MARIANA PALLÚ VIZIACK

**Efeito de diferentes biotécnicas reprodutivas (IA, TE e FIV) no
desempenho produtivo e reprodutivo de fêmeas da raça Holandesa**

São Paulo

2020

MARIANA PALLÚ VIZIACK

Efeito de diferentes biotécnicas reprodutivas (IA, TE e FIV) no desempenho produtivo e reprodutivo de fêmeas da raça Holandesa

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 27 de Novembro de 2020 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre/Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

De acordo:

Orientador

São Paulo
2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3982
FMVZ

Viziack, Mariana Pallú

Efeito de diferentes biotécnicas reprodutivas (IA, TE e FIV) no desempenho produtivo e reprodutivo de fêmeas da raça Holandesa / Mariana Pallú Viziack. – 2020. 94 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Biotecnologias reprodutivas. 2. Holandesa. 3. Produção de leite. 4. Epigenética. I. Título.

CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito de diferentes biotécnicas reprodutivas (IA, TE-in vivo e TE-in vitro) no desempenho reprodutivo de fêmeas Holandesas.", protocolada sob o CEUA nº 4163140218 (0000000), sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli** e equipe; Mariana Palú Vizlack - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/08/2019.

We certify that the proposal "Effect of different reproductive biotechnologies (AI, ET-in vivo and ET-in vitro) on reproductive performance of Holstein females.", utilizing 1349 Bovines (1349 females), protocol number CEUA 4163140218 (0000000), under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli** and team; Mariana Palú Vizlack - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/14/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2018** a **01/2020**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **0 a 8 anos**

N: **1349**

Linagem: **Holandês**

Peso: **0 a 900 kg**

Local do experimento: O experimento será realizado na Fazenda Santa Rita/Agrindus S.A., localizada em Descalvado - SP.

São Paulo, 02 de dezembro de 2019

Prof. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: VIZIACK, Mariana Pallú

Título: Efeito de diferentes biotécnicas reprodutivas (IA, TE e FIV) no desempenho produtivo e reprodutivo de fêmeas da raça Holandesa

Dissertação apresentada ao programa de
Pós-Graduação em Reprodução Animal da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da Universidade de São Paulo
para a obtenção de título de Mestre em
Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

À *Deus*, pela vida, saúde e determinação que sempre me fizeram ter disposição e força de vontade para delinear e buscar meus objetivos.

Aos meus pais, *Eliana* e *Synval*, por sempre me darem todo o amor e apoio que pais podem dar a um filho.

Ao meu namorado, *Claudio*, por ser parceiro e companheiro em todos os meus objetivos.

Às pessoas em quem me inspiro, *Laís Mendes Vieira*, *Carlos Alberto Rodrigues* e *Pietro Sampaio Baruselli*, por serem pessoas e profissionais admiráveis, que sempre confiaram em meu empenho e têm me guiado durante toda minha trajetória profissional.

AGRADECIMENTOS

Aos *meus pais, Eliana e Synval*, obrigada pelo carinho e pela educação de valores pessoais e profissionais. Tudo o que sou, o que faço e o que tenho é integralmente devido a vocês e por vocês.

Ao *meu namorado, Claudio*, obrigada por ser meu porto seguro, por me apoiar e por me fazer mais feliz a cada dia e, principalmente, por me ajudar a ser uma pessoa sempre melhor. Tenho muito orgulho do casal que construímos juntos todos os dias.

À toda a *minha família*, pelo apoio, orações e compreensão incondicionais durante toda a minha trajetória de estudos.

Aos meus *amigos de escola, de colégio e de faculdade* pelo estímulo à seguir sempre meus objetivos e por comemorarem comigo todas as minhas alegrias.

Aos meus *colegas de mestrado*, com carinho especial para a Mari Ortolan, Flávia e Gaúcho, obrigada por terem me ensinado e permitido com que eu pudesse ajudar em todos os projetos em andamento. Obrigada por terem se tornado grandes amigos e por todos os momentos de trabalho e risadas compartilhados.

Ao professor *Pietro Baruselli*, por ter sido um mestre e orientador pessoal e profissional. Professor, obrigada por ter me orientado durante a faculdade e durante o mestrado e por ter sido um exemplo de dedicação que levarei para toda minha vida profissional. Obrigada pela confiança, paciência e conselhos, você sempre será meu eterno mestre.

Ao Médico Veterinário *Carlão*, por ter sido um pai, um amigo e um exemplo de profissional incondicionais. Carlão, obrigada por todos os incontáveis ensinamentos e por ter permitido com que eu fizesse tanto para te ajudar e para ajudar a Agrindus. Sou muito grata a você por todo o período em que pude te acompanhar e por ter me estimulado a seguir o mestrado e a carreira empresarial.

Aos hoje colegas de MSD e amigos *Lais Vieira, Badá e Henderson Ayres*, obrigada por sempre terem sido minha fonte de inspiração e conselhos, e por sempre terem me encorajado e me estimulado a buscar pelos meus objetivos. Obrigada pela confiança em minha capacidade, sem dúvidas foi essencial para me estimular diariamente. Badá, especialmente a você, muito obrigada por toda a ajuda com a tese e com as análises de dados, desde os primeiros resultados parciais até a conclusão deste trabalho.

Às professoras *Mayra e Viviane*, obrigada por todo o carinho que vocês têm por mim desde o período da graduação e por terem contribuído tanto com meu crescimento pessoal e com meu mestrado. Ao *Luiz Siqueira*, obrigada por ter sido parte de minha banca e por poder contribuir com nosso trabalho.

À *Harumi*, por ser um exemplo de eficácia e por toda a ajuda com quaisquer burocracias.

À *Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo*, por ter sido minha casa durante a graduação e a pós-graduação, com tantas portas abertas e possibilidades de aprendizado e crescimento.

À FAPESP, processo nº 2018/05780-8, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, e à CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio financeiro durante o mestrado. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do autor e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e da CAPES.

Ao professor *Rodrigo Bicalho* e aos seus orientados, especialmente ao Léo, obrigada por terem permitido que eu ajudasse em suas pesquisas e por todos os ensinamentos durante o período do mestrado em que estive em Cornell. Sem dúvidas foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional.

À minha família de Descalvado, *Pensão da Dona Ana*, por ter sido meu lar durante o período em que trabalhei na Agrindus. Dona Ana, não tenho palavras para explicar meu carinho e gratidão a você por ter sido minha mãe, amiga, companheira e parceira de boas risadas diárias.

À querida *Agrindus (Fazenda Santa Rita)*, por ter me aberto as portas e por ter permitido com que eu aprendesse e contribuísse com a produção de leite. Ao *Roberto Jank*, obrigada por ter permitido com que eu analisasse os dados de sua fazenda e com que eu pudesse trabalhar nela com toda a liberdade. Aos funcionários *Thiago, Micky, Flaviani, Laércio, Victor, Guilherme, Lucas, Orlando, Tuta, Susy, Tonho, Tina, Joel, Cléber, Joãozinho* e falecido *Tião*, obrigada por terem me ensinado tanto sobre as vacas de leite, vocês são muito especiais na minha vida e guardo cada um com muito carinho em meus pensamentos. Aos veterinários *João e Guilherme*, obrigada por terem me acolhido, me ensinado tanto e permitido com que eu os ajudasse em tudo o possível.

Às *vacas de leite*, obrigada por terem me ensinado tanto sobre a vida e sobre a produção animal. Darei o meu melhor profissionalmente para uma melhor qualidade de vida compartilhada entre os animais e os seres humanos.

“O único passo entre o sonho e a realidade é a atitude”

Ruben Alves

RESUMO

VIZIACK, M. P. **Efeito de diferentes biotécnicas reprodutivas (IA, TE e FIV) no desempenho produtivo e reprodutivo de fêmeas da raça Holandesa.** 2020. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Biotécnicas da reprodução como IA, TE-*in vivo* e TE-*in vitro* têm sido aplicadas como estratégias de manejo visando maior produtividade, ganho genético e eficiência reprodutiva na pecuária brasileira e mundial. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das diferentes biotécnicas (IA, TE-*in vivo* e TE-*in vitro*) no desempenho reprodutivo de vacas da raça Holandesa em lactação, e avaliar o desempenho reprodutivo e produtivo de sua progênie. O estudo foi conduzido na Fazenda Santa Rita/Agrindus S.A. localizada em Descalvado, SP, Brasil. Foram analisadas as seguintes variáveis em vacas Holandesas lactantes que receberam as três biotecnologias contemporaneamente nos anos de 2013 a 2018: taxa de gestação aos 30 (TG30) e 60 (TG60) dias, taxa de perda gestacional entre 30 e 60 dias (TPG), taxa de abortamento (TA) e taxa de nascimento (TN). Além disso, também foram analisadas as variáveis duração da gestação (DG), facilidade de parto (FP) e retenção de anexos fetais (RAF). Na progênie, foram avaliadas as seguintes variáveis: informação genômica (IG), peso ao nascimento (PN) e ao desmame (PD), mortalidade do nascimento ao desmame (MN-D) e idade à primeira cobertura (IP-COB), das bezerras nascidas entre os anos de 2013 a 2018. Ainda, foram avaliadas idade ao primeiro parto (IP-PAR) e a produção de leite total na primeira lactação (PLT-1), das bezerras nascidas entre os anos de 2013 a 2017, e a produção de leite total na segunda lactação (PLT-2), das bezerras nascidas entre os anos de 2013 a 2015. Os dados foram analisados por procedimentos do SAS. Houve interação biotécnica ano para as variáveis TG30 ($P<0,0001$), TG60 ($P<0,0001$) e TPG ($P=0,03$), porém, houve efeito de biotécnica ($P=0,01$) e de ano ($P=0,03$) para TA e TN. Houve interação biotécnica ano para DG ($P<0,0001$). Houve efeito de biotécnica para FP ($P<0,0001$) e não houve efeito de biotécnica para RAF ($P=0,14$). Houve interação biotécnica ano para IG ($P<0,0001$). Não houve interação biotécnica ano ($P=0,30$), efeito de biotécnica ($P=0,62$) e de ano ($P=0,82$) para MN-D. Houve interação biotécnica ano para PN ($P=0,01$) e PD ($P<0,0001$). Entretanto, houve apenas efeito de ano para IP-

COB ($P<0,0001$), IP-PAR ($P=0,0002$) e PLT-1 ($P<0,0001$). Não houve interação biotécnica ano ($P=0,41$), efeito de biotécnica ($P=0,97$) e de ano ($P=0,92$) para PLT-2. Nas progenitoras, a TE apresentou maiores taxas de gestação, com semelhantes perdas gestacionais quando comparada com a IA. Adicionalmente, a TE-*in vivo* apresentou semelhantes taxas gestacionais e perda gestacional do que a TE-*in vitro*. Na progênie, não houve efeito de biotecnologia na produtividade de fêmeas nascidas de IA, TE-*in vivo* e TE-*in vitro*.

Palavras-chave: Biotecnologias reprodutivas, Holandesa, produção de leite, epigenética.

ABSTRACT

VIZIACK, M. P. **Effect of different reproductive biotechnologies (AI, *in vivo* ET and *in vitro* ET) on productive and reproductive performance of Holstein females.**

2020. 94 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Reproductive biotechnologies as AI, ET-*in vivo* and ET-*in vitro* have been applied as management strategies to accomplish productivity, genetic gain and reproductive efficiency on Brazilian and worldwide livestock. However, there are differences on the efficiency of this biotechnologies that may compromises the reproductive and productive development of the farms. The objective of this study was to evaluate the effect of different reproductive technologies (AI, ET-*in vivo* and ET-*in vitro*) on reproductive development of lactating Holstein cows, and evaluate the reproductive and productive development of their progeny. The study was conducted at Santa Rita/Agrindus S.A. Farm, located in Descalvado, SP, Brazil. The following variables of the lactating Holstein cows that received the three biotechnologies contemporaneously from 2013 to 2018 were analyzed: gestation rate at 30 (GR30) and 60 (GR60) days, gestation lost between 30 and 60 days (GLO), abortion rate (AR) and birth rate (BR). Additionally, other variables were analyzed: gestation length (GLE), labor facility (LF) and retention of fetal attachments (RFA). The following variables were analyzed on the progeny: genomic information (GI), weight at birth (WB) and at weaning (WW), mortality from calve to weaning (MCW) and age at first conception (ACON) of calves born from 2013 to 2018. Also, were analyzed age at first calve (ACA) and milk production from the first lactation (MP1) of calves born from 2013 to 2017, and milk production from the second lactation (MP2) of calves born from 2013 to 2015. The data were analyzed by procedures of SAS. There was interaction biotechnology year to GR30 ($P<0,0001$), GR60 ($P<0,0001$) and GLO ($P=0,03$), however, there was effect of biotechnology ($P=0,01$) and effect of year ($P=0,03$) to AR and BR. There was interaction biotechnology year to GLE ($P<0,0001$). There was effect of biotechnology to LF ($P<0,0001$), without effect of biotechnology to RFA ($P=0,14$). There was interaction biotechnology year to GI ($P<0,0001$). There was no interaction biotechnology year ($P=0,30$), effect of biotechnology ($P=0,62$) and effect of year

($P=0,82$) to MCW. There was interaction biotechnology year to WB ($P=0,01$) and WW ($P<0,0001$). However, there was only effect of year to ACON ($P<0,0001$), ACA ($P=0,0002$) and MP1 ($P<0,0001$). There was no interaction biotechnology year ($P=0,41$), effect of biotechnology ($P=0,97$) and effect of year ($P=0,92$) to MP2. On lactating cows ET presented better conception rates, with similar gestation lost than AI. Additionally, ET-*in vivo* presented similar gestation rate and lower gestation lost than ET-*in vitro*. On progeny, there were no differences between productivity of females born from AI, ET-*in vivo* or ET-*in vitro*.

Keywords: Reproductive biotechnology, Holstein, milk production, epigenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo descritivo da metodologia experimental com destaque na maturação oocitária, capacitação espermática, fertilização e desenvolvimento embrionário das diferentes biotécnicas avaliadas (IA, TE- <i>in vivo</i> e TE- <i>in vitro</i>).....	35
Figura 2. Modelo hipotético dos resultados esperados na progenitora e na progênie após o uso de diferentes biotécnicas da reprodução (IA, TE- <i>in vivo</i> e TE- <i>in vitro</i>) de acordo com as hipóteses elaboradas.....	35
Figura 3. Protocolos de superovulação (SOV) com inseminação artificial em tempo fixo (IATF) para produção de embriões <i>in vivo</i> para vacas Holandesas em lactação (A) e em período seco (B)	42
Figura 4. Protocolos de transferência de embrião após observação de estro (TE) ou de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) para vacas Holandesas em lactação, para embriões <i>in vivo</i> produzidos de vacas em lactação ou em período seco.	47
Figura 5. Protocolos de transferência de embrião após observação de estro (TE) ou de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) para vacas Holandesas em lactação, para embriões produzidos <i>in vitro</i>	47
Figura 6. Taxa de gestação aos 30 dias (TG 30; A); Taxa de gestação aos 60 dias (TG 60; B) de vacas Holandesas em lactação submetidas à IA (n=21.706), TE- <i>in vivo</i> (n=9.588) ou TE- <i>in vitro</i> (n=3.754) entre os anos de 2013 a 2018.	55
Figura 7. Taxa de perda gestacional entre 30 e 60 dias (TPG) de vacas Holandesas em lactação submetidas à IA (n=21.706), TE- <i>in vivo</i> (n=9.588) ou TE- <i>in vitro</i> (n=3.754) entre os anos de 2013 a 2018.....	57
Figura 8. Taxa de abortamento (TA) por biotécnica (A1) e por ano (B1); Taxa de nascimento (TN) por biotécnica (A2) e por ano (B2) de vacas Holandesas em lactação submetidas à IA (n=21.706), TE- <i>in vivo</i> (n=9.588) ou TE- <i>in vitro</i> (n=3.754) entre os anos de 2013 a 2018	58
Figura 9. Duração da gestação (DG) de vacas Holandesas em lactação submetidas à IA, TE- <i>in vivo</i> ou TE- <i>in vitro</i> entre os anos de 2013 a 2018.....	60
Figura 10. Informação genômica (IG) da progênie de fêmeas Holandesas provenientes de IA (n=1.665), TE- <i>in vivo</i> (n=233) ou TE- <i>in vitro</i> (n=385) entre os anos de 2013 a 2018.	64
Figura 11. Peso ao nascimento (PN) da progênie de fêmeas Holandesas provenientes de IA (n=3.489), TE- <i>in vivo</i> (n=746) ou TE- <i>in vitro</i> (n=460) entre os anos de 2013 a 2018	65
Figura 12. Peso ao desmame (PD) da progênie de fêmeas Holandesas provenientes de IA (n=3.489), TE- <i>in vivo</i> (n=740) ou TE- <i>in vitro</i> (n=460) entre os anos de 2013 a 2018.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Índices avaliados por categoria animal e por período.	39
Tabela 2. Taxa de gestação aos 30 dias (TG 30), taxa de gestação aos 60 dias (TG 60), taxa de perda gestacional entre 30 e 60 dias (TPG), taxa de abortamento (TA) e taxa de nascimento (TN) de vacas Holandesas em lactação submetidas à IA (n=21.706), TE- <i>in vivo</i> (n=9.588) ou TE- <i>in vitro</i> (n=3.754) entre os anos de 2013 a 2018.	54
Tabela 3. Duração da gestação (DG), facilidade ao parto (FP) e retenção de anexos fetais (RAF) de vacas Holandesas em lactação submetidas à IA, TE- <i>in vivo</i> ou TE- <i>in vitro</i> entre os anos de 2013 a 2018.	60
Tabela 4. Informação genômica (IG), mortalidade do nascimento ao desmame (MN-D), peso ao nascimento (PN), peso ao desmame (PD), idade à primeira cobertura (IP-COB), idade ao primeiro parto (IP-PAR) e produção total de leite na primeira (PLT-1) e segunda (PLT-2) lactação (em 305 dias) da progênie de bezerras Holandesas provenientes de IA, TE- <i>in vivo</i> ou TE- <i>in vitro</i> entre os anos de 2013 a 2018.	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA BOVINA	21
2.2. INDICADORES DE EFICIÊNCIA REPRODUTIVA	23
2.2.1. Novilhas	23
2.2.2. Vacas em lactação	24
2.3. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL	26
2.4. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES	28
2.4.1. Números da produção de embriões <i>in vivo</i> x <i>in vitro</i>	30
2.4.2. Alterações epigenéticas na fase inicial de desenvolvimento embrionário	31
3. HIPÓTESES	34
3.1. DESEMPENHO REPRODUTIVO DE VACAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO SUBMETIDAS À IA, TE- <i>IN VIVO</i> OU TE- <i>IN VITRO</i>	34
3.2. DESEMPENHO REPRODUTIVO E PRODUTIVO DA PROGÊNIE DE FÊMEAS HOLANDESAS PRODUZIDAS POR IA, TE- <i>IN VIVO</i> OU TE- <i>IN VITRO</i>	34
4. OBJETIVOS	36
5. MATERIAIS E MÉTODOS	37
5.1. FAZENDA E ANIMAIS	37
5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
5.3. MANEJO REPRODUTIVO COM O USO DA IA	40
5.4. MANEJO REPRODUTIVO COM O USO DA TE	41
5.4.1. Doadoras de embrião (TE- <i>in vivo</i>) e de oócitos (TE- <i>in vitro</i>)	41
5.4.2. Coleta, rastreamento e envasamento de embriões <i>in vivo</i>	43
5.4.3. Aspiração folicular (OPU) e produção de embriões <i>in vitro</i>	44
5.4.4. Receptoras de embrião (TE- <i>in vivo</i> e TE- <i>in vitro</i>)	46
5.4.5. Transferência de embriões (TE- <i>in vivo</i> e TE- <i>in vitro</i>)	48
5.5. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO	49
5.6. MANEJO DA PROGÊNIE	50
5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
6.1. DESEMPENHO REPRODUTIVO DE VACAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO SUBMETIDAS À IA, TE- <i>IN VIVO</i> OU TE- <i>IN VITRO</i>	53

6.1.1. Índices reprodutivos	53
6.1.2. Duração da gestação, facilidade ao parto e retenção de anexos fetais	60
6.2. DESEMPENHO REPRODUTIVO E PRODUTIVO DA PROGENIE DE FÊMEAS HOLANDESAS PRODUZIDAS POR IA, TE- <i>IN VIVO</i> OU TE- <i>IN VITRO</i>	63
7. CONCLUSÕES.....	70
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS	69
9. REFERÊNCIAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

A população mundial está projetada para aumentar 29% até 2050, atingindo 9,8 bilhões de pessoas (UNDESA, 2019), sendo 70% dessa população urbana (UNDESA, 2018). Estudos também apontam para o aumento do PIB per capita, o que eleva a demanda por produtos de origem animal em quantidade e qualidade, e que para acompanhar esse crescimento a produção mundial de alimentos deve aumentar 70% (FAO, 2009). Nesse contexto, o Brasil tem grande importância pelo fato de apresentar condições climáticas e territoriais adequadas para produção de ovos, carne e leite, e também por possuir o maior rebanho comercial bovino do mundo, com cerca de 215 milhões de animais (ABIEC, 2019).

