



Principais desafios para a utilização de embriões na pecuária de precisão

Main challenges for the use of embryos in precision livestock farming

Anne Kemmer Souza¹, Marcelo Marcondes Seneda^{1*}

Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brasil.

¹Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, 86.057-970, Brasil.

*Tel: +55 43 33715622.

Resumo

A pecuária de precisão avança com a incorporação de biotecnologias reprodutivas, como a produção *in vitro* de embriões, visando à intensificação da produtividade e à disseminação de genética superior. Apesar dos avanços, as perdas gestacionais precoces representam um entrave significativo, impactando negativamente os índices econômicos e produtivos. Esta revisão teve como objetivo fornecer um melhor entendimento sobre os desafios na utilização de embriões na pecuária, assim como apresentar estratégias para reduzir a perda embrionária precoce. De forma específica, a seleção e classificação criteriosa do material genético, oócitos e embriões, e a seleção das receptoras tem demonstrado grande diferença nos resultados de gestação. Associado a isso, a atenção com os aspectos básicos, como o cuidado com reprodutor e o manejo sanitário auxiliam significativamente na melhoria da eficiência reprodutiva e minimizam as perdas embrionárias.

Palavras-chave: Bovinos, Classificação embrionária, Perdas gestacionais, Seleção receptoras, Transferência de embrião.

Abstract

Precision livestock farming is advancing with the incorporation of reproductive biotechnologies, such as in vitro embryo production, aiming at increasing productivity and disseminating superior genetics. Despite the advances, early pregnancy losses represent a significant obstacle, negatively impacting economic and productive indices. This review aimed to provide a better understanding of the challenges in the use of embryos in livestock farming, as well as to present strategies to reduce early embryonic loss. Specifically, the careful selection and classification of genetic material, oocytes and embryos, and the selection of recipients have shown a great difference in pregnancy results. Associated with this, attention to basic aspects, care of the breeder and sanitary and nutritional management significantly help to improve reproductive efficiency and minimize embryonic losses.

Keywords: Cattle, Embryo classification, Pregnancy losses, Recipient selection, Embryo transfer.

Introdução

A pecuária de precisão avança por meio de tecnologias e processos que controlem cada vez mais a criação de animais que tenham importância na economia e na subsistência global. A intensificação do processo de produção requer a incorporação de biotecnologias reprodutivas que permitam potencializar os recursos existentes. Nesse contexto, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem sido uma ferramenta estratégica para realizar a seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores (Steenefeld et al., 2024). Houve um grande progresso científico envolvendo embriões mamíferos, sendo a espécie bovina a maior beneficiada com este avanço tecnológico (Ferré et al., 2020). Contudo, as falhas reprodutivas precoces tem sido um desafio importante a qual afeta negativamente a indústria pecuária, impactando nos índices econômicos e conseqüentemente toda a cadeia produtiva.

Em escala global, calcula-se que as falhas na eficiência reprodutiva gerem perdas superiores a 1 bilhão de dólares por ano para o setor pecuário (United States Department of Agriculture - USDA., 2023). Apesar de diversos elementos influenciarem o desempenho reprodutivo dos rebanhos, a principal origem das perdas está na interrupção das gestações (Lucy and Pohler, 2025). No caso da pecuária leiteira, esses prejuízos são frequentemente agravados por práticas inadequadas de manejo, resultando não apenas em uma produção de leite aquém do potencial, mas também no descarte precoce de animais. Além dos impactos financeiros, a ineficiência reprodutiva e as enfermidades associadas geram conseqüências mais amplas,

afetando negativamente o bem-estar dos animais, comprometendo a sustentabilidade ambiental e aumentando a necessidade do uso de antibióticos e outras substâncias que comprometem a produção (Steenefeld et al., 2024).

Em bovinos leiteiros, 25 a 30% das perdas gestacionais ocorrem no período embrionário inicial, abrangendo a fase entre a fertilização e mais ou menos 30 dias pós concepção (Smith et al., 2022; Albaaj et al., 2023). As causas são diversas, embora muitas vezes com origem indefinida (Abdalla et al., 2017). Somado a isso, as taxas de gestação e os índices de falhas reprodutivas também variam conforme a origem do embrião utilizado, sendo observadas diferenças expressivas entre embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* (Reese et al., 2020; Banliat et al., 2022). Quando os embriões são produzidos *in vitro*, a taxa de gestação pode ser até 20% inferior em relação aos embriões *in vivo* (Farin et al., 2001). Além disso, o tipo de conservação do embrião também influencia os resultados: embriões criopreservados tendem a apresentar maiores taxas de perda gestacional (até 5% a mais) do que aqueles transferidos a fresco (Baruselli et al., 2010).

No caso de vacas leiteiras submetidas à transferência de embriões em tempo fixo (TETF), a taxa de perda embrionária precoce, por volta de 32 dias após a transferência, permanece em torno de 55% (Pereira et al., 2016). Embriões bovinos são transferidos para fêmeas receptoras cerca de sete dias após o estro ou a ovulação, quando o embrião já alcançou o estágio de blastocisto. Isso permite contornar as principais causas biológicas, fisiológicas e técnicas que impediriam o desenvolvimento embrionário até esse estágio, como pode ocorrer após a inseminação artificial (Hansen, 2020). Com isso, seria esperado que mediante estresse térmico ou histórico de repetição de falhas reprodutivas, a taxa de gestação nas receptoras fosse superior à das fêmeas inseminadas. No entanto, os índices de prenhez após a transferência de embriões costumam ser semelhantes — ou apenas levemente superior — aos observados com a inseminação artificial (Wiltbank et al., 2016; Hansen, 2020).

Considerando que a maior parte das perdas gestacionais em bovinos ocorre durante a fase embrionária, a identificação precoce dessas falhas reprodutivas torna-se essencial para a eficiência do sistema produtivo. A realização do diagnóstico gestacional em momentos estratégicos, como aos 30 e 60 dias após a inseminação, permite detectar perdas ainda em estágio inicial, possibilitando intervenções rápidas, o reencaminhamento reprodutivo das fêmeas e, conseqüentemente, a redução dos prejuízos econômicos relacionados à ineficiência reprodutiva (Reese et al., 2020).

Dentre as diversas ferramentas disponíveis para o diagnóstico precoce da gestação, o ultrassom Doppler destaca-se como o método de eleição por sua alta precisão na identificação de fêmeas não gestantes a partir do 20º dia pós-inseminação (Pugliesi et al., 2014; Dalmaso de Melo et al., 2020). Outras técnicas também são utilizadas, como o ultrassom transretal convencional, a mensuração de concentrações séricas de progesterona, a detecção de produtos placentários circulantes — como glicoproteínas associadas à gestação (PAGs) e microRNAs — e a análise da expressão gênica induzida por interferon em leucócitos periféricos (Ealy and Seekford, 2019).

Portanto, essa revisão busca apresentar os principais desafios da produção de embriões bovinos, abordando tanto aspectos de práticas específicas — como seleção criteriosa de receptoras e à qualidade embrionária — quanto alguns tópicos do manejo básico relacionadas à influência paterna, e sanidade, com o intuito de apresentar estratégias eficazes para a identificação precoce e mitigação das falhas gestacionais, especialmente aquelas associadas à transferência de embriões.

