro* de embriões. As doadoras foram divididas em 3 categorias: novilhas precoces (< 15 meses de idade; NP); novilhas regulares (entre 18 e 24 meses de idade; NR) e vacas múltiparas paridas (VM). Os embriões (n = 4366) foram transferidos a fresco em receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus*, sincronizadas através do seguinte protocolo: D-17: inserção do dispositivo intravaginal de 0,5g de P4 (ReproOne, Globalgen) e 2mg de benzoato de estradiol (Bioestrogen, Biogenesis); D-9: remoção do dispositivo de P4 + 1 mg de cipionato de estradiol (Cronicip, Biogenesis) + 300UI de eCG (Ecegon, Biogenesis) + 150 µg de D-cloprostenol (Croniben, Biogenesis). Foi administrado 10,5 mcg de acetato de buserelina, análogo do hormônio GnRH (Gonaxal, Biogenesis) em todas as receptoras no dia da TETF (D0). Os diagnósticos para verificação da prenhez foram realizados através da ultrassonografia aos 25 ± 1,5 dias (DG1) e 83 ± 18,1 dias (DG2) após a TE. As receptoras prenhas ao DG2 foram acompanhadas até o parto, sendo que aquelas que não pariram, foi considerado perda gestacional. Não houve efeito da recuperação oocitária/doadora nos índices de manutenção da gestação ($P > 0,05$). Embriões provenientes de doadoras NP tiveram menor índice ao DG1 (39%, [808/2072]) e DG2 (22,7%; [470/2072]), comparado a doadoras NR (DG1 42,6%; [349/819] e DG2 27,4%; [224/819]) e VM (DG1 26,8%; [396/1475] e DG2 26,8%; [396/1475]). Embriões de doadoras NR apresentaram a maior taxa de parição (18,9%; [155/819]) comparado às NP (14,5%; [301/2072]) e VM (15,9%; [234/1475]). As receptoras em diferentes manejos nutricionais no momento da TE, tiveram concepção semelhante ao DG1 (a pasto 41,4%; [1317/3182] vs. confinadas 41%; [485/1184]), no entanto, receptoras mantidas a pasto

evidenciaram maior manutenção gestacional até o parto (a pasto 17,7% [564/3182] vs. confinadas 10,6% [126/1184]). Houve efeito do touro utilizado em todo o período gestacional avaliado: variações entre 39,3% a 47,6% ao DG1, 21,4% a 31,1% ao DG2 e 13,1% a 25% ao parto de acordo com o touro utilizado. Em resumo, os resultados demonstraram que a categoria da doadora utilizada pode impactar resultados de prenhez à TETF, sendo que doadoras NP exibiram menores taxas de concepção e parto; foram observadas maiores perdas gestacionais em receptoras submetidas a mudança de manejo após DG1 (do confinamento para pasto); e por fim, houve efeito do touro em todo o período gestacional avaliado, promovendo variações significativas na manutenção da gestação até o parto.

Palavras – chave: embrião, touro, perda gestacional, *Bos indicus*.

Factors that interfere in the maintenance of pregnancy in recipients submitted to *in vitro* FTET

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate factors related to the category of oocyte donors and the effect of the bull on the maintenance of pregnancy in *Bos indicus* x *Bos taurus* recipients, submitted to fixed-time embryo transfer (**FTET**) of Nellore embryos produced *in vitro*. A total of 463 Nellore donors and 6 Nellore bulls were used for the *in vitro* embryo production. Donors were divided into 3 categories: precocious heifers (< 15 months of age; **NP**); heifers (18-24 months of age; **NR**) and multiparous cows (**VM**). The embryos (n = 4366) were transferred fresh into *Bos indicus* x *Bos taurus* recipients, synchronized using the following protocol: D-17: insertion of 0.5g-P4 intravaginal device (ReproOne, Globalgen) + 2mg of estradiol benzoate (Bioestrogen, Biogenesis); D-9: P4 device removal + 1 mg of estradiol cypionate (Cronicip, Biogenesis) + 300IU of eCG (Ecegon, Biogenesis) + 150 µg of D-cloprostenol (Croniben, Biogenesis). On the day of FTET (D0), all recipients received 10.5mcg of buserelin acetate (GnRH hormone analogue; Gonaxal, Biogenesis). Pregnancy diagnosis were performed through ultrasound at 25 ± 1.5 days (DG1) and 83 ± 18.1 days (DG2) after FTET. The recipients that were pregnant at DG2 were separated until parturition; and the ones that did not delivered a calf, were considered to have gestational loss. There was no effect of oocyte per donor recovery on pregnancy maintenance rates ($P > 0.05$). Embryos from PH-donors had a lower rate at DG1 (39%, [808/2072]) and DG2 (22.7%; [470/2072]), compared to H-donors (DG1 42.6%; [349 /819] and DG2 27.4%; [224/819]) and MC-donors (DG1 26.8%; [396/1475] and DG2 26.8%; [396/1475]). Embryos from H-donors had the highest calving rate (18.9%; [155/819]) compared to PH-donors (14.5%; [301/2072]) and MC-donors (15.9%; [234/ 1475]). Recipients in different nutritional managements at the time of FTET had similar conception rate at DG1 (41.4% on pasture; [1317/3182] vs. confined 41%; [485/1184]); however, recipients maintained on pasture showed evidence of greater gestational maintenance until calving (pasture 17.7% [564/3182] vs. confined 10.6% [126/1184]). There was a bull

effect throughout the evaluated gestational period: 39.3% to 47.6% at DG1; 21.4% to 31.1% at DG2; and 13.1% to 25% at parturition. In summary, the results showed that donors' category can impact pregnancy results at FTET, with PH-donors resulting in decreased conception and parturition rates. In addition, higher gestational losses were observed in recipients submitted to managements changes after FTET (from confinement to pasture). Moreover, a bull effect was detected throughout the evaluated gestational period, promoting significant variations in pregnancy maintenance until calving.

Keywords: embryo, sire, pregnancy loss, *Bos indicus*.

1. INTRODUÇÃO

A crescente utilização da TE impulsiona a busca por resultados satisfatórios e consequente lucratividade no desempenho reprodutivo do rebanho (MERTON et al., 2003; VIANA, 2021). No entanto, a busca por melhores índices reprodutivos é contínua, e grandes oportunidades podem ser encontradas na rotina do sistema de produção (SUMMERS et al., 2004).

A intensificação dos sistemas objetivando eficiência produtiva está diretamente relacionada com melhores taxas reprodutivas, produzindo animais mais lucrativos. A TETF demonstra-se uma tecnologia vantajosa em termos de avanço genético, utilizando o potencial genético de doadoras e touros superiores, criando inúmeras vantagens e possibilidades na aplicação da técnica (BLONDIN, 2015).

As falhas reprodutivas prejudicam a produção de bezerros, e a mortalidade embrionária é o principal fator que afeta a fertilidade e eficiência econômica da fazenda (DISKIN et al., 2008; REESE et al., 2020). Os indicadores relacionados às perdas gestacionais são pouco explorados, e relatos que quantificam essas perdas gestacionais em bovinos de corte são inconsistentes (REESE et al., 2020).

O estabelecimento e a manutenção da gestação de receptoras de embriões são eventos multifatoriais, que envolvem interações hormonais, bioquímicas, fisiológicas e genéticas (FARIN et al., 2000; AMARAL et al., 2022). E a identificação dos períodos que ocorrem as perdas gestacionais é relevante para decisões e planejamentos das propriedades (REESE et al., 2019).