No entanto, o país ainda apresenta baixa produtividade de leite, com produção de 1,7 mil kg de leite/vaca/ano, enquanto que países como os Estados Unidos da América produzem 10,4 mil kg de leite/vaca/ano (EMBRAPA, 2019). Esses números demonstram que o Brasil necessita investir em tecnologia para aumentar a eficiência e produtividade do setor, considerando o elevado potencial produtivo do país. Ainda, o Brasil não é autossuficiente na produção de leite, o que gerou a importação de 142,4 mil toneladas de produtos lácteos em 2019 para abastecer a demanda do mercado interno (CEPEA, 2020).

Visando uma produção sustentável com aumento da produtividade e da eficiência reprodutiva, biotecnologias da reprodução têm sido aplicadas para o melhoramento genético e como estratégia de manejo reprodutivo na pecuária brasileira e mundial. Em 2019, 18 milhões de inseminações artificiais (IA) foram realizadas no Brasil, o que representa 16% das fêmeas bovinas em idade reprodutiva inseminadas artificialmente (ASBIA, 2020). Entretanto, o percentual de fêmeas inseminadas no Brasil é superior em rebanhos de corte quando comparado com rebanhos de leite (BARUSELLI et al., 2019). Nota-se que a IA é uma biotécnica que ainda possui grande capacidade de crescimento em nosso país, uma vez que aproximadamente 84% das fêmeas em idade reprodutiva são cobertas por touros. Entretanto, um dos grandes entraves para o aumento da utilização da IA nas propriedades rurais é a dificuldade de detecção do estro, que diminui a eficiência reprodutiva dos rebanhos com impactos diretos na produção de carne e de leite. Ainda, existem outros obstáculos além da

detecção de estro como questões culturais, de conhecimento da técnica e qualificação de mão-de-obra especializada para aumentar a utilização dessa biotecnologia no país.

No Brasil foram realizadas 16,4 milhões de sincronizações para IATF (inseminações artificiais em tempo fixo) em 2019, o que representa 87% do mercado de inseminação artificial (BARUSELLI, 2020). Estudos demonstraram que vacas submetidas à IA após a detecção de estro apresentam reduzidas taxas de serviço quando comparadas à vacas submetidas à IATF (TEIXEIRA; BARUSELLI, 2010; WILTBANK; PURSLEY, 2014). Essa diferença é principalmente devida ao anestro pós-parto e à falhas na detecção de estro. Ainda, vacas de alta produção apresentam maior metabolismo hepático de esteroides e menor duração do estro (BARUSELLI; VIEIRA; SÁ FILHO, 2015; LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004). Diversos estudos demonstraram a grande contribuição da IATF para a disseminação do uso dessa biotecnologia (BARUSELLI et al., 2017, 2018a; BORCHARDT; HAIMERL; HEUWIESER, 2016; STEVENSON; BRITT, 2017).

Enquanto que a IA aumenta a produtividade do rebanho fazendo uso apenas de sêmen de reprodutores provados, a transferência de embriões (TE) é uma biotécnica que introduz a linhagem materna no processo de melhoramento genético, aumentando a intensidade da seleção (KANIYAMATTAM et al., 2017). Dentre outras vantagens da TE, destaca-se o aumento na fertilidade de vacas repetidoras de serviço e de vacas durante períodos de estresse calórico, quando comparado com a IA (BARUSELLI et al., 2011; BONILLA et al., 2014; RASMUSSEN et al., 2013). Ainda, similarmente ao que ocorre com a IATF, a transferência de embriões em tempo fixo (TETF) aumenta a taxa de aproveitamento de receptoras e a taxa de prenhez, assim como elimina a necessidade de detecção de estro, facilitando o manejo e aumentando a eficiência reprodutiva principalmente de vacas receptoras em lactação (RODRIGUES et al., 2010).

De 1995 a 2010 a produção mundial de embriões bovinos cresceu 300.000 embriões por ano, especialmente devido ao crescimento da produção *in vitro* (VIANA et al., 2012). Ainda, de 1.487.343 embriões transferidos no mundo em 2017, 66,7% foram produzidos *in vitro* e 34% na América do Sul, sendo que 76,2% no Brasil (VIANA, 2018), colocando nosso país em destaque na adoção dessa tecnologia inovadora. Atualmente, verifica-se que 68,7% dos embriões no mundo são produzidos *in vitro* (1.029.400) e 31,3% *in vivo* (469.967) (IETS, 2019).

Ainda, protocolos de superovulação para produção *in vivo* de embriões com base na detecção de estro da doadora apresentam limitações, que foram solucionadas a partir de estudos sobre as técnicas de controle do crescimento folicular e da ovulação (MARTINS et al., 2012). Na atualidade, existem procedimentos para estabelecer os tratamentos superovulatórios e as inseminações artificiais nas doadoras em dias pré-determinados, facilitando sobremaneira a aplicação dessa tecnologia (BÓ et al., 2006).

Entretanto, apesar da TE apresentar maiores taxas de concepção quando comparada à IA, especialmente em vacas repetidoras de serviço e sob estresse térmico, verifica-se maiores taxas de perda gestacional nas receptoras de embrião (BARUSELLI et al., 2011). Ainda, alguns estudos relatam que apenas a TE de embriões produzidos *in vivo* (TE-*in vivo*) aumenta as taxas de concepção de vacas em lactação sob estresse térmico quando comparada com a IA, não sendo verificados ganhos na fertilidade quando se utiliza a TE de embriões produzidos *in vitro* (TE-*in vitro*) (AL-KATANANI et al., 2002; DROST et al., 1999). Por outro lado, o uso de sêmen sexado na produção *in vitro* de embriões apresenta melhores resultados quando comparado com seu uso na IA após a detecção do estro (PELLEGRINO et al., 2016) ou na superovulação para produção de embriões *in vivo* (SOARES et al., 2011).

No caso da TE-*in vitro*, efeitos epigenéticos nos primeiros estágios de desenvolvimento embrionário podem alterar a programação do fenótipo adulto devido à substituição do ambiente materno pela cultura artificial (SIQUEIRA et al., 2017). Por conseguinte, os sistemas de produção de embriões *in vitro* ainda não são capazes de produzir embriões com a mesma viabilidade da produção *in vivo* (HASLER, 2000), o que se reflete na produção de leite futura dos animais gerados por essa biotecnologia (BONILLA et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2017). Devido às vantagens da TE no ganho genético, espera-se que a produção de leite de animais resultantes dessa técnica seja superior do que a de animais provenientes de IA, mas podem existir comprometimentos devido a efeitos epigenéticos, especialmente na TE-*in vitro*.

Estudos recentes também demonstraram a eficiência do uso combinado das biotécnicas da reprodução disponíveis, relatando que o uso da TE-*in vitro* se justifica em fêmeas de maior valor genético, que atingem maiores valores no mercado com preços superiores quando comparado com fêmeas provenientes de IA (KANIYAMATTAM et al., 2017, 2018). Ainda, existem pesquisas que demonstram os efeitos positivos uso da TE em substituição a IA em vacas durante o período de estresse calórico (AMBROSE et al., 1999; DROST et al., 1999). No Brasil, os primeiros relatos

que confirmam essa hipótese utilizando significativo número de eventos analisados (7.501 IA e 2.112 TE) foram publicados em 2004 (RODRIGUES et al., 2004). Os autores verificaram significativo aumento da P/TE (prenhez por transferência de embriões) quando comparado com a P/IA (prenhez por inseminação artificial) durante os meses do verão. Entretanto, durante os meses do inverno a P/IA foi semelhante a P/TE.

Todos esses fatores devem ser levados em consideração no momento de estabelecer um programa reprodutivo eficiente para a propriedade. Entretanto, ainda são necessários estudos mais detalhados para avaliar o efeito dessas biotécnicas da reprodução na eficiência produtiva e reprodutiva de vacas leiteiras.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA FÊMEA BOVINA

Visando a eficiente produção de leite durante todo o ano, os sistemas tecnificados têm como objetivo a produção de um parto ao ano e 305 dias de duração da lactação. Entretanto, devido à seleção de vacas pela produção de leite, é um desafio otimizar a eficiência reprodutiva das vacas em lactação. Diversos fatores já foram correlacionados com a baixa fertilidade em vacas de leite, tais como, genética (BUABAN et al., 2015), sanidade (VANROOSE; DE KRUIF; VAN SOOM, 2000; ZANGIROLAMO et al., 2017), nutrição (ADAMIAK et al., 2005; KAWASHIMA et al., 2012; LEROY et al., 2008; SALES et al., 2015), ambiência (PAVANI et al., 2015; WALSH et al., 2014), metabolismo e produção de leite (DE VRIES; VEERKAMP, 2000; KAWASHIMA et al., 2007; LOMANDER et al., 2012). Portanto, diante dos vários desafios para obtenção de elevada eficiência reprodutiva em vacas de leite, a viabilização de ferramentas para selecionar animais mais férteis se torna uma estratégia importante. Para isso, é preciso conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva da fêmea bovina para que sejam aplicadas adequadamente as biotécnicas reprodutivas para proporcionar maior eficiência reprodutiva dos rebanhos (THATCHER, 2017).

O ciclo estral é definido pelo padrão cíclico de eventos reprodutivos da atividade ovariana e determina o período de receptividade sexual, que culmina no estabelecimento de uma subsequente gestação. Após a puberdade, as fêmeas bovinas apresentam ciclos com duração de 18 a 24 dias que são caracterizados por duas fases distintas: 1) fase luteínica, definida pela ovulação de um folículo dominante (FD) com a subsequente formação e presença do corpo lúteo (CL) e, 2) fase folicular, definida pela regressão do CL com a formação do próximo FD que irá culminar na próxima ovulação (FORDE et al., 2011). O desenvolvimento dos folículos ovarianos acontece em forma de ondas de crescimento folicular. Verifica-se, comumente, a presença de duas a três ondas de crescimento folicular por ciclo estral em fêmeas bovinas (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989). Durante o crescimento folicular são diferenciáveis as fases de recrutamento, seleção e dominância.

Em uma onda de crescimento folicular se verifica o crescimento de um grupo de folículos pré-antrais de forma independente do estímulo de hormônios gonadotrópicos

(ROCHE, 1996). Entretanto, na fase de recrutamento, estudos evidenciaram que os folículos antrais se tornam responsáveis ao hormônio folículo estimulante (FSH) e crescem até o momento em que um dos folículos recrutados se torna dominante e os outros subordinados entram em atresia (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989). Os folículos subordinados entram em atresia devido ao feedback negativo à liberação de FSH causado pela inibina e pelo estrógeno produzidos pelo folículo dominante em crescimento. Esse evento fisiológico denominado de seleção permite que somente folículo responsivo ao hormônio luteinizante (LH) continue crescendo, caracterizando a fase de dominância folicular. Devido à alta concentração de progesterona (P4) produzida pelo CL proveniente da ovulação do ciclo anterior, há um feedback negativo para a liberação do pico de LH com bloqueio da ovulação. Dessa forma, o folículo dominante entra em atresia e tem início uma nova onda de crescimento folicular. Com a regressão do CL, e consequente queda na concentração circulante de P4, ocorre mudanças fisiológicas que permitem a liberação de um pico de LH para que ocorra a ovulação do FD, dando início a um novo ciclo estral (MAPLETOFT; BÓ; BARUSELLI, 2009).

2.2. INDICADORES DE EFICIÊNCIA REPRODUTIVA

2.2.1. Novilhas

A determinação da sustentabilidade do sistema de produção de leite tem início com uma eficiente criação de novilhas para que, quando se tornem vacas em lactação, mantenham elevada a eficiência do sistema e atinjam o máximo potencial de produção (ARCHBOLD et al., 2012). O objetivo da criação de novilhas da raça Holandesa é desenvolver animais em peso adequado para que emprenhem em torno de 14 meses, e tenham seu primeiro parto aos 24 meses de idade (DONOVAN; BENNETT; SPRINGER, 2003; VAN AMBURGH et al., 1998). De acordo com (HOFFMAN; FUNK, 1992), novilhas que emprenham após esse período apresentam maiores taxas de distocia e maior escore de condição corporal (ECC) ao primeiro parto e, da mesma forma, outros autores (ETTEMA; SANTOS, 2004) reportaram que o maior retorno econômico de novilhas é observado quando seu primeiro parto acontece entre 23 e 24 meses.

De acordo com STEVENSON et al., 2008, novilhas devem ser avaliadas por palpação retal para que sejam identificadas como pré-púberes ou púberes, visto que novilhas pré-púberes têm performance reprodutiva e econômica inferiores quando submetidas à programas reprodutivos para inseminação artificial.

Preconiza-se na fazenda que a primeira inseminação seja realizada por meio de protocolos de IATF (SILVA et al., 2015), sendo utilizada a IA após observação de estro nos casos das novilhas não se tornarem gestantes na primeira IA, como ferramenta para diminuir a idade à primeira concepção e ao primeiro parto (FODOR et al., 2018). Ainda, recomenda-se a utilização de sêmen sexado em novilhas por apresentarem satisfatórias taxas de concepção (COLAZO; MAPLETOFT, 2017; NORMAN; HUTCHISON; MILLER, 2010; SÁ FILHO et al., 2010; SALES et al., 2011). Estudos demonstraram, também, que novilhas inseminadas com sêmen sexado apresentaram menores taxas de distocia e de natimortos devido à maior porcentagem de fêmeas nascidas (NORMAN; HUTCHISON; MILLER, 2010).

2.2.2. Vacas em lactação

Nas últimas cinco décadas a produção de leite por vaca aumentou, e em decorrência a fertilidade diminuiu. Mesmo com os avanços nas pesquisas para melhorar a reprodução de vacas em lactação de elevada produção, a redução na fertilidade ainda é um desafio (WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011). Os principais fatores que afetam a eficiência reprodutiva de rebanhos leiteiros são o período após o parto em que as vacas são inseminadas e a taxa de detecção de estro (taxa de serviço). Esses fatores podem ser controlados por técnicas de manejo reprodutivo. Entretanto, a taxa de concepção e a taxa de perda gestacional são mais influenciadas por fatores intrínsecos aos animais e de mais difícil controle (SANTOS, 2008). Pesquisas apontam que 90% dos oócitos ovulados são fertilizados (DISKIN; MORRIS, 2008). Entretanto, a confirmação da gestação varia entre 26,7 e 50,7% (TILLARD et al., 2008). Essas informações evidenciam comprometimento entre a fertilização e o desenvolvimento da gestação.

O escore de condição corporal, o estresse térmico, o número de partos, a produção de leite, o intervalo entre parto e primeiro serviço e as complicações do período pós parto (distocia, metrite e retenção de anexos fetais) são fatores determinantes que afetam a taxa de concepção. Em consequência a redução na taxa de concepção, verifica-se aumento do número de dias em aberto, do número de inseminações e do custo com alimentação (KIM; JEONG, 2018). O balanço energético negativo e o consumo de matéria seca são pontos críticos importantes que também influenciam a taxa de concepção (DISKIN; MORRIS, 2008; TILLARD et al., 2008).

Em vacas em lactação a maior taxa de perda gestacional acontece durante o período embrionário inicial (até 24 dias de gestação), especificamente nos primeiros oito dias de gestação. Essa perda gestacional pode atingir valores de até 43% (DISKIN; MORRIS, 2008). De acordo com (WILTBANK et al., 2016), durante sua primeira semana de estabelecimento da gestação de 20 a 50% das vacas em lactação perdem a gestação. Essa elevada ocorrência pode ser atribuída às inadequadas concentrações de progesterona para a secreção de histotrofo no lúmen uterino, positivamente correlacionado com a secreção de interferon-tau e com o estabelecimento da gestação (LONERGAN, 2011).

Considerando o período de perda embrionária tardia (do dia 27 ao dia 45) e perda fetal (do dia 45 ao término da gestação), verificam-se índices que variam entre 7 e

27% em vacas em lactação (SARTORI; DODE, 2008). Existem estudos (ABDALLA et al., 2017; SANTOS et al., 2004) que associam fatores maternos (ECC, produção de leite, dias em lactação, período entre o parto e a primeira inseminação, complicações do período pós-parto, número de partos e abortos anteriores) e não maternos (estação do ano, touro, anomalias de posições fetais, manejo da fazenda e protocolos de sincronização) com a perda gestacional. Esses fatores devem ser avaliados para que seja feita uma abordagem preventiva ou terapêutica para reduzir os problemas de perda gestacional.

Desde o início do século XX, com o conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva da fêmea bovina, inúmeras biotécnicas da reprodução foram desenvolvidas e são atualmente utilizadas para otimizar a performance reprodutiva e, consequentemente, a produtividade de leite em todo o mundo (STEVENSON; BRITT, 2017). A inseminação artificial, a criopreservação de sêmen, os protocolos de superovulação para transferência de embriões, as técnicas de aspiração folicular e de produção *in vitro* de embriões, a sexagem espermática, a clonagem e a análise e edição genômica são exemplos bem sucedidos do emprego de biotécnicas reprodutivas que vêm revolucionado a indústria de produção de leite (MOORE; HASLER, 2017). A implementação de tais tecnologias objetivando características de saúde, fertilidade e produção oferecem oportunidades para o melhoramento genético de rebanhos leiteiros, com significativos impactos econômicos e sociais (FLEMING et al., 2018).

2.3. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

A inseminação artificial (IA) foi a primeira biotécnica reprodutiva aplicada em bovinos, com a vantagem de apresentar potencial para aumentar a taxa de ganho genético ao utilizar sêmen de touros com mérito genético comprovado. Ainda, resultou em mudanças significativas no manejo das fazendas pela eliminação da necessidade do touro, possibilitando maior segurança aos funcionários (MOORE; HASLER, 2017), controle de doenças venéreas nos rebanhos (VISHWANATH, 2003) e a utilização de touros de raças não adaptáveis às condições tropicais (BARUSELLI et al., 2018a). Apesar do uso de touros em sistema de monta natural (MN) não resultar desvantagens na taxa de prenhez ao longo do tempo, apresenta maior variação do que quando é usada a IA (DE VRIES; STEENHOLDT; RISCO, 2005).

Apesar das vantagens da IA, sua maior desvantagem está na detecção de estro para que essa biotécnica seja realizada. De acordo com LARSON; BALL, 1992, cerca de 50% das vacas em lactação não são detectadas em estro, e possíveis erros na detecção limitam o número de inseminações e resultam em maiores dias em aberto com consequente perdas econômicas. Vacas em lactação apresentam menores concentrações sanguíneas de hormônios esteroides do que vacas em período seco ou novilhas (SARTORI; ROSA; WILTBANK, 2002) devido ao seu maior metabolismo para produção de leite. Esse fato foi relacionado com menores duração e intensidade de estro por pesquisadores (LOPEZ; SATTER; WILTBANK, 2004).

Diversos estudos (LARSON; BALL, 1992; PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995; WILTBANK; PURSLEY, 2014) relacionaram o problema da detecção de estro com a falta de utilização de protocolos de sincronização do ciclo estral desenvolvidos objetivando a inseminação artificial em tempo fixo (IATF). A IATF elimina a necessidade de detecção de estro para que seja realizada a IA. Comparando a taxa de prenhez de vacas inseminadas por IATF e por detecção do estro, estudos demonstram que a IATF antecipa a primeira inseminação pós-parto sem comprometer a taxa de concepção (TEIXEIRA; BARUSELLI, 2010). Vacas inseminadas por IATF se tornam prenhes antes do que vacas inseminadas após detecção de estro (SARTORI et al., 2016).