Seleção de embriões

Estima-se que cerca de 1,2 milhão de embriões bovinos sejam produzidos anualmente por meio de técnicas *in vivo* e *in vitro*, dos quais aproximadamente um milhão são transferidos para receptoras, seja em estado fresco ou após criopreservação (Viana, 2023, 2024). Diante desse cenário, intensificam-se os esforços científicos para melhorar tanto a produção quanto a qualidade embrionária, com o objetivo de elevar as taxas de prenhez obtidas por meio da transferência de embriões (TE) (Ferraz et al., 2016; Hansen, 2020). O sucesso da TE está diretamente relacionado à qualidade do embrião transferido, ao estado fisiológico da receptora e à adequada interação entre ambos (Spell et al., 2001). Nesse contexto, a seleção criteriosa de embriões viáveis e morfologicamente superiores torna-se fundamental, pois está diretamente associada ao aumento da eficiência reprodutiva e à maximização dos resultados nos programas de TE.

Em comparação com embriões produzidos *in vivo*, as taxas de prenhez de embriões *in vitro* são 10–40% menores (Ealy and Seekford, 2019; Reese et al., 2020). Ainda, oócitos maturados *in vivo* são mais eficientes no suporte ao desenvolvimento embrionário do que os maturados *in vitro*, possivelmente devido a diferenças na expressão gênica, transcrição e perfil proteico dos embriões resultantes (Banliat et al., 2022). Adicionalmente, características como citoplasma mais escuro, maior proporção de lipídios da classe TAG,

vacúolos em células trofoblásticas, alterações nas conexões intercelulares e maior fragilidade da zona pelúcida foram relatadas como diferenças entre a produção de embriões *in vitro* e *in vivo* (Duby et al., 1997; Abd El Razek IM et al., 2000; Fair, 2003).

Assim, esforços têm sido focados na pesquisa de biologia reprodutiva para determinar as características morfológicas, celulares e moleculares de embriões para garantir um desenvolvimento bem-sucedido da gestação. Neste contexto, a qualidade do oócito é fundamental para o início do desenvolvimento do embrião, já que ele fornece as primeiras instruções (como mRNAs e organelas) para esse processo. Mudanças na formação ou maturação dessa célula podem afetar negativamente esse desenvolvimento. Além disso, os miRNAs – moléculas que ajudam a controlar a atividade dos genes – também estão presentes nos oócitos e embriões nas fases iniciais e são importantes antes da ativação do DNA do próprio embrião (Misirlioglu et al., 2006). Esses genes estão ligados a processos importantes, como divisão celular, maturação e, principalmente, à diferenciação de células-tronco (Paulson et al., 2022). Isso reforça a importância dos miRNAs na pré-implantação bovina e no desenvolvimento embrionário.

Os embriões em estágio pré-implantação são altamente sensíveis ao ambiente, e fatores externos podem influenciar seu desenvolvimento imediato e futuro (Wooldridge et al., 2022). Durante esse período, ocorrem eventos fundamentais como a ativação do genoma embrionário e a reprogramação epigenética, que envolvem a perda e reativação de marcas como a metilação do DNA (Burdge and Lillycrop, 2010; Denicol and Siqueira, 2023). Alterações no microambiente, como a composição do fluido folicular, também podem impactar a qualidade do oócito e do embrião (Ávila et al., 2020).

Em bovinos, o protocolo de transferência de embriões para fêmeas receptoras ocorre aproximadamente sete dias após o estro ou ovulação, no estágio de blastocisto. Fatores relacionados aos diferentes estágios da produção embrionária, incluindo os meios de cultivo utilizados, influenciam significativamente tanto na taxa de formação de blastocistos quanto a manutenção da gestação (Lonergan et al., 2001). A maturação *in vitro* (MIV), por exemplo, pode representar até 60% das falhas na progressão ao estágio de blastocisto, evidenciando a importância da qualidade intrínseca dos oócitos nesse processo inicial.

Adicionalmente, embriões produzidos *in vitro*, especialmente em ambientes com alta concentração de oxigênio (20%), podem sofrer com o acúmulo de radicais livres, conhecidos como espécies reativas de oxigênio (ROS). Esse excesso causa estresse oxidativo, que pode prejudicar o desenvolvimento do embrião. Entre os danos estão alterações no metabolismo, redução da energia celular (ATP), danos às gorduras da célula, mudanças na produção de proteínas, na membrana celular e no funcionamento das mitocôndrias e do retículo endoplasmático (Cagnone and Sirard, 2013; Pawlak et al., 2024).

Embriões de alta qualidade estão diretamente associados a maiores taxas de prenhez em protocolos de transferência (Farin et al., 1999). Por isso, a avaliação precisa da qualidade embrionária é fundamental para selecionar os embriões com maior potencial de desenvolvimento. A escolha adequada permite não apenas aumentar o valor comercial dos embriões selecionados, mas também reduzir a necessidade de fêmeas receptoras, otimizando a eficiência dos programas de TE. A utilização do embrião após a criopreservação faz com que esse controle seja ainda mais relevante (Bó and Mapletoft, 2013).

Atualmente, a avaliação morfológica por estereomicroscopia é o método mais comum para determinar a qualidade embrionária (Hansen, 2020). No entanto, por ser baseada em observação visual, é subjetiva, pouco reprodutível e depende da experiência do avaliador (Rocha et al., 2017). Já foram observadas variações na ultraestrutura e no transcriptoma de embriões classificados de forma semelhante (López-Damián et al., 2008; Driver et al., 2012). Por isso, há interesse crescente em identificar marcadores objetivos de qualidade embrionária que possam prever melhor a sobrevivência após a transferência. Diversas abordagens, como análises ópticas e ômicas, têm sido exploradas para esse fim (Rabel et al., 2023).

Notavelmente, o embrião de melhor qualidade deve ser selecionado com grau de qualidade I (Excelente ou Bom). O embrião grau I apresenta uma massa celular compacta, simétrica e de contorno esférico, os blastômeros são uniformes em tamanho e densamente organizados, dificultando a distinção individual de cada blastômero, há ausência de células degeneradas ou de vesículas citoplasmáticas livres no espaço perivitelínico e a zona pelúcida está íntegra, lisa e de espessura homogênea. Já o embrião grau II considerado Bom/ Razoável, mantém uma massa celular compacta, mas pode apresentar ligeira assimetria ou uma leve irregularidade na forma esférica, os blastômeros ainda são visivelmente organizados, mas podem existir pequenas variações de tamanho entre eles, com discreta presença de células degeneradas ou pequena granulação citoplasmática, sem afetar significativamente a estrutura global. A zona pelúcida continua presente e funcional, embora pequenas irregularidades possam ser observadas (Bó and Mapletoft, 2013). Embriões de qualidade I apresentaram maiores taxas de concepção do que os de qualidade II. Em embriões produzidos *in vitro*, a diferença foi de cerca de 17% em novilhas e 22% em vacas lactantes

(Demetrio et al., 2020). Já em embriões in vivo, as taxas foram de 44,15% para grau I e 32,58% para grau II em vacas Simental após 30 dias da transferência (Erdem et al., 2020).

