



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

BRUNO AMBROZINI

TAXAS DE CONCEPÇÃO E PERDA GESTACIONAL DE  
NOVILHAS E VACAS GIROLANDO APÓS TRANSFERÊNCIA  
EM TEMPO FIXO DE EMBRIÕES FRESCOS OU  
VITRIFICADOS

---

Londrina

2020

BRUNO AMBROZINI

TAXAS DE CONCEPÇÃO E PERDA GESTACIONAL DE  
NOVILHAS E VACAS GIROLANDO APÓS TRANSFERÊNCIA  
EM TEMPO FIXO DE EMBRIÕES FRESCOS OU  
VITRIFICADOS

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katia Cristina Silva Santos

---

Londrina

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Ambrozini, Bruno.

Taxas de concepção e perda gestacional de novilhas e vacas Girolando após transferência em tempo fixo de embriões frescos ou vitrificados / Bruno Ambrozini. - Londrina, 2020.

49 f. : il.

Orientador: Katia Santos.

Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias, 2020.

Inclui bibliografia.

1. Reprodução bovinos - Tese. 2. Produção in vitro de embriões (PIVE) - Tese. 3. Transferência de embrião em tempo fixo (TETF) - Tese. 4. Vitrificação de embriões - Tese. I. Santos, Katia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias. III. Título.

CDU 619

BRUNO AMBROZINI

TAXAS DE CONCEPÇÃO E PERDA GESTACIONAL DE  
NOVILHAS E VACAS GIROLANDO APÓS TRANSFERÊNCIA  
EM TEMPO FIXO DE EMBRIÕES FRESCOS OU  
VITRIFICADOS

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Clínicas Veterinárias da  
Universidade Estadual de Londrina como  
requisito parcial para a obtenção do título  
de Mestre em Clínicas Veterinárias.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Katia Cristina Silva Santos  
Universidade Estadual de Londrina (UEL)

---

Prof. Dr. Flávio Antônio Barca Júnior  
UNOPAR - Arapongas

---

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros  
Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP)

Londrina, 26 de maio de 2020.

Dedico este trabalho aos meus pais, Fernando e Cristina, pelo carinho, todos os ensinamentos e conselhos que me proporcionaram, contribuindo imensamente para chegar até aqui e me tornar quem hoje sou.

# AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder tantas graças e poder alcançar meus objetivos.

Agradeço a Professora Dr<sup>a</sup>. Katia, por todos os ensinamentos, orientação e por toda a ajuda nessa jornada.

Ao Dr. Gustavo, por proporcionar o contato com os membros do Condomínio Canto Porto, bem como as lições, técnicas e possibilidades de treinamento prático.

Aos meus pais, Fernando e Cristina que sempre me apoiam em minhas escolhas, intervindo quando necessário, pensando no meu próprio bem. Sem eles nada disso seria possível.

As minhas irmãs Caroline e Alessandra, pelo companheirismo, amizade, puxões de orelhas e paciência desde sempre.

Aos meus amigos, Guilherme e Kaue, pelas histórias, ajuda em momentos difíceis e todos esses anos de amizade. Agradeço aos meus amigos da graduação e amigos de Piracicaba por todos esses anos de amizade.

Aos professores membros da banca de qualificação (Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros e Prof. Dr. Flávio Antônio Barca Júnior) agradeço por fazerem parte deste momento da minha vida profissional, e todo conhecimento e tempo para contribuir com esse trabalho.

Aos docentes do programa de Mestrado Profissional, pelos ensinamentos e conselhos dados.

E também a todos os funcionários do Condomínio Canto Porto, pela ajuda, tempo e conhecimento compartilhados.

MUITO OBRIGADO!

AMBROZINI, Bruno. **Taxas de concepção e perda gestacional de novilhas e vacas Girolando após transferência em tempo fixo de embriões frescos ou vitrificados.** 2020. 49p. Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar as taxas de concepção e perda gestacional de fêmeas bovinas da raça Girolando (1/2 Gir x 1/2 Holandês) submetidas a processo de transferência de embrião em tempo fixo (TETF), considerando a categoria animal e a vitrificação do embrião. Foram analisadas 4.987 transferências de embrião (TE), totalizando 1.780 inovulações em vacas e 3.207 em novilhas Girolando de um programa de produção de embriões em larga escala. Os dados foram divididos de acordo com a categoria animal (novilha ou vaca) e o embrião (fresco ou vitrificado) transferido. Os parâmetros avaliados foram: taxa de concepção (30 dias de gestação) e perda gestacional (dos 30 dias ao parto). Os animais foram submetidos a protocolo de TETF de três manejos, com aplicação IM de benzoato de estradiol (BE) e inserção de dispositivo intravaginal de progesterona (P4) em dias aleatórios do ciclo estral, denominando dia zero (D0). No nono dia (D9), retirou-se o dispositivo de progesterona e aplicou-se (IM) cloprostenol sódico (PGF2 $\alpha$ ), gonadotrofina coriônica equina (eCG) e cipionato de estradiol (CE). No décimo oitavo dia, foi realizada a TETF e, 23 dias depois (D41), foi realizado o diagnóstico de gestação por ultrassonografia. Os parâmetros avaliados foram: taxa de concepção (30 dias de gestação) e perda gestacional (dos 30 dias ao parto). Os dados foram analisados pelo modelo de Regressão Logística Múltipla ( $p \leq 0,05$ ), considerando os efeitos dos anos, da categoria animal e do embrião transferido. O ECC não foi considerado para as análises. A análise foi realizada utilizando o programa estatístico SigmaStat 4.0. As novilhas apresentaram maior taxa de concepção (56,56%;  $p = 0,01$ ) e menor taxa de perda gestacional (27,18%;  $p = 0,011$ ) comparado às vacas (40,62%; 40,94%). Não houve efeito do embrião transferido sobre as taxas de concepção ( $p = 0,0955$ ) e perda gestacional ( $p = 0,676$ ) das fêmeas. Da mesma forma, os anos em que as transferências foram realizadas não tiveram efeito sobre as taxas de concepção ( $p = 0,93$ ) e perda gestacional ( $p = 0,092$ ) das receptoras. Portanto, novilhas Girolando submetidas a protocolo de transferência de embrião em tempo fixo apresentaram maior taxa de concepção e menor perda gestacional, tanto com embrião fresco quanto vitrificado, em relação às vacas, e não houve diferença na taxa de concepção e perda gestacional das receptoras após transferência com embriões frescos ou vitrificados.

**Palavras-chave:** vitrificação; categoria animal; concepção; perda gestacional; TETF.

AMBROZINI, Bruno. **Conception rates and pregnancy loss of Holstein-Gir heifers and cows following fixed timed embryo transfer with fresh or vitrified embryos.** 2020. 49p. Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the conception and pregnancy loss rates of crossbred Holstein-Gir (1/2 Gir x 1/2 Holstein) bovine females submitted to fixed-time embryo transfer (FTET), considering the animal category and vitrification process. It were analyzed 4,987 embryo transfers (ET), on a total of 1,780 embryo transfers in Holstein-Gir cows and 3,207 in heifers. Data were divided according to the animal category (heifer or cow) and embryo (fresh or vitrified) transferred. The parameters evaluated were: conception rate (30 days of gestation) and gestational loss (from 30 days to delivery). The animals were submitted to a three-way TETF protocol, with IM application of estradiol benzoate (BE) and insertion of an intravaginal progesterone device (P4) on random days of the estrous cycle (D0). On D9, the progesterone device was removed and sodium cloprostenol (PGF2 $\alpha$ ), equine chorionic gonadotrophin (eCG) and estradiol cypionate (CE) were applied (IM). On the eighteenth day, ETFT was performed and, 23 days later (D41), the diagnosis of pregnancy by ultrasonography was performed. Data were analyzed using the model Multiple Logistic Regression ( $p \leq 0.05$ ), considering the effects of the years, the animal category and the transferred embryo. The ECC was not considered. The analysis was performed using the statistical program SigmaStat 4.0. Heifers had higher conception rates (56.56%;  $p = 0.01$ ) and lower rates of gestational loss (27.18%;  $p = 0.011$ ) compared to cows (40.62% and 40.94%). There was no effect of the transferred embryo on conception rates ( $p = 0.0955$ ) and gestational loss ( $p = 0.676$ ) of females. The years in which embryos were transferred also did not influenced rates of conception ( $p = 0.93$ ) and pregnancy loss ( $p = 0.092$ ) of recipients. Therefore, Holstein-Gir heifers submitted to a fixed-time embryo transfer protocol had higher conception rates and lower gestational loss compared to cows, both with fresh and vitrified embryo, and there was no difference in the conception rates and gestational loss among recipients following embryo transfer protocol using fresh or vitrified embryos.

**Keywords:** vitrification; animal category; conception; pregnancy loss; FTET.

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Influência da categoria animal da receptora e da vitrificação do embrião sobre as taxas de concepção e perda gestacional de animais da raça Girolando submetidos a protocolo de transferência de embrião em tempo fixo (TETF) ..... **41**

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão de Literatura

- Figura 1.** Esquema do protocolo de transferência de embrião em tempo fixo de três manejos ..... **17**

### Artigo

- Figura 1.** Esquema do protocolo de transferência de embrião em tempo fixo de três manejos utilizado em receptoras Girolando ..... **40**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BE	Benzoato de Estradiol
BEN	Balanço Energético Negativo
CE	Cipionato de Estradiol
CL	Corpo Lúteo
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
D	Dia
DG	Diagnóstico Gestacional
ECC	Escore de Condição Corporal
eCG	<i>Equine Chorionic Gonadotropin</i> - Gonadotrofina Coriônica Equina
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> - Hormônio Folículo Estimulante
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
GnRH	<i>Gonadotrophin-releasing Hormone</i> - Hormônio Liberador de Gonadotrofina
IA	Inseminação Artificial
IEP	Intervalo Entre Partos
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> - Hormônio Luteinizante
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
OPU	Ovum pick-up
P4	Progesterona
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de Embriões
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina F2 Alfa
SOV	Superovulação
TE	Transferência de Embrião
TETF	Transferência de Embrião em Tempo Fixo
US	Ultrassonografia