O princípio dos protocolos de IATF está na sincronização da onda de crescimento folicular, no controle da fase luteínica e na indução sincronizada da ovulação (BÓ et al., 1994; PURSLEY; MEE; WILTBANK, 1995). Diversos protocolos

de IATF estão disponíveis no mercado, e independente do protocolo utilizado os resultados de taxa de prenhez são similares (BARUSELLI et al., 2017), indicando que cada fazenda pode adaptar o protocolo que melhor se enquadra em seu manejo para aumentar a eficiência reprodutiva de vacas em lactação.

2.4. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

A IA e a IATF são biotécnicas reprodutivas que aumentam o ganho genético das futuras gerações dos rebanhos por favorecer o uso de genética comprovada de origem paterna. Entretanto, outras biotécnicas reprodutivas valorizam também o uso de fêmeas com comprovado mérito genético superior, como a transferência de embriões (TE) *in vivo* ou *in vitro*. Pesquisadores reportaram que a TE pode aumentar a taxa de melhoramento genético em até 30% nos programas de teste de progênie quando compara com a IA convencional que faz o uso apenas de touros selecionados (NICHOLAS; SMITH, 1983). Dessa forma é possível acelerar o ganho genético e reduzir a idade de seleção dos animais, diminuindo o intervalo entre gerações em programas reprodutivos (GRANLEESE et al., 2017).

A TE permite a multiplicação de fêmeas de superior mérito genético selecionadas do rebanho pela utilização de marcadores endócrinos e genéticos. A concentração plasmática de hormônio anti-mülleriano (AMH) pode ser usada como um marcador endócrino para a seleção de fêmeas que produzem maior número de embriões (GUERREIRO et al., 2014). A concentração de AMH está diretamente relacionada à população folicular de animais tanto *Bos taurus* como *Bos indicus* (BATISTA et al., 2014). Ainda, permite que essa seleção seja feita em doadoras pré-púbere, assim como o procedimento de coleta de oócitos via cirúrgica ou por aspiração de folículos guiada por ultrassonografia (BATISTA et al., 2016; ELLIFF et al., 2018; DA SILVA et al., 2019).

Como publicado por BARUSELLI et al., 2018b, além de promover acelerado ganho genético quando comparado com a IA, a TE tem o potencial de aumentar a fertilidade de vacas em lactação que passam por estresse calórico e de fêmeas diagnosticadas como repetidoras de serviço. O estresse calórico pode provocar redução no consumo alimentar e aumentar o balanço energético negativo, induzir mudanças na dinâmica folicular ovariana e morte embrionária (BARUSELLI et al., 2020). A performance reprodutiva de vacas em lactação é comprometida pelo estresse calórico por causar diminuição na qualidade oocitária, o que pode ser contornado pelo uso da TE (FERREIRA et al., 2011). Ainda, estudos foram indicativos de que a TE pode ser utilizada para minimizar a baixa fertilidade e a perda embrionária inicial de fêmeas repetidoras de serviço, promovendo maiores taxas de prenhez (BARUSELLI et al., 2011; RODRIGUES et al., 2010).

A TE tem o potencial de evitar danos causados pela hipertermia nos oócitos e embriões em fases iniciais, especialmente nos primeiros 7 dias após o estro (PUTNEY; DROST; THATCHER, 1989). Além disso, pode manter elevadas taxas de prenhez durante o ano pela produção de embriões durante meses mais frios que serão posteriormente transferidos em períodos de estresse térmico, visto que a produção de embriões em protocolos de superovulação também é comprometida durante as estações mais quentes do ano (METZGER; CHEBEL, 2008; VIEIRA et al., 2014a). Dessa forma, maiores taxas de prenhez durante o verão são verificadas em fêmeas que recebem TE quando comparadas com fêmeas que recebem IA (BARUSELLI et al., 2010). Em estudo recente, foi reportado que em períodos de estresse térmico é possível aumentar a taxa de prenhez em oito pontos percentuais utilizando a TE ao invés da IA, o que irá aumentar a rentabilidade por vaca por ano além de aumentar o valor genético obtido com sua progênie (BARUSELLI et al., 2020). Também é possível fazer uso de embriões criopreservados e de doadoras novilhas ou vacas que não estão em lactação, bem como seleção genética de doadoras para habilidade de termorregulação como estratégias para a produção de embriões nos meses mais quentes (BARUSELLI et al., 2020).

Estudo foi realizado para demonstrar as vantagens da TE com relação à IA na eficiência reprodutiva em vacas sob estresse térmico ou diagnosticadas como repetidoras de serviço (BARUSELLI et al., 2018b). Em simulação utilizando dados de estudos previamente realizados, foi verificado que as taxas de concepção e de prenhez foram maiores com o uso da TE e que as vacas submetidas exclusivamente à IA apresentaram maior período para a concepção do que vacas submetidas à TE. Ainda, a possibilidade de produzir embriões a partir de sêmen sexado aumentou as vantagens do uso da TE (SOARES et al., 2011). O uso de sêmen sexado é importante na pecuária leiteira por representar maior suprimento de novilhas de reposição e por aumentar o progresso de ganho genético (SÁ FILHO et al., 2013). Estudos confirmaram que a TE-*in vitro* aumenta a proporção de vacas em lactação prenhes e de fêmeas nascidas durante o verão quando comparadas com o uso da IA (STEWART et al., 2011).

Ainda, verifica-se que a TE-*in vitro* aumenta a proporção de vacas em lactação prenhes, mesmo que as taxas de embriões transferidos à fresco sejam superiores do que as de embriões transferidos após congelamento convencional ou vitrificação (STEWART et al., 2011). É demonstrado que embriões criopreservados (congelados ou vitrificados) apresentam menores taxas de prenhez do que embriões transferidos à

fresco (FLEURY et al., 2015; HASLER, 2014), indicando importante necessidade de melhorias na criopreservação de embriões para atender à demanda cada vez maior de embriões criopreservados. Vale ressaltar que, para otimizar o manejo reprodutivo das fazendas, é importante otimizar a técnica de congelamento lento como uma alternativa promissora.

Entretanto, quando embriões são produzidos em meios de cultivo que aumentem sua sobrevivência e desenvolvimento após a criopreservação, não é observado declínio na fertilidade de vacas em lactação quando embriões criopreservados são transferidos em comparação com a IA (BLOCK; BONILLA; HANSEN, 2010). Adicionalmente, um estudo recente demonstrou que a vitrificação de blastocistos produzidos *in vitro* é um interessante modo de criopreservação embrionária, ao resultar em similares taxas de prenhez quando comparados a embriões transferidos à fresco (DO et al., 2018). Esses estudos vêm reafirmando o fato de que a vitrificação pode ser uma alternativa promissora ao método de congelamento lento de embriões produzidos *in vitro* (CAAMAÑO et al., 2015).

2.4.1. Números da produção de embriões *in vivo* x *in vitro*

A produção de embriões vêm crescendo no Brasil nos últimos quinze anos, caracterizada pelo declínio na produção de embriões *in vivo* e crescente aumento na produção de embriões *in vitro*, que representa na atualidade 97% dos embriões produzidos pela indústria leiteira (VIANA; FIGUEIREDO; SIQUEIRA, 2017) e praticamente de 60% da produção de embriões mundial (SARTORI et al., 2016). Entretanto, apesar das raças *Bos taurus* representarem mais de 50% da produção brasileira de embriões e do Brasil ser o um dos maiores produtores de embriões *in vitro*, o uso dessa biotécnica é utilizada em menos de 1% das vacas e novilhas em idade reprodutiva, colocando o Brasil na 11ª posição pelo índice de intensidade de uso da transferência de embriões nos rebanhos (VIANA; FIGUEIREDO; SIQUEIRA, 2017).

O referido aumento de embriões produzidos *in vitro* nas raças leiteiras deve-se principalmente à facilidade de implementação da técnica e à eficiência dos protocolos de TETF desenvolvidos. Além disso, verifica-se a manutenção de características produtivas desejáveis através de cruzamentos entre raças e à possibilidade de uso de sêmen-sexado (SARTORI et al., 2016).

Entretanto, um dos maiores gargalos da produção *in vitro* de embriões (PIVE) está na acessibilidade dos oócitos provenientes de doadoras nas fazendas até os laboratórios de produção de embriões (MARINHO et al., 2012). Na tentativa de solucionar esse entrave, sistemas portáteis de transporte de oócitos e embriões foram desenvolvidos com benefícios diretos para a indústria da PIVE (CAVALCANTI et al., 2018). Ainda, outro grande gargalo da PIVE está nas diferenças no metabolismo embrionário de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, pelo fato de a nutrição do embrião ser uma das mais importantes influências na viabilidade futura (DE SOUZA; SALLES; ROSA E SILVA, 2015). Foi demonstrado que as primeiras clivagens embrionárias influenciam padrões moleculares e metabólicos de blastocistos e, dessa forma, a seleção de embriões baseada na velocidade das clivagens é uma alternativa para selecionar embriões com padrões de qualidade desejados, visto que embriões com menor velocidade são mais similares aos embriões *in vivo* (MILAZZOTTO et al., 2016). Também visando uma melhor seleção de embriões e uma monitoração em tempo real do metabolismo aeróbico e anaeróbico de embriões produzidos *in vitro*, sensores do fluxo metabólico de oxigênio, glicose e lactato de embriões foram desenvolvidos (OBEIDAT et al., 2019). Esses estudos colaboram para melhorar as condições de desenvolvimento inicial dos embriões visando melhorar a qualidade.

2.4.2. Alterações epigenéticas na fase inicial de desenvolvimento embrionário

O termo epigenética foi criado há aproximadamente 70 anos na tentativa de explicar os múltiplos fenótipos celulares oriundos de um mesmo genótipo (WIGHTMAN, 1956). O conceito clássico define epigenética como mudanças químicas na cromatina que não envolvem mudanças na sequência de nucleotídeos do DNA, entretanto, hoje o termo tomou proporções maiores e compreende diversos mecanismos que participam da regulação de expressão gênica, tais como metilação de DNA, modificações pós-traducionais em histonas, RNAs não codificadores, *imprinting* genômico, entre outros (BACCARELLI; BOLLATI, 2009; CHEN et al., 2016). Mecanismos epigenéticos podem alterar processos genéticos, e podem ser alterados por fatores externos (SKINNER, 2015). Sendo assim, os processos epigenéticos são potencialmente reversíveis, diferente de alterações genéticas, e são consequentemente

passíveis de tratamento, inclusive com a capacidade de serem usadas para tratamento (HAMM; COSTA, 2015).

Existem efeitos epigenéticos baseados em funções do gene que, quando alteradas, modificam o perfil de expressão genética dos animais (URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014). A metilação do DNA, caracterizada pela adição de radical metil, influenciam a expressão de genes e de fenótipos sem alterações na sequência do DNA, com efeitos na produção de leite, reprodução e saúde (FLEMING et al., 2018). Estudos sobre a epigenética em gado de leite podem auxiliar no desenvolvimento de novas biotécnicas e práticas de manejo que melhorem a qualidade de vida e produção dos animais (FLEMING et al., 2018), visto que variações fenotípicas não explicadas podem ser atribuídas aos efeitos epigenéticos (SINGH et al., 2010).

Embriões bovinos produzidos *in vitro* apresentaram comprometimento na estabilidade genômica de blastômeros e maior frequência de aberrações cromossômicas, quando comparados com embriões produzidos *in vivo* (TŠUIKO et al., 2017). Ainda, gametas e embriões que são expostos a estresse durante as etapas de produção de embriões *in vitro* apresentam menor capacidade de desenvolvimento, quando comparados com embriões produzidos *in vivo*. A alteração no perfil fisiológico dos gametas e dos embriões pode, ao menos parcialmente, explicar esses efeitos negativos da TE-*in vitro* (URREGO; RODRIGUEZ-OSORIO; NIEMANN, 2014).

Durante a gestação, a metilação do DNA pode alterar a expressão de genes e influenciar eventos que acontecem na prenhez inicial, visto que a regulação coordenada dessa expressão é essencial para o adequado estabelecimento da gestação (WALKER et al., 2013). Modificações no ambiente materno podem resultar em alterações no crescimento e funcionalidade da placenta das receptoras e podem aumentar a incidência de perda gestacional, de morbidade e de mortalidade perinatais, da síndrome do feto anormal ou feto gigante e levar à maiores taxas de distocias e retenções de placenta (BONILLA et al., 2014; DESHMUKH et al., 2012; FARIN; PIEDRAHITA; FARIN, 2006; NUMABE et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2017).

Estudos evidenciaram que, apesar de a duração da gestação não ser alterada em bezerros nascidos de IA ou FIV, bezerros nascidos de FIV são mais pesados quando comparados com nascidos de IA (CAMARGO et al., 2010; NUMABE et al., 2000; SIQUEIRA et al., 2017). Ainda, foi relatado maior taxa de natimortalidade e de mortalidade do nascimento ao desmame em bezerros produzidos por FIV (BONILLA et

al., 2014; SIQUEIRA et al., 2017). Estudos relataram que efeitos epigenéticos ligados à expressão gênica alteram indicadores de saúde em gado de leite, com efeitos no sistema imune inato (importante no reconhecimento e na resposta inicial à patógenos) (DOHERTY; O'FARRELLY; MEADE, 2013; GREEN; KERR, 2014) e no sistema adaptativo (PAIBOMESAI et al., 2013), podendo explicar a sobrevivência de bezerras nascidas a partir da FIV.

Com relação ao desempenho futuro das bezerras, não foi relatado efeito na idade à primeira concepção, na taxa de prenhez à primeira concepção e na produção e composição de leite da primeira lactação de fêmeas provenientes de IA ou FIV (BONILLA et al., 2014). Entretanto, (SIQUEIRA et al., 2017) observou que animais provenientes de FIV produziram menores quantidades de leite, gordura e proteína na primeira lactação em comparação com animais provenientes de IA. Essas diferenças podem ser explicadas pelo fato de que a produção de leite pode ser influenciada por uma resposta epigenética das células mamárias epiteliais à estímulos ambientais e de manejo externos (SINGH et al., 2010). Além disso, a produção de leite da receptora durante a gestação pode influenciar na produção de leite futura da progênie, ao passo que vacas em lactação de alta produção tendem a apresentar maior balanço energético negativo e, conseqüentemente, maior estresse metabólico durante a lactação e a gestação (FLEMING et al., 2018).

Visando melhorar os efeitos negativos da FIV, sistemas de cultura de embriões produzidos *in vitro* vêm sendo desenvolvidos e aprimorados a partir de novos conhecimentos com relação ao funcionamento molecular e metabólico dos embriões. A suplementação dos meios de cultivo com substâncias antioxidantes pode proteger embriões do estresse oxidativo, auxiliando em sua resposta adaptativa à condições estressantes durante o cultivo (DOS SANTOS et al., 2019). Além disso, a adição de moléculas secretadas pelas fêmeas gestantes para regular o desenvolvimento embrionário nos meios de cultura de embriões produzidos *in vitro* reduziram o peso ao nascimento dos bezerros (TRÍBULO et al., 2017). Esses resultados são indicativos de que os sistemas de produção de embriões estão sendo aprimorados para programação de fenótipo mais adequado com reduzidos efeitos epigenéticos na criação dos animais.

3. HIPÓTESES

3.1. DESEMPENHO REPRODUTIVO DE VACAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO SUBMETIDAS À IA, TE-*IN VIVO* OU TE-*IN VITRO*

3.1.1. A TE apresenta maior taxa de gestação e maior perda gestacional do que a IA;

3.1.2. A TE-*in vivo* apresenta maior taxa de gestação e menor perda gestacional do que a TE-*in vitro*.

3.2. DESEMPENHO REPRODUTIVO E PRODUTIVO DA PROGÊNIE DE FÊMEAS HOLANDESAS PRODUZIDAS POR IA, TE-*IN VIVO* OU TE-*IN VITRO*

3.2.1. Os animais provenientes da TE apresentam desempenho reprodutivo e produtivo superior aos animais provenientes da IA, devido ao superior mérito genético;

3.2.2. Os animais provenientes da TE-*in vitro*, apesar de terem mérito genético superior, apresentam desempenho reprodutivo e produtivo inferiores do que animais provenientes da TE-*in vivo* devido à possíveis fatores epigenéticos envolvidos na fertilização e no desenvolvimento embrionário inicial.

Figura 1. Modelo descritivo da metodologia experimental com destaque na maturação oocitária, capacitação espermática, fertilização e desenvolvimento embrionário das diferentes biotécnicas avaliadas (IA, TE-*in vivo* e TE-*in vitro*).

Figura 2. Modelo hipotético dos resultados esperados na progenitora e na progênie após o uso de diferentes biotécnicas da reprodução (IA, TE-*in vivo* e TE-*in vitro*) de acordo com as hipóteses elaboradas.

4. OBJETIVOS

Para testar as hipóteses levantadas, o presente estudo teve como primeiro objetivo avaliar o efeito de diferentes biotécnicas reprodutivas no desempenho reprodutivo de vacas da raça Holandesa em lactação submetidas à IA, TE-*in vivo* e TE-*in vitro*. Ainda, teve como segundo objetivo avaliar o efeito das biotecnologias no desempenho reprodutivo e produtivo das progênes geradas por essas biotecnologias em fêmeas Holandesas em lactação.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. FAZENDA E ANIMAIS

O presente estudo avaliou dados reprodutivos de vacas da raça Holandesa em lactação que receberam IA (n=21.706), TE-*in vivo* (n=9.584) ou TE-*in vitro* (n=3.754) durante os anos de 2013 a 2018 na Fazenda Santa Rita/Agrindus S.A., localizada no município de Descalvado, São Paulo, Brasil. Ainda, foi realizada a avaliação de dados reprodutivos e produtivos da progênie de fêmeas Holandesas provenientes de IA (n=3.759), TE-*in vivo* (n=822) e TE-*in vitro* (n=490), nascidas de 2013 a 2018.

A Fazenda Agrindus contém o maior rebanho holandês registrado no Brasil, com um total de 3,6 mil fêmeas jovens e adultas e 1,8 mil vacas em lactação. Os animais são classificados em PO e PC com *pedigree* na Associação Brasileira da Raça Holandesa. A fazenda é autossuficiente no fornecimento de alimentos volumosos para os animais, com rastreabilidade total sobre os processos produtivos, produção de alimentos e animais de reposição.

A produção de leite ocupa atualmente 500 dos 2 mil hectares da Fazenda Santa Rita e está em torno de 65 mil L/dia, com produção média dos animais de 35 mil L/ha/ano e 11,5 mil kg/vaca/ano. As vacas são ordenhadas três vezes ao dia e são mantidas em sistema de *free-stall* com acesso controlado à piquetes abertos, com camas de areia individuais e aspersores e ventiladores para o controle de estresse térmico, e túnel de vento (sistema inaugurado para 500 vacas em lactação em Dezembro de 2018). Recebem dieta completa para atingir ou exceder os requerimentos nutricionais mínimos da categoria (NRC, 2001), com livre acesso à água.

O armazenamento de dados é realizado por meio de planilhas (Excel®, Microsoft Office), em que foram coletados os dados retrospectivos do estudo, e de um programa de processamento de dados (Ideagri®, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil), em que foram coletados os dados prospectivos do estudo.

5.2. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Foram avaliadas as variáveis taxa de gestação aos 30 e 60 dias (% de vacas gestantes ao 30 e 60 dias/vacas inseminadas ou que receberam embrião; TG), taxa de perda gestacional entre 30 e 60 dias (% de vacas gestantes no diagnóstico de 60 dias/vacas gestantes no diagnóstico de 30 dias; TPG), taxa de abortamento (% de vacas que não pariram/vacas gestantes no diagnóstico de 60 dias; TA) e taxa de nascimento (% de partos viáveis ocorridos/vacas gestantes no diagnóstico de 60 dias; TN) nas vacas da raça Holandesa em lactação que receberam IA, TE-*in vivo* ou TE-*in vitro* nos anos de 2013 a 2018. Bezerros considerados natimortos não foram considerados na taxa de nascimento.

Ainda, entre os anos de 2013 a 2018 foram avaliadas nas progenitoras geradas por essas biotecnologias as variáveis: duração da gestação (DG), facilidade ao parto (% de partos auxiliados; FP) e retenção de anexos fetais (% de vacas que foram diagnosticadas com retenção de anexos fetais em até 24h após o parto; RAF). Na progênie de fêmeas Holandesas, foram avaliadas o peso ao nascimento (PN), o peso ao desmame (PD), a mortalidade do nascimento ao desmame (MN-D), a idade à primeira cobertura (IP-COB), a idade ao primeiro parto (IP-PAR), e a produção de leite total na primeira e na segunda lactações (PLT-1 e PLT-2). Para as variáveis de produção de leite foi considerada a produção corrigida – via Ideagri (programa de análise de produção de leite do rebanho) para 305 dias de lactação. Todos os índices avaliados por categoria animal e por período estão indicados na Tabela 1.