O sucesso da gestação é afetado por fatores maternos (POHLER et al., 2012; PEREIRA et al., 2016) paternos (POHLER et al., 2016; FRANCO et al., 2020; AMARAL et al., 2022) e do embrião (MARKUSFELD-NIR, 1997; ORTEGA et al., 2018; EALY et al., 2019; AMARAL et al., 2022). Com base nesse contexto, este estudo busca analisar fatores que influenciam a manutenção da gestação de embriões Nelore em receptoras novilhas *Nelore x Angus*, demonstrando índices de perdas gestacionais entre o dia da TE até o parto. A hipótese do estudo é que as taxas de manutenção de gestação podem ser influenciadas por fatores como características da doadora, receptora e touro utilizado na FIV.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Localização e animais

Foram utilizadas 463 doadoras: novilhas precoces (NP; n = 204; < 15 meses), novilhas regulares (NR; n = 67; entre 18 e 24 meses) e múltiparas paridas (VM; n = 192; > 42 meses), da raça Nelore (*Bos indicus*), vazias e de uma única fazenda localizada no município de Campinorte – GO. As doadoras NP estavam alocadas em confinamento, recebendo dieta com inclusão de silagem de milho (86,6%), torta de algodão (9,4%), núcleo (2,9%) e uréia (1%), suplementação com sal mineral e água *ad libitum*. As doadoras VM foram mantidas em regime de pastagem de *Brachiaria* spp. e *Panicum* spp., suplementadas com sal mineral e água *ad libitum*. O estudo foi conduzido durante a estação de monta de 2021.

As receptoras utilizadas eram novilhas *Bos indicus* x *Bos taurus* (Nelore x Angus), com média de 340 ± 35 kg no dia da TE, alocadas no município de Paraíso das Águas – MS.

Todos os procedimentos com animais seguiram as recomendações e princípios éticos na experimentação animal, protocolo **0038/2021**, determinados pela Câmara de Ética no Uso de Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu/SP, Brasil.

2.2 Produção de embriões

2.2.1 Aspiração/Ovum Pick Up (OPU)

Foram executadas 721 aspirações, aleatórias quanto ao dia do ciclo estral de cada animal. Todas as doadoras estavam vazias no momento da aspiração. O processo de aspiração folicular, seleção de oócitos, produção e transferência de embriões foi realizado por uma única empresa terceirizada.

Cada doadora foi submetida, em média, a $1,7 \pm 0,7$ sessões de aspiração, variando individualmente de 1 a 3 procedimentos, de acordo com o calendário reprodutivo da fazenda, sem critério específico para repetição. A média da produção oocitária por doadora foi calculada através da média geral de oócitos recuperados em relação às sessões de OPU (oócitos totais recuperados/número de sessões de OPU submetidas) para aquelas doadoras submetidas a mais de uma sessão.

O técnico responsável pela obtenção dos oócitos utilizou a técnica da aspiração folicular via transvaginal guiada por ultrassonografia, utilizando um aparelho de ultrassonografia da marca Mindray®, modelo DP2200 VET, acoplado ao transdutor microconvexo multifrequencial, variando de 5,0 a 8,0 MHz. Acoplado ao transdutor era inserido um mandril com cateter calibre 18G, conectado a um sistema estéril de aspiração folicular. Tal sistema é conectado a um tubo tipo Falcon de 50ml, contendo 5ml de solução tampão fosfato salino modificado por Dulbecco (DMPBS), previamente aquecida a 37,7°C e com 20µl de heparina sódica (5000UI/ml), onde foi depositado o conteúdo aspirado. Esse circuito tem também a participação de uma bomba de vácuo ajustada a 70mmHg, possibilitando a aspiração e fluxo do conteúdo no sistema.

Os oócitos foram selecionados e classificados de acordo com Viana et al. (2004), alocados em meio para maturação e transportados por 780 km para o laboratório sede, onde era feita a fertilização.

2.2.2 Fertilização in vitro (FIV)

Os complexos cumulus oócitos (COCs) foram fecundados com sêmen proveniente de centrais especializadas na comercialização de sêmen. Foi

utilizado sêmen sexado de fêmea, de seis touros Nelore, preparado através do método Gradiente de Percoll.

O acasalamento foi realizado através do PAD (Programa de Acasalamento Dirigido), programa desenvolvido pela GenSys, o qual auxilia no controle de consanguinidade e combina informações de avaliações genéticas da matriz e touro acasalados.

2.2.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

No sétimo dia após a fecundação, foi avaliada a quantidade de blastocistos produzidos, e posteriormente calculada a taxa de blastocisto ou taxa de produção de embriões, que consiste na relação entre a produção de embrião e o número de oócitos totais coletados através da OPU.

No sétimo dia após a fecundação, os embriões foram classificados de acordo com o grau de desenvolvimento, com auxílio de microscópio. A classificação dos embriões foi realizada através da avaliação dos aspectos morfológicos, como formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade da zona pelúcida, sendo essas características diretamente relacionadas com a viabilidade do embrião (HAFEZ et al., 2004).

Durante o cultivo, os embriões foram transportados por 700 km até a fazenda-destino, onde foi montada estrutura com equipamentos necessários para a avaliação e envase dos embriões, realizado cerca de 4 horas antes do manejo de transferência.

Os embriões foram classificados de acordo com a tabela abaixo (Tabela 1), e posteriormente preparados para transferência. O envase de embriões para transferência foi feito principalmente pelo estágio de desenvolvimento BX (84,5%), BL (8,0%), BN (5,0%), BE (0,5%) e BI (2,0%) (Figura 1).

Tabela 1 – Classificação dos embriões proposta pela IETS por códigos de acordo com o estágio de desenvolvimento e qualidade embrionária. Fonte: adaptado de Stringfellow; Seidel (1998).

Código	Estágio de desenvolvimento	Código	Grau de qualidade
1	Não fertilizado	1	Excelente ou bom
2	2-12 células	2	Razoável
3	Mórula inicial	3	Ruim
4	Mórula	4	Morto ou degenerado
5	Blastocisto inicial	-	-
6	Blastocisto	-	-
7	Blastocisto expandido	-	-
8	Blastocisto eclodindo	-	-
9	Blastocisto eclodido	-	-

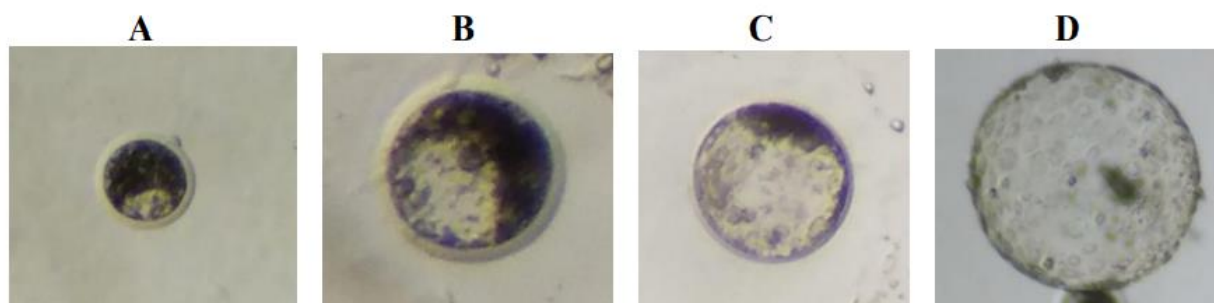


Figura 1 - Embriões em diferentes estágios de blastocistos. A. Blastocisto inicial; B. Blastocisto; C. Blastocisto expandido; D. Blastocisto eclodido. Fonte: Grazia, 2019.

2.3 Receptoras

Foram utilizadas novilhas *Bos indicus* x *Bos taurus* (Nelore x Angus) como receptoras (n = 5136), de 15 a 30 meses. A taxa de ovulação ao protocolo foi de 85%, resultando em 4366 transferências de embriões. As receptoras que não se tornaram gestantes na primeira tentativa, receberam nova transferência de embrião.