Ainda há dúvidas sobre qual o melhor estágio de desenvolvimento para transferir embriões bovinos, mas a maioria dos estudos indica que o estágio em si tem pouca influência, sendo a qualidade do embrião mais determinante nesse momento (Ferraz et al., 2016; Erdem et al., 2020). Alguns trabalhos mostram menor taxa de prenhez com embriões em estágio de mórula e melhores resultados com blastocistos iniciais e intermediários (Hasler et al., 1987; Putney et al., 1988). Além disso, taxas de prenhez variam conforme o tipo de embrião (fresco ou congelado) e o estágio em que ele se encontra. Esses resultados reforçam a importância de adaptar os protocolos à realidade de cada rebanho e indicam a necessidade de mais estudos para padronização.

Para melhorar a qualidade dos embriões bovinos e entender adequadamente seu desenvolvimento, o monitoramento por Time-Lapse (TLM) tem se mostrado uma ferramenta promissora. Diferente da avaliação morfológica tradicional, o TLM permite observar todo o processo de desenvolvimento, identificando fases críticas que poderiam passar despercebidas, no entanto, este método ainda não foi usado em uma produção bovina em larga escala (Rocha et al., 2017; Angel-Velez et al., 2023; Magata, 2023). Estudos mostram que indicadores morfocinéticos (MKIs), como o tempo da primeira clivagem e o número de blastômeros, ajudam a prever a qualidade do blastocisto e as chances de prenhez, podendo até substituir os sistemas clássicos de classificação (Sugimura et al., 2017).

Outras abordagens, como análises transcriptômicas, metabolômicas e a avaliação do meio de cultura, também oferecem informações importantes sobre a qualidade embrionária (Mullaart and Wells, 2018). Contudo, essas técnicas enfrentam desafios na prática, como a dificuldade de aplicação no campo, devido à necessidade de biópsia e à limitação de tempo entre a produção e a transferência dos embriões. Por isso, mesmo com o avanço das tecnologias, a seleção morfológica por estereomicroscopia ainda é amplamente utilizada. Espera-se o desenvolvimento de ferramentas mais acessíveis e eficientes para aplicação no campo, contribuindo para o aumento das taxas de concepção.

Seleção de Receptoras

Assim como a escolha das doadoras e dos embriões, a seleção das receptoras é fundamental para o êxito da transferência embrionária (Thomson et al., 2021). Um ambiente uterino desfavorável pode comprometer a viabilidade embrionária, resultando em perda gestacional ainda antes do sétimo dia pós-inseminação ou mesmo após a transferência de um embrião de boa qualidade. Fatores como doenças nos períodos pré e pós-parto, alterações metabólicas, período de lactação das vacas leiteiras, baixos escores de condição corporal, manejo sanitário inadequado e estresse de manejo interferem diretamente na gestação após a transferência do embrião (Ferraz et al., 2016).

No início da aplicação da técnica de TE, a simples identificação do corpo lúteo (CL) por palpação transretal, como evidência de ovulação, era considerada suficiente. Com o avanço das ferramentas de diagnóstico, a ultrassonografia modo B passou a ser utilizada, apresentando sensibilidade de 86,2% e especificidade de 70,3% na identificação do CL (Gómez-Seco et al., 2017). Assim, muitos protocolos comerciais continuam baseando a seleção de receptoras apenas na presença do CL (Morotti et al., 2014; Lovarelli et al., 2020). No entanto, a simples detecção do corpo lúteo no ovário da receptora não é suficiente para inferir sua funcionalidade e competência em sustentar a gestação. Alguns estudos sugerem que o tamanho do corpo lúteo pode influenciar a manutenção da gestação (Velho et al., 2022), enquanto outros não confirmam essa relação (Pugliesi et al., 2019; Thomson et al., 2021). Assim, embora haja uma tendência em priorizar receptoras com CL, o tema ainda exige mais investigação.

A ultrassonografia Doppler colorida tem se mostrado eficaz na avaliação da perfusão sanguínea do corpo lúteo (CL) e sua relação com o sucesso gestacional em programas de TETF (Pugliesi et al., 2018). Estudos demonstram que maior perfusão luteal está associada a maiores concentrações de progesterona e melhores taxas de prenhez (Fontes and Oosthuizen, 2022). Em um estudo com receptoras Brangus, o tamanho do CL não influenciou significativamente os resultados reprodutivos, mas a alta vascularização luteal (nota 3 na escala de 0 a 3 no grau de vascularização que passa pelo critério sem vascularização - 0, vascularização baixa - 1, moderada -2 ou intensa -3) aumentou as taxas de concepção e reduziu a perda gestacional (Santos et al., 2023). Esses achados reforçam a utilidade do Doppler como ferramenta complementar na seleção de receptoras, sendo mais eficaz que a avaliação morfológica isolada do CL. A combinação de parâmetros como tamanho, perfusão sanguínea e níveis séricos de progesterona pode aumentar a precisão na predição da competência reprodutiva das receptoras.

Outro aspecto importante na seleção de receptoras é o escore de condição corporal (ECC) e o

balanço energético, pois ambos influenciam diretamente a eficiência reprodutiva em bovinos. Distúrbios metabólicos, como cetose e aumento de nitrogênio ureico, estão associados a falhas gestacionais (Szelényi et al., 2023). Embora alguns estudos não tenham observado impacto do ECC sobre perdas embrionárias (Middleton et al., 2019) outros relatam maior incidência em vacas com ECC baixo (Thangavelu et al., 2015).

A perda de ECC durante a gestação ou início da lactação está ligada à maior taxa de perda embrionária, qualidade embrionária inferior e alterações metabólicas prejudiciais à fertilidade (Lima et al., 2022; Ruebel et al., 2022). Estratégias nutricionais adequadas são essenciais para manter o balanço energético e reduzir perdas reprodutivas.

Influências do reprodutor

O touro contribui significativamente para o desenvolvimento do embrião, pois sem ele não haveria a formação de uma nova vida. Independente da forma de sêmen utilizado - serviço natural, inseminação artificial ou pela utilização de espermatozoide criopreservado para a fertilização *in vitro* - o touro é um grande contribuidor para a fertilidade do rebanho e o desempenho reprodutivo (Fontes et al., 2025). Na pecuária de corte, é comum o uso de dietas intensivas no desenvolvimento de touros jovens, com o objetivo de promover alto ganho de peso e atingir um fenótipo desejado, o que frequentemente resulta em excesso de condição corporal. Essa prática é impulsionada pela preferência dos produtores por características relacionadas ao crescimento, muitas vezes em detrimento da eficiência alimentar (Oosthuizen et al., 2018).