A informação genômica (IG) da progênie foi avaliada por um programa terceirizado (Clarifide®, Zoetis, Brasil). *Clarifide Holandês®* é um painel de 12 mil marcadores que predizem o potencial genético de cada animal para 32 características, com confiabilidade superior à de avaliações genéticas tradicionais (60 a 70% e 30%, respectivamente). Para o presente estudo, será utilizada a característica Produção de Leite, que descreve diferenças genéticas na produção de leite pelo período de lactação de 305 dias, sendo um indicador comparado à base da raça Holandês americana (ZOETIS, 2013). A base americana da raça Holandesa é composta por 928.670 vacas nascidas em 2015 com produção de leite média de 12.734 L de leite produzido em lactação de 305 dias. Esses valores de base genética são atualizados a cada 5 anos, sendo este último indicador atualizado em Abril de 2020. A média de produção equivale

ao marco zero na avaliação do indicador, e indica o potencial genético transmitido pela vaca para a próxima geração. Para a apresentação de dados, esse valor foi corrigido para o potencial genético integral da vaca, não ilustrando apenas o que ela transmitiria para sua progênie. Dessa forma, esse indicador ilustra o ranqueamento dos animais a partir da base genética gerada do rebanho americano nascido em 2015. Esse indicador inclui apenas o valor de genótipo, não sendo alterado conforme a produtividade do animal, o que permite a comparação genética dos animais em diferentes períodos, como no caso deste estudo.

Tabela 1. Índices avaliados por categoria animal e por período.

	Índices avaliados	Sigla	Período
Progenitoras	Taxa de gestação aos 30 e 60 dias	TG 30 e 60	2013 a 2018
	Taxa de perda gestacional entre 30 e 60 dias	TPG	
	Taxa de abortamento	TA	
	Taxa de nascimento	TN	
	Duração da gestação	DG	
	Facilidade ao parto	FP	
	Retenção de anexos fetais	RAF	
Progênie	Informação genômica	IG	2013 a 2018
	Peso ao nascimento	PN	
	Peso ao desmame	PD	
	Mortalidade do nascimento ao desmame	MN-D	
	Idade à primeira cobertura	IP-COB	
	Idade ao primeiro parto	IP-PAR	2013 a 2017
	Produção de leite total na primeira lactação	PLT-1	
	Produção de leite total na segunda lactação	PLT-2	2013 a 2015

5.3. MANEJO REPRODUTIVO COM O USO DA IA

As inseminações artificiais (IA) foram realizadas após a detecção do estro ou após a sincronização para IATF. O estro é observado pelos funcionários durante o período da manhã e da tarde na ordenha e nos *free-stalls*, e quando é observado o estro, no próximo período as vacas são separadas após a ordenha para que seja realizada a IA. As vacas submetidas à protocolos de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) são sincronizadas em dia aleatório do ciclo estral (D0) e recebem 2 mg de benzoato de estradiol (BE; Ferticare Benzoato Sincronização®, MSD Saúde Animal, Brasil), 0,25 mg de GnRH (Fertagyl®, MSD Saúde Animal, Brasil) e um implante vaginal de progesterona (P4; CIDR®, Zoetis, Brasil); no D7, recebem 0,53 mg de prostaglandina F2 α (PGF2 α ; Ciosin®, MSD Saúde Animal, Brasil); no D9, recebem outra dose de 0,53 de PGF2 α , 500 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Folligon®, MSD Saúde Animal, Brasil), 0,5 mg de cipionato de estradiol (CE; Ferticare Ovulação®, MSD Saúde Animal, Brasil) e o implante vaginal de progesterona é removido; no D11 as vacas recebem a aplicação de GnRH (Fertagyl®, MSD Saúde Animal, Brasil) e é realizada a IATF.

5.4. MANEJO REPRODUTIVO COM O USO DA TE

5.4.1. Doadoras de embrião (TE-*in vivo*) e de oócitos (TE-*in vitro*)

As vacas doadoras de embrião são selecionadas pela predição do seu mérito genético por meio de um programa terceirizado de avaliação genética (Clarifide®, Zoetis, Brasil) e também por conformação e produção de leite, e podem estar em lactação ou no período seco. Os animais selecionados são divididos em grupos e são protocolados a cada 60 dias em média. Para a TE-*in vivo* é realizado protocolo de superovulação (SOV) para a coleta de embriões, enquanto que para a TE-*in vitro* não são realizados protocolos de superovulação e as vacas passam pelo procedimento de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU – *ovum pick-up*) em dias aleatórios do ciclo estral.

O protocolo de SOV utilizado para a produção de embriões na TE-*in vivo* consiste em: em dia aleatório do ciclo estral (D0), as vacas recebem 50 mg de progesterona injetável (P4i; Afisterone®, Hertape Saúde e Bem Estar Animal, Brasil), implante auricular de norgestomet [dois para vacas em lactação (6 mg) e um para vacas em período seco (3 mg); Crestar®, MSD Saúde Animal, Brasil], 2 mg de benzoato de estradiol (Fertilcare Benzoato Sincronização®, MSD Saúde Animal, Brasil). No D4, iniciam-se as aplicações de hormônio folículo estimulante para o tratamento de superovulação (FSH, 500 UI para vacas em lactação e 250 UI para vacas em período seco; Pluset®, Hertape Saúde e Bem-Estar Animal, Brasil). Em vacas em lactação, o tratamento tem início no D4 à tarde e termina no D7 pela manhã, enquanto que em vacas em período seco, o tratamento tem início no D4 pela manhã e termina no D6 à tarde. A aplicação é realizada em doses decrescentes, a cada 12 horas, por três dias. Concomitantemente com as duas últimas aplicações de FSH as vacas recebem 0,53 mg de PGF2 α (Ciosin®, MSD Saúde Animal, Brasil), e 12 horas após a última aplicação recebem uma dose de gonadotrofina eCG (500 UI para vacas em lactação e 400 UI para vacas em período seco; Folligon®, MSD Saúde Animal, Brasil). Após 12 horas da aplicação do eCG os implantes são removidos.

Para indução de ovulação é realizada a aplicação de GnRH (Fertagyl®, MSD Saúde Animal, Brasil) 24 ou 12 horas após a remoção do implante para vacas em

lactação e para vacas em período seco, respectivamente. São realizadas duas IA, 12 e 24 horas após a aplicação de GnRH, em ambas as categorias. Seis dias e meio após a primeira IA é realizada a coleta, após uma avaliação reprodutiva por palpação retal de cada doadora quanto ao útero (assimetria e consistência) e ovários [tamanho (N = noz – 3 cm, G = ovo de galinha – 3 a 7 cm e GA = ovo de ganso – 7 a 8 cm) e número de folículos (FL) e de corpos lúteos (CL) presentes] (BUSH; WABERSKI, 2007), e a coleta só é realizada em animais que apresentam mais de dois CL.

Figura 3. Protocolos de superovulação (SOV) com inseminação artificial em tempo fixo (IATF) para produção de embriões *in vivo* para vacas Holandesas em lactação (A) e em período seco (B).

A

B

5.4.2. Coleta, rastreamento e envasamento de embriões *in vivo*

O procedimento de coleta, rastreamento e envasamento de embriões *in vivo* é realizado por um único Médico Veterinário (M.V. Carlos Alberto Rodrigues) de uma empresa de transferência de embriões (SAMVET®, São Carlos, São Paulo, Brasil). Após a realização do protocolo de SOV e da avaliação das doadoras, as vacas que apresentaram mais de dois CL passaram pelo procedimento de coleta de embriões não cirúrgico (GONÇALVES; GREGORY; RODRIGUES, 1987). Após a coleta, os embriões são mantidos em placas de cultura de células contendo meio de manutenção (TQC®, AB Tecnologia, Nutricell, Brasil) durante a avaliação embrionária realizada com auxílio de um esteriomicroscópio (SMZ 645, Nikon, Japão) em aumento de cinquenta vezes (RODRIGUES et al., 2010). A avaliação é feita de acordo com o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (ROBERTSON; NELSON, 1998) para a classificação do estágio de desenvolvimento e do grau de qualidade dos embriões. Com relação ao estágio de desenvolvimento, inicialmente são classificados em fertilizados [viáveis (mórula - M, blastocisto inicial - Bi, blastocisto - BL e blastocisto expandido - BE) ou degenerados (D)] e não fertilizados (NF), e com relação ao grau de qualidade, são classificados em graus de 1 a 3 (1 = massa celular esférica em pelo menos 85% intacta, simétrica e homogênea; 2 = massa celular irregular em conformação e cor moderadamente e em pelo menos 50% intacta; e 3 = massa celular irregular em conformação e cor consideravelmente e em pelo menos 25% intacta), como descrito em (VIEIRA et al., 2014a).

Os embriões classificados como viáveis podem ser transferidos à fresco [envasados em palhetas de 0,25 mL (IMV, França) e mantidos em temperatura ambiente (25°C) até o momento da transferência] ou podem ser congelados para posterior transferência. Como descrito em (RODRIGUES et al., 2010), são selecionados para o congelamento embriões classificados como M, Bi e BL em graus 1 e 2. No processo de congelamento os embriões são envasados em palhetas de 0,25 mL (IMV, França) com etileno glicol TQC® (AB Technology, Nutricell, Brasil) e o congelamento é realizado inicialmente em uma máquina automática (TK 2000®, programa p1-01, BOV/E/O1, TK e Nutricell, Brasil) e posteriormente as palhetas são transferidas para botijões com nitrogênio líquido à -196°C, onde permanecem até o momento em que serão descongelados para a transferência.

5.4.3. Aspiração folicular (OPU) e produção de embriões *in vitro*

O procedimento de OPU é realizado por um Médico Veterinário de uma empresa especializada (Fininvitro®, Bauru, São Paulo, Brasil). Para a realização do procedimento, as vacas recebem anestesia epidural com 2% de cloridrato de lidocaína (Lidovet®, Bravet, Brasil) e o períneo é higienizado com água e álcool em concentração de 70%. É utilizado um ultrassom com transdutor convexo de 5 MHz e é acoplado a ele uma agulha de aspiração conectada em um sistema de vácuo (Watanabe Tecnologia Aplicada – Cravinhos, São Paulo, Brasil), mantido à pressão de 100mmHg e a agulha usada contém diâmetro de 18-gauge x 2-inch (0,9 x 50mm; Terumo Europe NV – Bélgica). Os folículos aspirados permanecem em um tubo contendo 15 mL de solução Dulbecco PBS (DPBS; Nutricell Nutrientes Celulares – Campinas, São Paulo, Brasil) contendo 1% de soro fetal bovino (SFB; Gibco Life Technologies – Grand Island, Nova York, Estados Unidos da América) e 5000 UI/mL de heparina (Parinex, Hipolabor – Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil) à 35-37°C.

No laboratório de campo, outro Médico Veterinário da mesma empresa é responsável pelo procedimento de seleção de oócitos. Os oócitos são recuperados com o uso de um filtro de 75µm (Watanabe Tecnologia Aplicada) e DPBS com 1% de SFB. Os oócitos são lavados em solução DPBS com 1% de SFB à 37°C e avaliados em esteriomicroscópio em aumento de oito a vinte vezes. Os oócitos são classificados em graus de acordo com o número de camadas de células do complexo cúmulos oophorus (1 = contendo mais de três camadas compactadas, 2 = contendo pelo menos uma camada, 3 = desnudos e 4 = atresícos, com sinais de degeneração e descartados). Os oócitos de graus 1 a 3 são mantidos em meio de maturação *in vitro* (MIV) e transportados para um laboratório de produção *in vitro* de embriões (Bioembryo Biotecnologia da Reprodução Animal – Bauru, São Paulo, Brasil – até 2015 e Reproll – Lins, São Paulo, Brasil – a partir de 2016).

O meio de MIV é composto de tampão de bicarbonato TCM-199 (Gibco Life Technologies) suplementado com 10% de SFB, 50 µg/mL de estradiol (17β Estradiol; Sigma-Aldrich Chemical Co.), 22 µg/mL de piruvato de sódio e 50 µg/mL de gentamicina. Os oócitos recuperados de cada vaca foram cultivados por 24 horas em 100 µL de meio de MIV sob óleo mineral (D'Altomare – São Paulo, São Paulo, Brasil)

à 39°C em atmosfera com 5% de CO₂ com ar umidificado. Após as 24 horas, os oócitos são lavados e mantidos em 100 µL de meio de fertilização *in vitro* (FIV) contendo solução de Tyrode com piruvato-lactato-albumina suplementado com 10 µg/mL de heparina, 22 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de gentamicina e 6 mg/mL de solução BSA livre de ácidos graxos e solução PHE (2µM de penicilina, 1µM de hipotaurina e 0,25µM de epinefrina). Para o procedimento de FIV, as palhetas de sêmen são descongeladas por 30 segundos em temperatura de 35°C e o sêmen é depositado em gradiente Percoll em concentração de 90 a 45% preparado com meio de lavagem de sêmen (meio de Tyrode modificado) e centrifugado à 320 x g por 30 minutos para separar o plasma seminal dos espermatozoides móveis. Cada gota de fertilização recebe 5 µL de espermatozoides e as gotas com oócitos e espermatozoides são incubadas por 18 a 20 horas à 38,5°C em atmosfera com 5% de CO₂ com ar umidificado.

Preconiza-se o uso de sêmen sexado na produção de embriões *in vitro*, mas para a produção de embriões *in vivo* a fazenda faz uso de sêmen convencional.

Após aproximadamente 18 horas os zigotos são retirados das células do cúmulus oophorus por pipetagem mecânica no meio de Tyrode e são cocultivados em uma monocamada de células do cumulus que permaneceu aderida na superfície da placa durante a MIV. O meio de MIV é substituído com meio de CR2aa suplementado com 2% de SFB e 30 mg/mL de BSA para cultivo de embriões *in vitro* (CIV) em 100 µL de meio de CIV à 39°C em atmosfera com 5% de CO₂ com ar umidificado por 48 a 72 horas. Durante o primeiro (dia 3 de cultivo) e segundo (dia 5 de cultivo) *feeding*, 50 µL são substituídos por novo meio. A taxa de clivagem é avaliada após 3 dias de CIV (número de zigotos clivados pelo número de oócitos cultivados) e a taxa de blastocisto após 7 dias de CIV (número de blastocistos pelo número de oócitos cultivados). Os procedimentos foram descritos de acordo com (VIEIRA et al., 2016).

5.4.4. Receptoras de embrião (TE-*in vivo* e TE-*in vitro*)

As vacas receptoras de embrião podem ser selecionadas de duas formas: para transferência de embriões após observação de estro (TE) ou para transferência de embriões em tempo fixo (TETF). Para a TE, as vacas são avaliadas de 6 a 8 dias após serem observadas em estro, e para a TETF é realizado protocolo que consiste em: no D0 as vacas recebem um implante auricular de norgestomet (Crestar®, MSD Saúde Animal, Brasil) e 2 mg de BE (Fertilcare Benzoato Sincronização®, MSD Saúde Animal, Brasil); no D8 o implante é removido e as vacas recebem 400 UI de eCG (Folligon®, MSD Saúde Animal, Brasil), 0,53 mg de PGF2 α (Ciosin®, MSD Saúde Animal, Brasil) e 1 mg de CE (Fertilcare Ovulação®, MSD Saúde Animal, Brasil); no D17 é realizada a TETF com a aplicação de GnRH (Fertagyl®, MSD Saúde Animal, Brasil).

Em ambos os casos, no dia da transferência de embriões (7, 8 ou 9 dias após a detecção do estro ou no D17 após o protocolo de TETF), as receptoras são avaliadas por palpação retal quanto à presença de CL, e apenas as receptoras que apresentam pelo menos um CL recebem um embrião.

Figura 4. Protocolos de transferência de embrião após observação de estro (TE) ou de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) para vacas Holandesas em lactação, para embriões *in vivo* produzidos de vacas em lactação ou em período seco.

Figura 5. Protocolos de transferência de embrião após observação de estro (TE) ou de transferência de embriões em tempo fixo (TETF) para vacas Holandesas em lactação, para embriões produzidos *in vitro*.

5.4.5. Transferência de embriões (TE-*in vivo* e TE-*in vitro*)

Foram utilizados na TE embriões produzidos à fresco ou após descongelamento, com predominância de embriões frescos para a TE-*in vivo* (a informação sobre o uso de embriões frescos ou congelados não consta nos dados do sistema analisado). Os embriões produzidos *in vitro* foram todos transferidos à fresco.

No momento da TE, as receptoras receberam anestesia epidural com 2% de cloridrato de lidocaína (Lidovet®, Bravet, Brasil), 0,1 mg de GnRH e os embriões foram transferidos pelo método não cirúrgico de inovulação embrionária no corno uterino ipsilateral ao CL presente avaliado (no caso de CL em ambos os ovários, no corno uterino com o ovário em que o CL foi melhor avaliado).

5.5. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação foi realizado pelo mesmo Médico Veterinário, tanto para a IA como para a TE. Aos 30 dias de gestação é realizado um diagnóstico inicial por ultrassonografia transretal (Aloka SSD 500 com transdutor linear 5 MHz, Japão), em que é considerada gestante a vaca com a presença de vesícula embrionária e embrião com batimentos cardíacos. A gestação é confirmada por palpação retal aos 60 dias de gestação, em que é considerada gestante a vaca com assimetria entre os cornos uterinos pela detecção de vesícula amniótica.

5.6. MANEJO DA PROGÊNIE

As fêmeas gestantes (tanto de IA como de TE) em período próximo ao estimado para a parição são encaminhadas ao setor da maternidade, onde são observadas desde os primeiros sinais de parição, para que os partos sejam sempre acompanhados. A fazenda faz uso de uma ficha de parição, em que são anotadas informações sobre o parto tais como: local onde foi realizado, horário de início e término, facilidade ao parto (FP; natimorto, induzido, normal e auxiliado) e se a vaca apresentou retenção de anexos fetais (RAF; sim ou não). Ainda, é feita uma análise do colostro em quantidade e qualidade, com o uso de bolas de colostrômetro (MS Colostro balls®, Suprivet, Brasil).

Com relação ao recém-nascido, também são anotadas as informações sobre peso ao nascimento, quantidade e qualidade de colostro ingerido, e horário de fornecimento do colostro. Preconiza-se que todas as fêmeas recebam ao menos quatro litros de colostro de ótima a excelente qualidade nas primeiras oito horas de vida. As fêmeas são criadas em instalações individuais elevadas do chão, forradas de feno, e permanecem na mesma instalação por cerca de 85 dias. Posteriormente, as bezerras passam a ser criadas em grupos de animais e recebem água e alimento concentrado *ad libitum*, sendo destinadas ao setor de criação de novilhas com cerca de 10 meses, onde permanecem até o período de pré-parto.

5.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A base de dados empregada neste estudo foi estruturada com informações retrospectivas de 35044 vacas que receberam IA, TE-*in vivo* ou TE-*in vitro*, e de 5071 bezerras da raça Holandesa provenientes dessas biotecnologias, com nascimentos registrados entre os anos de 2013 e 2018. A base de dados final continha 34 variáveis e aproximadamente 220.000 informações. Todas as análises foram realizadas utilizando o software *Statistical Analysis System* (SAS, Version 9.4 for Windows; SAS Inst., Cary, NC) pacote *Enterprise Guide* (v 7.1).

Análise de variáveis contínuas como duração da gestação da receptora, informação genômica, peso ao nascimento, peso ao desmame, idade à mortalidade, idade à primeira cobertura, idade à concepção, produção total de leite na primeira e segunda lactação e informação genômica foram realizadas por regressão multivariada utilizando o procedimento *MIXED*. A normalidade dos resíduos dos modelos foi testada por meio de histogramas, gráfico de resíduos estudentizados e do teste de *Shapiro-Wilk* utilizando o procedimento *UNIVARIATE*. Todos os valores foram expressos em média±EPM (erro padrão médio).