Todas as receptoras foram originadas de compra e foram submetidas a protocolo sanitário, com vacinação e reforço para doenças reprodutivas, assim como infecto-contagiosas, completando esquema vacinal pelo menos 30 dias antes do início do estudo.

O peso de um subgrupo de receptoras (n = 2237) foi coletado no momento da TE, e o escore de condição corporal foi avaliado em todas as receptoras no dia da transferência, seguindo a escala de 1 (magra) a 5 (obesa) (HOUGHTON et al., 1990), pelo transferidor responsável.

Foram realizadas 3182 transferências em receptoras mantidas em piquetes de *Brachiaria* spp. durante todo o período experimental, recebendo suplementação de sal proteinado a 0,3% do PV (composto por aveia (50%), DDG (31,6%), ureia (4%), sal branco (4%), fosfato (3,2%), carbonato (3%), ureia protegida (2,7%) e núcleo mineral (1,4%), e água *ad libitum*.

Foram realizadas 1184 transferências em receptoras mantidas por 120 dias em confinamento, recebendo dieta baseada em silagem de milho e capim Piatã (49%), DDG (7%), milho moído (26,5%), núcleo mineral (1,2%), ureia pecuária (0,3%), ureia protegida (0,5%) e água (15,5%). Essas receptoras foram alocadas no confinamento 90 dias antes da TE, receberam embrião e aguardaram o primeiro diagnóstico (DG1), completando 120 dias de confinamento. Após o primeiro diagnóstico, as receptoras prenhas foram alocadas a pasto, seguindo mesmo manejo que as demais receptoras.

2.4 Protocolo de sincronização

No D-17, 5136 receptoras receberam dispositivo intravaginal de 0,5g de P4 (ReproOne, Globalgen) e 2mg (2ml) de benzoato de estradiol (BE,

Bioestrogen, Biogenesis); no D-9 foi feita a remoção do dispositivo de P4 + 1mg (2ml) de cipionato de estradiol (CE, Cronicip, Biogenesis) + 300UI (1,5ml) de eCG (Ecegon, Biogenesis) + 150µg (2ml) de D-cloprostenol (PGF2α, Croniben, Biogenesis). Todas as receptoras receberam 10,5 mcg de acetato de buserelina, análogo do hormônio GnRH (Gonaxal, Biogenesis) no dia da TE (D0).

2.5 Transferência de embriões

No dia da TE (D0) todas as receptoras protocoladas foram avaliadas através de palpação retal, recebendo embrião apenas aquelas com presença de CL. A taxa de ovulação ao protocolo foi de 85%, e 4366 receptoras receberam embrião a fresco.

Os embriões foram transferidos nove dias após a retirada do implante de P4, por dois veterinários experientes da empresa contratada.

2.6 Diagnóstico de gestação

O primeiro diagnóstico de gestação (DG1) foi realizado através da avaliação uterina $25 \pm 1,5$ dias após da TE, sendo considerado prenhe através da visualização do embrião, por meio do aparelho DP10 Mindray® (com transdutor linear multifrequencial na opção 7,5MHz).

As receptoras prenhas ao DG1 foram reavaliadas via palpação retal através da ultrassonografia e do mesmo aparelho ultrassonográfico utilizado anteriormente, $83 \pm 18,1$ dias após a transferência (DG2), para verificação da manutenção da gestação. Foram consideradas prenhas quando houve visualização do conceito. Para os animais prenhes ao DG1 que não tiveram o conceito visualizado ao DG2, foi considerado perda gestacional.

2.7 Nascimento dos animais

As receptoras prenhas foram alocadas em lotes de acordo com a previsão de parto, para acompanhamento dos nascimentos, sendo coletadas informações

de parição e nascimento dos bezerros. Animais diagnosticados prenhas no DG2 e que não pariram, foi considerado perda gestacional entre DG2 e parto.

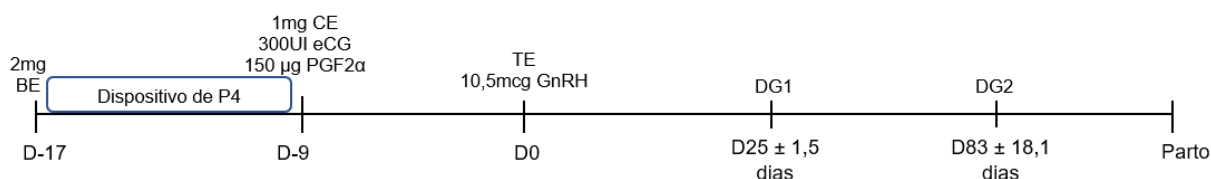


Figura 2 – Diagrama esquemático do protocolo de sincronização das receptoras e manejos de avaliação do experimento: D-17: inserção de dispositivo de P4 e aplicação de 2 mg de BE (benzoato de estradiol); D-9: retirada do dispositivo de P4, aplicação de 1mg de CE (cipionato de estradiol), 300UI de eCG (gonadotrofina coriônica equina) e 150µg de PGF2α; D0: transferência de embrião e aplicação de 10,5mcg de GnRH (gonadotrofina); DG1: diagnóstico de gestação por ultrassonografia 25 ± 1,5 dias após a transferência; DG2: diagnóstico de gestação por ultrassonografia 83 ± 18,1 dias após a transferência; Parto: coleta de informação de parto das receptoras prenhas.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas das variáveis binomiais foram analisadas pelo PROC GLIMMIX do SAS (SAS ver. 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC).

O status da prenhez foi considerado variável dependente, sendo que todos os touros avaliados tiveram, pelo menos 100 embriões transferidos. Foram realizadas análises nas variáveis de produção de oócitos, categoria da doadora, dieta (0,3%PV ou confinamento), ECC e peso da receptora no dia da TE, touro através do procedimento GLIMMIX do SAS.

Os efeitos significativos foram reportados através da média dos quadrados mínimos (ls) e pdiff. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $P \leq 0,05$ e tendências valores de $P \leq 0,10$. Os efeitos significativos serão reportados pela média dos quadrados mínimos.

4. RESULTADOS

4.1.1 Doadoras

Na Tabela 2 é apresentada a média da recuperação oocitária em cada sessão de OPU, de acordo com a categoria (NP, NR ou VM). Foi observado que, proporcionalmente, quase 50% das doadoras aspiradas foram NP, com contribuição de apenas 18% das NR. Entretanto, o número de oócitos recuperados da categoria de NR contribuiu com 19% dos oócitos totais.

A produção oocitária das novilhas foi semelhante (média de 40,7 oócitos/OPU), independente de NP ou NR.

Tabela 2 – Média da produção de oócitos/OPU e proporção da participação das doadoras nas sessões de aspiração de acordo com a categoria.

Doadora	Nº OPU	Oócitos Totais	Média de oócitos/OPU	Proporção
NP	344	14002	40,7	48%
NR	130	5288	40,7	18%
VM	247	8540	34,6	34%
Total	721	27830	38,6	100%

Em âmbito geral, as doadoras foram divididas em quartis de acordo com a produção oocitária/OPU, sendo o quartil I representado pela produção menor ou igual a 23 oócitos/doadora e o quartil IV representado pela produção maior ou igual a 73 oócitos/doadora. A Tabela 3 apresenta os dados relacionados a produção de oócitos e manutenção da gestação. Houve efeito do número de oócitos coletados na sessão de OPU e a relação parto/doadora ($P < 0,01$), sendo que à medida que as doadoras produziram mais oócitos, também resultaram em maior quantidade de partos. A produção de oócitos não interferiu nos índices de manutenção da gestação ($P > 0,05$).

Tabela 3 – Efeito da produção oocitária por doadora nos índices de manutenção da gestação.