Além disso, dietas com alta densidade energética exercem influência direta no desenvolvimento puberal, antecipando a maturidade sexual dos reprodutores (Fontes et al., 2025). Essa estratégia nutricional é relevante diante do esforço da indústria em reduzir o intervalo de gerações e acelerar o uso de sêmen de reprodutores jovens. No entanto, apesar dos benefícios no avanço puberal, a superalimentação após a puberdade pode comprometer a fertilidade. O aumento da adiposidade corporal em touros está associado à resistência à insulina, alterações negativas nos parâmetros do espermiograma e prejuízo na termorregulação testicular devido ao acúmulo de gordura escrotal, especialmente na região do cone vascular (Brito et al., 2012). Esses fatores resultam em maior ocorrência de anormalidades espermáticas, redução da motilidade e aumento do estresse oxidativo, impactando a integridade do sêmen e potencialmente o desenvolvimento embrionário pós-fertilização (Ayad et al., 2022).

Evidências recentes em modelos animais indicam que os espermatozoides desempenham funções essenciais no desenvolvimento embrionário inicial e estão implicados em casos de infertilidade pós-fertilização (Daigneault, 2021). Para além da entrega do material genético, o esperma carrega diversos fatores bioativos que participam de eventos cruciais após a fecundação, incluindo a singamia, divisões celulares iniciais (clivagem) e a regulação epigenética do embrião em desenvolvimento (Fontes et al., 2025). Alterações epigenéticas no genoma espermático têm sido apontadas como potenciais contribuintes para falhas no desenvolvimento embrionário e aumento da incidência de perdas gestacionais precoces (Emery and Carrell, 2006).

Adicionalmente, estudos demonstram que a condição nutricional do macho reprodutor afeta diretamente a competência embrionária. Embriões produzidos a partir de touros submetidos a dietas hipercalóricas apresentaram taxas significativamente reduzidas de clivagem e formação de blastocistos quando comparados a touros mantidos em condição corporal adequada. Muitos embriões que atingem o estágio de blastocisto revelam um número inferior de células na massa celular interna (ICM) e no trofotoderma (TE), indicando prejuízos estruturais mesmo em embriões morfolologicamente viáveis. Esses achados reforçam que os efeitos deletérios da obesidade em touros ultrapassam a qualidade do sêmen, demonstrando que a dieta paterna exerce influência direta sobre o desenvolvimento embrionário e as taxas subsequentes de gestação clínica.

Manejo Sanitário

As enfermidades reprodutivas representam um dos maiores entraves ao avanço sustentável da pecuária bovina em escala mundial. Estima-se que cerca de metade das perdas embrionárias tenha origem em agentes infecciosos (Aono et al., 2013). Desde os primórdios da utilização comercial da transferência de embriões, têm sido discutidas as implicações sanitárias associadas à exposição de embriões em estágios pré-implantacionais a patógenos, assim como os possíveis efeitos deletérios dessas infecções no desenvolvimento embrionário (Fray et al., 2000). No entanto, vale destacar que tais ocorrências são observadas, em animais que já são portadores das enfermidades por outras vias de transmissão, não sendo a transferência de embriões o mecanismo responsável pela disseminação das doenças (Funnell et al., 2024).

De fato, o rápido avanço das técnicas de PIVE tem superado a capacidade de governos e instituições de desenvolver normas e regulamentações padronizadas para o comércio internacional desses materiais reprodutivos. Entre os diversos desafios enfrentados, destaca-se a dificuldade em identificar e quantificar os riscos de transmissão de doenças associadas aos embriões produzidos *in vitro* — problema que é agravado pela escassez de dados científicos disponíveis sobre o tema.

O alfa-herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e o vírus da diarreia viral bovina (BVDV) — agentes causadores da rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR) e da diarreia viral bovina (BVD), respectivamente, estão entre os principais agentes associados à perda gestacional em bovinos (Aono et al., 2013). O BoHV-1 pode afetar a função ovariana, reduzir a viabilidade dos oócitos e comprometer a qualidade embrionária (Bielanski et al., 2013). Quando a infecção ocorre antes da concepção, o vírus pode alcançar oócitos em maturação dentro dos folículos (RUFINO et al., 2006).

O BVDV apresenta tropismo pelo sistema reprodutor, alterando a dinâmica folicular e o desenvolvimento embrionário. Pode persistir nos ovários por semanas e contaminar insumos utilizados na reprodução assistida por meio de doadoras infectadas (Tayefeh et al., 2023). Além disso, está associado à hipoplasia ovariana em animais persistentemente infectados, atraso no crescimento folicular e menor resposta à superovulação (Grooms et al., 1998; González Altamiranda et al., 2020). A interação entre os biótipos do BVDV e a zona pelúcida do oócito também pode comprometer o desenvolvimento embrionário inicial em protocolos de fertilização *in vitro* (Tayefeh et al., 2023).

A leptospirose tem um papel importante entre as doenças infecciosas que afetam a eficiência reprodutiva (Pereira et al., 2024). Há um grande comprometimento nos resultados reprodutivos devido a característica silenciosa e subclínica da doença (Loureiro et al., 2016). A leptospirose genital bovina (BGL) pode causar morte embrionária e embora os mecanismos envolvidos ainda não sejam totalmente conhecidos, a compreensão desse patógeno é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de controle sanitário nos rebanhos (Pereira et al., 2024). Ainda, a BGL pode causar perdas embrionárias por três vias principais: inflamação uterina, dano direto ao embrião ou comprometimento do oócito devido à presença de LPS no fluido folicular, afetando a esteroidogênese e a competência oocitária ((Loureiro and Lilenbaum, 2020). Pereira e colaboradores (2024), investigaram o impacto da presença de *Leptospira spp.* no fluido folicular (FF) sobre a eficiência da produção *in vitro* de embriões e concluíram que a infecção natural do patógeno no FF compromete negativamente a eficiência reprodutiva *in vitro* por meio da diminuição do número de complexo cumulus-oócito (COCs) recuperados por aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) e do número de blastocistos por vaca.

Por outro lado, falando da técnica propriamente dita, nas fases iniciais da PIVE, era comum cultivar zigotos até o estágio de blastocisto em meios contendo soro e em cocultura com células ovidutais ou outras células somáticas (Hasler, 1998). No entanto, essa abordagem representava um risco sanitário, já que eventuais patógenos poderiam se associar às células utilizadas na cocultura ou contaminar diretamente o meio de cultivo. Com o avanço da área, esse modelo foi sendo substituído, e atualmente o uso de coculturas é restrito a estudos experimentais específicos, sendo raramente empregado em contextos comerciais. Estudos atuais têm demonstrado que a maioria das células produzidas (especialmente bovinos) são processados sem células de cocultura e soro, o que torna o risco de transmissão de doenças obsoletas e parcialmente irrelevantes (Funnell et al., 2024).