Análise de variáveis binárias como risco de retenção de anexos fetais foram realizadas por regressão logística multivariada utilizando o procedimento *GLIMMIX* ajustando para distribuição *Binomial* - função *link = Logit*. A *Odds Ratio* ajustada (OR) e o intervalo de confiança de 95% (IC) foram devidamente calculados. Os valores foram expressos em porcentagem (%).

No modelo inicial foram analisadas os efeitos das variáveis classificatórias como biotecnologia (IA, TE-*in vivo*, TE-*in vitro*), ano da concepção da receptora (2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018), touro (111 touros utilizados), tecnologia do sêmen (convencional ou sexado), estação do ano na concepção e nascimento (primavera, verão, outono, inverno), tipo de parto (normal ou auxiliado), assim como as interações. As variáveis foram removidas por eliminação *backward*, com base no critério estatístico de *Wald* quando $P > 0,20$. O modelo estatístico final incluiu biotecnologia (IA, TE-*in vivo*, TE-*in vitro*), ano da concepção da receptora (2013, 2014, 2015, 2016, 2017, 2018) e interação biotecnologia*ano. Estação do ano na concepção e tecnologia do sêmen foram incluídos como efeito aleatório. Para determinar as diferenças foi utilizado o teste *post*

hoc de *Tukey*. A significância estatística foi considerada ao nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$).

Variáveis de performance reprodutiva como risco de prenhez aos 30 dias, risco de prenhez aos 60 dias, risco de perda gestacional, risco de abortos e de nascimentos foram realizadas por modelos lineares generalizados utilizando o procedimento *GENMOD* ajustando para distribuição *Binomial*. Para determinar as diferenças foi utilizado o teste *post hoc* de *Tukey*. A significância estatística foi considerada ao nível de 5% de probabilidade ($P \leq 0,05$). Os valores foram expressos em porcentagem (%).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. DESEMPENHO REPRODUTIVO DE VACAS HOLANDESAS EM LACTAÇÃO SUBMETIDAS À IA, TE-*IN VIVO* OU TE-*IN VITRO*

6.1.1. Índices reprodutivos

De acordo com os resultados apresentados (Tabela 2), foi possível analisar para cada biotecnologia as taxas anuais de fertilidade [taxa de gestação aos 30 dias (TG 30), taxa de gestação aos 60 dias (TG 60), taxa de perda gestacional entre 30 e 60 dias (TPG), taxa de abortamento entre 60 dias e o nascimento (TA) e taxa de nascimento (TN)] nos anos de 2013 a 2018.

Tabela 2. Taxa de gestação aos 30 dias (TG 30), taxa de gestação aos 60 dias (TG 60), taxa de perda gestacional entre 30 e 60 dias (TPG), taxa de abortamento (TA) e taxa de nascimento (TN) de vacas Holandesas em lactação submetidas à IA (n=21.706), TE-*in vivo* (n=9.588) ou TE-*in vitro* (n=3.754) entre os anos de 2013 a 2018.

		TG 30 (%)	TG 60 (%)	TPG (%)	TA (%)	TN (%)
2013	IA	31,8 ^b (823/2588)	23,6 ^b (611/2588)	25,7 ^a (212/823)	19,0 (116/611)	76,6 (468/611)
	TE- <i>in vivo</i>	39,7 ^a (769/1936)	30,8 ^a (597/1936)	22,3 ^a (172/769)	20,7 (124/597)	73,3 (437/596)
	TE- <i>in vitro</i>	29,6 ^b (151/509)	21,8 ^b (111/509)	26,4 ^a (40/151)	20,7 (23/111)	72,1 (80/111)
2014	IA	32,6 ^b (913/2799)	25,7 ^a (720/2799)	21,1 ^b (193/913)	20,8 (150/720)	73,0 (525/719)
	TE- <i>in vivo</i>	38,7 ^a (793/2049)	28,8 ^a (591/2049)	25,4 ^a (202/793)	24,7 (146/591)	68,3 (401/587)
	TE- <i>in vitro</i>	25,9 ^c (142/548)	18,6 ^b (102/548)	28,1 ^a (40/142)	32,3 (33/102)	62,8 (64/102)
2015	IA	30,5 ^b (914/2995)	22,2 ^b (665/2995)	27,2 ^a (249/914)	23,9 (159/665)	69,5 (462/665)
	TE- <i>in vivo</i>	39,3 ^a (944/2400)	27,6 ^a (663/2400)	29,8 ^a (281/944)	26,3 (174/663)	67,0 (444/662)
	TE- <i>in vitro</i>	26,9 ^b (120/446)	18,3 ^b (82/446)	31,6 ^a (38/120)	21,6 (18/82)	72,3 (59/82)
2016	IA	30,8 ^b (1388/4505)	22,6 ^b (1019/4505)	26,6 ^a (369/1388)	22,8 (232/1019)	68,1 (693/1018)
	TE- <i>in vivo</i>	38,8 ^a (748/1927)	26,9 ^a (519/1927)	30,6 ^a (229/748)	25,3 (131/519)	66,3 (344/518)
	TE- <i>in vitro</i>	57,5 ^a (19/33)	45,4 ^a (15/33)	21,0 ^a (4/19)	25,0 (4/16)	66,7 (10/15)
2017	IA	34,5 ^c (1553/4499)	23,9 ^b (1076/4499)	30,8 ^a (477/1553)	25,5 (274/1076)	70,1 (754/1075)
	TE- <i>in vivo</i>	39,9 ^b (396/990)	29,1 ^a (289/990)	27,0 ^a (107/396)	28,5 (82/289)	62,2 (179/288)
	TE- <i>in vitro</i>	50,1 ^a (259/515)	33,6 ^a (174/515)	32,9 ^a (85/259)	32,4 (56/174)	60,1 (104/173)
2018	IA	31,1 ^b (1344/4320)	21,5 ^b (929/4320)	30,8 (415/1344)	29,2 (272/929)	67,5 (628/930)
	TE- <i>in vivo</i>	34,6 ^{ab} (99/286)	20,6 ^b (59/286)	40,4 (40/99)	35,6 (21/59)	59,3 (35/59)
	TE- <i>in vitro</i>	41,2 ^a (702/1703)	28,4 ^a (484/1703)	31,1 (218/702)	23,5 (114/484)	71,2 (344/483)
Valor de P	Biotech	P<0,0001	P<0,0001	P<0,0001	P=0,01	P=0,01
	Ano	P<0,0001	P<0,0001	P=0,14	P=0,03	P=0,03
	Biotech*Ano	P<0,0001	P<0,0001	P=0,03	P=0,20	P=0,20

Figura 6. Taxa de gestação aos 30 dias (TG 30; A); Taxa de gestação aos 60 dias (TG 60; B) de vacas Holandesas em lactação submetidas à IA (n=21.706), TE-*in vivo* (n=9.588) ou TE-*in vitro* (n=3.754) entre os anos de 2013 a 2018.

Para a variável TG 30 (Tabela 2 e Figura 6A) houve interação biotécnica e ano ($P < 0,0001$). Verificou-se que a TE-*in vitro* apresentou menor eficiência do que IA e TE-*in vivo* nos anos de 2013 a 2015, entretanto apresentou maior eficiência nos anos de 2016 a 2018. A TG 30 para TE-*in vivo* se manteve superior a IA durante todos os anos analisados.

A TG 60 (Tabela 2 e Figura 6B) se comportou de forma similar, e também se verificou interação biotécnica e ano ($P < 0,0001$) para essa variável. A TE-*in vitro* apresentou menor eficiência do que TE-*in vivo* nos anos de 2013 a 2015. Entretanto, nos

anos de 2016 e 2017 essa diferença não foi verificada e, em 2018, a TE-*in vitro* apresentou maior eficiência que a TE-*in vivo*. A TE-*in vivo* foi superior a IA em todos os anos, exceto nos anos de 2014 e 2018, nos quais não foram encontradas diferenças entre essas biotecnologias.

Os resultados encontrados no presente estudo evidenciam que de 2013 a 2015 a P/TE dos embriões produzidos *in vivo* foi maior do que a P/IA, o que corrobora com estudos previamente publicados (DEMETRIO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2007; STEWART et al., 2011). Entretanto, nesse período, a P/IA foi maior do que a P/TE quando comparada com dos embriões produzidos *in vitro*. No entanto, quando os dados foram analisados para o período compreendido entre 2016 e 2018, a P/TE-*in vivo* e a P/TE-*in vitro* foram superiores quando comparadas com a P/IA. Esses dados podem ser explicados pela contínua evolução tecnológica da produção *in vitro* de embriões (BARUSELLI et al., 2020). Verificou-se, também, a mudança do laboratório responsável pela produção *in vitro* de embriões da fazenda a partir de 2016, o que pode ter colaborado positivamente no aumento da P/TE-*in vitro*. Ainda, os resultados do presente estudo para taxa gestacional aos 30 dias são similares aos previamente reportados na literatura. Estudos apontam taxas com o uso da IA em torno de 29% e com o uso da TE-*in vitro* em torno de 37% (embriões vitrificados) e 38% (embriões frescos) (SARTORI et al., 2016). Em outro estudo, as taxas de concepção aos 30 dias com o uso da IA variam entre 23 e 29% e com o uso da TE-*in vivo* entre 37 e 41% (BARUSELLI et al., 2011).

Taxas de concepção aos 30 dias foram similares para TE-*in vivo* e TE-*in vitro* em estudos anteriores (BARUSELLI et al., 2018b; BOUSQUET et al., 1999; VIEIRA et al., 2014b), diferentemente do que foi encontrado nos resultados do presente experimento. Apesar de a fazenda utilizar sêmen sexado para a TE-*in vitro* e sêmen convencional para a TE-*in vivo*, estudos demonstram que a menor produção de embriões devido ao uso de sêmen sexado acontece prioritariamente na produção *in vivo*, sendo esse efeito minimizado na produção *in vitro* de embriões (RIGO et al., 2013; SOARES et al., 2011). Diferentemente dos relatos apontados na literatura, esses efeitos não estão sendo observados na comparação da P/TE de embriões produzidos *in vivo* ou *in vitro*.

Na comparação da eficiência reprodutiva de vacas Holandesas em lactação submetidas à IA, TE-*in vivo* ou TE-*in vitro* na Fazenda Agrindus de 1998 a 2018, nota-se que a TE-*in vitro*, que foi introduzida na fazenda em 2011, aumentou a P/TE a partir

de 2014 e substituiu a técnica de produção de embriões *in vivo* em 2019 (BARUSELLI et al., 2020). Os dados do presente estudo corroboram com os apresentados na literatura e suportam a evolução na eficiência da técnica de produção *in vitro* de embriões com o passar dos anos.

Figura 7. Taxa de perda gestacional entre 30 e 60 dias (TPG) de vacas Holandesas em lactação submetidas à IA (n=21.706), TE-*in vivo* (n=9.588) ou TE-*in vitro* (n=3.754) entre os anos de 2013 a 2018.

Para a variável TPG (Tabela 2 e Figura 7) também houve interação entre biotécnica e ano ($P = 0,03$). A IA, a TE-*in vivo* e a TE-*in vitro* apresentaram taxas similares para os anos de 2013 a 2017 (exceto em 2014). No ano de 2018 a taxa de perda foi maior para a TE-*in vivo* quando comparada com a IA e com a TE-*in vitro*, mas o valor de P não foi significativo para esse ano. Os dados do presente estudo evidenciaram taxas similares de perda gestacional entre as diferentes biotécnicas, com efeito significativo apenas para o ano de 2014 (a IA apresentou TPG inferior a TE-*in vivo* e a TE-*in vitro*). Entretanto, nos outros anos não foram verificadas diferenças significativas para perda gestacional entre as diferentes biotécnicas. De acordo com dados da literatura, as taxas são menores para a IA (BARUSELLI et al., 2011), similarmente ao que foi identificado nos anos 2014, 2015 e 2018. No mesmo estudo, os autores evidenciaram que as taxas de perda gestacional entre 30 e 60 dias variam entre 16 e 19% para a IA, e entre 18 a 23% para a TE-*in vivo* (BARUSELLI et al., 2011). Em outro estudo, as taxas de perda gestacional entre 30 e 60 dias para a IA estão em torno de 14%, similar valor para a TE-*in vitro* (8, para embriões vitrificados e 13%, para embriões frescos) (SARTORI et al., 2016). SARTORI et al., (2006), comparando IA

com a TE-*in vivo* para as taxas de concepção aos 30 dias (35 x 40%, respectivamente) e perda gestacional entre 30 e 60 dias (18 e 26%, respectivamente), não evidenciaram diferenças estatísticas, diferentemente do que foi encontrado nos resultados do presente estudo.

Figura 8. Taxa de abortamento (TA) por biotécnica (A1) e por ano (B1); Taxa de nascimento (TN) por biotécnica (A2) e por ano (B2) de vacas Holandesas em lactação submetidas à IA (n=21.706), TE-*in vivo* (n=9.588) ou TE-*in vitro* (n=3.754) entre os anos de 2013 a 2018.

Para as variáveis TA e TN (Tabela 2 e Figura 8) não houve interação entre biotécnica e ano ($P = 0,20$). Verificou-se efeito significativo de biotécnica ($P=0,01$). Gestações provenientes de TE-*in vivo* apresentaram maior taxa de abortamento [26,8% (2.570/9.588)] quando comparadas com a IA [23,5% (5.101/21.706)]. Entretanto, a TE-*in vitro* [26,4% (992/3.754)] não diferiu da TE-*in vivo* e da IA. Vacas Holandesas gestantes de TE-*in vivo* apresentaram menor taxa de nascimento [66,1% (2.718/9.588)] quando comparadas com a IA [70,8% (5.020/21.706)]. Entretanto, a TE-*in vitro* [67,5% (969/3.754)] não diferiu da TE-*in vivo* e da IA.

Também se verificou efeito de ano ($P=0,03$) para essas variáveis. A taxa de abortamento aumentou e a taxa de nascimento diminuiu com o passar dos anos devido a dificuldades de manejo enfrentadas pela fazenda durante os anos relatados. Houve maior lotação de animais nas instalações e foram identificados problemas sanitários no rebanho. Ambos os problemas foram identificados e devidamente controlados. A taxa de abortamento de 2013 [20,1% (1.012/5.033)] foi inferior à de 2017 [28,8% (1.730/6.004)] e de 2018 [30,0% (1.893/6.309)], com taxas intermediárias observadas em 2014 [25,9% (1.398/5.396)], 2015 [23,9% (1.396/5.841)] e 2016 [24,9% (1.610/6.465)]. Consequentemente, a taxa de nascimento de 2013 [74,0% (1.319/5.033)] foi inferior à de 2017 [64,1% (1.539/6.004)] e de 2018 [66,0% (1.472/6.309)], com taxas intermediárias observadas em 2014 [68,0% (1.413/5.396)], 2015 [69,6% (1.410/5.841)] e 2016 [67,1% (1.554/6.465)]. No presente estudo a taxa de abortamento aumentou com o passar dos anos para todas as biotécnicas e foi superior para a TE-*in vivo* do que para a IA. Similar aos dados de literatura (SARTORI et al., 2016), as taxas de abortamento são maiores para TE do que para IA. Entretanto, no presente estudo a taxa de abortamento para TE-*in vitro* não diferiu da IA e da TE-*in vivo*. Dados semelhantes foram verificados para taxa de nascimento.

6.1.2. Duração da gestação, facilidade ao parto e retenção de anexos fetais

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, houve interação biotécnica e o ano de avaliação (2013 a 2018) para duração da gestação (DG). Devido ao reduzido número de observações levantados na propriedade para as variáveis facilidade ao parto (FP) e retenção de anexos fetais (RAF) nos anos de 2013 e 2014 não foi avaliar a interação biotécnica*ano para essas variáveis. Nesse caso, foi feita apenas avaliação estatística para verificar o efeito de biotécnica sem levar em consideração o ano (Tabela 3).

Tabela 3. Duração da gestação (DG), facilidade ao parto (FP) e retenção de anexos fetais (RAF) de vacas Holandesas em lactação submetidas à IA, TE-*in vivo* ou TE-*in vitro* entre os anos de 2013 a 2018.

	IA	TE- <i>in vivo</i>	TE- <i>in vitro</i>	Valor de P		
				Biotec	Ano	Biotec*Ano
DG (dias)	275,1±0,10 (n=3.759)	274,5±0,23 (n=822)	273,9±0,28 (n=490)	P=0,10	P<0,0001	P<0,0001
FP (%)	33,5 ^a (n=3.467)	22,5 ^b (n=129)	13,2 ^c (n=288)	P<0,0001	-	-
RAF (%)	13,5 (n=3.467)	14,7 (n=129)	17,4 (n=288)	P=0,14	-	-

Figura 9. Duração da gestação (DG) de vacas Holandesas em lactação submetidas à IA, TE-*in vivo* ou TE-*in vitro* entre os anos de 2013 a 2018.

Para a variável DG (Tabela 3 e Figura 9) houve interação biotécnica e ano ($P < 0,0001$). No ano de 2013, a IA apresentou menor DG (275,1±0,23 dias) quando comparada com a TE-*in vivo* (276,3±0,36 dias) e a TE-*in vitro* (277,1±0,85 dias).

Entretanto, em 2014 a IA apresentou valor intermediário ($274,9 \pm 0,24$ dias), sendo inferior a TE-*in vitro* ($277,4 \pm 0,91$ dias) e superior a TE-*in vivo* ($273,7 \pm 0,23$ dias). Em 2015 a DG para bezerras provenientes de IA ($276,1 \pm 0,24$ dias) foi superior da DG de bezerras provenientes de TE-*in vivo* ($273,7 \pm 0,55$ dias), e a TE-*in vitro* não diferiu entre ambas ($275,1 \pm 1,44$ dias). Em 2016 não houve diferença significativa entre as biotécnicas para DG, e em 2017 a IA ($274,6 \pm 0,23$ dias) e TE-*in vivo* ($275,7 \pm 0,65$ dias) tiveram duração de gestação superior a TE-*in vitro* ($273,1 \pm 0,57$ dias). Em 2018, apesar da IA ($274,3 \pm 0,23$ dias) se manter com duração superior a TE-*in vitro* ($273,1 \pm 0,36$ dias), a TE-*in vivo* não diferiu entre as duas biotécnicas ($273,5 \pm 1,01$ dias). Verificou-se que os valores de DG foram diminuindo com o passar dos anos: 2013 ($275,5 \pm 0,19$ dias; $n=814$), 2014 ($274,7 \pm 0,21$ dias; $n=828$), 2015 ($275,5 \pm 0,23$ dias; $n=812$), 2016 ($275,1 \pm 0,24$ dias; $n=840$), 2017 ($274,6 \pm 0,21$ dias; $n=781$) e 2018 ($273,9 \pm 0,19$ dias; $n=996$). Esses dados são indicativos de que os efeitos de ano interferiram com mais intensidade na duração da gestação do que os efeitos de biotecnologia.

De acordo com a literatura, a duração da gestação de vacas Holandesas varia de 276 a 280 dias (ANDERSEN; PLUM, 1965; NORMAN et al., 2009), e pode ser afetada por diversos fatores, como idade da vaca (primíparas apresentam menor duração) e temperatura ambiental (menor duração associada às estações mais quentes (ANDERSEN; PLUM, 1965). Ainda, a duração da gestação afeta o desempenho produtivo e reprodutivo das vacas (maiores índices de retenção de anexos fetais, metrite e descarte, e menores taxas de prenhez para vacas com gestação abaixo ou acima da média) e de sua progênie (maiores índices de mortalidade pós parto e descarte, e menores taxas de prenhez à primeira IA, também para vacas com gestação abaixo ou acima da média; VIEIRA-NETO et al., 2017). Devido à inúmeros fatores genéticos e ambientais que podem alterar a duração da gestação, entretanto, não se recomenda selecionar ou descartar animais com base nesse indicador (NORMAN et al., 2009).

Verificou-se efeito de biotecnologia para FP ($P < 0,0001$). Foi observado maior facilidade de parto para os bezerros nascidos de TE-*in vitro* quando comparados com os bezerros nascidos de IA e TE-*in vivo*. Esse resultado pode ser explicado pelo uso de sêmen sexado na TE-*in vitro*, resultando em maior nascimento de fêmeas (normalmente menores e mais leves do que machos) e, dessa forma, em partos com maior facilidade sem necessidade de auxílio. Para a variável RAF, por outro lado, não houve diferença estatística entre as diferentes biotécnicas ($P = 0,14$). Esse resultado demonstra que mesmo com diferentes porcentagens de auxílio durante o parto conforme as

biotecnologias empregadas, as vacas tiveram mesmo comportamento após o parto com relação a eliminação de anexos fetais. Foram realizados levantamentos identificando como fatores de risco para retenção de placenta distocia, natimortos, abortos, hipocalcemia pós-parto, parto gemelar e menor duração de gestação (HOSSEIN-ZADEH; ARDALAN, 2011), sem apresentar o uso de diferentes biotécnicas como um dos fatores que podem influenciar essa variável.