Quartil	Nº doadoras	Nº embriões	DG1	DG2	Parto	Perda DG1-DG2	Perda DG2-parto	Parto/DG1	Parto/doadora
I	112	365	37,0%	21,6%	12,9%	41,5%	40,5%	34,8%	0,42^a
≤ 23 óocitos			(135/365)	(79/365)	(47/365)	(56/135)	(32/79)	(47/135)	(47/112)
II	109	691	42,0%	25,6%	15,3%	39,0%	40,1%	36,6%	0,97^b
24 - 38 óocitos			(290/691)	(177/691)	(106/691)	(113/290)	(71/177)	(106/290)	(106/109)
III	122	1112	43,5%	26,6%	16,5%	38,8%	38,2%	37,8%	1,5^c
39 - 72 óocitos			(484/1112)	(296/1112)	(183/1112)	(188/484)	(113/296)	(183/484)	(183/122)
IV	120	2198	40,6%	24,5%	16,1%	39,6%	34,2%	39,6%	2,95^d
≥ 73 óocitos			(893/2198)	(538/2198)	(354/2198)	(355/893)	(184/538)	(354/893)	(354/120)
Erro medio padrao			1,74	1,53	1,29	2,73	3,48	2,72	0,16
Valor de P			0,13	0,24	0,39	0,94	0,38	0,61	< 0,01

DG1 25 ± 1,5 dias após a TE; DG2 83 ± 18,1 dias após a TE; Perda DG1-DG2 perdas gestacionais entre o primeiro e segundo diagnóstico; Perda DG2-parto perdas gestacionais entre o DG2 e parto.

a, b Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente; P<0,05.

Dados relacionados à categoria das doadoras de óocitos para produção dos embriões estão reportados na Tabela 4. Houve efeito da categoria das doadoras nos índices de manutenção da gestação ($P < 0,05$), mas não para perdas gestacionais entre DG1 e DG2 ($P > 0,05$).

Ao DG1, embriões provenientes de doadoras NP promoveram menor resultado de prenhez (39%; 808/2072) quando comparados com doadoras NR (42,6%; 349/819) e VM (43,7%; 645/1475). As duas últimas categorias promoveram resultados estatisticamente semelhantes entre si no DG1 ($P > 0,05$). O mesmo comportamento de resultados foi observado ao DG2, com menores resultados para embriões de NP (22,7%; 470/2072), seguido de NR (27,4%; 224/819) e VM (26,8%; 396/1475).

Embriões provenientes de NR foram aqueles que promoveram maior taxa de parição, enquanto a taxa de parição de embriões de NP e VM não diferiram entre si.

Não houve efeito da categoria da doadora nas perdas gestacionais entre DG1 e DG2 ($P = 0,13$), mas esse efeito se destacou nas perdas entre DG2 e parto ($P = 0,04$), sendo que embriões provenientes de VM promoveram maiores

perdas entre DG2 e parto (40,9%; 162/396) e NR apresentaram as menores perdas entre DG2 e parto (30,8%; 69/224).

Tabela 4 – Efeito da categoria da doadora nos índices de manutenção da gestação.

Doadora	Nº embriões	DG1	DG2	Parto	Perda DG1-DG2	Perda DG2-parto	Parto/DG1
NP	2072	39% ^b	22,7% ^b	14,5% ^b	41,8%	36% _{ab}	37,3% ^b
		(808/2072)	(470/2072)	(301/2072)	(338/808)	(169/470)	(301/808)
NR	819	42,6% ^a	27,4% ^a	18,9% ^a	35,8%	30,8% ^b	44,4% ^a
		(349/819)	(224/819)	(155/819)	(125/349)	(69/224)	(155/349)
VM	1475	43,7% ^a	26,8% ^a	15,9% ^b	38,1%	40,9% ^a	36,3% ^b
		(645/1475)	(396/1475)	(234/1475)	(249/645)	(162/396)	(234/645)
Erro medio padrao		1,36	1,19	1,00	2,08	2,61	2,07
Valor de P		0,01	< 0.01	0,01	0,13	0,04	0,03

DG1 25 ± 1,5 dias após a TE; DG2 83 ± 18,1 dias após a TE; Perda DG1-DG2 perdas gestacionais entre o primeiro e segundo diagnóstico; Perda DG2-parto perdas gestacionais entre o DG2 e parto.

a, b Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente; P<0,05.

A Tabela 5 mostra os índices de manutenção da gestação de acordo com a taxa de produção de embriões (embriões produzidos/oócitos coletados), que foram categorizadas de acordo com a média da taxa de produção, ou seja, abaixo ou acima de 18%. Não houve efeito da taxa de produção de embriões no DG1 (P > 0,05), entretanto houve efeito no DG2 e parto (P < 0,01). Dessa forma, a taxa de produção de embriões influenciou as perdas gestacionais entre DG1 e DG2 (P < 0,01).

Tabela 5 – Efeito da taxa de produção de embriões por doadora nos índices de manutenção da gestação.

Taxa de produção de embriões	Nº doadoras	Nº embriões	DG1	DG2	Parto	Perda DG1-DG2	Perda DG2-parto	Parto/DG1
≤ 18%	240	1411	40,3% (568/1411)	22,5%^b (317/1411)	13,9%^b (196/1411)	44,2%^a (251/568)	38,2% (121/317)	34,5%^b (196/568)
> 18%	223	2955	41,8% (1234/2955)	26,2%^a (773/2955)	16,7%^a (494/2955)	37,4%^b (461/1234)	36,1% (279/773)	40%^a (494/1234)
Erro medio padrao			1,11	0,97	0,82	1,73	2,24	1,72
Valor de P			0,28	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0,38	< 0.01

DG1 25 ± 1,5 dias após a TE; DG2 83 ± 18,1 dias após a TE; Perda DG1-DG2 perdas gestacionais entre o primeiro e segundo diagnóstico; Perda DG2-parto perdas gestacionais entre o DG2 e parto.

a, b Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente; P<0,05.

4.1.2 Receptoras

A Tabela 6 representa os dados de manutenção da gestação de acordo com a dieta que as receptoras foram submetidas. Houve efeito da dieta nos índices de manutenção da gestação ($P < 0,01$), exceto para DG1 ($P > 0,05$). Sendo que receptoras mantidas em pastagem com suplementação de 0,3% PV tiveram melhor desempenho na manutenção da gestação, e maiores índices de parto ($P < 0,01$) do que aquelas receptoras mantidas em confinamento até o primeiro diagnóstico (DG1) e soltas a pasto a partir de então.

Tabela 6 – Efeito da dieta das receptoras nos índices de manutenção da gestação.

Dieta	Nº embriões	DG1	DG2	Parto	Perda DG1-DG2	Perda DG2-parto	Parto/DG1
0,3% PV	3182	41,4% (1317/3182)	26,6%^a (848/3182)	17,7%^a (564/3182)	35,6%^a (469/1317)	33,5%^a (284/848)	42,8%^a (564/1317)
CONFINAMENTO	1184	41,0% (485/1184)	20,4%^b (242/1184)	10,6%^b (126/1184)	50,1%^b (243/485)	47,9%^b (116/242)	26%^b (126/485)
Erro medio padrao		1,15	1,01	0,85	1,76	2,36	1,75
Valor de P		0,79	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01

DG1 25 ± 1,5 dias após a TE; DG2 83 ± 18,1 dias após a TE; Perda DG1-DG2 perdas gestacionais entre o primeiro e segundo diagnóstico; Perda DG2-parto perdas gestacionais entre o DG2 e parto.

a, b Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente; P<0,05.

