



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA-  
PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**PERDAS GESTACIONAIS EM BOVINOS DE LEITE EM PROGRAMAS DE  
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES E A PARTICIPAÇÃO DE *NEOSPORA  
CANINUM***

**GUSTAVO FERNANDES GRILLO**

*Sob Orientação do Professor*  
**Marco Roberto Bourg de Mello**  
*e Coorientação dos Professores*  
**Andressa Ferreira da Silva Spyrides**  
**Helcimar Barbosa Palhano**

Tese submetida como requisito parcial para  
obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no  
Programa de Pós-Graduação em Medicina  
Veterinária, Área de Concentração em  
Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ  
Setembro de 2021

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**TESE**

**PERDAS GESTACIONAIS EM BOVINOS DE LEITE EM PROGRAMAS DE  
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES E A PARTICIPAÇÃO DE *NEOSPORA*  
*CANINUM***

**Gustavo Fernandes Grillo**

**2021**

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G859p Grillo, Gustavo Fernandes, 1990-  
Perdas Gestacionais em Bovinos de Leite em  
Programas de Transferência de Embriões e a  
Participação de Neospora caninum / Gustavo Fernandes  
Grillo. - São José dos Campos, 2021.  
57 f.: il.

Orientador: Marco Roberto Bourg de Mello.  
Coorientadora: Andressa Ferreira da Silva  
Spyrudes.  
Coorientador: Helcimar Barbosa Palhano.  
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro, PPGMV, 2021.

1. Reprodução Animal. 2. Transferência de Embriões.  
3. Perda Gestacional. 4. Neospora Caninum. 5.  
Bovinos. I. Mello, Marco Roberto Bourg de, 1978-,  
orient. II. Silva Spyrudes, Andressa Ferreira da , -,  
coorient. III. Palhano, Helcimar Barbosa , -,  
coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. PPGMV. V. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**GUSTAVO FERNANDES GRILLO**

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Ciências Clínicas.

TESE APROVADA EM 27/09/2021

---

Marco Roberto Bourg de Mello. Dr. UFRRJ  
(orientador)

---

Vera Lucia Teixeira de Jesus. Dra. UFRRJ

---

Edwards Frazão Teixeira. Dr. FIOCRUZ

---

Joaquim Esquerdo Ferreira. Dr. CESVA

---

Ângelo José Burla Dias. Dr. UENF



**TERMO Nº 21/2024 - PPGMV (12.28.01.00.00.00.51)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

**(Assinado digitalmente em 25/01/2024 13:37 )**

**MARCO ROBERTO BOURG DE MELLO**

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)

Matrícula: ###480#3

**(Assinado digitalmente em 25/01/2024 08:27 )**

**VERA LUCIA TEIXEIRA DE JESUS**

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DeptRAA (12.28.01.00.00.00.64)

Matrícula: ###015#9

**(Assinado digitalmente em 24/01/2024 15:25 )**

**ANGELO JOSÉ BURLA DIAS**

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.986-##

**(Assinado digitalmente em 25/03/2024 16:16 )**

**JOAQUIM ESQUERDO FERREIRA**

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.256-##

**(Assinado digitalmente em 25/03/2024 15:18 )**

**EDWARDS FRAZÃO TEIXEIRA**

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.747-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/documentos/> informando seu número: **21**, ano: **2024**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **24/01/2024** e o código de verificação: **a202bb8ae2**

## **DEDICATÓRIA**

A minha formação como profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda de meus amados pais Ozório e Audrey que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me carinho e amor, integridade moral e condições para estudar e de procurar meus objetivos. À minha esposa Gabriela e ao meu filho Gabriel, que além de me fazerem feliz, ajudaram-me durante todo o percurso, permaneceram sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos. A vocês, além de meus sorrisos, suor e lágrimas, dedico esta tese.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela força e perseverança, que me fizeram alcançar meus objetivos, e pelas oportunidades e aprendizado que apareceram durante minha vida.

Aos meus pais, Ozório e Audrey, por me educarem, sempre com paciência e amor, para que me tornasse uma pessoa íntegra, e pelas oportunidades de estudo e agradável vida que me proporcionaram.

À minha família, Gabriela e Gabriel, que me fazem sorrir sempre que abro os olhos e sonhar sempre que os fecho, as razões de todos meus sorrisos.

Aos meus irmãos, Guilherme e Matheus, por estarem sempre ao meu lado, durante toda minha vida, nos momentos bons e ruins.