O fator mais importante correlacionado ao indicador de facilidade ao parto é o peso ao nascimento do bezerro (NAAZIE; MAKARECHIAN; BERG, 1989; UNALAN, 2009). Existem relatos de poucos efeitos da duração da gestação com facilidade de parto (HANSEN et al., 2004). Essas informações são importantes para a eficiência produtiva, visto que problemas durante o parto podem levar à redução no desempenho da bezerra nascida. Estudos evidenciaram maior mortalidade neonatal e menor performance reprodutiva em bezerras nascidas de partos distócicos (HOSSEIN-ZADEH, 2014; JOHANSON; BERGER, 2003; LOMBARD et al., 2007). Bezerros com menores pesos ao nascimento apresentam menores taxas de distocia (TAKAHASHI et al., 2001), com consequência de menores índices de partos auxiliados. Estudos relataram que o uso de embriões congelados resultou em aumento na dificuldade ao parto e maior peso ao nascimento, quando comparado com embriões transferidos à fresco (UNALAN, 2009). Em concordância, outros estudos também relataram que vacas que receberam embriões tiveram maiores duração da gestação, dificuldade ao parto e retenção de anexos fetais, quando comparadas com vacas que receberam IA (BONILLA et al., 2014). Os resultados do presente estudo diferem da literatura. Para a duração da gestação houve interação biotecnologia*ano, e dessa forma não podemos afirmar que houve efeito de biotecnologia. Entretanto, para a facilidade de parto foi observado que vacas que receberam IA tiveram a maior porcentagem de partos auxiliados, mas não houve diferença entre as biotécnicas para a retenção de anexos fetais. Devido à menor porcentagem de partos auxiliados de gestações provenientes da TE-*in vitro*, os resultados identificados podem ser explicados em parte pela evolução tecnológica da produção de embriões nos últimos anos.

6.2. DESEMPENHO REPRODUTIVO E PRODUTIVO DA PROGÊNIE DE FÊMEAS HOLANDESAS PRODUZIDAS POR IA, TE-*IN VIVO* OU TE-*IN VITRO*

Avaliando os indicadores da progênie (Tabela 4), foi possível avaliar os efeitos da biotécnica, do ano e da interação entre ambos para as variáveis informação genômica (IG), mortalidade do nascimento ao desmame (MN-D), peso ao nascimento (PN), peso ao desmame (PD), idade à primeira cobertura (IP-COB), idade ao primeiro parto (IP-PAR) e produção total de leite na primeira (PLT-1) e segunda (PLT-2) lactações. Houve interação entre biotécnica e ano para IG, PN e PD, e houve diferença entre biotécnicas para PN e PD. Ainda, houve diferença entre anos para IG, PN, PD, IP-COB, IP-PAR e PLT-1. Tais resultados são indicativos de que não foi possível identificar efeitos das diferentes biotecnologias utilizadas nas performances das progênies. Esses dados diferem da literatura, que explicam possíveis diferenças pelo fato de que embriões produzidos *in vitro* podem diferir de embriões produzidos *in vivo* em termos de morfologia e expressão gênica (HANSEN, 2006, 2014).

Tabela 4. Informação genômica (IG), mortalidade do nascimento ao desmame (MN-D), peso ao nascimento (PN), peso ao desmame (PD), idade à primeira cobertura (IP-COB), idade ao primeiro parto (IP-PAR) e produção total de leite na primeira (PLT-1) e segunda (PLT-2) lactação (em 305 dias) da progênie de bezerras Holandesas provenientes de IA, TE-*in vivo* ou TE-*in vitro* entre os anos de 2013 a 2018.

	IA	TE- <i>in vivo</i>	TE- <i>in vitro</i>	Valor de P		
				Biotec	Ano	Biotec*Ano
IG (L)	283,2±11,0 (n=1.665)	154,2±29,3 (n=233)	588,7±28,2 (n=385)	P=0,38	P<0,0001	P<0,0001
MN-D (%)	2,79 (n=3.759)	3,77 (n=822)	2,86 (n=490)	P=0,62	P=0,82	P=0,30
PN (kg)	37,7±0,08 ^b (n=3.489)	38,0±0,15 ^a (n=740)	38,0±0,24 ^a (n=460)	P<0,0001	P<0,0001	P=0,01
PD (kg)	101,1±0,13 ^a (n=3.489)	100,3±0,29 ^a (n=740)	102,9±0,32 ^a (n=460)	P=0,03	P<0,0001	P<0,0001
IP-COB (meses)	14,2±0,03 (n=2.901)	14,2±0,06 (n=706)	14,3±0,10 (n=201)	P=0,86	P<0,0001	P=0,27
IP-PAR (meses)	24,8±0,06 (n=2.134)	25,0±0,12 (n=525)	24,9±0,27 (n=86)	P=0,71	P=0,0002	P=0,49
PLT-1, 305d (L)	9.626,0±44,9 (n=2.065)	9.821,6±84,6 (n=516)	9.501,8±230,6 (n=85)	P=0,93	P<0,0001	P=0,56
PLT-2, 305d (L)	10.401,8±73,2 (n=1.011)	10.284,9±153,7 (n=258)	10.431,0±296,0 (n=39)	P=0,97	P=0,92	P=0,41

Figura 10. Informação genômica (IG) da progênie de fêmeas Holandesas provenientes de IA (n=1.665), TE-*in vivo* (n=233) ou TE-*in vitro* (n=385) entre os anos de 2013 a 2018.

Para a variável IG (Tabela 4 e Figura 10), houve interação entre biotécnica e ano ($P < 0,0001$). Em 2013, as fêmeas provenientes de IA tinham o mesmo mérito genético do que fêmeas provenientes de TE-*in vivo* e TE-*in vitro*. Entretanto, de 2014 a 2017 o mérito genético de fêmeas nascidas a partir das três biotécnicas foi semelhante. Durante esse período a fazenda buscava por doadoras com a maior produtividade de embriões, prioritariamente, pela necessidade de aumentar a eficiência reprodutiva do rebanho. Porém em 2018, verificou-se aumento significativo de mérito genético para a TE-*in vitro*, fato que pode ser explicado pela utilização do programa de melhoramento genético a partir da avaliação genômica dos animais implantado na propriedade desde 2017. Essa avaliação permitiu maior acurácia na seleção de doadoras, o que pode ser observado pela evolução genética com o passar dos anos. Recentemente, a incorporação de informação genômica em programas de melhoramento genético deve ajudar a melhorar a performance produtiva e reprodutiva de vacas em lactação (BACH, 2019).

Para a variável MN-D, não houve interação entre biotécnica e ano ($P = 0,30$), diferença entre os anos ($P = 0,82$) e nem diferença entre as biotécnicas ($P = 0,62$). O fato de a criação das bezerras acontecer de forma semelhante para todos animais, independente da biotécnica que a originou, pode explicar os resultados encontrados. Ainda, é um indicativo de que os possíveis efeitos epigenéticos não foram evidenciados no sentido de aumentar a mortalidade do nascimento ao desmame de bezerras originadas de TE-*in vitro*. Os resultados não corroboram com dados previamente

publicados (BONILLA et al., 2014; SCHMIDT et al., 1996; SIQUEIRA et al., 2017), que evidenciaram maior mortalidade neonatal em bezerros provenientes de TE-*in vitro*, justificado por fatores inerentes à produção *in vitro* de embriões. Entretanto, pesquisadores discutem que a evolução do desenvolvimento de técnicas de produção *in vitro* de embriões reduziu o risco de mortalidade neonatal e da síndrome do feto gigante (HOSHI, 2003), o que pode justificar a ausência de efeito da biotecnologia nas variáveis analisadas no presente estudo.

Figura 11. Peso ao nascimento (PN) da progênie de fêmeas Holandesas provenientes de IA (n=3.489), TE-*in vivo* (n=746) ou TE-*in vitro* (n=460) entre os anos de 2013 a 2018.

Para a variável PN (Tabela 4 e Figura 11) houve interação biotécnica e ano ($P = 0,01$), e também houve diferença entre biotécnicas ($P < 0,0001$) e ano ($P < 0,0001$). Na Figura 11, nota-se que em 2014 as bezerras provenientes de TE-*in vitro* nasceram mais pesadas do que as bezerras provenientes de IA e TE-*in vivo*. Entretanto, em 2013, 2015, 2016 e 2017 o PN não diferiu entre as biotecnologias. Em 2018 as bezerras provenientes de TE-*in vivo* e TE-*in vitro* foram mais pesadas do que bezerras provenientes de IA.

Os principais fatores que afetam o peso ao nascimento são raça e indicadores relacionados à progenitora, tais como idade, paridade, estrutura corporal (NAAZIE; MAKARECHIAN; BERG, 1989), e biotécnica reprodutiva utilizada (AGCA et al., 1998; HASLER et al., 1995). Trabalhos indicam que existe uma relação positiva entre duração da gestação e peso ao nascimento (ANDERSEN; PLUM, 1965). Entretanto, os resultados do presente estudo não corroboram com essas informações, visto que bezerras provenientes de IA apresentaram gestações mais longas e pesos inferiores,

quando comparadas às bezerras provenientes de TE-*in vivo* e TE-*in vitro*. Trabalhos evidenciaram que a TE-*in vitro* origina bezerros com maior peso ao nascimento, quando comparados à bezerros provenientes de IA ou TE-*in vivo* (BONILLA et al., 2014; FARIN; FARMER, 2010). Portanto, os dados do presente estudo contradizem dados da literatura que apontam para problemas ao nascimento de bezerros provenientes de TE-*in vitro* devido ao maior peso. Essas diferenças podem ser devido à evolução tecnológica dos meios de produção *in vitro* de embriões.

Figura 12. Peso ao desmame (PD) da progênie de fêmeas Holandesas provenientes de IA (n=3.489), TE-*in vivo* (n=740) ou TE-*in vitro* (n=460) entre os anos de 2013 a 2018.

Para a variável PD (Tabela 4 e Figura 12) também houve interação entre biotécnica e ano ($P < 0,0001$). No ano de 2013 bezerras provenientes de TE-*in vivo* foram mais pesadas do que bezerras provenientes de IA e de TE-*in vitro*. Ainda, verificou-se diferença entre as biotécnicas no ano de 2015. Nesse ano, as bezerras nascidas de TE-*in vivo* apresentaram maior PD do que as bezerras nascidas de TE-*in vitro* e de IA. Entretanto, não foram evidenciadas diferenças entre as biotecnologias para o PD nos anos de 2014, 2016, 2017 e 2018. Nota-se que o peso ao desmame foi aumentando ao longo dos anos, indicando melhora nos processos de criação de bezerras. A melhoria manejo das bezerras pode reduzir os possíveis impactos negativos da DG e do PN no desenvolvimento dos animais. Sendo assim, no presente estudo, apesar das progênes de TE-*in vitro* apresentarem maior peso ao nascimento nos anos de 2014 e 2018 quando comparada com IA, não houve diferença no peso ao desmame entre TE-*in vitro* e IA, o que corrobora com dados da literatura (SIQUEIRA et al., 2017). Inclusive,

foi demonstrado na literatura que bezerros mais leves não tiveram nenhum efeito adverso com relação ao desempenho e à produtividade futuras, sendo o efeito do touro mais importante nesse sentido (SWALI; WATHES, 2006).

Para a variável IP-COB não houve interação biotécnica e ano ($P = 0,27$) e nem diferença entre biotécnicas ($P = 0,86$). Houve apenas diferença para ano ($P < 0,0001$), com variações ao longo do período estudado. Comparando 2013 ($14,5 \pm 0,07$ meses; $n=655$) com 2018 ($14,2 \pm 0,05$ meses; $n=970$) não foi verificada diferença. De forma similar, para a variável IP-PAR não houve interação entre biotécnica e ano ($P = 0,49$) e nem diferença entre biotécnicas ($P = 0,71$). Diferentemente do que ocorreu com IP-COB, em que a variação entre anos não foi linear, para IP-PAR a variação foi linear, sendo que o mês ao primeiro parto foi maior em 2013 ($24,8 \pm 0,10$ meses; $n=605$)^a e menor em 2017 ($23,5 \pm 0,13$ meses; $n=149$)^b. A idade ao primeiro parto menor em 2017, quando comparado com 2013, ilustra melhoria no sistema de criação de novilhas. O manejo de novilhas visando o primeiro parto entre 23 e 24,5 meses está associado ao maior retorno econômico do sistema de produção de leite (ETTEMA; SANTOS, 2004). Adicionalmente, novilhas que parem nessa idade têm melhores resultados de fertilidade e de produção de leite futura (COOKE et al., 2013). Os resultados de IP-COB e de IP-PAR apresentaram efeito de ano e podem ser explicados por melhorias no manejo da propriedade (alimentação, ambiência, sanidade, entre outros) durante os anos de levantamento de dados do presente estudo.

Para a variável PLT-1 não houve interação biotécnica e ano ($P = 0,56$) e nem diferença entre biotécnicas ($P = 0,93$). Houve diferença para ano ($P < 0,0001$), com variação linear de maior produção de leite em 2013 ($9.999,7 \pm 78,9$ kg; $n=619$)^a, com produções intermediárias em 2014 ($9.793,1 \pm 68,5$ kg; $n=635$)^b, 2015 ($9.380,63 \pm 72,5$ kg; $n=641$)^b e 2016 ($9.892,4 \pm 86,3$ kg; $n=643$)^b, para menor produção em 2017 ($7.571,6 \pm 201,8$ kg; $n=128$)^c. A menor produção de leite ilustrada em 2017 pode ser explicada pelo menor número de animais com a primeira lactação concluída na avaliação (foram utilizadas no presente estudo somente as lactações finalizadas), visto que a fazenda está melhorando geneticamente seu rebanho e aumentando a produção de leite ao longo dos anos. Ainda, houve maior lotação de animais nas instalações e foram identificados problemas sanitários no rebanho, e ambas as constatações foram identificadas e devidamente controladas, conforme foi abordado nos resultados sobre taxa de abortamento. Diversos fatores podem atuar na produção da primeira lactação, tais como enfermidades, consumo de matéria seca após o desmame e peso corporal ao

primeiro serviço (HEINRICHS; HEINRICHS, 2011). Além disso, a criação das bezerras e os resultados anteriormente apresentados também podem explicar a ausência de diferença estatística entre as biotécnicas para os indicadores avaliados em novilhas. Sendo assim, independente da biotécnica, bezerras nascidas de IA, TE-*in vivo* e TE-*in vitro* se comportaram de forma semelhante para as variáveis IP-COB, IP-PAR e PLT-1.

Para a variável PLT-2, não houve interação biotécnica e ano ($P = 0,41$), diferença entre anos ($P = 0,92$) e nem diferença entre as biotécnicas ($P = 0,97$). Dessa forma, nota-se que não houve diferença entre as biotécnicas para a avaliação de produção de leite nas primeira e segunda lactações. Esse resultado pode ser justificado pelo resultado da avaliação genômica, o qual indicou que não houve diferença do potencial genético entre as biotécnicas, com potencial genético de produção aumentando com o passar dos anos. Portanto, pelo fato de os animais apresentarem o mesmo padrão genético e estarem inseridos no mesmo sistema de produção, os dados do presente estudo são indicativos de que a biotecnologia utilizada para a produção das fêmeas em lactação não interferiu na produção de leite da progênie.

Existem relatos que evidenciam efeito do crescimento da bezerra durante o período de aleitamento, a taxa de concepção, a idade ao primeiro parto e a presença de aborto afetam a sobrevivência das matrizes até a terceira lactação (BACH, 2011). Há divergência nos estudos que analisam a produção de leite na primeira lactação de bezerras provenientes de TE-*in vitro*, visto que foi demonstrado que esses animais produziram menos leite na primeira lactação quando comparadas com bezerras de IA e TE-*in vivo*. Os estudos apontam o envolvimento de efeitos epigenéticos influenciando a produção dos animais produzidos *in vitro* (FLEMING et al., 2018; SIQUEIRA et al., 2017). Entretanto, outros estudos demonstraram que não houve diferença na produtividade de indivíduos oriundos de embriões produzidos *in vitro* (BONILLA et al., 2014), em concordância com os resultados encontrados neste estudo. Os dados deste estudo corroboram com pesquisas anteriores, que evidenciaram que bezerras produzidas a partir de embriões não apresentaram diferenças de produtividade quando comparadas com bezerras produzidas a partir de inseminação artificial (RASMUSSEN et al., 2013).

O entendimento sobre epigenética deve ajudar a melhorar a performance reprodutiva de vacas em lactação, visto que ao menos 80% de regiões não codificadas de DNA participam do controle da expressão gênica (FATIMA; MORRIS, 2013). Estudiosos relatam que não existe informação em bovinos sobre a influência paterna nos marcadores epigenéticos. Entretanto, devido à larga utilização de biotécnicas

reprodutivas essa influência, quando estudada, terá maior impacto do que a avaliação materna (BACH, 2019). Efeitos externos podem ter influência na progenitora (nos casos da IA ou da TE-*in vivo*) ou diretamente no embrião (no caso da TE-*in vitro*), programando o desenvolvimento embrionário pré-implantação (HANSEN, 2015). Ainda, a dinâmica da epigenética é importante durante a maturação oocitária com reflexos no desenvolvimento embrionário durante o período de pré-implantação (RIVERA; ROSS, 2013).

Estudos recentes demonstram que os principais efeitos observados após o nascimento de animais provenientes da produção *in vitro* de embriões (aumento de mortalidade, alteração em crescimento e redução na performance produtiva) são devidos à alterações na programação fetal (SIQUEIRA et al., 2019). O genoma não contém informação suficiente para regular todo o subsequente desenvolvimento, sendo necessário um equilíbrio entre genoma e epigenética para postularem o futuro fenótipo do indivíduo (MOSS, 1981).

A eficiência produtiva de uma vaca em lactação não depende apenas do seu genótipo e do ambiente no qual está inserida, mas também das alterações epigenéticas que podem ocorrer durante esse período. O conhecimento da origem dessas alterações pode guiar intervenções que visem melhorar a eficiência da produção animal (HANSEN; SIQUEIRA, 2017). Metabólitos presentes no fluido uterino nos primeiros sete dias após o estro afetam o desenvolvimento embrionário no período de pré-implantação, e o conhecimento de seu conteúdo é a base para estudos de melhores condições para cultura embrionária (TRÍBULO et al., 2019). Neste estudo, entretanto, não foram identificados efeitos fenotípicos (desempenho reprodutivo e produtivo) que podem ser relacionados a alterações epigenéticas em fêmeas Holandesas. Tendo em vista que existem controvérsias com os resultados do presente estudo com a literatura, novos estudos são necessários para confirmar o possível efeito da epigenética no desenvolvimento dos animais e na produção de leite.

7. CONCLUSÕES

Sobre as **variáveis avaliadas nas progenitoras** submetidas à IA, *TE-in vivo* ou *TE-in vitro*:

- Taxa de gestação:

TE-in vivo e TE-in vitro X IA: A *TE-in vivo* apresentou maiores taxas de gestação do que a IA em todo o período experimental. Entretanto, a *TE-in vitro* manteve-se superior à IA apenas nos últimos anos avaliados. Dessa forma, a hipótese inicial do presente estudo de que a *TE-in vivo* e *TE-in vitro* apresentam taxas de gestação superiores à IA foi parcialmente confirmada.

TE-in vivo X TE-in vitro: A *TE-in vitro* apresentou menores taxas de gestação do que a *TE-in vivo* nos primeiros anos analisados. Entretanto, a *TE-in vitro* apresentou maiores taxas de gestação no último ano avaliado. Dessa forma, a hipótese inicial do presente estudo de que a *TE-in vivo* apresenta taxas de gestação superiores à *TE-in vitro* não foi confirmada.

- Perda gestacional:

TE-in vivo e TE-in vitro X IA: A taxa de perda gestacional foi maior para a TE do que para a IA apenas durante um ano do período avaliado. A taxa de abortamento foi superior para *TE-in vivo* do que para IA, e a *TE-in vitro* não diferiu entre as biotécnicas avaliadas. Dessa forma, a hipótese inicial do presente estudo de que a *TE-in vivo* e *TE-in vitro* apresentam perda gestacional superior à IA foi parcialmente confirmada.