A Tabela 7 mostra o efeito do escore de condição corporal (ECC) no dia da TE e os índices de manutenção da gestação. Não houve efeito do ECC no DG1 ($P > 0,05$). Receptoras com ECC menor ou igual a 3,0 tiveram maior taxa de parto ($P < 0,01$) e apresentaram menores índices de perdas ao longo da gestação ($P \leq 0,05$), do que aquelas com ECC > 3 .

Tabela 7 – Efeito do ECC das receptoras nos índices de manutenção da gestação.

ECC	N embriões	DG1	DG2	Parto	Perdas DG1-DG2	Perdas DG2-parto	Parto/DG1
$\leq 3,0$	1348	42,5% (573/1348)	28,0% ^a (377/1348)	19,9% ^a (256/1348)	34,2% ^b (196/573)	32,0% ^b (121/377)	44,7% ^a (256/573)
$> 3,0$	3018	40,7% (1229/3018)	23,6% ^b (713/3018)	14,4% ^b (434/3018)	42,0% ^a (516/1229)	39,1% ^a (279/713)	35,3% ^b (434/1229)
Valor de P		0,27	$< 0,01$	$< 0,01$	$< 0,01$	0,02	$< 0,01$

DG1 $25 \pm 1,5$ dias após a TE; DG2 $83 \pm 18,1$ dias após a TE; Perda DG1-DG2 perdas gestacionais entre o primeiro e segundo diagnóstico; Perda DG2-parto perdas gestacionais entre o DG2 e parto.

a, b Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente; $P < 0,05$.

A Tabela 8 descreve o efeito do peso da receptora no dia da TE e os índices de manutenção da gestação. Receptoras mais pesadas no dia da TE (> 391 kg) apresentaram melhor índice de parto, e portanto maior taxa de parição em relação primeiro diagnóstico ($P < 0,05$). Houve efeito do peso apenas no parto ($P < 0,05$), com maiores índices para receptoras mais pesadas.

Tabela 8 – Efeito do peso das receptoras no dia da TE e os índices de manutenção da gestação.

Peso	Nº embriões	DG1	DG2	Parto	Perda DG1-DG2	Perda DG2-Parto	Parto/DG1
< 300 kg	204	38,7% (79/204)	21,0% (43/204)	10%^b (20/204)	45,6% (36/79)	53,5% (23/43)	25,3%^b (20/79)
300 - 330 kg	664	37,8% (251/664)	20,0% (133/664)	13%^b (86/664)	47,0% (118/251)	35,3% (47/133)	34,3%^b (86/251)
331 - 360 kg	764	43,2% (330/764)	23,3% (178/764)	13,4%^b (102/764)	46,0% (152/330)	42,7% (76/178)	30,9%^b (102/330)
361 - 390 kg	386	38,9% (150/386)	21,5% (82/386)	13,5%^b (52/386)	45,3% (68/150)	36,6% (30/82)	34,7%^b (52/150)
> 391kg	219	43,4% (95/219)	27,9% (61/219)	20,5%^a (45/219)	35,8% (34/95)	26,2% (16/61)	47,4%^a (45/95)
Erro medio padrao		2,58	2,19	1,80	4,13	5,41	3,91
Valor de P		0,22	0,15	0,02	0,39	0,14	0,02

DG1 25 ± 1,5 dias após a TE; DG2 83 ± 18,1 dias após a TE; Perda DG1-DG2 perdas gestacionais entre o primeiro e segundo diagnóstico; Perda DG2-parto perdas gestacionais entre o DG2 e parto.

a, b Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente; P<0,05.

4.1.3 Touro

Foi observado efeito do touro nos índices de manutenção da gestação, assim descrito na Tabela 9 ($P < 0,01$). As perdas entre DG1 e DG2 variaram entre 28,1% e 55,1% ($P < 0,01$). E as perdas entre DG2 e parto variaram de 18,4% a 57% ($P < 0,01$).

Tabela 9 – Efeito dos touros nos índices de manutenção da gestação.

Touro	Nº embriões	DG1	DG2	Parto	Perda DG1-DG2	Perda DG2-parto	Parto/DG1
Touro A	103	47,6%	21,4%	13,6%	55,1%	36,4%	28,6%
		(49/103)	(22/103)	(14/103)	(27/49)	(8/22)	(14/49)
Touro B	572	46,2%	29,5%	20,3%	36,0%	31,4%	43,9%
		(264/572)	(169/572)	(116/572)	(95/264)	(53/169)	(116/264)
Touro C	206	43,2%	31,1%	20,9%	28,1%	32,8%	48,3%
		(89/206)	(64/206)	(43/206)	(25/89)	(21/64)	(43/89)
Touro D	1447	39,3%	22,9%	13,1%	41,7%	43,1%	33,2%
		(569/1447)	(332/1447)	(189/1447)	(237/569)	(143/332)	(189/569)
Touro E	124	43,5%	30,6%	25,0%	29,6%	18,4%	57,4%
		(54/124)	(38/124)	(31/124)	(16/54)	(7/38)	(31/54)
Touro F	1914	40,1%	24,3%	15,5%	40,2%	57,0%	38,2%
		(777/1914)	(465/1914)	(297/1914)	(312/777)	(168/297)	(297/777)
Erro medio padrao		2,82	2,51	2,11	4,26	5,43	4,22
Valor de P		0,05	< 0.01	< 0.01	0,01	0,01	< 0.01

DG1 25 ± 1,5 dias após a TE; DG2 83 ± 18,1 dias após a TE; Perda DG1-DG2 perdas gestacionais entre o primeiro e segundo diagnóstico; Perda DG2-parto perdas gestacionais entre o DG2 e parto.

a, b Letras distintas na mesma coluna diferem estatisticamente; $P < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

Este estudo foi realizado para verificar fatores que interferem na manutenção da gestação de embriões FIV transferidos em receptoras *Bos indicus* x *Bos taurus* (Nelore x Angus). Foram encontradas altas taxas de perdas ao longo da gestação, promovendo taxa de parição geral de 15,8% - em relação ao total de embriões transferidos. Existe grande lacuna na literatura sobre dados de perdas gestacionais até o parto em vacas de corte, principalmente utilizando a TE. As informações disponíveis relacionadas às perdas geralmente são reportadas até 100 dias de gestação (REESE et al., 2020).

As falhas reprodutivas possuem crucial relevância na economia da atividade, e as perdas gestacionais mostram-se expressivas nos dois primeiros meses de gestação, principalmente no período de desenvolvimento embrionário inicial (até 28 dias de gestação), com relatos de aproximadamente 50% de perda (REESE et al., 2020). Entre os dias 30 e 60 de gestação, Sales et al. (2011) reportou perdas gestacionais de 13,7% (28/204).

A perda gestacional envolve múltiplos fatores, inerentes a linhagem materna e paterna (POHLER et al., 2012; 2016; ORTEGA et al., 2018; FRANCO et al., 2020). Assim, a investigação de efeitos que podem ser aperfeiçoados é promissora para melhoria dos resultados dessa técnica.

Relatos na literatura confirmam grande variação individual na recuperação oocitária de doadoras *Bos indicus*, sendo que, neste estudo, as doadoras produziram 0 a 215 oócitos/sessão de OPU, com média de 38,6 oócitos/doadora. Pontes et al. (2011) relataram recuperação de 0 a 128 oócitos viáveis por sessão de OPU em doadoras da mesma raça e média de 30 oócitos/OPU. Outros estudos, especulam média de recuperação oocitária/OPU na raça Nelore em torno de 25 a 30 oócitos (BLASCHI et al., 2004), inferior à média de produção geral encontrada aqui. Tal diferença pode estar atribuída à população de animais aspirada, pertencente a um rebanho fonte de melhoramento genético, selecionadas geneticamente para melhor desempenho produtivo e, conseqüentemente, reprodutivo.