Aos professores Marco Roberto Bourg de Mello, Helcimar Barbosa Palhano e Andressa Ferreira da Silva Spyrides pela oportunidade de aprendizado, pela paciência, ajuda e indispensável orientação, os quais me fizeram um profissional e uma pessoa melhor.

Aos professores e funcionários do Departamento de Reprodução e Avaliação Animal do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, pela paciência, ensinamentos e orientação durante as aulas, estágio e monitoria. Em especial aos Professores Marco Roberto Bourg de Mello e José Eugênio Três pelas oportunidades de estágio e os conhecimentos que adquiri com estes, o alicerce da minha formação profissional.

Aos funcionários do Setor de Bovinocultura de Leite UFRRJ, pela parceria e por acreditarem no projeto. Agradeço também especialmente ao Dr. Joaquim Esquerdo Ferreira por todos os ensinamentos, orientação e parceria durante todo o projeto. Agradeço também a ajuda de todos os estagiários e colegas orientados do Prof. Marco Mello.

Aos meus colegas, que por estarem sempre ao meu lado, durante toda a graduação, se tornaram meus irmãos; God, Brunão, Ruan, Felipe, Jaime, Manel, Rodrigo, Karol e Natali.

Ao professor Milo C. Wiltbank por me abrir as portas de seu laboratório para realizar parte do meu doutorado na University of Wisconsin, período engrandecedor da vida e do meu aprendizado. Agradeço também toda a equipe, em especial ao Pedro, Victor, João Paulo, Rafael e Guilherme.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível superior – Brasil (Capes) - Código de Financiamento 001.

## RESUMO GERAL

GRILLO, Gustavo Fernandes. **Perdas gestacionais em bovinos de leite em programas de transferência de embriões e a participação de *Neospora caninum***. 2021. 42p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Patologia e Ciências Clínicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

O uso de biotécnicas, evoluiu de forma significativa nas últimas décadas, proporcionando aumento da eficiência reprodutiva. A Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), Transferência de Embriões (TE) e a Fertilização in vitro (FIV), são as que mais evoluíram e apesar de sua capacidade é necessária a compreensão dos fatores relacionados ao seu sucesso para a aplicação das mesmas, assim o desenvolvimento de estudos que avaliem a resposta superovulatória, as taxas de prenhez e perdas gestacionais podem contribuir para o aumento da eficácia. Assim, dois experimentos foram desenvolvidos. O primeiro teve como objetivo avaliar a viabilidade da Transferência de embriões oriundos de vacas soropositivas para *Neospora caninum* em protocolos de superovulação e detectar, através da técnica de PCR, o DNA do parasita em embriões e lavados uterinos. Entre receptoras de embriões provenientes de doadoras soropositivas e soronegativas não foram encontradas diferenças na taxa de prenhez (60 e 57,1%,  $P=0,57$ ), perda gestacional (50% e 43,8%,  $P=0,79$ ) e número de embriões produzidos após superovulação (40 e 51,  $P=0,64$ ). Não houve também alteração do status sorológicos das receptoras, assim como não foram identificados o DNA do protozoário em embriões e amostras de PBS da lavagem uterina realizada para a coleta de embriões. Demonstrou-se que a técnica de TE é segura e pode ser utilizada em programas de controle da neosporose, ressaltando que apesar da similaridade no número de embriões, houve diferença significativa no número de estruturas congeláveis (25% e 74%,  $P<0,0001$ ) e transferíveis (27,5% e 78,4%,  $P<0,0001$ ). O segundo estudo avaliou o efeito do aumento da progesterona circulante (P4) pela indução da formação de corpo lúteo acessório (CL) em receptoras de embriões clonados (TNCS) e produzidos in vitro (FIV). O tratamento com hCG causou ovulação e aumentou a P4 circulante, e houve uma tendência de aumento nas prenhez por TE (P/TE) para receptoras de embriões TNCS nos dias 28 ( $P = 0,07$ ) e 42 ( $P = 0,09$ ). As taxas de prenhez foram semelhantes para embriões FIV e TNCS nos dias 28 e 33, no entanto, P/TE foi maior para FIV do que TNCS no dia 42 e mais tarde, devido a maiores ( $P = 0,05$ ) perdas de gestação no TNCS (44,4%) do que embriões FIV (15,0%) dos dias 33-42. Assim, o aumento da P4 circulante pode melhorar a fertilidade em receptoras de embriões TNCS, como evidenciado pela tendência do tratamento com hCG para aumentar P/ET. Houveram perdas gestacionais em ambos experimentos, principalmente em embriões TNCS, concluiu-se que não houve diferença no número de embriões, taxas de prenhez e perda gestacional na superovulação de fêmeas soropositivas e negativas para *N.caninum*. Os embriões não foram meios de transmissão para doença e pode ser utilizado em programas de controle da doença, ressalta-se porém que a houve diferença na qualidade dos embriões. O aumento da progesterona por produção de CL acessórios gerou uma tendência de melhora da prenhez em embriões TNCS, porém não foi capaz de reduzir as perdas gestacionais. Outros mecanismos além da concentração da progesterona devem ser investigados para melhorar a eficiência da TE em TNCS.