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 PRODUÇÃO LEITEIRA.....	12
2.1.1 RAÇA GIROLANDO.....	13
2.2 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES - TE.....	14
2.2.1 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO - TETF.....	15
2.3 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES – PIVE.....	17
2.3.1 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV).....	18
2.3.2 FECUNDAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV).....	18
2.3.3 CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV).....	19
2.3.4 VITRIFICAÇÃO.....	19
2.4 FATORES QUE INTERFEREM NA REPRODUÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS DE LEITE.....	20
2.4.1 INFLUÊNCIA DA CATEGORIA ANIMAL.....	22
REFERÊNCIAS.....	24
3 HIPÓTESE.....	34
4 OBJETIVOS.....	35
4.1 OBJETIVO GERAL.....	35
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
5 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	36
1 Resumo.....	36
2 Introdução.....	37
3 Material e Métodos.....	38
3.1 Animais e local do experimento.....	38
3.2 Parâmetros avaliados.....	39
3.3 Protocolo de sincronização das receptoras.....	39
3.4 Análise estatística.....	40
4 Resultados.....	41
5 Discussão.....	41
6 Conclusão.....	44
REFERÊNCIAS.....	45
7 Considerações Finais.....	49

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar do Brasil possuir o maior rebanho comercial do mundo, apresenta-se em quarto lugar no ranking de produção leiteira, abaixo da China, Índia e EUA (FAOSTAT, 2017), o que traduz a baixa produtividade nacional, com produção de cerca de 30 bilhões de litros por ano, com um plantel de 11,5 milhões de cabeças ordenhadas (IBGE, 2017). Parte dos animais destinados à produção de leite, no Brasil, são da raça Holandesa, entretanto, muitos não conseguem expressar todo seu potencial, produtivo e reprodutivo, devido à falta de adaptabilidade às condições climáticas brasileiras. Uma alternativa seria o cruzamento com animais *Bos taurus indicus*, por sua resistência e rusticidade, originando animais, como os da raça Girolando, que são melhor adaptados às regiões tropicais (MCMANUS et al., 2008).

São várias as características interessantes da raça Girolando: boa produção leiteira, primeiro parto precoce, longevidade para produção leiteira, baixo intervalo entre partos (IEP) e boa adaptação aos programas reprodutivos (GIROLANDO, 2017). O intuito de estabelecer esse cruzamento com ganho de heterose vai além da adaptação ao clima tropical, mas melhorar os índices brasileiros de produtividade, usando o cruzamento de gado zebuíno bem adaptado ao clima brasileiro com animais taurinos de grande produtividade (PEREIRA, 2008).

Visando aumentar a produção leiteira e melhorar os índices reprodutivos do rebanho, pode-se fazer o investimento em genética superior e biotécnica reprodutiva que possibilite a inserção destes alelos no rebanho. Uma das ferramentas que otimiza o ganho genético do plantel é a transferência de embriões (TE; PELLEGRINO et al., 2016). Porém, são vários os fatores que podem afetar os parâmetros reprodutivos dos embriões bovinos, como a categoria animal da receptora (HASLER, 2001), qualidade do embrião, corpo lúteo, sincronismo com a doadora (ANDRADE et al., 2012) e a concentração sérica de progesterona (P4) no dia da transferência (REMSEN; ROUSSEL; KARIHALOO, 1982).

Como comentado anteriormente, a qualidade do embrião é um importante fator para o sucesso da técnica (GALIMBERT et al., 2001). Após transferência de embriões frescos e criopreservados em receptoras cruzadas *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*, a taxa de prenhez foi maior nas receptoras que

receberam embriões frescos (PERES, 2014). Hasler (2001) encontrou taxa de prenhez 10 a 13 pontos percentuais maior em receptoras Holandesas que receberam embriões frescos. Essa diferença deve-se ao fato que os embriões sofrem danos severos no processo de criopreservação, resultando em menor qualidade embrionária e, conseqüentemente, piores índices reprodutivos (VAJTA; KUWAYAMA, 2006).

A categoria animal também influencia nos índices reprodutivos, principalmente para animais leiteiros, as novilhas apresentam resultados melhores do que vacas quando submetidas ao processo de TE (LOONEY et al., 2006). Vacas apresentam oócitos de qualidade inferior, menores níveis de esteroides foliculares (ROTH; INBAR; ARAV, 2008), aumento de metabolismo e redução na concentração de estrógeno e progesterona (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004), fluido folicular com aumento de ácidos graxos saturados (fator negativo em relação à maturação oocitária; BENDER et al., 2010), bem como ambiente do oviduto menos favorável ao desenvolvimento embrionário, quando comparada ao da novilha (SWANGCHAN-UTHAI et al., 2011). Além disso, animais em lactação encontram-se em balanço energético negativo durante o pico de lactação, período em que será desafiada a ficar gestante (BEN; SANTOS, 2009).

Os dados na literatura referente à taxa de sucesso na transferência de embrião em tempo fixo são divergentes. Al-Katanani et al. (2002), utilizando vacas Holandesas, relataram taxa de concepção de 19% com embriões frescos e 6,5% com embriões vitrificados, enquanto no estudo retrospectivo de Rodrigues et al. (2007) com vacas Holandesas repetidoras de estro, a taxa de concepção foi de 41,7%. Entretanto, não existem trabalhos que avaliem o resultado de um programa de TETF utilizando receptoras Girolando de alta produção leiteira e embriões frescos ou vitrificados produzidos *in vitro* em um programa em larga escala. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da categoria animal (novilha ou vaca) e da vitrificação do embrião sobre as taxas de concepção e perda gestacional de fêmeas Girolando de alta produção leiteira submetidas a protocolo de transferência de embrião em tempo fixo.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PRODUÇÃO LEITEIRA

A produção de leite no Brasil apresenta grande importância para o agronegócio nacional, sendo considerada uma das cadeias produtivas mais complexas, englobando desde o manejo dos animais até a comercialização do produto final ao consumidor (MARTINS, 2005). Este segmento contribui consideravelmente para a economia brasileira; somente a comercialização de insumos relacionados a esta atividade inclui: sêmen, rações, volumosos, produtos veterinários, defensivos agrícolas, equipamentos de ordenha e de refrigeração (LOPES; CAMPOS; ROMEU, 2006).

Pode-se dizer que esta atividade está presente em todo o país, segundo o IBGE (2017), 99% (5.570/5.504) dos municípios produzem alguma quantidade de leite. Porém, essa atividade é bastante heterogênea, uma vez que apresentam polos produtivos com grande número de animais e altamente tecnificadas (LOPES JUNIOR et al., 2012). Em 2017 foram produzidos cerca de 30 bilhões de litros de leite, sendo que a maior parte foi produzida nas regiões Sul (37%) e Sudeste (34%), o restante no Centro-Oeste (12%), Nordeste (11%) e Norte (6%; IBGE, 2017).

Entre 1980 e 2005, houve um aumento de 109,10% na produtividade leiteira, resultante de um crescimento no número de vacas ordenhadas de 16.513 mil para 20.820 mil (CASARI; TORMEM, 2011). Não só houve um aumento do rebanho, mas também avanço na produtividade dos animais. Em 1974, a média de produção era de 655 litros de leite/vaca/ano, passando para 1.381 litros/vacas/ano em 2011 (MAIA et al., 2013) e chegando a aproximadamente 2.600 litros/vaca/ano (IBGE, 2017).

O setor leiteiro brasileiro apresenta baixa produtividade, levando em consideração o tamanho de nosso rebanho e a média de produção (GOBBI; PESSOA, 2009). Israel, apesar de uma baixa produção leiteira (1,49 bilhões de litros/ ano), apresenta-se em primeiro lugar em produtividade, com 12.953 litros/ vaca/ ano, seguido pelos EUA, que contribuem com 96,36 bilhões de litros por ano, com uma

produtividade média de 10.330 litros/vaca/ano (FAOSTAT, 2017). É seguro afirmar que o Brasil pode aumentar sua produtividade, dada às condições climáticas e menor custo de terras e mão-de-obra em relação aos países desenvolvidos. Além disso, o melhoramento genético, a nutrição adequada e a sanidade animal podem alavancar a eficiência produtiva do país (CAPUCHO, 2010).

### 2.1.1 RAÇA GIROLANDO

A raça Girolando é proveniente do cruzamento entre animais taurinos e zebuínos, mais especificamente Gir (*Bos taurus indicus*) e Holandês (*Bos taurus taurus*). Criada no Brasil, sua finalidade era aproveitar a heterose resultante do cruzamento, associada à adaptação as condições tropicais, (PEREIRA, 2008). Além da adaptação ao clima, os animais 5/8 Girolando apresentam eficiência reprodutiva superior em relação aos graus de sangue (LEITE, 2016). O intuito de se fazer esse cruzamento com ganho de heterose não depende apenas da adaptação ao clima tropical, mas visa melhorar os índices brasileiros de produtividade, substituindo o animal zebu, menos produtivo, e o de origem europeia, mais sensível, e incrementando assim as médias de produtividade brasileira (PEREIRA, 2008).

Em se tratando de aporte nutricional e clima, animais mestiços apresentam menores exigências, de forma a serem mais produtivos e também maior adaptabilidade ao clima tropical, em relação aos animais puros Holandeses. E vacas Girolando, quando suplementadas no início da lactação, tendem a apresentar menor balanço energético negativo, bem como maior desempenho produtivo e reprodutivo (PÉRES et al., 2009). Estabelecendo uma comparação entre os diferentes graus de heterose, em um estudo desenvolvido com animais de 1/2 até 7/8 Holandês, Balancin Jr. et al. (2014) observaram que os animais mestiços 1/2 Holandês apresentaram menor IEP e menor período de serviço em relação aos outros graus de cruzamento. Em adição, vacas 3/4 Holandês, em um estudo conduzido no Brasil, tiveram menor intervalo entre partos quando comparadas a animais puros Holandeses (MCMANUS et al., 2008).

Existem muitas características interessantes no gado Girolando, como: boa produção leiteira, média nacional de 5264 kg leite/lactação de 264 dias; idade ao primeiro parto de 36 meses; longevidade, picos de lactação até os 10 anos e produção satisfatória até os 15; intervalo entre partos (IEP) médio de 430 dias; também se adapta bem aos programas reprodutivos como a inseminação artificial (IA), fecundação *in vitro* (FIV) e transferência de embriões (TE; GIROLANDO, 2017).

## 2.2 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES - TE

A transferência de embrião é uma biotécnica que permite a colheita de embriões de uma fêmea bovina de valor genético superior, previamente estimulada pelo processo de superovulação (SOV), tratamento farmacológico para induzir ovulações múltiplas, fertilizada *in vivo* por meio da inseminação artificial, passa pela lavagem uterina a fim de recuperar os embriões que serão avaliados e, posteriormente, transferidos a outros animais de valor genético inferior (GONÇALVES et al., 2001). Dessa forma, assumindo que houve uma seleção criteriosa para os animais doadores dos gametas, teremos indivíduos de alto valor genético padronizados, ganho de eficiência produtiva, aumento no número de descendentes da doadora durante sua vida reprodutiva e, não obstante, possibilitar o comércio de embriões, venda de animais de grande valor zootécnico (REICHENBACH et al., 2002).