Além disso, é necessário considerar que o impacto do sistema imunológico do doador sobre os patógenos nos ovários, particularmente nos folículos - até que os COCs sejam coletados, amadurecidos, classificados, lavados (com múltiplas lavagens ocorrendo em várias etapas) e fertilizados - são eficientes para evitar contaminações por patógenos (Funnell et al., 2024). Poucos estudos avaliaram a ação do sistema imune contra patógenos no ovário, contudo, Galik e colaboradores (2002), detectaram o BVDV apenas em 1 de 55 amostras de fluido folicular por RT-nPCR, mas não por isolamento viral, indicando a presença de material viral não infeccioso. Anticorpos neutralizantes anti-BVDV também foram identificados, sugerindo que esses anticorpos foram eficazes em neutralizar o vírus no fluido folicular (Galik et al., 2002). Somado a isso, a estrutura COC atua como barreira física contra patógenos, com células cumulus unidas por ácido hialurônico protegendo o oócito de possíveis contaminações sanguíneas durante a recuperação (Arashiro et al., 2013). A lavagem imediata e repetida dos COCs, com alta diluição, antes da maturação, auxilia na remoção de contaminantes (Speckhart et al., 2023).

Xiao-Kim e colaboradores (2024), demonstraram que embriões PIV expostos a *Brucella abortus* não apresentaram contaminação após lavagens em diferentes estágios, com ou sem tripsina, exceto quando a lavagem foi feita no estágio de COC, o que reduziu a produção embrionária. Assim, a lavagem após a maturação parece eficaz para eliminar patógenos sem comprometer o desenvolvimento embrionário (Xiao-Kim et al., 2023). Da mesma maneira, a inclusão de antibióticos em cada etapa do processo de PIV, incluindo nos extensores de sêmen, é essencial para proteger contra o crescimento de microrganismos

contaminantes. Ademais, os processos aos quais os espermatozoides são submetidos na PIVE podem remover ou reduzir o risco de patógenos no sêmen. Amostras de sêmen de touros positivos para *Ureaplasma spp.* foram usadas para fertilização *in vitro* de oócitos, e após a preparação do sêmen, todas as amostras testaram negativo para *Ureaplasma* por PCR. O estudo indica que técnicas como centrifugação em gradiente de densidade e swim up, comuns na FIV bovina, são eficazes na remoção de bactérias do sêmen (Chen et al., 2022).

Ao comparar embriões *in vitro* e *in vivo* quanto ao risco sanitário, embriões *in vivo* são expostos a mais tecidos potencialmente infectados durante sua formação natural (Daniel Givens et al., 2007). Já os COCs usados em embriões *in vitro* evitam contato com oviduto e útero, reduzindo esse risco. No entanto, a resposta imune local no ovário ainda é pouco compreendida. Para exportação segura de embriões PIV, recomenda-se o uso apenas de COCs de Grau 1 ou 2 (Demetrio et al., 2020). Funnell et al., 2024 afirmou que, seguindo as diretrizes do Manual IETS, o risco sanitário de transmissão dos embriões PIV — especialmente oriundos de COCs coletados por OPU — é igual ou inferior ao dos embriões *in vivo*. A exigência de COCs Grau 1 ou 2, lavagens adequadas, uso de tripsina e ausência de soro e cocultura reforçam essa segurança. Apesar do crescimento global da PIV, não há relatos de transmissão de doenças por embriões PIV, indicando eficácia sanitária (Funnell et al., 2024). Ainda assim, estudos epidemiológicos e testes de vigilância laboratorial podem fortalecer ainda mais a confiança regulatória.

É possível reconhecer que a transmissão de patógenos por embriões *in vitro* não representa risco relevante para as receptoras ao observar o avanço nas transferências de embriões. Os Boletins do IETS, desde 1991, registraram a coleta de mais de 32 milhões de embriões bovinos, com mais de 25 milhões transferidos. A partir de 2016, a produção de embriões *in vitro* superou a de *in vivo*, e, desde 2017, esse avanço também se refletiu nas transferências. Hoje, mais de 80% dos embriões transferíveis são *in vitro*, não tendo a transmissão de patógenos como uma ameaça significativa à saúde das receptoras. Além disso, as técnicas de coleta *in vivo* também evoluíram, mantendo a eficiência mesmo com a presença de patógenos.

Considerações Finais

Para enfrentar os desafios da eficiência reprodutiva na pecuária com o uso de embriões, é essencial integrar biotécnicas avançadas com práticas criteriosas de seleção das receptoras e dos embriões, sempre associando manejos básicos adequados. Embora o foco deste trabalho esteja direcionado à seleção de embriões e receptoras, é importante destacar que esses aspectos fazem parte de um conjunto mais amplo de ações indispensáveis para o sucesso reprodutivo. O manejo nutricional, a qualificação técnica da equipe envolvida, a adequação dos meios de produção de embriões e o desenvolvimento de estratégias eficientes de criopreservação também são componentes essenciais desse contexto. Em suma, o sucesso desta biotécnica depende da correta adequação de cada uma das etapas envolvidas.

Referências

- Abd El Razek IM, Charpigny G, Kodja S, Marquant-Le Guienne B, Mermillod P, Guyader-Joly C, Humblot P, 2000. Differences in lipid composition between *in vivo*- and *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology* 53, 346.
- Abdalla, H., Elghafghuf, A., Elsohaby, I., Nasr, M.A.F., 2017. Maternal and non-maternal factors associated with late embryonic and early fetal losses in dairy cows. *Theriogenology* 100, 16–23. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2017.04.005>
- Albaaj, A., Durocher, J., LeBlanc, S.J., Dufour, S., 2023. Meta-analysis of the incidence of pregnancy losses in dairy cows at different stages to 90 days of gestation. *JDS Communications* 4, 144–148. <https://doi.org/10.3168/jdsc.2022-0278>
- Angel-Velez, D., De Coster, T., Azari-Dolatabad, N., Fernández-Montoro, A., Benedetti, C., Pavani, K., Van Soom, A., Bogado Pascottini, O., Smits, K., 2023. Embryo morphokinetics derived from fresh and vitrified bovine oocytes predict blastocyst development and nuclear abnormalities. *Sci Rep* 13, 4765. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31268-6>
- Aono, F.H., Cooke, R.F., Alfieri, A.A., Vasconcelos, J.L.M., 2013. Effects of vaccination against reproductive diseases on reproductive performance of beef cows submitted to fixed-timed AI in Brazilian cow-calf operations. *Theriogenology* 79, 242–248. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.08.008>
- Arashiro, E.K., Palhao, M.P., Wohlres-Viana, S., Siqueira, L.G., Camargo, L.S., Henry, M., Viana, J.H., 2013. *In vivo* collection of follicular fluid and granulosa cells from individual follicles of different