**Palavras-chave:** TE, perdas gestacionais, taxa de prenhez.



## GENERAL ABSTRACT

GRILLO, Gustavo Fernandes. **Gestational losses in dairy cattle in embryo transfer programs and the participation of the *Neospora caninum***. 2021. 42p. Thesis (Doutorado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária Patologia e Ciências Clínicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

The use of biotechniques as a reproductive management tool has evolved significantly in recent decades, increasing reproductive efficiency in dairy cattle. Among the biotechniques, Fixed-Time Artificial Insemination (FTAI), Embryo Transfer (ET) and in vitro Fertilization (IVF) the most evolved and currently used in reproductive programs for dairy herds. Despite their capacity, it is necessary to understand the factors related to their success for their application, thus the development of studies that assess the superovulatory response, pregnancy rates and pregnancy losses can contribute to increased effectiveness. The strict sanitary control of the herds becomes essential so that the respective programs can provide the expected gains in reproductive efficiency. In this way, two experiments were developed. The first experiment aimed to detect, through the PCR technique, the DNA of *Neospora caninum* in embryos from seropositive cows in superovulation protocols for embryo transfer. Among recipients of embryos from seropositive and seronegative donors, no differences were found in the pregnancy rate (60 and 57.1%,  $P=0.57$ ), gestational loss (50% and 43.8%,  $P=0.79$ ) and number of embryos produced after superovulation (40 and 51,  $P=0.64$ ). There was also no change in the serological status of the recipients, regardless of the status of the donor, as well as the protozoan DNA in embryos and PBS samples from the uterine lavage performed for embryo flushing were not identified. Thus, it can be demonstrated that the TE technique is safe and can be used in neosporosis control programs, noting that despite the similarity in the number of embryos, there was a significant difference in the number of freezeable (25% and 74%,  $P < 0.0001$ ) and transferable (27.5% and 78.4%,  $P < 0.0001$ ) structures. The second study evaluated the effect of increasing circulating progesterone (P4) by inducing accessory corpus luteum (CL) formation in recipients of cloned (SCNT) and in vitro produced (IVF) embryos. As expected, treatment with hCG caused ovulation and increased circulating P4, although hCG tended to increase pregnancies by ET (P/ET) for SCNT embryo recipients on days 28 ( $P = 0.07$ ) and 42 ( $P = 0.09$ ). Pregnancy rates were similar for IVF and SCNT embryos on days 28 and 33, however, P/ET was higher for IVF than SCNT on day 42 and later, due to higher ( $P = 0.05$ ) pregnancy losses in SCNT (44.4%) than IVF embryos (15.0%) from days 33-42. Thus, increasing circulating P4 may improve fertility in recipients of SCNT embryos, as evidenced by the tendency of treatment with hCG to increase P/ET of SCNT embryos. Although additional research is needed, it can be concluded that ET is a viable technique for the genetic improvement of the herd, which can also be used to control diseases such as bovine neosporosis.