A TE aumenta o impacto da fêmea na seleção genética e características fenotípicas, uma vez que essa biotécnica possibilita o aumento do número de indivíduos produzidos por uma fêmea, fazendo com que uma vaca possa ter vários descendentes contemporâneos e padronizados, também pela criopreservação e comércio internacional do embrião, como ocorre com o sêmen bovino congelado (REICHENBACH et al., 2001). A partir de um mesmo animal, é possível fazer diversas coletas durante o ano, sendo assim, a mesma doadora é capaz de obter mais descendentes contemporâneos, do que o esperado em sua vida reprodutiva (TANEJA et al., 2000).

Para a realização da TE, são necessárias fêmeas doadoras e receptoras. A doadora passará por um tratamento farmacológico que permitirá a ovulação múltipla, isso é, mais oócitos disponíveis para fecundação. Após a

superovulação, a doadora é submetida à inseminação artificial e, uma semana depois, os melhores embriões são inovulados em fêmeas receptoras (COSTA, 2009; PASA, 2008).

Para que se obtenha sucesso na TE, doadora e receptora devem se encontrar sincronizadas, isso é, na mesma fase do ciclo estral, com no máximo um dia de diferença entre o ciclo das mesmas. Para isso, pode-se utilizar o processo de SOV na doadora e observação de sinais de estro na receptora. Dessa forma, a eficiência na prática de observação de estro, se torna imprescindível para o sucesso de tal biotécnica, a fim de ser rentável e produtiva (COSTA, 2009; PASA, 2008).

Outro processo importante para a biotécnica em questão é a possibilidade da criopreservação do embrião já formado. Em muitos casos, a produção de embriões é maior que o número de receptoras sincronizadas, para não perder o material genético, pode-se congelar os embriões excedentes, sendo assim, é possível fazer o transporte desses embriões e ainda promover a preservação de raças em perigo de extinção (NEVES et al., 2010).

#### 2.2.1 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM TEMPO FIXO - TETF

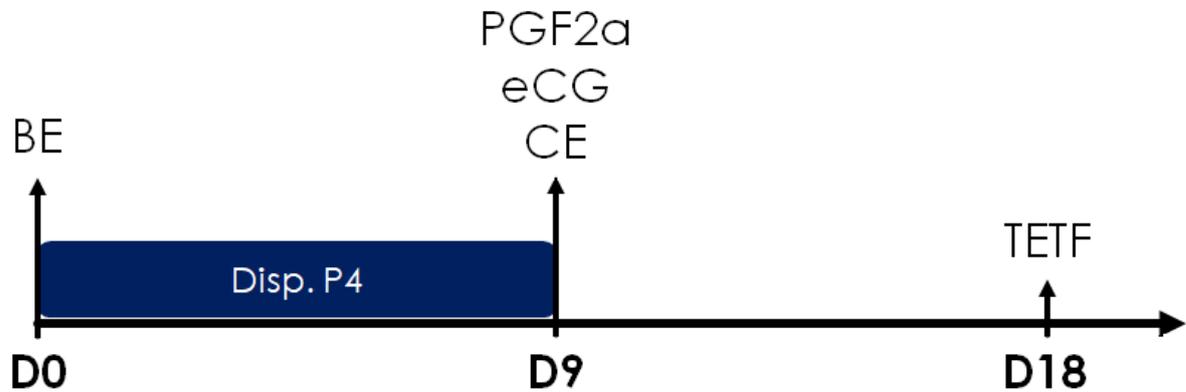
O sucesso no processo da TE depende não apenas da doadora, uma vez que é a receptora que deverá estabelecer e levar a gestação a termo, conceber um animal de alto valor genético (JONES; LAMB, 2008). Sendo assim, os altos custos para a manutenção dessas receptoras, aliados à dificuldade na detecção de cio e obter receptoras aptas a participar do programa, podem ser fatores limitantes no uso e sucesso desta biotécnica (BO et al., 2002).

Para que a biotécnica em questão seja rentável, precisa-se de uma boa taxa de aproveitamento das receptoras, a fim de diminuir custos. A sincronização do estro permite saber com boa precisão o momento da ovulação e tem permitido aumentar as taxas de aproveitamento de receptoras e a rentabilidade da técnica (BARUSELLI et al., 2000).

Diferentes estudos demonstram que os protocolos de sincronização de receptoras, na forma tradicional, com a utilização de prostaglandina e observação de cio, possuem taxas semelhantes com as receptoras submetidas ao protocolo de sincronização estral com uso de dispositivo intravaginal de P4. Dessa forma, a taxa de aproveitamento pode reduzir o número de receptoras e aumentar a lucratividade da técnica (CHASE et al., 2009; BARREIROS et al., 2006). Baruselli et al. (2004) observaram uma taxa de aproveitamento de 40 a 50% em receptoras tratadas apenas com prostaglandina e observação de cio, enquanto Nogueira et al. (2013) obtiveram 60,73% de aproveitamento em vacas e novilhas submetidas à mesma técnica. Estes valores são inferiores comparados aos de animais que foram submetidos ao protocolo de TETF, cujas taxas de aproveitamento chegaram a 83,24% (NOGUEIRA et al., 2013).

Os protocolos de transferência de embrião em tempo fixo são parecidos com os de inseminação artificial em tempo fixo, mas em vez de realizar a inseminação, é feita a ovulação sete dias depois. Na Figura 1, exemplifica-se um protocolo de três manejos, com aplicação intramuscular (IM) de benzoato de estradiol (BE) e inserção de um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) em dia aleatório do ciclo estral, denominado dia zero (D0). No nono dia (D9), é retirado o dispositivo de progesterona e são aplicados (IM): gonadotrofina coriônica equina (eCG), cloprostenol sódico (PGF2 $\alpha$ ) e cipionato de estradiol (CE). No dia da transferência de embrião (D18), avalia-se se existe um ou mais corpo lúteo (CL) e o lado da ovulação; se estiver presente, prossegue-se com a TE; caso contrário, a receptora não respondeu adequadamente ao protocolo (BARUSELLI et al., 2017).

**Figura 1.** Ilustração esquemática do protocolo tradicional de transferência de embrião em tempo fixo de três manejos para a realização de sincronização das receptoras.



### 2.3 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES – PIVE

A produção *in vitro* de embriões tem sido amplamente utilizada atualmente, pode ser uma técnica complementar ou substitutiva em relação à superovulação. Nesta biotécnica são usados oócitos imaturos recuperados de animais de idades e estados fisiológico-reprodutivos distintos (YOUNG et al., 1998). A técnica mais utilizada para fazer a recuperação destes oócitos tem sido a aspiração folicular (OPU – Ovum pick-up) transvaginal guiada pela ultrassonografia (RODRIGUES; GARCIA, 2000). Após recuperados, os oócitos devem passar por três processos que mimetizam o desenvolvimento *in vivo*: maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), para que estejam aptos à TE (THOMPSON, 2000).

Por meio da PIVE, é possível multiplicar o rebanho com animais de alto valor genético com mais agilidade, se comparado a TE associada a SOV uma vez que possibilita gerar mais embriões no mesmo intervalo de tempo. Os mesmos podem ser transferidos a fresco; isso é, logo após o processo de CIV, ou serem vitrificados para maior durabilidade e disseminação desse material genético (PERES, 2014).

### 2.3.1 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

A maturação *in vitro* tem início no momento em que o oócito é retirado do interior do folículo, ou seja, logo após a aspiração folicular, no processo *in vivo* ela ocorre depois do pico ovulatório de LH (hormônio luteinizante; HOSHI, 2003). Nessa fase, ocorrerão transformações nuclear e citoplasmática do oócito (GALLI et al., 2003). No citoplasma, acontecerá uma reorganização das organelas, mudanças no padrão de síntese proteica e migração dos grânulos corticais (YOUNG et al., 1998), enquanto o núcleo passará do estágio diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para estágio de metáfase II (THOMPSON, 2000).

Para que a MIV seja eficiente, os meios de cultivo devem mimetizar as ações e condições que ocorrem no ambiente intrauterino (SANGILD et al., 2000). Vários laboratórios optaram em fazer a suplementação do meio de maturação com gonadotrofinas (estradiol, LH e FSH) e soro fetal bovino, em um ambiente com controle de atmosfera e temperatura (RODRIGUES; GARCIA, 2000). A fase de maturação *in vitro* tem seu fim marcado pelo aparecimento do primeiro corpúsculo polar, que representa que o oócito está preparado para a fecundação (AVELINO et al., 2002).

### 2.3.2 FECUNDAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

Essa fase é considerada curta, dura aproximadamente de 12 a 20 horas (BUENO; BELTRAN, 2008). São utilizados espermatozoides a partir de palhetas comerciais de inseminação, separados pelo gradiente de Percoll, a fim de obter uma fração viva e descongelada do sêmen. Obtendo assim o máximo de fertilidade com menor chance de ocorrer polispermia (GALLI; LAZZARI, 1996). A concentração utilizada normalmente para esse processo é de  $2 \times 10^6$  espermatozoides / mL, calculados de acordo com a motilidade da fração viva obtida após a centrifugação no gradiente de Percoll (YOUNG et al., 1998).

### 2.3.3 CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

O cultivo *in vitro* tem como início a fecundação do oócito e termina com a formação do blastocisto (SANGILD et al., 2000). Nesta fase, ocorrem processos como ativação do genoma embrionário, divisão celular, compactação de blastômeros e diferenciação embrionária com aparecimento da blastocele (HOSHI, 2003). Durante o CIV, podem-se utilizar diferentes meios para o desenvolvimento (GALLI; LAZZARI, 1996). Anteriormente, os laboratórios estavam apresentando bons resultados junto do co-cultivo com células do oviduto ou monocamadas de células diferenciadas (HOSHI, 2003). Atualmente, esse sistema tem pouca utilização, devido a dificuldade de manutenção dos meios e possibilidades de anomalias que poderiam afetar negativamente o desenvolvimento do embrião (SANGILD et al., 2000), fazendo com que desenvolvessem um meio de cultivo com nenhum ou pouco soro fetal bovino e baixa tensão de oxigênio (AVELINO et al., 2002).

Após o sexto dia de cultivo, o embrião é avaliado. Ao fim dessa etapa, deve apresentar compactação dos blastômeros e formação da blastocele. No sétimo dia, é realizada a avaliação final e o mesmo segue para o processo de transferência de embrião ou criopreservação (THOMPSON, 2000).