- diameters in cattle by an adapted ovum pick-up system. *Reproductive Biology and Endocrinology* 11, 73. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-11-73>
- Ayad, B., Omolaoye, T.S., Louw, N., Ramsunder, Y., Skosana, B.T., Oyeipo, P.I., Du Plessis, S.S.,** 2022. Oxidative Stress and Male Infertility: Evidence From a Research Perspective. *Frontiers in Reproductive Health* 4. <https://doi.org/10.3389/frph.2022.822257>
- Banliat, C., Mahé, C., Lavigne, R., Com, E., Pineau, C., Labas, V., Guyonnet, B., Mermillod, P., Saint-Dizier, M.,** 2022. Dynamic Changes in the Proteome of Early Bovine Embryos Developed In Vivo. *Front Cell Dev Biol* 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.863700>
- Baruselli, P.S., Ferreira, R.M., Filho, M.F.S., Nasser, L.F.T., Rodrigues, C.A., Bó, G.A.,** 2010. Bovine embryo transfer recipient synchronisation and management in tropical environments. *Reprod Fertil Dev* 22, 67. <https://doi.org/10.1071/RD09214>
- Bielanski, A., Algire, J., Lalonde, A., Garceac, A.,** 2013. Embryos produced from fertilization with bovine viral diarrhoea virus (BVDV)-infected semen and the risk of disease transmission to embryo transfer (ET) recipients and offspring. *Theriogenology* 80, 451–455. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.04.028>
- Bó, G.A., Mapletoft, R.J.,** 2013. Evaluation and classification of bovine embryos, *Anim. Reprod.*, v.
- Brito, L.F.C., Barth, A.D., Wilde, R.E., Kastelic, J.P.,** 2012. Testicular vascular cone development and its association with scrotal temperature, semen quality, and sperm production in beef bulls. *Anim Reprod Sci* 134, 135–140. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.025>
- Burdge, G.C., Lillycrop, K.A.,** 2010. Nutrition, Epigenetics, and Developmental Plasticity: Implications for Understanding Human Disease. *Annu Rev Nutr* 30, 315–339. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.012809.104751>
- Cagnone, G.L.M., Sirard, M.,** 2013. Transcriptomic signature to oxidative stress exposure at the time of embryonic genome activation in bovine blastocysts. *Mol Reprod Dev* 80, 297–314. <https://doi.org/10.1002/mrd.22162>
- Chen, Z., Jiang, L., Wang, H., Quan, W., Yang, L., Ou, C., Sun, L.,** 2022. Elimination of bacteria from semen using a combination of density gradient centrifugation and swim-up. *J Mens Health* 18. <https://doi.org/10.31083/j.jomh1806124>
- Daigneault, B.W.,** 2021. Dynamics of paternal contributions to early embryo development in large animals. *Biol Reprod* 104, 274–281. <https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa182>
- Dalmaso de Melo, G., Mello, B.P., Ferreira, C.A., Souto Godoy Filho, C.A., Rocha, C.C., Silva, A.G., Reese, S.T., Madureira, E.H., Pohler, K.G., Pugliesi, G.,** 2020. Applied use of interferon-tau stimulated genes expression in polymorphonuclear cells to detect pregnancy compared to other early predictors in beef cattle. *Theriogenology* 152, 94–105. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.04.001>
- Daniel Givens, M., Gard, J.A.,** Stringfellow, D.A., 2007. Relative risks and approaches to biosecurity in the use of embryo technologies in livestock. *Theriogenology* 68, 298–307. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.04.004>
- Demetrio, D.G.B., Benedetti, E., Demetrio, C.G.B., Fonseca, J., Oliveira, M., Magalhaes, A., Santos, R.M. dos,** 2020. How can we improve embryo production and pregnancy outcomes of Holstein embryos produced in vitro? (12 years of practical results at a California dairy farm). *Anim Reprod* 17. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2020-0053>
- Denicol, A.C., Siqueira, L.G.B.,** 2023. Maternal contributions to pregnancy success: from gamete quality to uterine environment. *Anim Reprod* 20. <https://doi.org/10.1590/1984-3143-ar2023-0085>
- Driver, A.M., Peñagaricano, F., Huang, W., Ahmad, K.R., Hackbart, K.S., Wiltbank, M.C., Khatib, H.,** 2012. RNA-Seq analysis uncovers transcriptomic variations between morphologically similar in vivo- and in vitro-derived bovine blastocysts. *BMC Genomics* 13, 118. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-118>
- Duby, R.T., Hill, J.L.,** O’Callaghan, D., Overstrom, E.W., Boland, M.P., 1997. Changes induced in the bovine zona pellucida by ovine and bovine oviducts. *Theriogenology* 47, 332. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)82459-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)82459-4)
- Ealy, A.D., Seekford, Z.K.,** 2019. Symposium review: Predicting pregnancy loss in dairy cattle. *J Dairy Sci* 102, 11798–11804. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17176>
- Emery, B.R., Carrell, D.T.,** 2006. The effect of epigenetic sperm abnormalities on early embryo-genesis. *Asian J Androl* 8, 131–142. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2006.00127.x>
- Erdem, H., Karasahin, T., Alkan, H., Dursun, S., Satilmis, F., Guler, M.,** 2020. Effect of embryo quality and developmental stages on pregnancy rate during fresh embryo transfer in beef heifers. *Trop Anim Health Prod* 52, 2541–2547. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02287-6>