**Key-words:** ET, gestacional losses, pregnancy rates.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ciclo de vida do protozoário *Neospora caninum*. Oocistos esporulados eliminados anteriormente pelo hospedeiro definitivo (canídeos) são ingeridos por um hospedeiro intermediário (aniamis de sangue quente) onde os esporozoítos se diferenciam em taquizoítos, que se disseminam para diferentes órgãos (fase aguda da infecção). A resposta imune do hospedeiro causa a transformação de taquizoítas em bradizoítas dentro dos cistos teciduais (fase persistente da infecção), que pode infectar o hospedeiro definitivo após sua ingestão.....4
- Figura 2.** Protocolo de sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo em receptoras e protocolo de superovulação das doadoras. FSH = Hormônio Folículo Estimulante, GnRH = Hôrmônio Liberador de Gonadotrofinas, IA = Inseminação Artificial, eCG = Gonadotrofina Coriônica Equina. .... 13
- Figura 3.** Esquema de alocação dos embriões em palhetas de 0,25 ml contendo três colunas de meio holding (PBS + 0,4% BSA) separadas por duas colunas de ar, sendo que os embriões permanecem na coluna central. PBS = Solução salina tamponada com fosfato; BSA = Album ..... 16
- Figura 4.** Eletroforese das amostras do meio de coleta de embriões do primeiro e o último lavado uterino, assim como do meio da placa de petri e embriões da primeira superovulação. M, Marcador; C+, Controle positivo; C-, Controle negativo; E, Embriões; L1, PBS do primeiro lavado uterino; L2, PBS do segundo lavado uterino; 1,2,3 e 4, identificação das doadoras; pb, protein bases (Pares de bases). .... 21
- Figura 5.** Protocolo de sincronização da ovulação e tratamento com GnRH e hCG em receptoras bovinas para transferência de embriões TNCS e FIV. GnRH = Hormônio Liberador de Gonadotrofina; hCG = Gonadotrofina Coriônica Humana; TE = Transferência de Embriões; UI = Unidades Internacionais; TNCS = transferência Nuclear de Células Somáticas; FIV = Fertilização in vitro..... 25
- Figura 6.** Concentrações circulantes de progesterona (P4) e do PSPB do dia 5 até o dia 63 após a ovulação (Dia 0) em receptoras de embriões gestantes recebendo ou não 3.300 IU de gonadotrofina coriônica humana (hCG) nos dias 5 e 12 do ciclo estral..... 28
- Figura 7.** Perda gestacional entre os dias 28 e 63 de gestação em receptoras (n = 41) tratadas ou não com hCG (Gonadotrofina coriônica equina) e que receberam embriões clonados ou fertilizados *in vitro*. .... 29

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Prevalência de <i>N.caninum</i> em relação à distribuição geográfica e teste diagnóstico utilizado (Adaptado de Dubey & Schares 2011). .....	5
<b>Tabela 2.</b> Efeito do touro sobre a qualidade e o estágio de desenvolvimento embrionário de doadoras soropositivas e soronegativas para <i>N. caninum</i> submetidas a duas rodadas de superovulação (SOV). .....	17
<b>Tabela 3.</b> Análise individual do número de corpos lúteos e total de estruturas coletadas de doadoras soropositivas e soronegativas para <i>N. caninum</i> submetidas a duas rodadas de superovulação (SOV). .....	18
<b>Tabela 4.</b> Classificação dos embriões oriundos de doadoras soropositivas e soronegativas para <i>N. caninum</i> de acordo com o estágio de desenvolvimento.....	19
<b>Tabela 5.</b> Classificação dos embriões oriundos de doadoras soropositivas e soronegativas para <i>N. caninum</i> de acordo com à qualidade.....	19
<b>Tabela 6.</b> Diagnóstico de gestação aos 30 dias e perdas gestacionais em receptoras soronegativas inovuladas com embriões oriundos de doadoras soropositivas e soronegativas para <i>N.caninum</i> .....	20
<b>Tabela 7.</b> Avaliação ovariana de receptoras holandesas nulíparas tratadas ou não com gonadotrofina coriônica humana (hCG) nos dias 5 e 12 após a sincronização da ovulação (Dia -8: inserção de um implante intravaginal de progesterona [P4] contendo 1,38 g; Dia -3: retirada de o implante de P4 e administração de 500 µg de cloprostenol [PGF]; Dia -2: administração de um segundo PGF; Dia 0: 100 µg de acetato de gonadorelina [GnRH]). .....	27
<b>Tabela 8.</b> Taxa de prenhez (P/TE) e perda gestacional de acordo com o tipo de embrião (FIV vs. TNCS) em diferentes fases da gestação. ....	29
<b>Tabela 9.</b> Características morfológicas do embrião e sua respectiva vesícula amniótica no 33º dia de gestação de receptoras que receberam embrião fertilizado <i>in vitro</i> (FIV) ou produzido por transferência nuclear (TNCS). Cada grupo de embriões (FIV vs. TNCS) foi dividido para receber ou não 3.300 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) nos dias 5 e 12 após a ovulação.....	31

## LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS OU SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
BE	Benzoato de estradiol
BI	Blastocisto inicial
BL	Blastocisto
bp	Pares de base
BSA	Albumina sérica bovina
BX	Blastocisto expandido
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
CL	Corpo lúteo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gravidade
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
HI	Hemaglutinação indireta
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
IBR	Rinotraqueíte infecciosa bovina
IETS	Sociedade internacional de tecnologia de embriões
IFAT	Imunofluorescência indireta
IM	Intramuscular
IP	Intervalo de partos
IZ	Instituto de zootecnia
Kg	Quilograma
km	Quilômetro
LBE	Laboratório de biologia estrutural
mA	Miliampere
MC	Mórula compacta
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
MI	Mórula inicial
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
NF	Não fertilizado(a)
ng	Nanograma
OPU	Ovum pick up
P	Prenhez
P4	Progesterona