### 2.3.4 VITRIFICAÇÃO

O processo de criopreservação de embriões mamíferos vem sendo amplamente estudado. Estudos visam realizar as curvas de resfriamento e reaquecimento de forma a serem eficazes, práticas, simples e com bons resultados de sobrevivência embrionária (BERTOLINI, 1994). A vitrificação é uma forma de congelamento de embriões, definida como um processo que possibilita uma solução chegar ao estado vítreo, sem ocorrer a cristalização do mesmo, pelo grande aumento da viscosidade durante o processo de resfriamento (FAHY et al., 1984). Essa técnica visa uma maior velocidade de congelamento quando comparada à congelação lenta; dessa forma, o embrião fica menos tempo submetido a temperaturas críticas. Para atingir essa rápida curva de congelamento, são utilizados crioprotetores mais

concentrados, que aceleram a desidratação celular e promovem a vitrificação, não permitindo a formação de cristais de gelo, intra e extracelulares, minimizando as injúrias físicas da cristalização (RALL; FAHY, 1985; ARAV, 1992; KASAI, 2002).

Os embriões produzidos *in vitro* são mais sensíveis aos danos causados pela criopreservação, em relação aos transferidos a fresco e produzidos *in vivo*, reduzindo a qualidade embrionária (KHURANA; NIEMANN, 2000), uma vez que a alta concentração de crioprotetores pode apresentar efeitos tóxicos ao embrião (FAHY, 2007). Após vitrificados, os embriões produzidos *in vitro* (PIV) apresentam redução na atividade metabólica e sobrevivência, resultando em piores taxas de fertilidade quando submetidos à transferência embrionária (LEIBO; LOSKUTOFF, 1993; POLLARD; LEIBO, 1994; NIEMANN, 1995), uma vez que a qualidade do embrião afeta o índice de prenhez (ANDRADE et al., 2012).

A maior parte dos estudos realizados acerca da viabilidade da técnica de vitrificação avaliam resultados de taxa de reexpansão e eclosão do embrião (DODE et al., 2013; SANCHES et al., 2016). Anteriormente, os índices reprodutivos de receptoras de embrião eram melhores quando transferidos a fresco em relação aos criopreservados (PERES, 2014). Entretanto, Borges Filho (2018), em estudo realizado com novilhas e vacas múltiparas, não evidenciou diferença nas taxas de concepção após a inovulação nas receptoras em relação a embriões frescos e vitrificados produzidos *in vitro*, mostrando que o processo de vitrificação está se tornando mais seguro para os embriões PIV, usando alta concentração de crioprotetores, prevenindo a formação de cristais de gelo intra e extracelular (MASSIP, 2001; VAJTA; NAGY, 2006).

#### 2.4 FATORES QUE INTERFEREM NA REPRODUÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS DE LEITE

As três semanas que antecedem e sucedem o parto são chamadas de período de transição, momento em que ocorrem mudanças hormonais a fim de favorecer o parto e a produção de colostro e leite (GRUMMER, 1995). Devido à formação do colostro, nesse período há um aumento da demanda de vitaminas, minerais, ácidos graxos e glicose (ARTUNDUAGA, 2009). Esse crescimento da

necessidade do animal para manutenção e produção leiteira é superior à quantidade de energia que ele consegue obter a partir de sua dieta. O aumento metabólico juntamente com a falta de nutrientes faz com que o animal entre em um estado de balanço energético negativo (BEN), momento em que começa a perder escore de condição corporal (ECC; BELL, 1995). O BEN, em conjunto com a diminuição do ECC, inibe os pulsos de hormônio luteinizante (LH), reduzindo a resposta ovariana e a funcionalidade do folículo, de tal forma a reduzir a maturação oocitária e a ovulação (DISKIN et al., 2003) interferindo de forma negativa na reprodução animal (SANTOS, 2009).

A fim de atender a maior demanda energética, o animal consome mais alimentos, aumentando o fluxo sanguíneo hepático e, conseqüentemente, elevando o metabolismo de estradiol e progesterona (SAGSRITAVONG et al., 2002). O ciclo estral das fêmeas é dependente de estrógenos e progestágenos, uma vez que o animal aumenta o metabolismo de tais hormônios, seus parâmetros reprodutivos tendem a reduzir. Dessa maneira, pode-se afirmar que a eficiência reprodutiva, em vacas de alta produção, e produtividade leiteira são inversamente proporcionais, o aumento de uma acarretará na diminuição da outra (WILTBANK et al., 2006). Animais de alta produção costumam apresentar maiores taxas de ovulação dupla, perda embrionária, ocorrência de cistos ovarianos, menor taxa de concepção, menor duração e manifestação do estro, justificando uma piora nos índices reprodutivos (WILTBANK et al., 2006, WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011).

Animais de alta produção normalmente apresentam folículos grandes e concentrações baixas de estradiol (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004), bem como maior corpo lúteo e menor concentração de progesterona circulante (LOPEZ et al., 2005). Isso se deve à redução da concentração de estradiol e progesterona mencionada anteriormente, e, por mecanismo de compensação, o organismo aumenta o tamanho dos folículos e CL para suprir as necessidades hormonais (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004).

Outro fator que pode afetar a eficiência reprodutiva das vacas é o estresse térmico. A pressão de seleção por animais mais produtivos, sem se atentar aos problemas de regulação de temperatura corporal, resultaram em animais com piores índices reprodutivos (HANSEN, 2007). A qualidade do oócito é comprometida

pela termorregulação ineficiente, diminuindo a fertilidade dos animais (ROCHA et al, 1998). Em adição, Sartori et al. (2002) registraram baixas taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário em novilhas e mais drástico em vacas, quando compararam épocas de altas temperaturas com as de baixa, assumindo que as alterações metabólicas provocadas pelo estresse térmico foram prejudiciais ao fluido folicular e o desenvolvimento oocitário.

#### 2.4.1 INFLUÊNCIA DA CATEGORIA ANIMAL

A eficiência reprodutiva de animais lactantes normalmente é reduzida devido ao estado fisiológico e endócrino em que se encontram (TIEZZI et al., 2012). Nessa categoria animal, é comum a redução da fertilidade, devido aos anos de seleção genética para a produção leiteira e não para a reprodução (ROTH; INBAR; ARAV, 2008), evidenciados pela menor taxa de concepção, aumento do intervalo entre partos e número de serviços por prenhez, devido à maior produção leiteira e duração da lactação, fatores desfavoráveis à atividade reprodutiva (TIEZZI et al., 2012). Vacas em lactação também podem demonstrar mais falhas na ovulação após a luteólise e maior taxa de ovulações múltiplas quando comparadas à categoria de novilhas (SARTORI et al., 2004).

Contraopondo os anos de seleção genética para a produção leiteira, a qualidade oocitária e níveis de esteroides de novilhas mantiveram-se estáveis, resultando em taxas de fertilidade mais elevadas quando comparadas aos índices reprodutivos de vacas lactantes (ROTH; INBAR; ARAV, 2008). Bem como, novilhas normalmente não apresentam balanço energético negativo no momento do serviço, enquanto vacas lactantes estão em seu pico de lactação e são desafiadas a se tornarem prenhes novamente. O BEN interfere na qualidade do fluido folicular, afetando o desenvolvimento oocitário (SARTORI et al., 2002). Em adição a esses fatores, Wolfenson et al. (2004) afirmaram que a dominância folicular é mais longa em vacas do que novilhas, resultando em oócitos piores, bem como menor concentração circulante de LH, progesterona e estradiol, fatores intimamente relacionados à diminuição da fertilidade.

O desenvolvimento embrionário inicial ocorre no oviduto, este deve fornecer um ambiente favorável ao embrião. Sabe-se que o fator de crescimento semelhante à insulina é um importante contribuinte para o ambiente intrauterino. Vacas em lactação apresentam menor IGF-1 circulante, quando comparadas a novilhas no momento do estro e início da fase lútea, em adição, vacas tem menor expressão da proteína de ligação do IGF-1 no oviduto; dessa forma, as novilhas apresentam melhores condições para o desenvolvimento embrionário inicial (SWANGCHAN-UTHAI et al., 2011).

Animais em lactação apresentam maiores concentrações de ácidos graxos saturados no fluido folicular quando comparados a novilhas, fator que causa impacto negativo sobre a maturação oocitária; conseqüentemente, prejudicando o desenvolvimento embrionário, justificando assim menores taxas de fertilidades em vacas lactantes (BENDER et al., 2010).

## REFERÊNCIAS

AL-KATANANI, Y. M. et al. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. **Theriogenology**, v. 58, n. 1, p. 171-182, 2002.

ANDRADE, G.A.; FERNANDES, M.A.; KNYCHALA, R.M.; PEREIRA JUNIOR, M.V.; OLIVEIRA, A.J.; NUNES, D.P.; BONATO, G.L.; SANTOS, R.M. Fatores que afetam a taxa de prenhe de receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 36, n. 1, p. 66-69, 2012.

ARAV, A. Vitrification of oocytes and embryos. *In*: LAURIA, A.; GANDOLFI, F. **Embryonic Development and Manipulation in Animal Production**. Portland Press, London and Chapel Hill. Cap. 22, p. 255-264, 1992.

ARTUNDUAGA M.A.T. **Efeito de dietas com fontes lipídicas e gliconeogênicas no período de transição de primíparas leiteiras sobre: perfil metabólico, produção de leite e reprodução**. 2009. Tese (Doutorado em Produção Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

AVELINO, K.B., VANTINI, E., SENEDA, M.M., et al. In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, v.57, p.656, 2002.

BALANCIN Jr, A.; PRATA, M.A.; MOREIRA, H.L.; FILHO A.E.V.; CARDOSO, V.L.; EL FARO, L. Avaliação de desempenho produtivo e reprodutivo de animais mestiços do cruzamento holandês x gir. **Boletim de Indústria Animal**, Nova Odessa, v.71, n.4, p.357-364, 2014.

BARREIROS, T.R.R.; BLASCHI, W.; BORSATO, E.A.; LUDWIG, H.E.; MEIRA DA SILVA, D.R.; SENEDA, M.M. Comparação das taxas de prenhez entre receptoras com corpos lúteos cavitários ou compactos após protocolo de sincronização com cloprostenol ou transferência de embriões em tempo fixo. **Semina: Ciências Agrárias**, v.27, p.657 - 664, 2006.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; COLLI, M. H. A.; FILHO, M. F. S.; VIEIRA, L.; FREITAS, B. G. **Timed artificial insemination: current challenges and recente advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil**. Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Cabo de Santo Agostinho – PE, Brasil, p. 14, 2017.

BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; CARVALHO, N.A.T.; VALENTIM, R.; BERBER, R.C.A.; CARVALHO FILHO, A.F.; MADUREIRA, E.H.; COSTA NETO W.P. Ovsynch protocol with fixed time embryo transfer increasing pregnancy rates in bovine recipients. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.I, n.28, p.205, 2000. Suppl.

BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BO, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Animal Reproduction Science**, v.82–83, p.479 - 486, 2004.

BELL, A.W. Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2804-2819, 1995.

BENDER, K.; WALSH, S.; EVANS, A. C. O. FAIR, T.; BRENNAN, L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 139, n. 1, p. 1047-1055, 2010.

BERTOLINI, M. **Sobrevivência *in vitro* e *in vivo* de embriões *Mus musculus* vitrificados**. Porto Alegre, RS, 1994. 210p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1994.

BO, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRIBULO, R. The control of Follicular wave development for self. Appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.57, p.53–72, 2002.

BORGES FILHO, G.N. **Taxa de concepção e gestação de embriões produzidos *in vitro*, transferidos a fresco ou criopreservado, em vacas e novilhas nelore**. 2018. 33 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal-SP. 2018.

BUENO, A.P.; BELTRAN, M.P. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 2008, 6.11: 1-7.

CAPUCHO, T.O. **Produção leiteira no Paraná: um estudo considerando os efeitos espaciais**. 2010. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá.

CASARI, P.; TORMEM, P. Atividade leiteira agricultura familiar e desenvolvimento regional: estudo de caso da Linha Tormem, Chapecó-SC. **Revista Estudos do CEPE**, Santa Cruz do Sul, n. 34, p. 139-171, jul-dez., 2011.

CHASE, C.C.; VARGAS, C.A.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; GRIFFIN, J.L.; MURPHY, C.N.; TEWOLDE, A.; FIELDS, M.J. Embryo transfer in angus and brahman recipient cows: Effect of two methods of estrus synchronization on induced estrus and pregnancy. **Revista científica**, v.19, n.6, p.630 - 638, 2009.

COSTA, M.A. **O uso das técnicas de transferência de embriões e fertilização in vitro em bovinos da raça Gir, na associação dos produtores rurais da comunidade de vista alegre-aprovista**. Cáceres- Mato Grosso: Universidade do Estado de Mato Grosso; 2009, 10:14-17.

DISKIN, M. G.; MACKEY, D. R.; ROCHE, J. F.; SREENAN, J. M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 1, p. 345-370, 2003.

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

FAHY, G.M. 'Cryopharmacological' aspects of vitrification solutions. **Cryobiology**, v. 55, p. 351-352, 2007.

FAHY, G.M. et al. Vitrification as an approach to cryopreservation. **Cryobiology**, v. 21, p. 407-426, 1984.

FAOSTAT, 2017. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 29/01/2020.

GALIMBERTI, A.M. et al. Taxa de gestação e níveis plasmáticos de progesterona, em receptoras de embrião bovino, tratadas com Buserelina após a inovulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 2, p. 352-359, 2001.

GALLI, C. et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM-IVF in cattle. **Animal Reproduction Science** v.42, p.371-379, 1996.

GIROLANDO. **Associação Brasileira dos Criadores de Girolando**. Vantagens em Ser Associado. Disponível em: <<http://www.girolando.com.br>>. Acesso em 04/07/2019.

GOBBI, W.A.O; PESSOA, V.L.S. A pecuária leiteira e a agricultura familiar em Ituiutaba (MG): as transformações na comunidade da Canoa. **Geo UERJ**, Rio de Janeiro, ano 11, v.1, n.19, 1º semestre, p. 79-110, 2009.

GONÇALVES, P. B. F.; FIGUEIREDO, J. R de; FREITAS, V. J de F. **Biotecnicas aplicadas à reprodução animal**. REICHENBACH, Horst, Dieter, et al., São Paulo: Varela, Cap. 8. p.127 – 162. 2001.

GRUMMER, R.R. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. **Journal of Animal Science**, v.73, p.2820-2833, 1995

HANSEN, P.J. Exploitation of genetic and physiological determinants of embryonic resistance to elevated temperature to improve embryonic survival in dairy cattle during heat stress. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 68, n. 1, p. 242-249, 2007.

HASLER, J.F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology** 2001; 56: 1401-1415.

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.

IBGE. **Censo Agropecuário de 2017**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>>. Acesso em: 19/02/2020.

JONES, A.L.; LAMB, G.C. Nutrition, synchronization, and management of beef embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v.69, p.107–115, 2008.

KASAI, M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. **Reproductive e Medicine and Biology**, v. 1, p. 1-9, 2002.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects os cryopreservtion on glucose metabolism and survival of bovine morulae and blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. **Theriogenhlogy**, v.54, p.313-326, 2000.

LEIBO, S.P.; LOSKUTOFF, N.M. Cryobiology of in vitroderived bovine embryos. **Theriogenology**, v.39, p.81-94, 1993.

LEITE, M.B. **Desempenho produtivo e reprodutivo de grupos genéticos da raça girolando**. 2016. 32 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

LOONEY, C. R. et al. Improving fertility in beef cow recipients. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 201-209, 2006.

LOPES, F.F.; CAMPOS, E.M.; ROMEU, J.C. Insumos Agropecuários. In: CÔNSOLI, M.A.; NEVES, M.F. **Estratégias para o Leite no Brasil**. São Paulo: Atlas, 2006. cap. 3, p. 66-89.

LOPES JUNIOR, J.R.; RAMOS, C.E.C.O.; SANTOS, G.T.; GRANDE, P.A.; DAMASCENO, J.C.; MASSUDA, E.M. Análise das práticas de produtores em sistemas de produção leiteiros e seus resultados na produção e qualidade do leite. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, p. 1199-1208, 2012.

LOPEZ, H.; CARAVIELLO, D. Z.; SATTER, L. D.; FRICKE, P. M.; WILTBANK, M. C. Relationship Between Level of Milk Production and Multiple Ovulations in Lactating Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 88, n. 1, p. 2783-2793, 2005.

LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 81, n. 1, p. 209-223, 2004.

MAIA, G.B.S. *et al.* **Produção leiteira no Brasil**. BNDES Setorial, Rio de Janeiro, v.37, p. 371- 398, 2013.

MARTINS, P.C. Oportunidades e desafios para a cadeia produtiva do leite. In: ZOCCAL, R.; CARVALHO, L.A.; MARTINS, P.C.; ARCURI, P.B.; MOREIRA, M.S.P. **A inserção do Brasil no mercado internacional de lácteos**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, p. 11-30, 2005.

MASSIP, A. Cryopreservation of Embryos of Farm Animals (review). **Reproduction in Domestic Animals**, v 36, p. 49-55, 2001.

MCMANUS, C.; TEIXEIRA, R.A.; DIAS, L.T.; LOUVANDINI, E.; OLIVEIRA, E.M.B. Características produtivas e reprodutivas de vacas Holandesas e mestiça Holandes x Gir no Planalto Central. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. 5, p. 819-823, 2008.

NEVES JP, MIRANDA KL, TORTORELLA RD. Progresso Científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39. 2010, p. 414-418.

NIEMANN, H. Advances in cryopreservation of bovine oocytes and embryos derived in vitro and in vivo. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF SOCIETÀ ITALIANA PER IL PROGRESSO DELLA ZOOTECNICA, 30., 1995, Milan, Italy. 1995, **Proceedings...** 1995. p.117-128.

NOGUEIRA, É.; PANTOJA, T.A.R.; PEDROSO, M.F.; MARQUES JUNIOR, H.R.; BORGES, J.C.; DIAS, A.M.; ITAVO, L.C.V. Comparação entre protocolos de sincronização de cio para receptoras de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**. Salvador, v.14, n.3, p.558-564, 2013.

PASA, C. **Transferência de embriões em bovinos**. Biodiversidade. FAMEV – UFMT, v. 7, n. 1, 2008, p. 67-68.

PELLEGRINO, C. A. G.; MOROTTI, F.; UNTURA, R. M.; PONTES, J. H. F.; PELLEGRINO, M. F. O.; CAMPOLINA, J. P.; SENEDA, M. M.; BARBOSA, F. A.; HENRY, M. Uso de semen sexado na inseminação artificial em tempo fixo e transferência de embrião em tempo fixo de embriões produzidos *in vitro* em bovinos. **Theriogenology**, v. 86, p. 888-893, 2016.

PEREIRA, J.C.C. Herança e Meio. In: PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. 5. ed. Belo Horizonte: FEPMVZ-Editora, 2008. p. 62-94.

PERES, A.R. **Avaliação da taxa de concepção de novilhas e vacas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) com o uso de sêmen sexado na inseminação artificial ou embriões produzidos in vivo e in vitro.** 2014. 54 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal-SP. 2014.

PÉREZ, C.A.; VERA, J.; CASTRO, F.C.; GARNSWORTHY, P.C. Energy balance, milk production and reproduction in grazing crossbred cows in the tropics with and without cereal supplementation. **Livestock Science**, v.122, p.227–233, 2009.

POLLARD, J.W.; LEIBO, S.P. Chilling sensitivity of mammalian embryos. **Theriogenology**, v.41, p.101-106, 1994.

RALL, W.F.; FAHY, G.M. Criopreservação sem cristalização de embriões de ratos a -196°C por vitrificação. **Nature**, v. 313, p. 573-575, 1985.

REICHENBACH, H. D.; DE OLIVEIRA, M.A. L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A. S.; ANDRADE, J. C. O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONÇALVES et al. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela. p.127 – 177. 2001.

REICHENBACH, H.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F.; SANTOS FILHO, A.S.; ANDRADE, J.C.O. Transfer and cryopreservation of bovine embryo. In: Gonsalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, 1ªed. São Paulo, Ed. Varela, 2002 p.153 - 160.

REMSEN, L. G.; ROUSSEL, J. D.; KARIHALOO, A. K. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. **Theriogenology**, 1982, 18.3: 365-372.

ROCHA, A.; RANDEL, R.D.; BROUSSARD, J.R.; LIM, J.M.; BLAIR, R.M.; ROUSSEL, J.D. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 49, n. 1, p. 657-665, 1998.

RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. Fecundação in vitro em bovinos: aplicação comercial. **Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS Supl.**, v.28, p.186-187, 2000.