As diferenças na recuperação oocitária entre vacas e novilhas pode estar associada ao estado fisiológico dessas categorias, já que todas as doadoras

multíparas eram paridas, em média, há 45 dias. Fêmeas não lactantes apresentam maior produção de oócitos e de blastocistos, quando comparadas àquelas em lactação (BARUSELLI et al., 2016). A lactação e presença do bezerro tornam o anestro pós-parto de vacas Nelore mais prolongado quando comparado com *Bos taurus*, sendo justificados pelas alterações endócrinas e metabólicas desse período, como inibição da secreção de GnRH, maior taxa metabólica de hormônios esteróides, dentre outros aspectos (SARTORI et al., 2002; BARUSELLI et al., 2012).

A relação de doadoras com maior produção oocitária e consequentemente mais prenhez encontradas neste estudo também foi relatada por Pontes et al. (2011), no qual o grupo de alta produção oocitária contemplava produção de $58,94 \pm 2,04$ oócitos/doadora, e promoveu maior quantidade de prenhez do que outros grupos de produção inferior. Santos et al. (2016) observou que a seleção de doadoras com alta produção oocitária produziu 10 a 30 vezes maior quantidade de embriões em relação às doadoras de produção baixa ou intermediária. Do mesmo modo, a relação de parto por doadora aumentou à medida que o número de oócitos aumentou. Dessa maneira, a seleção exclusiva de doadoras de alta produção pode promover uma produção acumulativa de blastocisto de 96,3% maior do que a contagem acumulativa de blastocisto de doadoras de baixa produção oocitária (MOROTTI et al., 2015; MONTEIRO et al., 2016).

Ao avaliar a categoria da doadora e sua influência na manutenção da gestação, Baruselli et al. (2016) observaram menor taxa de concepção aos 30 dias de embriões provenientes de novilhas pré-púberes e púberes (7%; 3/43), melhorando a concepção para embriões de doadoras em lactação (28,6%; 10/25) e não lactantes (32,7%; 36/74). Este fato pode estar relacionado com a melhor qualidade oocitária de fêmeas adultas, quando comparado com fêmeas jovens, corroborando com os resultados encontrados, onde embriões de NP promoveram índices de 39% (808/2072) ao DG1 e 22,7% (470/2072) ao DG2, enquanto doadoras NR e VM tiveram índices semelhantes entre si (42,6%; [349/819] e 43,7%; [645/1475], respectivamente, para DG1 e 27,4%; [224/819] e 26,8%; [396/1475] respectivamente, para DG2).

As fêmeas jovens podem apresentar competência oocitária comprometida, devido ao ajuste hormonal que vem ocorrendo nessa fase, com

tendência de produzir oócitos de menor diâmetro folicular, associados a menor concentração de estradiol pré-ovulatório, impactando a sobrevivência embrionária (VASCONCELOS et al., 2001; HANSEN, 2002; MARTINS et al., 2014). Entre as fêmeas não lactantes, notam-se diferentes produções de embriões de novilhas pré-púberes e púberes, sendo que novilhas mais velhas apresentam maior eficiência na produção de embriões, assim como maior contagem de oócitos viáveis na recuperação oocitária (BARUSELLI et al., 2016), podendo justificar maior taxa de prenhez de embriões provenientes de NR e VM ao DG1 e DG2.

Ainda nesse sentido, doadoras com maiores taxas de produção de embriões, ou seja, melhor desempenho na PIV promoveram maior manutenção da gestação, com taxa de parto de 16,7% (494/2955) vs. 13,9% (196/1411).

A dinâmica do ciclo estral e o conjunto de variações hormonais no período pré ovulatório e metaestro são fundamentais para promover receptividade uterina e orquestrar desenvolvimento endometrial coordenado (CRUPPE, 2011). Quando a regulação fisiológica hormonal e uterina é inadequada, a sobrevivência embrionária e posterior desenvolvimento do concepto é comprometida (HANSEN, 2002; CRUPPE, 2011). Portanto, o período de proestro, indução da ovulação de folículos pequenos ou não competentes, idade e estresses maternos podem comprometer a sobrevivência do embrião (VASCONCELOS et al., 2001; HANSEN et al., 2002; SANTOS et al., 2004).

A duração do proestro de 3 dias neste estudo, pode ter impactado os efeitos de manutenção da gestação, levando em consideração os argumentos expostos, o aumento na duração do proestro pode impactar positivamente os resultados de preparação uterina e sobrevivência embrionária.

A sobrevivência embrionária é influenciada por inúmeros fatores, e o zigoto é formado por materiais genéticos e não genéticos provenientes de oócitos e espermatozoides. Dessa forma, defeitos na função oocitária ou no espermatozoide podem reduzir a sobrevivência embrionária (HANSEN, 2002). O desenvolvimento do embrião é composto por múltiplos processos, e estresses maternos afetam a sobrevivência do embrião, sendo esta dependente não somente da magnitude do estresse aplicado, mas também da eficácia das respostas adaptativas embrionárias nessa situação (HANSEN, 2002).

A capacidade de sobrevivência do embrião à perturbações no ambiente materno depende do grau de adaptação desse embrião ao ambiente em que reside (HANSEN, 2002). Demetrio et al. (2007) relataram o efeito do estresse por calor nos índices de concepção e perdas gestacionais em vacas holandesas, sendo que as perdas embrionárias podem representar efeito residual de estresses que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário, refletindo até o período fetal (HANSEN, 2002; DEMETRIO et al., 2007).

Diante disso, fatores como estresse ambiental e nutricional impactam diretamente a sobrevivência embrionária (HANSEN, 2002; DEMETRIO et al., 2007). É bem relatado na literatura que o estresse impacta diretamente a performance reprodutiva de vacas independente da raça (taurina ou zebuína). Relata-se que animais mais reativos possuem efeito deletério na taxa de concepção, assim como doadoras de oócitos submetidas a estresse por calor produzem menos embriões viáveis e mudanças de grupos sociais provocam maior taxa de serviço (DOBSON et al., 2001; COOKE et al., 2011). Esses estudos sustentam a justificativa de que a mudança do manejo nutricional e social das receptoras impactaram os índices de manutenção da gestação, pelo menos parcialmente pelo estresse sofrido nas mudanças, sendo que receptoras mantidas em confinamento e posteriormente manejadas a pasto, promoveram índices de manutenção da gestação muito inferiores às aquelas mantidas a pasto durante o período experimental (DG2: 26,6% vs 20,4%; Parto: 17,7% vs 10,6%, respectivamente).

Efeitos da alta lotação durante a recria de novilhas foram observados por Schubach e colaboradores (2017), que avaliaram novilhas recriadas em piquetes de baixa lotação (25.000m²/novilha) e em confinamento sob alta lotação (14m²/novilha), recebendo a mesma dieta. Os autores observaram efeito do tipo de manejo no alcance à puberdade, sendo que novilhas sob baixa lotação atingiram a puberdade em maior proporção do que aquelas em alta lotação (65,4% vs 31,9%), mesmo apresentando peso corporal e ganho semelhantes ao fim do período experimental (0 a 182 dias). No mesmo estudo, foram avaliadas concentrações de cortisol em amostras de pelo das novilhas em diferentes manejos, sugerindo maior estresse crônico no grupo de alta lotação. Diante desses resultados, o raciocínio de que o estresse impacta a fertilidade de bovinos é reforçado (SCHUBACH et al., 2019). Dessa maneira, a mudança de

manejo de receptoras prenhas aos $32 \pm 1,5$ dias mostrou efeitos prejudiciais aos resultados de manutenção da gestação ao longo de todo período gestacional.