PAGs	Glicoproteínas associadas à prenhez
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGF2 $\alpha$	Prostaglandina f2alfa
PNCEBT	Programa nacional de controle e erradicação da brucelose e tuberculose
PSPB	Proteína b específica da prenhez
RJ	Rio de janeiro
SAS	Statistical analysis system
SOV	Superovulação
TC	Taxa de concepção
TE	Transferência de embriões
TNCS	Transferência nuclear de células somáticas
TP	Taxa de prenhez
UFRRJ	Universidade federal rural do rio de janeiro
UI	Unidades internacionais
US	Ultrassonografia
ZP	Zona pelúcida

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>2</b>
2.1 Transferência de Embriões na Bovinocultura Leiteira .....	2
2.2 Perdas Embrionárias e Fetais em Bovinos de Leite .....	2
2.3 Ciclo Biológico do <i>Neospora caninum</i> .....	3
2.4 Epidemiologia do <i>Neospora caninum</i> .....	4
2.5 Surtos e Influência na Eficiência Reprodutiva .....	5
2.6 Patologia e Transmissão da Neosporose.....	6
2.7 <i>Neospora caninum</i> e Biotécnicas da Reprodução .....	7
2.8 Diagnóstico de Neosporose.....	7
2.9 Controle da Neosporose .....	8
<b>3 CAPÍTULO I .....</b>	<b>9</b>
3.1 Resumo .....	9
3.2 Abstract .....	10
3.3 Introdução .....	10
3.4 Material e Métodos.....	12
3.4.1 Condições gerais do experimento .....	12
3.4.2 Controle sanitário e sorologia.....	12
3.4.3 Seleção de doadoras, superovulação, coleta e manipulação de embriões.....	12
3.4.4 Avaliação morfológica dos embriões .....	14
3.4.5 Seleção e sincronização de receptoras e transferência de embriões .....	14
3.4.6 Diagnóstico de gestação e avaliação da perda gestacional.....	15
3.4.7 Avaliações sorológicas das receptoras gestantes e dos bezerros .....	15
3.4.8 Análise dos embriões e do lavado uterino por PCR para detecção de <i>N. caninum</i> .....	15
3.4.9 Análise Estatística.....	16
3.5 Resultados e Discussão .....	16
3.7 Conclusões .....	22
<b>4 CAPÍTULO II.....</b>	<b>22</b>
4.1 Resumo .....	22
4.2 Abstract .....	23
4.3. Introdução .....	24
4.4 Material e Métodos.....	25
4.4.1 Animais e tratamentos .....	25
4.4.2 Dosagem de P4 e PSPB.....	25
4.4.3 Avaliações ultrassonográficas e mensuração do embrião e da vesícula amniótica .....	26
4.4.4 Análise estatística.....	26
4.5 Resultados .....	27
4.6 Discussão .....	31

<b>4.7 Conclusões .....</b>	<b>33</b>
<b>5 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>33</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>34</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>42</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, sendo o maior exportador de carne, segundo maior produtor de bezerros (USDA, 2021) e sexto em produção de leite (USDA, 2020). Apesar da alta produção de leite (23.505.000 toneladas), o país sempre foi um tradicional importador de lácteos e a produtividade do rebanho é baixa (4,02 kg/vaca/dia) (USDA, 2020). A produção por vaca por ano apresentou aumento comparando os dois últimos censos, quando mesmo com um menor número de animais houve um aumento na produção de leite, por investimentos em tecnologia, nutrição, genética e saúde animal (Anuário do Leite EMBRAPA, 2020).

Para um rebanho leiteiro alcançar o máximo de sua capacidade produtiva, deve ser livre de doenças e possuir um bom manejo reprodutivo, uma vez que, a diminuição do intervalo de partos (IP) é uma necessidade fundamental para a sustentabilidade do modelo produtivo (CONSENTINI et al., 2021). Estarem adaptados às condições ambientais nas quais são explorados e serem alimentados de acordo com sua demanda nutricional também são quesitos importantes para maximização da produção.

A implantação de um programa sanitário em um rebanho bovino leiteiro possibilita maior eficiência reprodutiva. As medidas preventivas devem envolver a utilização de biotécnicas reprodutivas (inseminação artificial e transferências de embriões) livres de patógenos, assim como o monitoramento e vacinação para controle de enfermidades como brucelose, tuberculose e leptospirose (DEL FAVA et al., 2004).