RODRIGUES, C.A., AYRES, H., FERREIRA, R.M., TEIXEIRA, A.A., MANCILHA, R.F., OLIVEIRA, M.E.F., SOUZA, A.H., BARUSELLI, P.S., 2007. Comparação das taxas de prenhez após inseminação artificial ou transferência de embriões em vacas Holandesas repetidoras de serviço de alta produção. SBTE, Costa do Sauípe. **Acta Scientiae Veterinariae** 35 (Suppl. 3), 1255.

ROTH, Z.; INBAR, G.; ARAV, A. Comparison of oocyte developmental competence and follicular steroid content of nulliparous heifers and cows at different stages of lactation. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 69, n. 1. p. 932-939, 2008.

SANCHES, B. V.; LUNARDELLI, P. A.; TANNURA, J. H.; CARDOSO, B. L.; PEREIRA, M. H. C.; GAITKOSKI, D.; BASSO, A. C.; ARNOLD, D. R.; SENEDA, M. M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF Embryos. **Theriogenology**, v. 85, p. 1147-1151, 2016.

SANGILD, P.T., SCHMIDT, M., JACOBSEN, H., et al. Blood chemistry, nutrient metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from in vitro produced bovine embryos. **Biology and Reproduction**, v.62, p.1495-1504, 2000.

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L. E.; WILTBANK, M. C. High Feed Intake Increases Liver Blood Flow and Metabolism of Progesterone and Estradiol-17 $\beta$  in Dairy Cattle. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 85, n. 1, p. 2831-2842, 2002.

SANTOS, J. E. P. Pregnancy Losses: Prevalence, Timing and Associated Causes. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, Bogotá, v. 56, n.1, p. 241-252, 2009.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 87, n. 1, p. 905-920, 2004.

SARTORI, R.; SATOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilização e desenvolvimento embrionário em novilhas e vacas lactantes no verão e vacas lactantes e secas no inverno. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 85, n. 1, p. 2803-2812, 2002.

SWANGCHAN-UTHAI, T.; WALSH, S. W.; ALEXANDER, S. L. H.; CHENG, Z.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C. O.; WATHES, D. C. Comparison of mRNA for IGFs and their binding proteins in the oviduct during the peri-oestrous period between dairy heifers and lactating cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 142, n. 1, p. 457-465, 2011.

TANEJA, M.; BOLS, P.E.J.; VELDE, V. Development competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal, variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology Reproduction**, Champaing. v. 31. pag. 67-73, 2000.

TIEZZI, F.; MALTECCA, C.; CECCHINATO, A.; PENASA, M.; BITTANTE, G. Genetic parameters for fertility of dairy heifers and cows at different parities and relationships with production traits in first lactation. **Journal of Dairy Science**, New York, v. 95, n. 1, p. 7355-7362, 2012.

THOMPSON, J.G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.263-275, 2000.

VAJTA, G.; KUWAYAMA, M. Improving cryopreservation systems. **Theriogenology**, v.65, p.236-244, 2006.

VAJTA, G.; NAGY Z.P. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory Review on vitrification. **Reproduction Biomed Online**, v. 12, p. 779-796, 2006.

WALSH, S. W.; WILLIAMS, E. J.; EVANS, A. C. O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 127–138, 2011.

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

WOLFENSON, D.; INBAR, G.; ROTH, Z.; KAIM, M.; BLOCH, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 62, n. 1, p.1042-1055, 2004.

YOUNG, L.E., SINCLAIR, K.D., WILMUT, I. Large offspring Syndrome in cattle and sheep. **Reproduction**, v.3, p.155-163, 1998.

### **3 HIPÓTESE**

A categoria animal e a vitrificação do embrião têm influência sobre as taxas de concepção e perda embrionária de receptoras Girolando após protocolo de transferência de embrião em tempo fixo (TETF).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a taxa de concepção e perda gestacional de novilhas e vacas Girolando (1/2 Gir x 1/2 Holandês) submetidas a protocolo de transferência de embrião em tempo fixo utilizando embriões frescos ou vitrificados.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da categoria animal (novilhas ou vacas) sobre as taxas de concepção e perda gestacional após protocolo de transferência de embrião em tempo fixo;
- Avaliar a influência da vitrificação do embrião sobre as taxas de concepção e perda gestacional de novilhas e vacas Girolando submetidas a protocolo de transferência de embrião em tempo fixo.

## 5 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

**“Influência da categoria da receptora sobre as taxas de concepção e perda gestacional em um programa em larga escala de produção *in vitro* e TETF utilizando embriões *Bos taurus* x *Bos indicus* frescos ou vitrificados”**

### 1 Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar as taxas de concepção e perda gestacional de fêmeas bovinas da raça Girolando (1/2 Gir x Holandês) submetidas a processo de transferência de embrião em tempo fixo (TETF), em relação à categoria animal e vitrificação do embrião. Foram analisadas 4.987 transferências de embrião (TE), os dados foram divididos de acordo com a categoria animal (novilha ou vaca) e o embrião (fresco ou vitrificado) transferido. Os parâmetros avaliados foram: taxa de concepção (30 dias de gestação) e perda gestacional (dos 30 dias ao parto). Os animais foram submetidos a protocolo de TETF de três manejos, com aplicação IM de benzoato de estradiol (BE) e inserção de dispositivo intravaginal de progesterona (P4) em dias aleatórios do ciclo estral, denominando dia zero (D0). No nono dia (D9), retirou-se o dispositivo de progesterona e aplicou-se (IM) cloprostenol sódico (PGF2 $\alpha$ ), gonadotrofina coriônica equina (eCG) e cipionato de estradiol (CE), sendo a transferência realizada no décimo oitavo dia do protocolo e diagnóstico gestacional 23 dias depois por ultrassonografia (transdutor linear 5 MHz). Os dados foram analisados pelo modelo de Regressão Logística Múltipla ( $p \leq 0,05$ ), considerando os efeitos dos anos, da categoria animal e do embrião transferido, fresco ou vitrificado. O ECC não foi considerado para as análises. A análise foi realizada utilizando o programa estatístico SigmaStat 4.0 (Jandel Scientific Software, San Jose, CA). As novilhas apresentaram maior taxa de concepção (56,56%;  $p = 0,01$ ) e menor taxa de perda gestacional (27,18%;  $p = 0,011$ ) comparado às vacas (40,62%; 40,94%). Não houve efeito do embrião transferido sobre a taxa de concepção (51,42% para frescos vs. 49,72% para vitrificados), bem como a perda gestacional foi semelhante entre embriões frescos e vitrificados (29,95% vs. 33,58%;  $p = 0,676$ ) das fêmeas. Da mesma forma, os anos em que as transferências foram realizadas não tiveram efeito sobre as taxas de concepção ( $p = 0,93$ ) e perda gestacional ( $p = 0,092$ ) das receptoras. Portanto, novilhas Girolando submetidas a protocolo de transferência de embrião em tempo fixo apresentaram maior taxa de concepção e menor de perda gestacional em relação às vacas, tanto com embrião fresco quanto vitrificado, e não houve diferença na taxa de concepção e perda gestacional das receptoras após transferência com embriões frescos ou vitrificados.

## 2 Introdução

O rebanho brasileiro é composto por 214,90 milhões de bovinos, sendo considerado o maior rebanho comercial do mundo. Aproximadamente 60 milhões de animais são fêmeas em idade reprodutiva, das quais 11,99 milhões são ordenhadas. A produção de leite no Brasil em 2017 foi de 30,11 bilhões de litros, média de 2,5 mil L/ ano por animal (IBGE, 2017), demonstrando o grande potencial de crescimento, visto que os Estados Unidos possuem produção de aproximadamente 97,73 bilhões de litros de leite, cerca de 10,45 mil L/ ano por animal, com um rebanho de 9,34 milhões de animais (FAOSTAT,2017).

Para alcançar esse potencial de produção em um curto período, a associação entre o melhoramento genético e o uso de biotécnicas reprodutivas é uma ótima estratégia. Desta forma, faz-se necessário conhecer quais manejos podem ser utilizados, bem como suas taxas de aproveitamento em cada situação. Segundo Mapletoft e Hásler (2005) e Hansen (2014), as biotécnicas mais difundidas atualmente são a inseminação artificial e a produção de embriões, técnicas que possibilitam disseminar animais geneticamente superiores, que podem melhorar o desempenho produtivo e reprodutivo dos rebanhos.

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) foi implementada no Brasil em escala comercial no ano de 1998 (GALLI et al., 2003), desde então tem se destacado no quesito produtivo (BONI, 2012). Isso porque a PIVE permite um aumento significativo do número de descendentes de um mesmo animal (é possível produzir cerca de 50 descendentes no mesmo período em que seria produzido apenas um), maior ganho genético por unidade de tempo, facilidade de importação e exportação de material genético e possibilidade de usar animais que não poderiam mais entrar na reprodução como animais senis, jovens, com afecções no trato reprodutivo ou até mesmo fêmeas gestantes (PALHANO, 2008).

Neste contexto, melhorias no processo de criopreservação de embriões produzidos *in vitro* - vitrificação (Sanches et al., 2013) e, mais recentemente, transferência direta de embriões congelados (Sanches et al., 2016) - têm permitido difusão ainda maior desta biotécnica. Entretanto, os resultados após transferência de embriões PIV vitrificados são controversos. As taxas de concepção variam de 6,5 (AL-

KATANANI et al., 2002) até 35,9% (BLOCK; BONILLA; HANSEN, 2010; SANCHES et al., 2016).

Neste contexto, existe uma grande divergência entre os trabalhos que avaliam a taxa de concepção de embriões produzidos in vitro em vacas e novilhas de diferentes raças e sistemas de produção, assim como, ao nosso conhecimento, não existem informações em relação à transferência de embriões PIV em animais cruzados (*Bos taurus* x *Bos indicus*) de aptidão leiteira. Além da escassez de informações relacionadas a diferentes categorias animais das receptoras, há poucos trabalhos considerando-se os índices reprodutivos considerando-se o processo de criopreservação de embriões por meio da vitrificação vs. embriões transferidos a fresco. Neste contexto, o intuito do presente trabalho foi avaliar a taxa de concepção e perda gestacional de receptoras Girolando submetidas a protocolo de transferência de embrião em tempo fixo e a influência da categoria animal e vitrificação do embrião.