- Fair, T., 2003. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci* 78, 203–216. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00091-5)
- Farin, P.W., Crosier, A.E., Farin, C.E.**, 2001. Influence of in vitro systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology* 55, 151–170. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00452-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00452-0)
- Farin, P.W., Slenning, B.D., Britt, J.H.**, 1999. Estimates of pregnancy outcomes based on selection of bovine embryos produced in vivo or in vitro. *Theriogenology* 52, 659–670. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00160-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00160-0)
- Ferraz, P.A., Burnley, C., Karanja, J., Viera-Neto, A., Santos, J.E.P., Chebel, R.C., Galvão, K.N.**, 2016. Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenology* 86, 1834–1841. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.032>
- Ferré, L.B., Kjelland, M.E., Strøbech, L.B., Hyttel, P., Mermillod, P., Ross, P.J.**, 2020. Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. *Animal* 14, 991–1004. <https://doi.org/10.1017/S1751731119002775>
- Fontes, P.L.P., Bromfield, J.J., Pohler, K.G., Lamb, G.C.**, 2025. Impact of paternal high-energy diets on semen quality and embryo development in cattle. *Reproduction and Fertility* 6. <https://doi.org/10.1530/RAF-24-0082>
- Fontes, P.L.P., Oosthuizen, N.**, 2022. Applied Use of Doppler Ultrasonography in Bovine Reproduction. *Frontiers in Animal Science* 3. <https://doi.org/10.3389/fanim.2022.912854>
- Fray, M.D., Mann, G.E., Clarke, M.C., Charleston, B.**, 2000. Bovine viral diarrhoea virus: its effects on ovarian function in the cow. *Vet Microbiol* 77, 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00275-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00275-3)
- Funnell, B., Briand-Amirat, L., Viana, J.H.M., Perry, G.**, 2024. Disease risk of in vitro produced embryos: A review of current commercial practices in the context of international trade with emphasis on bovine embryos. *Theriogenology* 230, 212–219. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2024.09.019>
- Galik, P.K., Givens, M.D., Stringfellow, D.A., Crichton, E.G., Bishop, M.D., Eilertsen, K.J.**, 2002. Bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and anti-BVDV antibodies in pooled samples of follicular fluid. *Theriogenology* 57, 1219–1227. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00633-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00633-7)
- Gómez-Seco, C., Alegre, B., Martínez-Pastor, F., Prieto, J.G., González-Montaña, J.R., Alonso, M.E., Domínguez, J.C.**, 2017. Evolution of the corpus luteum volume determined ultrasonographically and its relation to the plasma progesterone concentration after artificial insemination in pregnant and non-pregnant dairy cows. *Vet Res Commun* 41, 183–188. <https://doi.org/10.1007/s11259-017-9685-x>
- González Altamiranda, E.A., Arias, M.E., Kaiser, G.G., Mucci, N.C., Odeón, A.C., Felmer, R.N.**, 2020. Upregulation of interferon-alpha gene in bovine embryos produced in vitro in response to experimental infection with noncytotoxic bovine-viral-diarrhoea virus. *Mol Biol Rep* 47, 9959–9965. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05958-7>
- Grooms, D.L., Brock, K.V., Pate, J.L., Day, M.L.**, 1998. Changes in ovarian follicles following acute infection with bovine viral diarrhoea virus. *Theriogenology* 49, 595–605. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00010-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00010-7)
- Hansen, P.J.**, 2020. The incompletely fulfilled promise of embryo transfer in cattle—why aren't pregnancy rates greater and what can we do about it? *J Anim Sci* 98. <https://doi.org/10.1093/jas/skaa288>
- Hasler, J.F.**, 1998. The Current Status of Oocyte Recovery, In Vitro Embryo Production, and Embryo Transfer in Domestic Animals, with an Emphasis on the Bovine. *J Anim Sci* 76, 52. https://doi.org/10.2527/1998.76suppl_352x
- Hasler, J.F., McCauley, A.D., Lathrop, W.F., Foote, R.H.**, 1987. Effect of donor-embryo-recipient interactions on pregnancy rate in a large-scale bovine embryo transfer program. *Theriogenology* 27, 139–168. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(87\)90075-6](https://doi.org/10.1016/0093-691X(87)90075-6)
- Lima, A.C.N. de, Pereira, E.T.N., Almeida, I. de C., Xavier, E.D., Oliveira, D.C.F., Almeida, A.C. de**, 2022. Reproductive disorders and reconception of beef cows subjected to timed artificial insemination. *Ciência Animal Brasileira* 23. <https://doi.org/10.1590/1809-6891v22e-70384>
- Loneragan, P., Rizos, D., Ward, F., Boland, M.P.**, 2001. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reprod Nutr Dev* 41, 427–437. <https://doi.org/10.1051/rnd:2001142>
- López-Damián, E., Galina, C.S., Cedillo-Peláez, C.**, 2008. Assessment of *Bos taurus* embryos comparing stereoscopic microscopy and transmission electron microscopy.
- Loureiro, A.P., Hamond, C., Pinto, P., Bremont, S., Bourhy, P., Lilenbaum, W.**, 2016. Molecular analysis of leptospire from serogroup Sejroe obtained from asymptomatic cattle in Rio de Janeiro — Brazil reveals genetic proximity to serovar Guaricura. *Res Vet Sci* 105, 249–253. <https://doi.org/10.1016/J.RVSC.2016.02.012>



- Loureiro, A.P., Lilenbaum, W.,** 2020. Genital bovine leptospirosis: A new look for an old disease. *Theriogenology* 141, 41–47. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2019.09.011>
- Lovarelli, D., Bacenetti, J., Guarino, M.,** 2020. A review on dairy cattle farming: Is precision livestock farming the compromise for an environmental, economic and social sustainable production? *J Clean Prod* 262, 121409. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121409>
- Lucy, M.C., Pohler, K.G.,** 2025. North American perspectives for cattle production and reproduction for the next 20 years. *Theriogenology* 232, 109–116. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2024.11.006>
- MAGATA, F.,** 2023. Time-lapse monitoring technologies for the selection of bovine &i&t;in vitro&t;i&t; fertilized embryos with high implantation potential. *Journal of Reproduction and Development* 69, 2022–131. <https://doi.org/10.1262/jrd.2022-131>
- Middleton, E.L., Minela, T., Pursley, J.R.,** 2019. The high-fertility cycle: How timely pregnancies in one lactation may lead to less body condition loss, fewer health issues, greater fertility, and reduced early pregnancy losses in the next lactation. *J Dairy Sci* 102, 5577–5587. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15828>
- Misirlioglu, M., Page, G.P., Sagirkaya, H., Kaya, A., Parrish, J.J., First, N.L., Memili, E.,** 2006. Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 18905–18910. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608247103>
- Morotti, F., Sanches, B.V., Pontes, J.H.F., Basso, A.C., Siqueira, E.R., Lisboa, L.A., Seneda, M.M.,** 2014. Pregnancy rate and birth rate of calves from a large-scale IVF program using reverse-sorted semen in *Bos indicus*, *Bos indicus-taurus*, and *Bos taurus* cattle. *Theriogenology* 81, 696–701. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.12.002>
- Mullaart, E., Wells, D.,** 2018. Embryo Biopsies for Genomic Selection, in: *Animal Biotechnology* 2. Springer International Publishing, Cham, pp. 81–94. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92348-2_5
- Oosthuizen, N., Fontes, P., Thomas, D., Canal, L., Sanford, C., DiLorenzo, N., Lamb, G.,** 2018. PSXVII-24 Relationships among feed efficiency, performance, and value of bulls in the Florida Bull Test. *J Anim Sci* 96, 200–200. <https://doi.org/10.1093/jas/sky404.434>
- Paulson, E.E., Fishman, E.L., Ma, J., Schultz, R.M., Ross, P.J.,** 2022. Embryonic microRNAs are essential for bovine preimplantation embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2212942119>
- Pawlak, P., Lipinska, P., Sell-Kubiak, E., Kajdasz, A., Derebecka, N., Warzych, E.,** 2024. Energy metabolism disorders during in vitro maturation of bovine cumulus-oocyte complexes interfere with blastocyst quality and metabolism. *Dev Biol* 509, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2024.02.004>
- Pereira, M.H.C., Wiltbank, M.C., Vasconcelos, J.L.M.,** 2016. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. *J Dairy Sci* 99, 2237–2247. <https://doi.org/10.3168/jds.2015-9903>
- Pereira, P.V. dos S., Di Azevedo, M.I.N., Arashiro, E.K.N., Watanabe, Y.F., Correia, L.F.L., Lilenbaum, W., Souza-Fabjan, J.M.G.,** 2024. The presence of *Leptospira* spp. in the follicular fluid of naturally infected cows affects the overall efficiency of the in vitro embryo production technique. *Anim Reprod Sci* 266, 107492. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2024.107492>
- Pugliesi, G., Dalmaso de Melo, G., Silva, J.B., Carvalhêdo, A.S., Lopes, E., de Siqueira Filho, E., Silva, L.A., Binelli, M.,** 2019. Use of color-Doppler ultrasonography for selection of recipients in timed-embryo transfer programs in beef cattle. *Theriogenology* 135, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.06.006>
- Pugliesi, G., Melo, G.D. de, Ataíde, G.A., Pellegrino, C.A.G., Silva, J.B., Rocha, C.C., Motta, I.G., Vasconcelos, J.L.M., Binelli, M.,** 2018. Use of Doppler ultrasonography in embryo transfer programs: feasibility and field results. *Anim Reprod* 15, 239–246. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0059>
- Pugliesi, G., Miagawa, B.T., Paiva, Y.N., França, M.R., Silva, L.A., Binelli, M.,** 2014. Conceptus-Induced Changes in the Gene Expression of Blood Immune Cells and the Ultrasound-Accessed Luteal Function in Beef Cattle: How Early Can We Detect Pregnancy?1. *Biol Reprod* 91. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121525>
- Putney, D.J., Thatcher, W.W., Drost, M., Wright, J.M., DeLorenzo, M.A.,** 1988. Influence of environmental temperature on reproductive performance of bovine embryo donors and recipients in the southwest region of the united states. *Theriogenology* 30, 905–922. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(88\)80053-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(88)80053-0)
- Rabel, R.A.C., Marchioretto, P. V., Bangert, E.A., Wilson, K., Milner, D.J., Wheeler, M.B.,** 2023. Pre-Implantation Bovine Embryo Evaluation—From Optics to Omics and Beyond. *Animals* 13, 2102. <https://doi.org/10.3390/ani13132102>