Além destas enfermidades, a neosporose tem sido apontada como importante fator de perda gestacional em bovinos sendo responsável por até 26% dos abortamentos em um estudo realizado no México (GARCIA-VASQUEZ et al., 2005). O prejuízo causado pelas perdas relacionadas foi estimado em US\$ 700 por animal (DEMIR et al., 2020), em um estudo realizado na Turquia, fazendo-se necessário o uso de medidas de controle específico para *N. caninum*.

O uso da transferência de embriões (TE) tem sido sugerido como possível medida de controle para transmissão de doenças, dentre elas, a neosporose em bovinos desde que adotadas medidas preconizadas pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS). Até o momento não foram realizadas pesquisas que avaliem a qualidade e o grau de desenvolvimento de embriões coletados após protocolos de superovulação em doadoras soropositivas para *N. caninum*.

O uso da TE promove grande progresso genético do rebanho, uma vez que permite que uma doadora de alto mérito genético aumente o número de bezerros que produziria em sua vida útil. O Brasil é um dos países líderes em produção e transferência de embriões com 364.802 embriões produzidos em 2018, sendo 23.219 produzidos por superovulação (VIANA, 2019).

A produção de embriões por Transferência Nuclear de Células Somáticas (TNCS), conhecidos por embriões clone, também é uma técnica que visa o progresso genético e possui a transferência como uma de suas etapas. Desde a produção do primeiro mamífero clonado usando o núcleo de uma célula somática adulta (WILMUT et al., 1997), as técnicas de clonagem baseadas na transferência nuclear de células somáticas (TNCS) têm sido amplamente estudadas e utilizadas para replicar animais de alto mérito genético (PAGE & AMBANDY, 2004; BORDIGNON et al., 2017). Apesar da pesquisa e do potencial prático da TNCS, a técnica ainda é ineficiente e apenas 10% dos embriões transferidos resultam em bezerros que se desenvolvem com sucesso (PANARACE et al., 2006). Mesmo que as taxas de prenhez após a transferência de embriões TNCS e fertilizados *in vitro* (FIV) sejam geralmente semelhantes aos 30 dias de gestação, existe uma maior perda gestacional entre 30 dias e a termo (WELLS, 2005;



PANARACE et al., 2006). Assim, a compreensão das diferenças que ocorrem durante o desenvolvimento e manutenção da prenhez deve aumentar a sobrevivência dos bezerros e melhorar os resultados usando esta técnica (FABER et al., 2004).

A presente tese foi estruturada em três partes, sendo primeira uma revisão de literatura com objetivo de embasar a metodologia utilizada nos experimentos, abordar a importância do assunto e fomentar a discussão dos resultados dos capítulos seguintes. A segunda parte (Capítulo I) está apresentada em forma de artigo científico, cujo foco foi avaliar se doadoras de embriões, soropositivas para *N. caninum*, apresentam comprometimento na quantidade e qualidade de embriões produzidos e ainda se os embriões podem ser considerados como fonte de transmissão vertical da doença. A terceira e última parte da tese (Capítulo II), também em forma de artigo, é um experimento cujo objetivo principal foi correlacionar as perdas gestacionais com o perfil hormonal em receptoras de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Transferência de Embriões na Bovinocultura Leiteira

As biotécnicas da reprodução mais utilizadas na bovinocultura leiteira, Inseminação Artificial (IA) e Transferência de Embriões (TE) [SOV – Superovulação e FIV – Fertilização *In Vitro*], têm como objetivo o melhoramento genético do rebanho. A TE permite que uma doadora de alto mérito genético aumente o número de bezerros que produziria em sua vida útil e o Brasil se destaca na implementação desta técnica com 364.802 embriões produzidos em 2018, sendo 23.219 produzidos por superovulação (VIANA, 2019). Além destas a TNCS (Transferência nuclear de células somáticas) permite multiplicar indivíduos de alto mérito genético e assim descendentes com características desejadas (PANARACE et al., 2009)

Os protocolos de sincronização de ovulação e de superovulação são ferramentas que favorecem a utilização da TE, por fixar o momento da ovulação, o que permite prever os dias de desenvolvimento uterino e da formação do corpo lúteo (CL) (BARUSELLI et al., 2019). Estes protocolos permitem que 75 a 85% das receptoras apresentem um corpo lúteo com diâmetro superior a 13 mm, o que é adequado para TE a sem a necessidade de detecção de estro (AMBROSE et al., 2010).