### **3 Material e Métodos**

#### **3.1 Animais e local do experimento**

Foi realizado um estudo retrospectivo, utilizando informações de um centro comercial de produção de fêmeas leiteiras de alta produção (Condomínio Canto Porto), localizado em Mogi Mirim-SP (latitude 22° 27' 21,2" Sul, longitude 46° 55' 03,4" Oeste), local de clima temperado quente, classificação Cwa segundo Köppen-Geiger (1928), caracterizado por clima temperado úmido com temperatura anual variando de 17 a 28°C, inverno seco e verão quente com temperaturas acima de 22°C. Foram avaliadas 4.987 transferências de embrião referentes ao período de setembro de 2015 a outubro de 2019, referentes a programas de transferência de embrião em tempo fixo utilizando-se novilhas (16 ± 3 meses) e vacas em lactação (56 ± 6 meses) da raça Girolando (1/2 Gir x 1/2 Holandês) como receptoras de embrião.

As fêmeas apresentavam ECC maior ou igual a 3 (escala de 1-5; LOWMAN et al., 1976) e eram mantidas em pastagem de capim-tifton 85 irrigado por

pivô central (garantindo volumoso de excelente qualidade o ano todo), que gera sombreamento artificial, além da irrigação, com livre acesso à água e suplementação mineral. Durante o período pré-parto, permaneciam em confinamento no sistema *Compost Barns*, com oferta de silagem três vezes ao dia. Após a parição, as vacas eram alocadas em um grupo pós-parto, em piquetes de capim-tifton 85 com água e suplementação mineral à vontade. As fêmeas apresentavam produção média diária de leite de 24 litros por animal e permaneciam aproximadamente 185 dias em lactação. Todos os animais eram submetidos a rigoroso protocolo sanitário, com vacinações periódicas para as principais doenças como: brucelose, leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina e neosporose, que afetam a reprodução animal.

Os embriões foram produzidos em um único laboratório comercial, por meio de fecundação *in vitro*, utilizando sêmen congelado de touros previamente testados. Foram utilizadas 355 doadoras das raças Gir e 1/2 Gir x 1/2 Holandês e sêmen de 55 touros Gir e Holandês. Os embriões produzidos foram transferidos a fresco ou submetidos à vitrificação para posterior transferência.

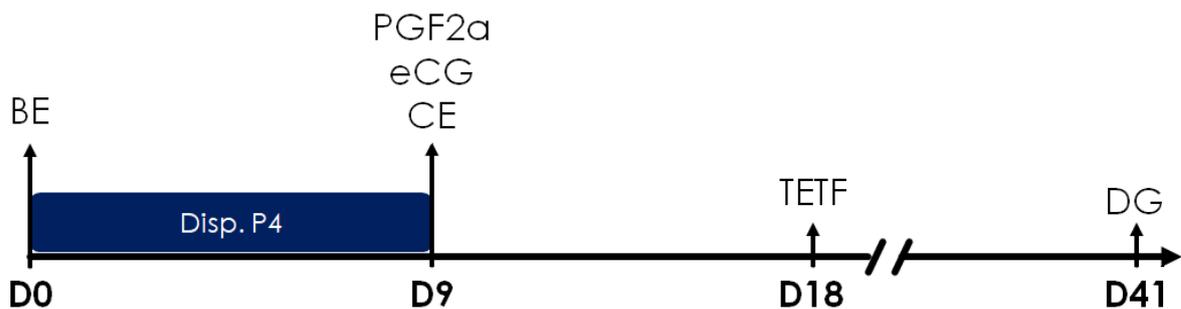
### 3.2 Parâmetros avaliados

Foram analisadas 4.987 transferências de embrião, totalizando 1.780 inovulações em vacas e 3.207 em novilhas Girolando. Os dados foram divididos de acordo com a categoria animal (novilha ou vaca) e o embrião transferido (fresco ou vitrificado) transferido. Os parâmetros avaliados foram: taxa de concepção (30 dias de gestação; número de fêmeas prenhes em relação ao número de fêmeas colocadas em serviço) e perda gestacional (dos 30 dias ao parto; número de bezerros nascidos em relação ao número de fêmeas gestantes).

### 3.3 Protocolo de sincronização das receptoras

Para a sincronização das receptoras de embrião, foi utilizado um protocolo de três manejos, com aplicação IM de 2,0 mg de benzoato de estradiol (BE; Sincrodiol® - Ourofino Saúde Animal, Cravinhos-SP, Brasil) e inserção de um dispositivo intravaginal de 1g de progesterona de primeiro uso (P4; Sincrogest® -

Laboratórios Grascon do Brasil, São Paulo-SP, Brasil) em dias aleatórios do ciclo estral, denominando dia zero (D0). No nono dia (D9), retirou-se o dispositivo de progesterona e aplicou-se (IM) 0,526 mg de cloprostenol sódico (PGF2 $\alpha$ ; Sincrocio<sup>®</sup> - Ourofino Saúde Animal, Cravinhos-SP, Brasil), 400 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Sincro eCG<sup>®</sup> - Laboratório Biomega S.A., Melo-Cerro Largo, Uruguai), 1,0 mg de cipionato de estradiol (CE; SincroCP<sup>®</sup> - Ourofino Saúde Animal, Cravinhos-SP, Brasil). No dia da transferência de embrião em tempo fixo (TETF; D18), avaliou-se a presença de corpo lúteo (CL) e o lado da ovulação; quando o CL estava presente, prosseguia-se com a TE; caso contrário, o animal não era inovulado. Após 23 dias da TETF (D41), foi realizado o diagnóstico de gestação (DG) por meio da ultrassonografia modo B (transdutor linear 5 MHz; A5V, Sonoscape, Shinzhen, China).



**Figura 1.** Esquema do protocolo de transferência de embrião em tempo fixo de três manejos utilizado em receptoras Girolando.

**Legenda:** BE (benzoato de estradiol), PGF2 $\alpha$  (cloprostenol sódico), eCG (gonadotrofina coriônica equina), CE (cipionato de estradiol), TETF (transferência de embrião em tempo fixo), DG (diagnóstico gestacional) e P4 (progesterona).

### 3.4 Análise estatística

As taxas de concepção e perda gestacional após o programa de TETF foram analisadas pelo modelo de Regressão Logística Múltipla, considerando o efeito do ano, da categoria animal e do embrião transferido. O ECC não foi incluído no modelo de análise. A análise foi realizada utilizando o programa estatístico SigmaStat 4.0 (Jandel Scientific Software, San Jose, CA). O nível mínimo de significância adotado foi de 5%.

## 4 Resultados

A taxa de concepção no período de 2015 a 2019, independente das categorias e do embrião transferido foi de 50,87% (2537/ 4987) e a taxa de perda gestacional média 31,10% (789/ 2537). As novilhas apresentaram maior taxa de concepção e menor taxa de perda gestacional comparado às vacas. Não houve efeito do embrião transferido sobre as taxas de concepção e perda gestacional das fêmeas (Tabela 1). Da mesma forma, os anos em que as transferências foram realizadas não tiveram efeito sobre as taxas de concepção e perda gestacional das receptoras.

**Tabela 1.** Influência da categoria animal da receptora e da vitrificação do embrião sobre as taxas de concepção e perda gestacional de animais da raça Girolando submetidos a protocolo de transferência de embrião em tempo fixo (TETF).

<b>Categoria</b>	<b>Nº Animais % (n)</b>	<b>Concepção % (n)</b>	<b>Perda Gestacional % (n)</b>
Novilha	64,31 (3207)	56,56% (1814) <sup>A</sup>	27,18% (493) <sup>B</sup>
Vaca	35,69 (1780)	40,62% (723) <sup>B</sup>	40,94% (296) <sup>A</sup>
p-valor	-	0,01	0,011
Total	100 (4987)	50,87% (2537)	31,10% (789)
Fresco	67,58 (3370)	51,42% (1733) <sup>a</sup>	29,95% (519) <sup>a</sup>
Vitrificado	32,42 (1617)	49,72% (804) <sup>a</sup>	33,58% (270) <sup>a</sup>
p-valor	-	0,955	0,676
Total	100 (4987)	50,87% (2537)	31,10% (789)

Na mesma variável, letras iguais na mesma coluna indicam não haver diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

## 5 Discussão

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo que avalia a taxa de concepção e perda gestacional de receptoras de embrião da raça Girolando considerando-se diferentes categorias animais e utilizando-se embriões frescos ou

vitrificados provenientes de um programa de produção comercial em larga escala. A categoria animal influenciou as taxas de concepção e perda gestacional, mas não houve influência do processo de vitrificação do embrião sobre as mesmas.

A taxa de concepção média, independente da categoria animal e embrião transferido foi de 50,63% (2537/4987), próximo dos valores encontrados por Trigo et al. (2012) trabalhando com novilhas cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*; 52,80%), e superior à de novilhas e vacas da raça Girolando (37%; Pontes et al., 2010). É válido ressaltar que Trigo et al. (2012) utilizaram apenas novilhas, fator que pode ter influenciado positivamente no índice reprodutivo em questão; enquanto, no presente estudo foram utilizadas vacas e novilhas.

No presente trabalho, não houve diferença na taxa de concepção utilizando-se embriões frescos (51,42%) ou vitrificados (49,72%), resultado semelhante ao de Borges Filho (2018) após transferência de embriões frescos ou vitrificados (37,64 vs. 24,09%;  $p = 0,06$ ) em novilhas e vacas da raça Nelore. Após programa de superovulação, não foi observada diferença na taxa de concepção de vacas Holandesas em lactação utilizando-se embriões frescos (32%) ou congelados (34%; Vieira et al., 2014), resultado divergente ao de um programa de superovulação com novilhas leiteiras que apresentaram maior taxa de concepção com embriões frescos vs. congelados (56,9 vs. 44,2%; Chebel et al., 2008). A taxa de concepção de vacas Holandesas sob condições de estresse térmico foi maior após transferência de embriões frescos vs. vitrificados (19,0 vs. 6,5%; Al-Katanani et al., 2002).

Assim como na concepção, não houve diferença na perda gestacional após transferência de embriões frescos (29,95%) ou vitrificados (33,58%). Apesar de não ser possível estabelecer comparações diretas devido à diferença no processo de produção de embriões e no período de avaliação da perda gestacional, a taxa de perda embrionária aos 45 dias de gestação de vacas Holandesas repetidoras de estro submetidas à superovulação não diferiu entre embriões transferidos a fresco (17,2%) ou após descongelamento (22,3%; Vieira et al., 2014). No entanto, Rodrigues et al. (2010) relataram taxa de perda embrionária aos 60 dias de gestação de apenas 9% para vacas Holandesas repetidoras de estro de alta produção leiteira.