TE-in vivo X TE-in vitro: Não houve maior perda gestacional para *TE-in vitro* do que para *TE-in vivo*. Dessa forma, a hipótese inicial do presente estudo de que a *TE-in vivo* apresenta perda gestacional inferior do que a *TE-in vitro* não foi confirmada.

Sobre as **variáveis avaliadas na progênie** produzida por IA, TE-*in vivo* ou TE-*in vitro*:

- Desempenho reprodutivo e produtivo:

TE-*in vivo* e TE-*in vitro* X IA (*mérito genético*): Não houve diferença na desempenho reprodutivo e na produtividade das fêmeas provenientes de IA, TE-*in vivo* e TE-*in vitro*, diferentemente do que foi estabelecido na hipótese inicial do presente estudo. Porém, apesar de não haver diferença na informação genômica entre as bezerras nascidas das diferentes biotécnicas nos primeiros anos do estudo, verificou-se superioridade genética para bezerras nascidas de TE-*in vitro* no ano de 2018.

TE-*in vivo* X TE-*in vitro* (*efeitos epigenéticos*): Não houve diferença entre a produtividade de fêmeas provenientes de TE-*in vivo* e TE-*in vitro*. Sendo assim, os possíveis fatores epigenéticos ocorridos durante a maturação oocitária, a fertilização e o período de desenvolvimento embrionário inicial de fêmeas de TE-*in vitro* não foram suficientes para alterar seu desempenho reprodutivo e produtivo futuros. Dessa forma, a hipótese inicial do presente estudo não foi confirmada.

De forma geral, não houve diferença no desempenho reprodutivo de vacas da raça Holandesa em lactação submetidas à IA, TE-*in vivo* e TE-*in vitro*. Ainda, não houve diferença no desempenho reprodutivo e produtivo das progênes geradas por essas biotecnologias em fêmeas Holandesas em lactação.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS

As biotécnicas reprodutivas devem ser eficazes e facilmente aplicáveis a campo para aumentar a produtividade e o retorno econômico das fazendas. O uso da TE é preconizada visando o aumento do ganho genético dos rebanhos e como alternativa à problemas reprodutivos resultantes especialmente de estresse térmico em vacas Holandesas em lactação. Ainda, o uso da técnica de produção *in vitro* de embriões maximiza a eficiência da produção de embriões com a possibilidade de uso de sêmen sexado, visando maior produção de fêmeas e alto valor genético e produtivo.

Recentemente foram realizados estudos científicos que apontaram possíveis efeitos epigenéticos, que ocorrem nos processos iniciais do desenvolvimento embrionário, na produtividade das progenitoras. Os mecanismos epigenéticos promovem pequenas alterações químicas na sequência de DNA (metilação do DNA, modificações em histonas e a atuação dos RNA não codificantes), mudando a acessibilidade à cromatina e gerando mudanças na leitura dos genes, com alterações no fenótipo dos indivíduos. A epigenética promove modificações das funções genéticas que são herdadas, mas não alteram a sequência do DNA do indivíduo. Essas modificações não-genéticas são transmitidas de uma geração para outra.

No presente estudo não foram constatados efeitos de possíveis alterações epigenéticas ocorridas no período maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial na eficiência reprodutiva da progenitora e no desempenho produtivo e reprodutivo da progênie. Possivelmente, as alterações epigenéticas ocorridas, principalmente nos embriões produzidos *in vitro*, não foram suficientes para alterar o desempenho reprodutivo e produtivo das futuras gerações.

Os dados do presente estudo suportam a utilização dessas biotecnologias da reprodução para o melhoramento genético e produtivo dos rebanhos, sem evidenciar possíveis efeitos epigenéticos negativos. As biotécnicas reprodutivas apresentam significativos avanços com o passar dos anos, devido a melhorias nos procedimentos de produção de embriões *in vitro*. Além disso, a associação dessas tecnologias com a avaliação genômica aumenta seu impacto na produtividade da fazenda. No presente estudo, a melhora na eficiência da produção de embriões *in vitro* pode ser devido à mudança no laboratório responsável pela produção na fazenda a partir de 2016.

9. REFERÊNCIAS

ABDALLA, H.; ELGHAFGHUF, A.; ELSOHABY, I.; NASR, M. A. F. Maternal and non-maternal factors associated with late embryonic and early fetal losses in dairy cows. **Theriogenology**, v. 100, p. 16–23, 2017.

ABIEC. Perfil da pecuária no Brasil. **Beef Report**, 2019.

ADAMIAK, S. J.; MACKIE, K.; WATT, R. G.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Impact of nutrition on oocyte quality: cumulative effects of body composition and diet leading to hyperinsulinemia in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 5, p. 918–926, 2005.

AGCA, Y.; MONSON, R. L.; NORTHEY, D. I.; MAZNI, O. A.; SCHAEFER, D. M.; RUTLEDGE, J. J. Transfer of fresh and cryopreserved IVP bovine embryos: normal calving, birth weight and gestation lengths. **Theriogenology**, n. 98, p. 147–162, 1998.

AL-KATANANI, Y. M.; DROST, M.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J.; KRININGER, C. E.; BLOCK, J.; THATCHER, W. W.; 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**, v. 58, p. 171–182, 2002.

AMBROSE, J. D.; DROST, M.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; THATCHER, M. J. Efficacy of timed embryo transfer with fresh and frozen *in vitro* produced embryos to increase pregnancy rates in heat-stressed dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 82, p. 2369–2376, 1999.

ANDERSEN, H.; PLUM, M. Gestation length and birth weight in cattle and buffaloes: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 48, n. 9, p. 1224–1235, 1965.

ARCHBOLD, H.; SHALLOO, L.; KENNEDY, E.; PIERCE, K. M.; BUCKLEY, F. Influence of age, body weight and body condition score before mating start date on the pubertal rate of maiden Holstein-Friesian heifers and implications for subsequent cow

performance and profitability. **Animal**, v. 6, n. 7, p. 1143–1151, 2012.

ASBIA. Relatório 2020. **Relatório anual 2020**, 2020.

BACCARELLI, A.; BOLLATI, V. Epigenetics and environmental chemicals. **Curr Opin Pediatr**, v. 21, n. 2, p. 243–251, 2009.

BACH, A. Associations between several aspects of heifer development and dairy cow survivability to second lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 1052–1057, 2011.

BACH, À. Effects of nutrition and genetics on fertility in dairy cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 1, p. 40–54, 2019.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SÁ FILHO, M. F.; NASSER, L. F.; RODRIGUES, C. A.; BÓ, G. A. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 67–74, 2010.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; MARTINS, C. M.; RODRIGUES, C. A.; BÓ, G. A. Timed embryo transfer programs for management of donor and recipient cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1583–1593, 2011.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; COLLI, M. H. A.; ELLIFF, F. M.; SÁ FILHO, M. F.; VIEIRA, L. M.; FREITAS, B. G. Timed artificial insemination: current challenges and recent advances in reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 558–571, 2017.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SÁ FILHO, M. F.; BÓ, G. A. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **Animal**, v. 12, n. 1, p. 45–52, 2018a.

BARUSELLI, P. S.; SOUZA, A. H.; SÁ FILHO, M. F.; MARQUES, M. O.; SALES, J. N. S. Genetic market in cattle (Bull, AI, FTAI, MOET and IVP): financial payback

based on reproductive efficiency in beef and dairy herds in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 247–255, 2018b.

BARUSELLI, P. S.; CATUSSI, B. L. C.; DE ABREU, L. A.; ELLIFF, F. M.; DA SILVA, L. G.; BATISTA, E. O. S. Challenges to increase the AI and ET markets in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 364–375, 2019.

BARUSELLI, P. S. Avaliação do mercado de IATF no Brasil. **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP**, v. 2019, 3ª edição, 2020.

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; VIEIRA, L. M.; SOUZA, A. H.; BÓ, G. A.; RODRIGUES, C. A. Use of embryo transfer to alleviate infertility caused by heat stress. **Theriogenology**, v.155, p. 1-11, 2020.

BARUSELLI, P. S.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. Cattle planned breeding: techniques and outcomes. **Research Gate - Technical Bulletin**, v. 001, p. 1–16, 2015.

BATISTA, E. O. S.; MACEDO, G. G.; SALA, R. V.; ORTOLAN, M. D. D. V.; SÁ FILHO, M. F.; DEL VALLE, T. A.; JESUS, E. F.; LOPES, R. N. V. R.; RENNÓ, F. P.; 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.

BATISTA, E. O. S.; GUERREIRO, B. M.; FREITAS, B. G.; SILVA, J. C. B.; VIEIRA, L. M.; FERREIRA, R. M.; REZENDE, R. G.; BASSO, A. C.; LOPES, R. N. V. R.; RENNÓ, F. P.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select Bos taurus (Holstein) and Bos indicus (Nelore) calves for in vitro embryo production. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 54, p. 1–9, 2016.

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, p. 5234–5242, 2010.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, v. 41, p. 1555–1569, 1994.

BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S.; CHESTA, P. M.; MARTINS, C. M. The timing of ovulation and insemination schedules in superstimulated cattle. **Theriogenology**, v. 65, p. 89–101, 2006.

BONILLA, L.; BLOCK, J.; DENICOL, A. C.; HANSEN, P. J. Consequences of transfer of an in vitro-produced embryo for the dam and resultant calf. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 1, p. 229–239, 2014.

BORCHARDT, S.; HAIMERL, P.; HEUWIESER, W. Effect of insemination after estrous detection on pregnancy per artificial insemination and pregnancy loss in a Presynch-Ovsynch protocol: A meta-analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 2248–2256, 2016.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. In vitro embryo production in the cow: An effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 59–70, 1999.

BUABAN, S.; DUANGJINDA, M.; SUZUKI, M.; MASUDA, Y.; SANPOTE, J.; KUCHIDA, K. Genetic analysis for fertility traits of heifers and cows from smallholder dairy farms in a tropical environment. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 7, p. 4990–4998, 2015.

BUSH, W.; WABERSKI, D. **Kunstliche Besamung bei Haus-und Nutztieren**. Stuttgart ed. Alemanha: 2007.

CAAMAÑO, J. N.; GÓMEZ, E.; TRIGAL, B.; MUÑOZ, M.; CARROCERA, S.; MARTÍN, D.; DÍEZ, C. Survival of vitrified invitro-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. **Theriogenology**, v. 83, n. 5, p. 881–890, 2015.

CAMARGO, L. S. A.; FREITAS, C.; DE SÁ, W. F.; DE MORAES, A. F.; SERAPIAO, R. V.; VIANA, J. H. M. Gestation length, birth weight and offspring gender ratio of in vitro-produced Gyr (*Bos indicus*) cattle embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 120, n. 1–4, p. 10–15, 2010.

CAVALCANTI, C. M.; CAMPELO, I. S.; SILVA, M. M. A. S.; ALBUQUERQUE, J. V. S.; MELO, L. M.; FREITAS, V. J. F. Efficiency of different incubation systems for the in vitro production of bovine embryos. **Zygote**, v. 26, p. 314–318, 2018.

CEPEA. Boletim do leite. **Boletim do leite CEPEA ESALQ/USP**, v. 295, p. 8, 2020.

CHEN, Z.; HAGEN, D. E.; WANG, J.; ELSIK, C. G.; JI, T.; SIQUEIRA, L. G.; HANSEN, P. J.; RIVERA, R. M. Global assessment of imprinted gene expression in the bovine conceptus by next generation sequencing. **Epigenetics**, v. 11, n. 7, p. 501–516, 2016.

COLAZO, M. G.; MAPLETOFT, R. J. Pregnancy per AI in Holstein heifers inseminated with sexed semen after detected estrus or timed-AI. **Canadian Veterinary Journal**, v. 58, n. 4, p. 365–370, 2017.

DE SOUZA, D. K.; SALLES, L. P.; ROSA E SILVA, A. Aspects of energetic substrate metabolism of in vitro and in vivo bovine embryos. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 3, p. 191–197, 2015.

DE VRIES, A.; STEENHOLDT, C.; RISCO, C. A. Pregnancy rates and milk production in natural service and artificially inseminated dairy herds in Florida and Georgia. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 3, p. 948–956, 2005.

DE VRIES, M. J.; VEERKAMP, R. F. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 1, p. 62–69, 2000.

DEMETRIO, D. G. B.; SANTOS, R. M.; DEMETRIO, C. G. B.; VASCONCELOS, J. L. M. 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.

DESHMUKH, R. S.; OSTRUP, O.; STREJCEK, F.; VEJLSTED, M.; LUCAS-HAHN, A.; PETERSEN, B.; LI, J.; CALLESEN, H.; NIEMANN, H.; HYTTEL, P. Early aberrations in chromatin dynamics in embryos produced under in vitro conditions. **Cellular reprogramming**, v. 14, n. 3, p. 225–34, 2012.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 2, p. 260–267, 2008.

DO, V. H.; CATT, S.; AMAYA, G.; BATSIOKIS, M.; WALTON, S.; TAYLOR-ROBINSON, A. W. Comparison of pregnancy in cattle when non-vitrified and vitrified in vitro-derived embryos are transferred into recipients. **Theriogenology**, v. 120, p. 105–110, 2018.

DOHERTY, R.; O’FARRELLY, C.; MEADE, K. G. Epigenetic regulation of the innate immune response to LPS in bovine peripheral blood mononuclear cells (PBMC). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 154, n. 3–4, p. 102–110, 2013.

DONOVAN, G. A.; BENNETT, F. L.; SPRINGER, F. S. Factors associated with first service conception in artificially inseminated nulliparous Holstein heifers. **Theriogenology**, v. 60, n. 1, p. 67–75, 2003.

DOS SANTOS, E. C.; VARCHETTA, R.; DE LIMA, C. B.; ISPADA, J.; MARTINHO, H. S.; FONTES, P. K.; NOGUEIRA, M. F. G.; GASPARRINI, B.; MILAZZOTTO, M. P. The effects of crocetin supplementation on the blastocyst outcome, transcriptomic and metabolic profile of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 123, p. 30–36, 2019.

DROST, M.; AMBROSE, J. D.; TCHATCHER, M. J.; CANTRELL, C. K.; WOLFSDORF, K. E.; HASLER, J. F.; THATCHER W. W. Conception rates after artificial insemination or embryo transfer in lactating dairy cows during summer in Florida. **Theriogenology**, v. 52, n. 7, p. 1161–1167, 1999.

ELLIFF, F. M.; GUIMARAES, E. C.; FÉRES, L. F.; BAYEUX, B. M.; COLLI, M. H. A.; BARUSELLI, P. S. Effect of treatment with follicle-stimulating hormone on in vitro embryo production of Gyr (*Bos indicus*) calves, pubertal heifers and adult cows. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, p. 191, 2018.

EMBRAPA. Novos produtos e novas estratégias da cadeia do leite para ganhar competitividade e conquistar os clientes finais. **Anuario Leite 2019**, n. 35 art, p. 104, 2019.

ETTEMA, J. F.; SANTOS, J. E. P. Impact of Age at Calving on Lactation, Reproduction, Health, and Income in First-Parity Holsteins on Commercial Farms. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 8, p. 2730–2742, 2004.

FAO. Global agriculture towards 2050. **How to Feed the World 2050**, p. 46–58, 2009.

FARIN, C. E.; FARMER, W. T.; FARIN, P. W. Pregnancy recognition and abnormal offspring syndrome in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, p. 75–87, 2010.

FARIN, P. W.; PIEDRAHITA, J. A.; FARIN, C. E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 178–191, 2006.

FATIMA, A.; MORRIS, D. G. MicroRNAs in domestic livestock. **Physiological Genomics**, v. 45, n. 16, p. 685–696, 2013.

FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M. R.; FERRAZ, M. L.; ARAÚJO, A. B.; RODRIGUES, C. A.; WATANABE, Y. F.; VIREQUE, A. A.; JOAQUIM, D. C.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V.; BARUSELLI, P. S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2383–2392, 2011.

FLEMING, A.; ABDALLA, E. A.; MALTECCA, C.; BAES, C. F. Invited review: reproductive and genomic technologies to optimize breeding strategies for genetic

progress in dairy cattle. **Archives Animal Breeding**, v. 61, n. 1, p. 43–57, 2018.

FLEURY, P. D. C.; SANCHES, B. V.; CARDOSO, B. L.; BASSO, A. C.; ARNOLD, D. R.; TANNURA, J. H.; PEREIRA, M. H. C.; GAITKOSKI, D.; SENEDA, M. M. Comparison of pregnancy rates after fresh, vitrified or cryopreserved in vitro produced embryos for direct transfer. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 828 (abstract), 2014.

FODOR, I.; BAUMGARTNER, W.; ABONYI-TÓTH, ZS.; LANG, ZS.; ÓZSVÁRI, L. Associations between management practices and major reproductive parameters of Holstein-Friesian replacement heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 188, p. 114–122, 2018.

FORDE, N.; BELTMAN, M. E.; LONERGAN, P.; DISKIN, M.; ROCHE, J. F.; CROWE, M. A. Oestrous cycles in *Bos taurus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 124, n. 3–4, p. 163–169, 2011.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 20, p. 187–200, 1989.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1987, p. 223–230, 1989.

GONÇALVES, P. B. D.; GREGORY, R. M.; RODRIGUES, J. L. The efficiency of two nonsurgical techniques for bovine embryo recovery on days 6 and 7 of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 28, n. 1, p. 25–32, 1987.

GRANLEESE, T.; CLARK, S. A.; SWAN, A. A.; VAN DER WERF, J. H. J. Increased genetic gains in multi-trait sheep indices using female reproductive technologies combined with optimal contribution selection and genomic breeding values. **Animal Production Science**, v. 57, n. 10, p. 1984–1992, 2017.

GREEN, B. B.; KERR, D. E. Epigenetic contribution to individual variation in response

to lipopolysaccharide in bovine dermal fibroblasts. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 157, n. 1–2, p. 49–58, 2014.

GUERREIRO, B. M.; BATISTA, E. O. S.; VIEIA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETTO, A.; SILVEIRA, C. R. A.; BAYEUX, B. M.; DIAS, E. A. R.; MONTEIRO, F. M.; ACCORSI, M.; LOPES, R. N. V. R.; BARUSELLI, P. S. Plasma anti-Mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 49, p. 96–104, 2014.

HAMM, C. A.; COSTA, F. F. Epigenomes as therapeutic targets. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 151, p. 72–86, 2015.

HANSEN, M.; LUND, M. S.; PEDERSEN, J.; CHRISTENSEN, L. G. Gestation length in Danish Holsteins has weak genetic associations with stillbirth, calving difficulty, and calf size. **Livestock Production Science**, v. 91, n. 1–2, p. 23–33, 2004.

HANSEN, P. J. Realizing the promise of IVF in cattle — an overview. **Theriogenology**, v. 65, p. 119–125, 2006.

HANSEN, P. J. Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 752, p. 1–22, 2014.

HANSEN, P. J. Developmental programming in the preimplantation period: can it be exploited to enhance postnatal function in cattle? **Animal Reproduction**, v. 12, n. 3, p. 428–436, 2015.

HANSEN, P. J.; SIQUEIRA, L. G. B. Postnatal consequences of assisted reproductive technologies in cattle. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 490–496, 2017.

HASLER, J. F.; HENDERSON, W. B.; HURTHEN, P. J.; JIN, Z. Q.; MCCAULEY, A. D.; MOWER, S. A.; NEELY, B.; SHUEY, L. S.; STOKES, J. E.; TRIMMER, S. A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving

results. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 141–152, 1995.

HASLER, J. F. In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. **Human Reproduction**, v. 15, p. 47–58, 2000.

HASLER, J. F. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 152–169, 2014.

HEINRICHS, A. J.; HEINRICHS, B. S. A prospective study of calf factors affecting first-lactation and lifetime milk production and age of cows when removed from the herd. **Journal of Dairy Science**, v. 94, p. 336–341, 2011.

HOFFMAN, P. C.; FUNK, D. A. Applied dynamics of dairy replacement growth and management. **Journal of Dairy Science**, v. 75, n. 9, p. 2504–2516, 1992.

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 675–685, 2003.

HOSSEIN-ZADEH, N. G.; ARDALAN, M. Cow-specific risk factors for retained placenta, metritis and clinical mastitis in Holstein cows. **Veterinary Research Communications**, v. 35, p. 345–354, 2011.