As taxas de prenhez após a transferências de embriões produzidos *In vitro* estão em torno de 40 a 45% e os fatores que influenciam no sucesso da técnica são a qualidade do embrião e o diâmetro do CL (ALKAN et al., 2020). Os embriões podem ser classificados em relação às suas características morfológicas de estágio de desenvolvimento (não fertilizados, 2-8 células, 8-16 células, Mórula Inicial-MI, Mórula Compacta-MC, Blastocisto Inicial-BI, Blastocisto-BL e Blastocisto expandido-BX) e à sua qualidade (grau I - Excelente, grau II - Bom, grau III - Regular, e grau IV - Ruim) de acordo com STRINGFELLOW & GIVENS (2010), sendo que os embriões podem ainda ser classificados como congeláveis (Grau I e II) ou transferíveis (Grau I, II e III).

### 2.2 Perdas Embrionárias e Fetais em Bovinos de Leite

A mortalidade embrionária é uma das principais causas de perda econômica na bovinocultura leiteira (DISKIN et al., 2016), e as perdas embrionárias e fetais geram

ineficiência reprodutiva por aumentar o intervalo de partos, diminuindo assim a produtividade dos animais em sua vida útil, e acarretando em gastos com diagnóstico e tratamentos de possíveis enfermidades. Essas perdas podem ocorrer tanto na fase embrionária como na fase fetal (WILTIBANK et al., 2016).

Bovinos leiteiros apresentam alta taxa de fertilização, a maioria dos embriões coletado até o sétimo dia após a inseminação se demonstram viáveis (POHLER et al., 2020), e aproximadamente 70% das fêmeas inseminadas, após o cio ou sincronizadas para IATF, terão um blastocisto (WILTIBANK et al., 2016). O período após a descida do embrião do oviduto ao útero, sua implantação e alongamento são momentos críticos para a manutenção da gestação, principalmente em vacas leiteiras de alta produção. A falha no reconhecimento materno e a ineficiente produção de progesterona são as principais causas de falhas neste período (LUCY, 2001; WILTIBANK et al., 2016).

As perdas gestacionais desde a fertilização do oócito até o vigésimo sétimo dia de gestação representam até 20% do total, e após este período até o começo do desenvolvimento fetal podem representar até 15% das perdas (WILTIBANK et al., 2016), sendo estas ainda pouco elucidadas (POHLER et al., 2020).

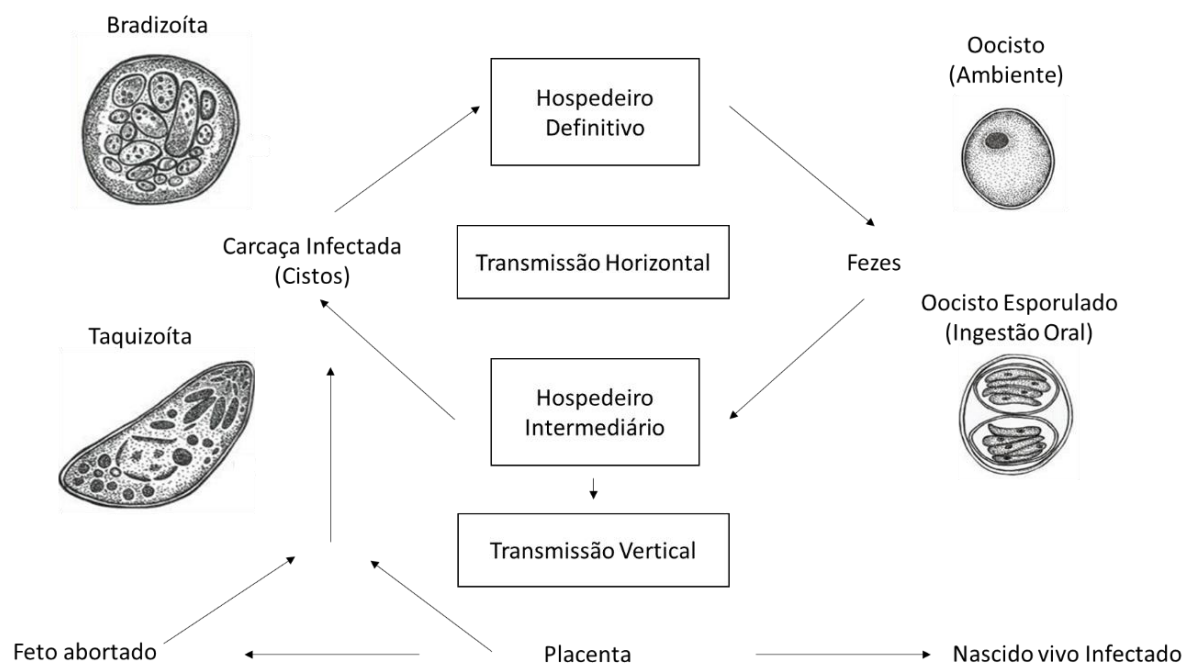
Perdas embrionárias e fetais associadas às infecções bacterianas, virais, protozoárias e fúngicas dependem do agente, de sua virulência e da competência imunológica da gestante e do conceito no momento da infecção (DISKIN et al., 2016). Dentre as causas destas perdas, destacam-se a campilobacteriose, leptospirose, rinotraqueíte infecciosa bovina, diarreia viral bovina, brucelose, tricomonose e neosporose (RANI et al., 2018), sendo que a brucelose, leptospirose, campilobacteriose e neosporose têm sido as mais citadas como causadoras de abortamentos em bovinos (GIVENS & MARLEY, 2008)