De acordo com a influência do cortisol na manutenção da gestação, Braun et al. (2007) investigaram os efeitos da administração de uma (104 dias de gestação), duas (104 e 111 dias de gestação) ou três (104, 111 e 118 dias de gestação) doses de betametasona (BET) em ovelhas gestantes, no número e distribuição de células binucleadas placentárias, nos níveis de proteína oPL (hormônio lactogênico placentário) e nos níveis plasmáticos de oPL materno e fetal em ovelhas. A BET é um glicocorticoide que age em *feedback* negativo ao cortisol, conhecido por efeitos benéficos em gestações de alto risco em humanos (MALTAU et al., 1979). Os autores observaram que a administração de BET resultou em redução significativa em BNC entre 109 e 146 dias de gestação, para valores que foram 24 a 475 vezes menores do que em animais que não receberam BET. Adicionalmente, animais tratados apresentaram níveis de oPL – importante para o crescimento fetal - 52 a 72% inferiores aos animais controle nos dias 116 e 121 de gestação. Ao avaliar amostras do tecido placentário, foi observado que a administração materna de BET alterou a distribuição e localização de BNC dentro dos placentomas – podendo estar associado às alterações na formação de BNC e produção de oPL. Dessa forma, o aumento da concentração de BET com o intuito de controlar as concentrações de cortisol, pode potencializar alterações placentárias e perdas gestacionais.

Os efeitos do *status* nutricional das matrizes também são facilmente encontrados nos resultados reprodutivos, já que a boa nutrição implica em alterações no ambiente uterino, impactando tanto o desenvolvimento oocitário como viabilidade embrionária (FERNANDES et al., 2016). Santos e colaboradores (2004) observaram maiores perdas gestacionais em animais submetidos a estresses nutricionais e perda de ECC, principalmente porque o status metabólico da vaca afeta a sobrevivência embrionária e fetal (SANTOS et al., 2004). Assim, maior peso corporal das receptoras foi importante para melhores índices de parto, entretanto, essa variável foi mensurada pontualmente apenas no momento da TE. Da mesma forma, a avaliação de ECC ocorreu pontualmente, não sendo considerada a variação de ECC durante a gestação, a qual se mostraria mais fidedigna. Adicionalmente, análises mais robustas com

relação a interação do peso e ECC com o manejo nutricional ao qual as receptoras estavam submetidas no momento da TE, devem ser consideradas.

Com relação ao efeito dos touros, muitos estudos relatam variação do desempenho de touros na FIV (ASSUMPÇÃO et al., 2019; ALMEIDA et al., 2022). Entretanto, existem poucos relatos que exploram o efeito do touro na manutenção da gestação. Franco et al. (2020) encontraram grandes variações - 1,8 a 11,7% para perdas embrionárias iniciais de 24 a 31 dias de gestação e 2,3 a 12,6% para perdas embrionárias tardias de 31 a 60 dias de gestação de acordo com o touro utilizado na IATF. Os autores associaram a disparidade na manutenção da gestação entre touros com a possível deficiência da placentação (que ocorre entre os dias 21 a 42 da gestação).

Além disso, Barton e colaboradores (1985) verificaram a relevância do genoma paterno no desenvolvimento placentário de embriões de rato, atuando diretamente na capacidade de proliferação do trofoectoderma e desenvolvimento do embrião. Corroborando com esses resultados, Pohler e colaboradores (dados não publicados) transferiram embriões bovinos partenogenéticos em receptoras no estágio de blastocisto, e monitoraram o desenvolvimento gestacional. Os pesquisadores observaram em dados preliminares que mesmo que os embriões consigam sobreviver até 40-45 dias de gestação, nenhum sítio de implantação e fixação ao endométrio foi observado, sugerindo que os tecidos trofoblásticos não são adequadamente formados na ausência de genes paternos (citado em Pohler et al., 2020).

Dessa forma, a genética paterna influencia diretamente a placentação, podendo justificar o efeito do touro nas perdas gestacionais tardias. A mortalidade embrionária até 60 dias de gestação pode estar relacionada com a vascularização deficiente do alantoide, retardo em seu crescimento ou até mesmo ausência (LEMLEY et al., 2021).

Em busca de monitorar a função placentária e viabilidade embrionária, Pohler et al. (2016) e Franco et al. (2018) observaram que menores concentrações de PAGs por volta de 30 dias de gestação foram correlacionadas positivamente com perdas gestacionais, sendo que significativas diferenças na concentração de PAGs foram observadas de acordo com o touro utilizado na IATF. Essas variações na produção de PAGs de acordo com o touro utilizado, também foram observadas por Ortega et al. (2018).

Ainda nesse contexto, Amaral e colaboradores (2022) observaram efeito do touro na taxa de concepção aos 30 dias ($P=0,008$), taxa de parto ($P<0,001$) e perdas gestacionais até o parto ($P=0,017$) ao avaliar embriões produzidos *in vitro*, assim como observado neste estudo, onde as perdas gestacionais entre $32 \pm 1,5$ dias e $90 \pm 18,1$ dias de gestação variaram entre 28,1% a 55,1%, e as perdas gestacionais entre 90 ± 30 dias de gestação até o parto variaram entre 18,4% a 57%.

6. CONCLUSÃO

Os índices de manutenção da gestação de receptoras submetidas a TETF *in vitro* são afetados por características das doadoras, como a categoria da doadora aspirada para produção dos embriões, sendo que NP e VM promoveram piores índices de sobrevivência embrionária do que doadoras NR, provavelmente associado à competência oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário.

A quantidade de oócitos recuperados não afetou a manutenção da gestação, enquanto a taxa de produção de embriões (embriões produzidos/oócitos coletados acima de 18%) demonstrou efeito positivo na manutenção da gestação até o parto.

Quanto às receptoras, melhores índices de manutenção da gestação foram encontrados para receptoras manejadas à pasto durante todo o período experimental, já que a mudança de manejo das receptoras pode ter promovido estresse maternal afetando diretamente a sobrevivência embrionária.

O touro utilizado na produção embrionária mostrou efeito durante todas as etapas do estudo, promovendo efeitos desde o primeiro diagnóstico até o parto, demonstrando variações individuais no efeito de perda gestacional e no período avaliado.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T. G., MINGOTI, R. D., CASTRO, L. S., SIQUEIRA, A. F. P., HAMILTON, T. R., FONTES, P. K., ... & ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. A. Paternal effect does not affect in vitro embryo morphokinetics but modulates molecular profile. *Theriogenology*, v. 178, p. 30-39, 2022.

AMARAL, T.F. et al. Actions of CSF2 and DKK1 on bovine embryo development and pregnancy outcomes are affected by composition of embryo culture medium. *Scientific reports*, v. 12, n. 1, p. 1-11, 2022.

ASSUMPCAO, M. E. O. et al. Bull individual effect is determinant to in vitro embryo production regardless of seminal profile. *Animal Reproduction*, v. 16, n. 3, p. 604, 2019

BARUSELLI, P. S. et al. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 134-141, 2012.

BARUSELLI, P. S. et al. Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. *Animal Reproduction (AR)*, v. 13, n. 3, p. 264-272, 2018.

BARTON, S. C. et al. Development of gynogenetic and parthenogenetic inner cell mass and trophectoderm tissues in reconstituted blastocysts in the mouse. 1985.

BLASCHI W., ANDRADE E.R., NONATO JR. I., PONTES J.H.F., ERENO JR. J.C., UVO S.; SENEDA, M.M. Utilização prévia do Pluset na aspiração folicular: Impacto na produção in vitro de embriões em vacas *Bos indicus*. *Acta Scientiae Veterinariae*; v.32, p. 186. 2004.

BLONDIN, P. Status of embryo production in the world. *Animal Reproduction (AR)*, v. 12, n. 3, p. 356-358, 2018.