Apesar da toxicidade dos crioprotetores utilizados no processo de vitrificação, bem como as injúrias causadas ao embrião nesse procedimento (FAHY,

2007), não foi constatada diferença nas taxas de concepção e perda gestacional entre embriões transferidos a fresco ou após a vitrificação. Representando os avanços no modelo de criopreservação, esse resultado implica o possível crescimento da técnica de PIVE, podendo ser aplicada em maior escala, preservando embriões excedentes e facilitando o comércio, exportação e importação do material genético já formado.

No presente trabalho, as novilhas apresentaram maior taxa de concepção (56,56%) comparado às vacas (40,62%), resultado semelhante ao Peres (2014), que também não observou diferença na taxa de concepção entre novilhas e vacas leiteiras *Bos taurus x Bos indicus* (28 vs. 24%), após transferência de embriões PIV com sêmen sexado. Em animais superovulados da raça Holandesa, há relatos de maior taxa de concepção em novilhas vs. vacas (50,6 vs. 42,0%; Chebel et al., 2008) e maior taxa de concepção em vacas (36%) em relação a novilhas (30%; Vieira et al., 2014).

Além de maior taxa de concepção, as novilhas apresentaram menor taxa de perda gestacional até o parto (27,18%) do que as vacas (40,94%). Estes valores são maiores do que os relatados para a taxa de perda embrionária de vacas e novilhas de corte (*Bos taurus x Bos indicus*) - 15,50% com embriões produzidos *in vitro* (REIS et al., 2004) e 4,40% com embriões produzidos *in vivo* - ZANENGA; PEDROSO, 1995), e para vacas leiteiras da raça Holandesa - 26,2% com embriões produzidos *in vivo* (Sartori et al., 2003). Vieira et al. (2014) não observaram diferenças nas taxas de perdas embrionárias entre vacas (16,6%) e novilhas (18,2%) com embriões produzidos *in vivo*. Entretanto, estes autores avaliaram perda embrionária e não perda gestacional total como no presente trabalho.

A categoria animal de vacas encontra-se em BEN quando desafiada a tornar-se gestante, reduzindo sua taxa de fertilidade (SANTOS, 2009). Além disso, animais múltiparos de alta produção apresentam maior concentração de ácidos graxos saturados no líquido folicular (BENDER et al., 2010), menor concentração de fator de crescimento semelhante a insulina (SWANGCHAN-UTHAI et al., 2011), menor concentração de estradiol, pico de LH, progesterona (WOLFENSON et al., 2004) e ambiente da tuba uterina menos favorável ao embrião comparado ao útero de uma novilha (SWANGCHAN-UTHAI et al., 2011). Estes fatores são prejudiciais à maturação do oócito e também ao desenvolvimento embrionário; sendo assim, as

vacas costumam apresentar maiores taxas de perda gestacional e menores de concepção, conseqüentemente, piores índices reprodutivos quando comparadas às novilhas. Os resultados do presente trabalho, utilizando grande número de novilhas como receptoras, demonstram que aplicar a PIVE em um rebanho leiteiro comercial de alto padrão, com bom controle sanitário, boa condição corporal e boas condições de manejo, pode trazer ótimos resultados, tanto com embriões frescos quanto vitrificados.

## **6 Conclusão**

A partir do presente estudo, pôde-se inferir que a categoria animal que obteve melhores resultados foi a de novilhas e que não houve diferença nas taxas de concepção e perda gestacional em um programa de larga escala de TETF com receptoras da raça Girolando, considerando-se embriões frescos ou vitrificados. Sendo assim, a aplicação da PIVE em larga escala é bastante viável, tanto para embriões frescos quanto vitrificados, diminuindo as barreiras causadas pela distância, a partir da técnica de vitrificação, podendo melhorar a logística comercial e também na propriedade, utilizando o número exato de receptoras que se desejar trabalhar, sem gastos desnecessários com protocolos de sincronização.

## REFERÊNCIAS

AL-KATANANI, Y.M.; DROST, M.; MONSON, R.L.; RUTLEDGE, J.J.; KRININGER III, C.E.; BLOCK, J.; HANSEN, P.J. Pregnancy rates following timed embryo transfer with fresh or vitrified in vitro produced embryos in lactating dairy cows under heat stress conditions. **Theriogenology**, 58(1), 171-182. 2002

BENDER, K.; WALSH, S.; EVANS, A. C. O. FAIR, T.; BRENNAN, L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 139, n. 1, p. 1047-1055, 2010.

BLOCK, J.; BONILLA, L.; HANSEN, P. J. Efficacy of in vitro embryo transfer in lactating dairy cows using fresh or vitrified embryos produced in a novel embryo culture medium. **Journal of Dairy Science**. v. 93, n. 11, 2010.

BONI, R. Ovum pick-up in cattle: a 25 yr retrospective analysis. **Animal Reproduction** 2012. v. 9, p. 362-369.

BORGES FILHO, G.N. **Taxa de concepção e gestação de embriões produzidos in vitro, transferidos a fresco ou criopreservado, em vacas e novilhas nelore**. 2018. 33 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal-SP. 2018.

CHEBEL, R. C.; DEMÉTRIO, D. G. B.; METZGER, J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. **Theriogenology**, 2008, 69.1: 98-106.

FAHY, G.M. 'Cryopharmacological' aspects of vitrification solutions. **Cryobiology**, v. 55, p. 351-352, 2007.

FAOSTAT, 2017. **Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/#data>>. Acesso em: 29/01/2020.

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

HASLER, J.F. In vitro culture of bovine embryos in Ménézo's B2 medium with or without coculture and serum: the normalcy of pregnancies and calves resulting from transferred embryos. **Animal Reproduction Science** 2000; 60-61: 81-91.

IBGE. **Censo Agropecuário de 2017**. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/censo-agropecuario/censo-agropecuario-2017>>. Acesso em: 19/02/2020.

KOPPEN, W.; GEIGER, R. **Klimate der Erde**. Gotha: Verlag Jusuts Perthos. 1928. Wall-map 150 cm x 200 cm

LOWMAN, B. G.; SCOTT, N. A.; SOMERVILLE, S. H. **East of Scotland College of Agriculture**. Animal Production A, Department D. Condition Scoring of Cattle: Edinburgh School of Agriculture; 1976. MAPLETOFT, R.J.; HASLER, J.F. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. **Review of Science Technology**, 2005; v. 24, p. 393-403.

PALHANO, H.B. **Reprodução em bovinos-fisiopatologia, terapêutica, manejo e biotecnologia**. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora LF Livros, 2008, p.181-224.

PERES, A.R. **Avaliação da taxa de concepção de novilhas e vacas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) com o uso de sêmen sexado na inseminação artificial ou embriões produzidos in vivo e in vitro**. 2014. 54 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal-SP. 2014.

PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER, F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 74, n.1, p. 1349-1355, 2010.

REIS, E.L.; NASSER, L.F.; NICHI, M.; BARUSELLI, P.S. Embryonic mortality in recipients (*Bos indicus* x *Bos taurus*) superovulated with eCG. **Acta Scientiae Veterinariae** 2004; 32: 198.

RODRIGUES, C.A.; TEIXEIRA, A.A.; FERREIRA, R.M.; AYRES, H.; MANCILHA, R.F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P.S. Effect of fixed-time embryo transfer on

reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. **Animal reproduction science**, 118 (2-4), 110-117. 2010

SANCHES, B.V.; PONTES, J.H.F.; BASSO, A.C.; MARINHO, L. S.R.; SILVA-SANTOS, K.C.; SENEDA, M.M.; FILHO, B.D.O.; MEIRINHOS, M.L.G.; FERREIRA, C.R.; SENEDA, M.M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v. 80, pp. 372-377. 2013.

SANCHES, B. V.; LUNARDELLI, P. A.; TANNURA, J. H.; CARDOSO, B. L.; PEREIRA, M. H. C.; GAITKOSKI, D.; BASSO, A. C.; ARNOLD, D. R.; SENEDA, M. M. A new direct transfer protocol for cryopreserved IVF Embryos. **Theriogenology**, v. 85, p. 1147-1151, 2016.

SANTOS, J. E. P. Pregnancy Losses: Prevalence, Timing and Associated Causes. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, Bogotá, v. 56, n.1, p. 241-252, 2009.

SARTORI, R.; GÜMEN, A.; GUENTHER, J.N.; SOUZA, A.H.; WILTBANK, M.C. Comparison of artificial insemination (AI) versus embryo transfer (ET) in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science** 2003; 86: 238-239.

SWANGCHAN-UTHAI, T.; WALSH, S. W.; ALEXANDER, S. L. H.; CHENG, Z.; CROWE, M. A.; EVANS, A. C. O.; WATHES, D. C. Comparison of mRNA for IGFs and their binding proteins in the oviduct during the peri-oestrous period between dairy heifers and lactating cows. **Reproduction**, Cambridge, v. 142, n. 1, p. 457-465, 2011.

TRIGAL, B.; GÓMEZ, E.; CAAMAÑO, J. N.; MUÑOZ, M.; MORENO, J.; CARROCERA, S.; MARTÍN, D.; DIEZ, C. *In vitro* and *in vivo* quality of bovine embryos in vitro produced with sex-sorted sperm. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 78, n. 1, p. 1465-1475, 2012.

VIEIRA, L.M.; RODRIGUES, C.A.; MENDANHA, M.F.; SÁ FILHO, M.F.D.; SALES, J.N.D.S.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. **Theriogenology**, 82(2), 204-212. 2014

WOLFENSON, D.; INBAR, G.; ROTH, Z.; KAIM, M.; BLOCH, A.; BRAW-TAL, R. Follicular dynamics and concentrations of steroids and gonadotropins in lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, Philadelphia, v. 62, n. 1, p.1042-1055, 2004.

ZANENGA, C.A.; PEDROSO, M.F. Early pregnancy check by ultrasound scanning in bovine embryo transfer. **ARS Veterinaria** 1995; 11: 151.

## 7 Considerações Finais

Após findado o presente estudo, pôde-se inferir que houve influência da categoria animal nas taxas de concepção e perda embrionária de receptoras Girolando submetidas ao protocolo de TETF, mas o mesmo não aconteceu quando utilizou-se embriões frescos ou vitrificados, dessa forma, temos que:

- A categoria animal teve influência sobre as taxas de concepção e perda embrionária, sendo que as novilhas apresentaram maior taxa de concepção e menor taxa de perda gestacional em relação às vacas, conforme esperado segundo informações existentes para outras raças;
- O processo de vitrificação do embrião não influenciou as taxas de concepção e perda gestacional das receptoras Girolando; desta forma, as taxas foram semelhantes após transferência com embrião fresco ou vitrificado, diferentemente do esperado, onde classicamente os embriões a fresco apresentam melhores possibilidades de sobrevivência.