HOSSEIN-ZADEH, N. G. Effect of dystocia on the productive performance and calf stillbirth in Iranian Holsteins. **Journal of Agricultural Science Technology**, v. 16, p. 69–78, 2014.

JOHANSON, J. M.; BERGER, P. J. Birth weight as a predictor of calving ease and perinatal mortality in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 11, p. 3745–3755, 2003.

KANIYAMATTAM, K.; BLOCK, J.; HANSEN, P. J.; DE VRIES, A. Comparison between an exclusive in vitro-produced embryo transfer system and artificial insemination for genetic, technical, and financial herd performance. **Journal of Dairy**

Science, v. 100, n. 7, p. 5729–5745, 2017.

KANIYAMATTAM, K.; BLOCK, J.; HANSEN, P. J.; DE VRIES, A. Economic and genetic performance of various combinations of in vitro-produced embryo transfers and artificial insemination in a dairy herd. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 2, p. 1540–1553, 2018.

KAWASHIMA, C.; FUKIHARA, S.; MAEDA, M.; KANEKO, E.; MONTROYA, C. A.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; MATSUNAGA, N.; KIDA, K.; MIYAKE, Y.; SCHAMS, D.; MIYAMOTO, A. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. **Reproduction Research**, v. 133, p. 155–163, 2007.

KAWASHIMA, C.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; KIDA, K.; MIYAMOTO, A. Nutritional factors that regulate ovulation of the dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 1, p. 10–16, 2012.

KIM, I.; JEONG, J. K. Risk factors limiting first service conception rate in dairy cows, and their economic impact. **Asian-Australas Journal Animal Science**, p. 1–21, 2018.

LARSON, L. L.; BALL, P. J. H. Regulation of estrous cycles in dairy cattle: A review. **Theriogenology**, v. 38, n. 2, p. 255–267, 1992.

LEROY, J. L. M. R.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 5, p. 623–632, 2008.

LOMANDER, H.; FROSSLING, J.; INGVARTSEN, K. L.; GUSTAFSSON, H.; SVENSSON, C. Supplemental feeding with glycerol or propylene glycol of dairy cows in early lactation-Effects on metabolic status, body condition, and milk yield. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 5, p. 2397–2408, 2012.

LOMBARD, J. E.; GARRY, F. B.; TOMLINSON, M.; GARBER, L. P. Impacts of dystocia on health and survival of dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 4, p. 1751–1760, 2007.

LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1594–1601, 2011.

LOPEZ, H.; SATTER, L. D.; WILTBANK, M. C. Relationship between level of milk production and estrous behavior of lactating dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 81, n. 3–4, p. 209–223, 2004.

MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. **Animal Reproduction**, v. 6, n. 1, p. 114–124, 2009.

MARINHO, L. S. R.; UNTURA, R. M.; MOROTTI, F.; MOINO, L. L.; RIGO, A. G.; SANCHES, B. V. Large-scale programs for recipients of in vitro -produced embryos. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 323–328, 2012.

MARTINS, C. M.; RODRIGUES, C. A.; VIEIRA, L. M.; MAPLETOFT, R. J.; BÓ, G. A. The effect of timing of the induction of ovulation on embryo production in superstimulated lactating Holstein cows undergoing fixed-time artificial insemination. **Theriogenology**, v. 78, p. 974–980, 2012.

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

MILAZZOTTO, M. P.; GOISSIS, M. D.; CHITWOOD, J. L.; ANNES, K.; SOARES, C. A.; ISPADA, J.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; ROSS, P. J. Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 83, n. 4, p. 324–336, 2016.

MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-Year Review: reproductive technologies in dairy science. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10314–10331, 2017.

MOSS, M. L. Genetics, epigenetics, and causation. **American Journal of Orthodontics**, v. 80, n. 4, p. 366–375, 1981.

NAAZIE, A.; MAKARECHIAN, R.; BERG, R. T. Factors influencing calving difficulty in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v. 67, n. 12, p. 3243–3249, 1989.

NICHOLAS, F. W.; SMITH, C. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. **Journal of Reproduction and Development**, v. 36, p. 341–353, 1983.

NORMAN, H. D.; WRIGHT, J. R.; KUHN, M. T.; HUBBARD, S. M.; COLE, J. B.; VANRADEN, P. M. Genetic and environmental factors that affect gestation length in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 2259–2269, 2009.

NORMAN, H. D.; HUTCHISON, J. L.; MILLER, R. H. Use of sexed semen and its effect on conception rate, calf sex, dystocia, and stillbirth of Holsteins in the United States. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 3880–3890, 2010.

NUMABE, T.; OIKAWA, T.; KIKUCHI, T.; HORIUCHI, T. Birth weight and birth rate of heavy calves conceived by transfer of in vitro or in vivo produced bovine embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 64, n. 1–2, p. 13–20, 2000.

OBEIDAT, Y.; CATANDI, G.; CARNEVALE, E.; CHICCO, A. J.; DEMANN, A.; FIELD, S.; CHEN, T. A multi-sensor system for measuring bovine embryo metabolism. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 126, p. 615–623, 2019.

PAIBOMESAI, M.; HUSSEY, B.; NINO-SOTO, M.; MALLARD, B. A. Effects of parturition and dexamethasone on DNA methylation patterns of IFN- γ and IL-4 promoters in CD4⁺ T-lymphocytes of Holstein dairy cows. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 77, n. 1, p. 54–62, 2013.

PAVANI, K.; CARVALHAIS, I.; FAHEEM, M.; CHAVEIRO, A.; REIS, F. V.; MOREIRA, F. Reproductive performance of Holstein dairy cows grazing in dry-summer subtropical climatic conditions: effect of heat stress and heat shock on meiotic

competence and in vitro fertilization. **Asian-Australas Journal Animal Science**, v. 28, n. 3, p. 334–342, 2015.

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. Use of sexed sorted semen for fixed-time artificial insemination or fixed-time embryo transfer of in vitro – produced embryos in cattle. **Theriogenology**, v. 86, p. 888–893, 2016.

PURSLEY, J. R.; MEE, M. O.; WILTBANK, M. C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF2 α and GnRH. **Theriogenology**, v. 44, n. 7, p. 915–923, 1995.

PUTNEY, D. J.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. **Theriogenology**, v. 31, n. 4, p. 765–778, 1989.

RASMUSSEN, S.; BLOCK, J.; SEIDEL, G. E.; BRINK, Z.; MCSWEENEY, K.; FARIN, P. W.; BONILLA, L.; HANSEN, P. J. Pregnancy rates of lactating cows after transfer of in vitro produced embryos using X-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 79, n. 3, p. 453–461, 2013.

RIGO, A. G.; PONTES, J. H. F.; SANCHES, B. V.; BASSO, A. C.; MEDANHA, M. F.; VIEIRA, L. M. Effect of bull in in vitro embryo production of Holstein cows with sexed or conventional semen. **Animal Reproduction**, v. 10, p. 496 (abstract), 2013.

RIVERA, R. M.; ROSS, J. W. Epigenetics in fertilization and preimplantation embryo development. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 113, n. 3, p. 423–432, 2013.

ROBERTSON, I.; NELSON, R. E. Certification and identification of the embryo. **Manual of the international embryo transfer society**, Eds D. A. STRINGFELLOW AND S. M. SEIDEL, p. 103.134, 1998.

ROCHE, J. F. Control and regulation of folliculogenesis - a symposium in perspective.

Reviews of Reproduction, v. 1, n. 1, p. 19–27, 1996.

RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; NICHI, M.; BÓ, G. A.; BARUSELLI, P. S. Artificial insemination and embryo transfer pregnancy rates in high production Holstein breeding under tropical conditions. **International Congress of Animal Reproduction**, v. 14, p. 396 (abstract), 2004.

RODRIGUES, C. A.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TEIXEIRA, A.; MANCILHA, R. F.; OLIVEIRA, M. E. F. Comparison of pregnancy rates after artificial insemination or embryo transfer in high producing repeat breeder Holstein cows. **Proceedings of the 21st Annual meeting brazilian embryo technology society**, Acta Sci Vet, v. 35, p. 1255 (abstract), 2007.

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**, v. 118, n. 2–4, p. 110–117, 2010.

SÁ FILHO, M. F.; AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; NICHI, M.; FOSADO, M.; CAMPOS FILHO, E. P.; BARUSELLI, P. S. Strategies to improve pregnancy per insemination using sex-sorted semen in dairy heifers detected in estrus. **Theriogenology**, v. 74, n. 9, p. 1636–1642, 2010.

SÁ FILHO, M. F.; MENDANHA, M. F.; SALA, R. V.; CARVALHO, F. J.; GUIMARAES, L. H. C.; BARUSELLI, P. S. Use of sex-sorted sperm in lactating dairy cows upon estrus detection or following timed artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, v. 143, n. 1–4, p. 19–23, 2013.

SALES, J. N. S.; NEVES, K. A. L.; SOUZA, A. H.; CREPALDI, G. A.; SALA, R. V.; FOSADO, M.; FILHO, E. C. P.; DE FARIA, M.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Timing of insemination and fertility in dairy and beef cattle receiving timed artificial insemination using sex-sorted sperm. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 427–435, 2011.

SALES, J. N. S.; IGUMA, L. T.; BATISTA, R. I. T. P.; QUINTAO, C. C. R.; GAMA,

M. A. S.; FREITAS, C.; PEREIRA, M. M.; CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3086–3099, 2015.

SANTOS, J. E. P.; JUCHEM, S. O.; CERRI, R. L. A.; GALVÃO, K. N.; CHEBEL, R. C.; THATCHER, W. W.; DEI, C. S.; BILBY, C. R. Effect of bST and Reproductive Management on Reproductive Performance of Holstein Dairy Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 868–881, 2004.

SANTOS, J. E. P. Implementation of reproductive programs in dairy herds. **Cattle Practice**, v. 16, p. 5-13, 2008.

SARTORI, R.; GUMEN, A.; GUENTHER, J. N.; SOUZA, A. H.; CARAVIELLO, D. Z.; WILTBANK, M. C. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 65, n. 7, p. 1311–1321, 2006.

SARTORI, R.; PRATA, A. B.; SANCHES, B. V.; PONTES, G. C. S.; VIANNA, J. H. M.; PONTES, J. H.; VASCONCELOS, J. L. M.; PEREIRA, M. H. C.; DODE, M. A. N.; MONTEIRO, P. L. J.; BARUSELLI, P. S. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 300–312, 2016.

SARTORI, R.; DODE, M. A. N. Morte embrionária na IA, TE, FIV e clonagem. **Biotecnologia da Reprodução em Bovinos**, 3º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, p. 175–194, 2008.

SARTORI, R.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2813–2822, 2002.

SCHMIDT, M.; GREVE, T.; AVERY, B.; BECKERS, J. F.; SULON, J.; HANSEN, H. B. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 46, n. 3, p. 527–539, 1996.

DA SILVA, L. G.; BAYEUX, B. M.; ELLIFF, F. M.; RODRIGUES, N. N.; MINGOTI, R. D.; CATUSSI, B. L. C.; MONTEIRO, F. M.; BARUSELLI, P. S. In vitro production and transfer of embryos from 12 and 24 months old Nellore heifers (*B. indicus*) treated or not with FSH. **Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society**, Acta Sci Vet, v. 16, n. 3, p. 586 (abstract), 2019.

SILVA, T. V.; LIMA, F. S.; THATCHER, W. W.; SANTOS, J. E. P. Synchronized ovulation for first insemination improves reproductive performance and reduces cost per pregnancy in dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 11, p. 7810–7822, 2015.

SINGH, K.; ERDMAN, R. A.; SWANSON, K. M.; MOLENAAR, A. J.; MAQBOOL, N. J.; WHEELER, T. T.; ARIAS, J. A.; QUINN-WALSH, E. C.; STELWAGEN, K. Epigenetic regulation of milk production in dairy cows. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 15, n. 1, p. 101–112, 2010.

SIQUEIRA, L. G. B.; DIKMEN, S.; ORTEGA, M. S.; HANSEN, P. J. Postnatal phenotype of dairy cows is altered by in vitro embryo production using reverse X-sorted semen. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 7, p. 5899–5908, 2017.

SIQUEIRA, L. G. B.; SILVA, M. V. G.; PANETTO, J. C.; VIANA, J. H. Consequences of assisted reproductive technologies for offspring function in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, p. 82–97, 2019.

SKINNER, M. K. Environmental epigenetics and a unified theory of the molecular aspects of evolution: A neo-Lamarckian concept that facilitates neo-Darwinian evolution. **Genome Biology and Evolution**, v. 7, n. 5, p. 1296–1302, 2015.

SOARES, J. G.; MARTINS, C. M.; CARVALHO, N. A. T.; NICACIO, A. C.; ABREU-SILVA, A. L.; CAMPOS FILHO, E. P.; TORRES JÚNIOR, J. R. S.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Timing of insemination using sex-sorted sperm in embryo production with *Bos indicus* and *Bos taurus* superovulated donors. **Animal Reproduction Science**, v. 127, n. 3–4, p. 148–153, 2011.

STEVENSON, J. L.; RODRIGUES, J. A.; BRAGA, F. A.; BITENTE, S.; DALTON, J.

C.; SANTOS, J. E. P.; CHEBEL, R. C. Effect of breeding protocols and reproductive tract score on reproductive performance of dairy heifers and economic outcome of breeding programs. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 9, p. 3424–3438, 2008.

STEVENSON, J. S.; BRITT, J. H. A 100-Year review: practical female reproductive management. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10292–10313, 2017.

STEWART, B. M.; BLOCK, J.; MORELLI, P.; NAVARETTE, A. E.; AMSTALDEN, M.; BONILLA, L.; HANSEN, P. J.; BILBY, T. R. Efficacy of embryo transfer in lactating dairy cows during summer using fresh or vitrified embryos produced in vitro with sex-sorted semen. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 7, p. 3437–3445, 2011.

SWALI, A.; WATHES, D. C. Influence of the dam and sire on size at birth and subsequent growth, milk production and fertility in dairy heifers. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1173–1184, 2006.

TAKAHASHI, M.; UEKI, A.; KAWAHATA, K.; GOTO, T. Relationships between the width of metacarpus or metatarsus and the birth weight in Holstein calves. **Journal of Reproduction and Development**, v. 47, n. 2, p. 105–108, 2001.

TEIXEIRA, A. A.; BARUSELLI, P. Impacto da inseminação artificial em tempo fixo na eficiência reprodutiva de vacas de leite de alta produção. **Tese (Mestrado em Reprodução Animal)** – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

THATCHER, W. W. A 100-Year review: historical development of female reproductive physiology in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10272–10291, 2017.

TILLARD, E.; HUMBLLOT, P.; FAYE, B.; LECOMTE, P.; DOHOO, I.; BOCQUIER, F. Postcalving factors affecting conception risk in Holstein dairy cows in tropical and sub-tropical conditions. **Theriogenology**, v. 69, n. 4, p. 443–457, 2008.

TRÍBULO, P.; BERNAL BALLESTEROS, B. H.; RUIZ, A.; TRIBULO, A.;

TRIBULO, R. J.; TRIBULO, H. E.; BÓ, G. A.; HANSEN, P.J. Consequences of exposure of embryos produced in vitro in a serum-containing medium to dickkopf-related protein 1 and colony stimulating factor 2 on blastocyst yield, pregnancy rate, and birth weight. **Journal of Animal Science**, v. 95, n. 10, p. 4407–4412, 2017.

TRÍBULO, P.; BALZANO-NOGUEIRA, L.; CONESA, A.; SIQUEIRA, L. G.; HANSEN, P. J. Changes in the uterine metabolome of the cow during the first 7 days after estrus. **Molecular Reproduction and Development**, v. 86, n. 1, p. 75–87, 2019.

TŠUIKO, O.; CATTEEUW, M.; ESTEKI, M. Z.; DESTOUNI, A.; PASCOTTINI, O. B.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; SMITS, K.; KURG, A.; SALUMETS, A.; D’HOOGHE, T.; VOET, T.; VAN SOON, A.; VERMEESCH, J. R. Genome stability of bovine in vivoconceived cleavage-stage embryos is higher compared to in vitro-produced embryos. **Human Reproduction**, v. 32, n. 11, p. 2348–2357, 2017.

UNALAN, A. Estimation of genetic parameters and correlations among some body measurements of holstein calves and effects of these measurements on calving difficulty. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 8, n. 8, p. 1589–1594, 2009.

UNDESA. World Urbanization Prospects 2018. **United Nations Department of Economic and Social Affairs**, 2018.

UNDESA. World prospects 2019. **United Nations Department of Economic and Social Affairs**, 2019.

URREGO, R.; RODRIGUEZ-OSORIO, N.; NIEMANN, H. Epigenetic disorders and altered gene expression after use of assisted reproductive technologies in domestic cattle. **Epigenetics**, v. 9, n. 6, p. 803–815, 2014.

VAN AMBURGH, M. E.; GALTON, D. M.; BAUMAN, D. E.; EVERETT, R. W.; FOX, D. G.; CHASE, L. E.; ERB, H. N. Effects of three prepubertal body growth rates on performance of Holstein heifers during first lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 2, p. 527–538, 1998.

VANROOSE, G.; DE KRUIF, A.; VAN SOOM, A. Embryonic mortality and embryo-pathogen interactions. **Animal Reproduction Science**, v. 60–61, p. 131–143, 2000.

VIANA, J. H. M. 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter of the 45th Annual Conference of IETS**, v. 36, p. 8–19, 2018.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 3, p. 476–481, 2017.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHAO, M. P.; CAMARGO, L. S. A. Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 1, 2012.

VIEIRA-NETO, A.; GALVÃO, K. N.; THATCHER, W. W.; SANTOS, E. P. Association among gestation length and health, production, and reproduction in Holstein cows and implications for their offspring. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 4, p. 3166–3181, 2017.

VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; MENDANHA, M. F.; SÁ FILHO, M. F.; SALES, J. N. S.; SOUZA, A. H.; SANTOS, J. E. P.; 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**, v. 82, n. 2, p. 204–212, 2014a.

VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETTO, A.; GUERREIRO, B. M.; SILVEIRA, C. R. A.; MOREIRA, R. J. C.; SÁ FILHO, M. F.; BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Superstimulation prior to the ovum pick-up to improve invitro embryo production in lactating and non-lactating Holstein cows. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 318–324, 2014b.

VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETTO, A.; GUERREIRO, B. M.; SILVEIRA, C. R. A.; FREITAS, B. G.; BRAGANÇA, L. G. M.; MARQUES, K. N. G.;

SÁ FILHO, M. F.; BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. **Theriogenology**, v. 85, n. 5, p. 877–886, 2016.

VISHWANATH, R. Artificial insemination: the state of the art. **Theriogenology**, v. 59, n. 2, p. 571–584, 2003.

WALKER, C. G.; LITTLEJOHN, M. D.; MEIER, S.; ROCHE, J. R.; MITCHELL, M. D. DNA methylation is correlated with gene expression during early pregnancy in *Bos taurus*. **Physiological Genomics**, v. 45, n. 7, p. 276–286, 2013.

WALSH, S. W.; MOSSA, F.; BUTLER, S. T.; BERRY, D. P.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; TEMPELMAN, R. J.; CARTER, F.; LONERGAN, P.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J. Heritability and impact of environmental effects during pregnancy on antral follicle count in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 7, p. 4503–4511, 2014.

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**, v. 123, n. 3–4, p. 127–138, 2011.

WIGHTMAN, W. P. D. Embryology, epigenetics and biogenetics. **Nature**, v. 177, 1956.

WILTBANK, M. .; PURSLEY, J. R. The cow as an induced ovulator: timed AI after synchronization of ovulation. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 170–185, 2014.

WILTBANK, M. C.; BAEZ, G. M.; GARCIA-GUERRA, A.; TOLEDO, M. Z.; MONTEIRO, P. L. J.; MELO, L. F.; OCHOA, J. C.; SANTOS, J. E. P.; SARTORI, R. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 239–253, 2016.

ZANGIROLAMO, A. F.; DA SILVA, N. C.; MOROTTI, F.; SENEDA, M. M. The impact of sanity on the fertility of cows submitted to reproductive biotechnics. **Revista**

Acadêmica: Ciência Animal, v. 15, n. 2, p. 91–98, 2017.

ZOETIS. Clarifide Holandês Informativo técnico, 2013.