BRAUN, T., LI, S., MOSS, T. J., NEWNHAM, J. P., CHALLIS, J. R., GLUCKMAN, P. D., & SLOBODA, D. M. Maternal betamethasone administration reduces binucleate cell number and placental lactogen in sheep. *Journal of Endocrinology*, v.194, n.2, p.337-347. 2007.

CRUPPE, L.H. The effect of preovulatory concentration of estradiol and length of proestrus on fertility in beef cattle. Tese de Doutorado. Ohio State University. 2011.

COOKE, R. F. et al. Effects of temperament on pregnancy rates to fixed-timed AI in Bos indicus beef cows. *Livestock science*, v. 142, n. 1-3, p. 108-113, 2011.

DEMETRIO, D. G. B. et al. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, v. 90, n. 11, p. 5073-5082, 2007.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 260-267, 2008.

DOBSON, H. et al. Is stress really all that important?. *Theriogenology*, v. 55, n. 1, p. 65-73, 2001.

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. 2019.

FARIN, P. W., CROSIER, A. E., & FARIN, C. E. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*, V. 55, N. 1, P. 151-170. 2001.

FERNANDES, C. A. C., PALHAO, M. P., FIGUEIREDO, A. C. S., RIBEIRO, J. R., E SILVA, F. F., & VIANA, J. H. M. Weight gain potential affects pregnancy rates in bovine embryo recipients raised under pasture conditions. *Tropical animal health and production*, v.48, n.1, p.103-107. 2016.

FRANCO, G., REESE, S., POOLE, R., RHINEHART, J., THOMPSON, K., COOKE, R., & POHLER, K. Sire contribution to pregnancy loss in different periods of embryonic and fetal development of beef cows. *Theriogenology*, v. 154, p.84-91. 2020.

GRAZIA, J. G. V. Produção in vitro de embriões (PIVE) na bovinocultura de leite e de corte. 2019. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais.

HAFEZ, Elsayed Saad Eldin; HAFEZ, B. (Ed.). *Reproduction in farm animals*. John Wiley & Sons, 2013.

HANSEN, P. J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. *Journal of Animal Science*, v. 80, n. E-suppl_2, p. E33-E44, 2002.

HOUGHTON PL, LEMENAGER RP, MOSS GE, HENDRIX KS. Prediction of postpartum beef cow body composition using weight to height ratio and visual body condition score. *J Anim Sci* 1990;68:1428–37.

LEMLEY, C. O., CAMACHO, L. E., & VONNAHME, K. A. Maternal recognition and physiology of pregnancy. *Bovine reproduction*, p.324-338. 2021

MALTAU, J. M., STOKKE, K. T., & MOE, N. Effects of betamethasone on plasma levels of estriol, cortisol and HCS in late pregnancy. *Acta Obstetricia et Gynecologica Scandinavica*, v.58, n.3, p.235-238. 1979.

MARKUSFELD-NIR, O. Epidemiology of bovine abortions in Israeli dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine*, v. 31, n. 3-4, p. 245-255, 1997.

MERTON, J. S. et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*, v. 59, n. 2, p. 651-674, 2003.

MONTEIRO, F. M., BATISTA, E. O. S., VIEIRA, L. M., BAYEUX, B. M., ACCORSI, M., CAMPANHOLI, S. P., ... & BARUSELLI, P. S. Beef donor cows

with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology*, v. 90, p.54-58. 2017.

MOROTTI, F., SANTOS, G. M. G., JÚNIOR, C. K., SILVA-SANTOS, K. C., ROSO, V. M., & SENEDA, M. M. Correlation between phenotype, genotype and antral follicle population in beef heifers. *Theriogenology*, v.91, 21-26, 2017.

ORTEGA, M. et al. Influences of sire conception rate on pregnancy establishment in dairy cattle. *Biology of reproduction*, v. 99, n. 6, p. 1244-1254, 2018.

POHLER, K. G., GEARY, T. W., ATKINS, J. A., PERRY, G. A., JINKS, E. M., & SMITH, M. F. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. *Cell and tissue research*, v. 349, n.3, p.649-664. 2012.

POHLER, K. G., PERES, R. F. G., GREEN, J. A., GRAFF, H., MARTINS, T., VASCONCELOS, J. L. M., & SMITH, M. F. Use of bovine pregnancy-associated glycoproteins to predict late embryonic mortality in postpartum Nelore beef cows. *Theriogenology*, v.85, n.9, p.1652-1659. 2016.

PONTES, J. H. F., STERZA, F. M., BASSO, A. C., FERREIRA, C. R., SANCHES, B. V., RUBIN, K. C. P., & SENEDA, M. M. Ovum pick up, in vitro embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, V. 75, n.9, p.1640-1646. 2011.

REESE, S. T., FRANCO, G. A., POOLE, R. K., HOOD, R., MONTERO, L. F., OLIVEIRA FILHO, R. V., ... & POHLER, K. G. Pregnancy loss in beef cattle: A meta-analysis. *Animal reproduction science*, v. 212, 2020.

SALES, J. N. S., PEREIRA, R. V. V., BICALHO, R. C., & BARUSELLI, P. S. Effect of injectable copper, selenium, zinc and manganese on the pregnancy rate of crossbred heifers (*Bos indicus* × *Bos taurus*) synchronized for timed embryo transfer. *Livestock Science*, v.142, n.1-3, p.59-62. 2011.

SANTOS, J. E. P., Thatcher, W. W., Chebel, R. C., Cerri, R. L. A., & Galvao, K. N. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Animal reproduction science*, v. 82, p.513-535. 2004.

SANTOS, G. M. G., SILVA-SANTOS, K. C., BARREIROS, T. R. R., MOROTTI, F., SANCHES, B. V., DE MORAES, F. L. Z., ... & SENEDA, M. M. High numbers of antral follicles are positively associated with in vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. *Animal reproduction science*, v.165, p.17-21. 2016.

SARTORI, R., PRATA, A. B., FIGUEIREDO, A. C. S., SANCHES, B. V., PONTES, G. C. S., VIANA, J. H. M., ... & BARUSELLI, P. S. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. *Animal Reproduction (AR)*, v.13, n.3, p.300-312. 2018.

SCHUBACH, K. M. et al. Impacts of stocking density on development and puberty attainment of replacement beef heifers. *Animal*, v. 11, n. 12, p. 2260-2267, 2017.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 3. ed. Champaign, IL: International Embryo Transfer Society, 1998.

SUMMERS, R. N., PETERSON, C. A., LOCK, T. F., POLLACK, C., IRELAND, F. A., FAULKNER, D. B., & KESLER, D. J. The effect of exogenous progesterone administered intravaginally, via CIDR, on embryo survival in beef cattle. *Illini BeefNet, University of Illinois*. Published on <http://traill.outrreach.uiuc.edu/beefnet>. 2004.

VASCONCELOS, J. L. M., SARTORI, R., OLIVEIRA, H. N., GUENTHER, J. G., & WILTBANK, M. C. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology*, v.56, n.2, p.307-314. 2001.

VIANA, J. H.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; FERNANDES, C. A. C.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 84, p. 1–12, 2004.

VIANA, J. H. 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*, v. 39, n. 4, 2021.

IMPLICAÇÕES

O presente estudo trará contribuições para pesquisadores e pecuaristas na área de reprodução animal, já que demonstrou importantes resultados de perdas gestacionais em receptoras submetidas a TETF. Além disso, esse assunto pouco discutido traz grandes impactos econômicos no sistema de corte. Ter conhecimento dos números atribuídos a esse impacto, e levando em consideração fatores que influenciam as perdas, surgem oportunidades de ajustes operacionais que podem otimizar resultados de manutenção da gestação, e consequentemente, maior taxa de parição.