- Reese, S.T., Franco, G.A., Poole, R.K., Hood, R., Fernandez Montero, L., Oliveira Filho, R.V., Cooke, R.F., Pohler, K.G., 2020. Pregnancy loss in beef cattle: A meta-analysis. *Anim Reprod Sci* 212, 106251. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106251>
- Rocha, J.C., Passalia, F.J., Matos, F.D., Takahashi, M.B., Ciniciato, D. de S., Maserati, M.P., Alves, M.F., de Almeida, T.G., Cardoso, B.L., Basso, A.C., Nogueira, M.F.G., 2017. A Method Based on Artificial Intelligence To Fully Automatize The Evaluation of Bovine Blastocyst Images. *Sci Rep* 7, 7659. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08104-9>
- Ruebel, M.L., Martins, L.R., Schall, P.Z., Pursley, J.R., Latham, K.E., 2022. Effects of early lactation body condition loss in dairy cows on serum lipid profiles and on oocyte and cumulus cell transcriptomes. *J Dairy Sci* 105, 8470–8484. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-21919>
- Rufino, F.A., Seneda, M.M., Alfieri, A.A., 2006. Impacto do herpesvírus bovino 1 e do vírus da diarréia viral bovina na transferência de embriões. *Archives of Veterinary Science* 11. <https://doi.org/10.5380/avs.v11i1.5606>
- Santos, G.M.G. dos, Junior, L.B., Silva-Santos, K.C., Ayres Dias, J.H., Dias, I. da S., Seneda, M.M., Morotti, F., 2023. Conception rate and pregnancy loss in fixed-time cattle embryo transfer programs are related to the luteal blood perfusion but not to the corpus luteum size. *Theriogenology* 210, 251–255. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.07.039>
- Smith, B.D., Poliakiwski, B., Polanco, O., Singleton, S., de Melo, G.D., Muntari, M., Oliveira Filho, R. V., Pohler, K.G., 2022. Decisive points for pregnancy losses in beef cattle. *Reprod Fertil Dev* 35, 70–83. <https://doi.org/10.1071/RD22206>
- Speckhart, S.L., Wooldridge, L.K., Ealy, A.D., 2023. An updated protocol for in vitro bovine embryo production. *STAR Protoc* 4, 101924. <https://doi.org/10.1016/J.XPRO.2022.101924>
- Spell, A.R., Beal, W.E., Corah, L.R., Lamb, G.C., 2001. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology* 56, 287–297. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00563-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00563-5)
- Steenefeld, W., van den Borne, B.H.P., Kok, A., Rodenburg, T.B., Hogeveen, H., 2024. Invited review: Quantifying multiple burdens of dairy cattle production diseases and reproductive inefficiency—Current knowledge and proposed metrics. *J Dairy Sci* 107, 8765–8795. <https://doi.org/10.3168/JDS.2023-24538>
- Sugimura, S., Akai, T., Imai, K., 2017. Selection of viable &in vitro&-fertilized bovine embryos using time-lapse monitoring in microwell culture dishes. *Journal of Reproduction and Development* 63, 353–357. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-041>
- Szelényi, Z., Szenci, O., Bodó, S., Kovács, L., 2023. Noninfectious Causes of Pregnancy Loss at the Late Embryonic/Early Fetal Stage in Dairy Cattle. *Animals* 13, 3390. <https://doi.org/10.3390/ani13213390>
- Tayefeh, A.R., Garoussi, M.T., Heidari, F., Bakhshesh, M., Shirazi, A., Vahidi, M., 2023. Effect of bovine viral diarrhoea virus biotypes exposure on bovine gametes in early embryonic development in vitro. *Veterinary Research Forum* 14, 207–212. <https://doi.org/10.30466/vrf.2022.555199.3504>
- Thangavelu, G., Gobikrushanth, M., Colazo, M.G., Ambrose, D.J., 2015. Pregnancy per artificial insemination and pregnancy loss in lactating dairy cows of a single herd following timed artificial insemination or insemination at detected estrus. *Can J Anim Sci* 95, 383–388. <https://doi.org/10.4141/cjas-2014-122>
- Thomson, S., Holmes, R., Landes, P., Allworth, M., 2021. Assessment and selection of the recipient cows' corpus luteum at the time of embryo transfer, and its influence on conception rate. *Aust Vet J* 99, 288–292. <https://doi.org/10.1111/avj.13068>
- United States Department of Agriculture - USDA., 2023. Dairy and Products Annual. Global Agriculture Information Network.
- Velho, G. dos S., Rovani, M.T., Ferreira, R., Gasperin, B.G., Dalto, A.G.C., 2022. Blood perfusion and diameter of bovine corpus luteum as predictors of luteal function in early pregnancy. *Reproduction in Domestic Animals* 57, 246–252. <https://doi.org/10.1111/rda.14046>
- Viana, J.H.M., 2024. Development of the world farm animal embryo industry over the past 30 years. *Theriogenology* 230, 151–156. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2024.09.012>
- Viana, J.H.M., 2023. 2022 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. In: *Embryo Technology Newsletter*.
- 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., 2016. Pivotal periods for pregnancy loss during the first trimester of gestation in lactating dairy cows. *Theriogenology* 86, 239–253. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.037>
- Wooldridge, L.K., Keane, J.A., Rhoads, M.L., Ealy, A.D., 2022. Bioactive supplements influencing bovine in vitro embryo development. *J Anim Sci* 100. <https://doi.org/10.1093/jas/skac091>



Xiao-Kim, E., Kincade, J., Bosco-Lauth, A., Barfield, J.P., 2023. 134 Effectiveness of the timing of trypsin washing to remove pathogens from in vitro-produced bovine embryos at different stages of development. *Reprod Fertil Dev* 36, 220–220. <https://doi.org/10.1071/RDv36n2Ab134>.