Estudos epidemiológicos conduzidos no México, Argentina e Estados Unidos avaliaram agentes etiológicos em fetos abortados e apontaram que a neosporose pode ser o principal fator causador de abortamento em bovinos (GARCIA-VASQUEZ et al., 2005; DUBEY et al., 2007; MORREL et al., 2019).

### **2.3 Ciclo Biológico do *Neospora caninum***

O protozoário *Neospora caninum* é um parasita pertencente ao filo Apicomplexa e à família *Sarcocystidae* (MCALLISTER et al., 1998). Pode ser diagnosticado em diferentes espécies silvestres e domésticas, incluindo as espécies pecuárias de maior relevância (CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017).

É um parasita de ciclo heteroxeno obrigatório, necessitando de dois hospedeiros para completar seu ciclo biológico, o Hospedeiro Definitivo (Caninos) e o Hospedeiro Intermediário (Animais de Sangue quente). Os três estágios do ciclo de vida do parasito são taquizoítos, cistos contendo os bradizoítos e oocistos, sendo que os dois primeiros estágios ocorrem nos tecidos do hospedeiro intermediário e o último é eliminado nas fezes do hospedeiro definitivo (CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017). Os hospedeiros intermediários infectam-se ingerindo oocistos esporulados do parasito que foram eliminados no ambiente pelos hospedeiros definitivos. Estes, por sua vez, ingerem carcaças, fetos e restos de placentas contaminados. Nos hospedeiros definitivos ocorre a fase reprodutiva do parasito, o que origina os oocistos que serão eliminados no ambiente, completando assim o ciclo de transmissão horizontal (SOKOLBORELLI, 2020), conforme apresentado na Figura 1.



**Figura 1** Ciclo de vida do protozoário *Neospora caninum*. Oocistos esporulados eliminados anteriormente pelo hospedeiro definitivo (canídeos) são ingeridos por um hospedeiro intermediário (animais de sangue quente) onde os esporozoítos se diferenciam em taquizoítas, que se disseminam para diferentes órgãos (fase aguda da infecção). A resposta imune do hospedeiro causa a transformação de taquizoítas em bradizoítas dentro dos cistos teciduais (fase persistente da infecção), que pode infectar o hospedeiro definitivo após sua ingestão.

Os canídeos são seu hospedeiro definitivo, mas diversos animais podem servir como hospedeiro intermediário (DUBEY et al., 2017). Os taquizoítos e os bradizoítos são estágios de multiplicação assexuada, os esporozoítos estão contidos em oocistos, que são produzidos de forma sexuada e eliminados apenas nas fezes dos hospedeiros definitivos (DUBEY et al., 2006).

Os esporozoítos invadem as células epiteliais do intestino delgado e diferenciam-se em taquizoítos, estes taquizoítos diferenciam-se em bradizoítas que se encistam nos tecidos do hospedeiro, que podem persistir por toda a vida dos animais de sangue quente, sem causar manifestações clínicas significativas (DUBEY et al., 2017).

## 2.4 Epidemiologia do *Neospora caninum*

A neosporose bovina é uma enfermidade amplamente disseminada, tendo sido reportada em diversos países como Austrália, Nova Zelândia, Coreia, Japão, Tailândia e Estados Unidos (DUBEY, 2005). No Brasil, a soropositividade contra a Neosporose foi identificada em diversos estados do sul ao norte do país (MARTINS et al., 2011; SANTOS et al., 2014; KLAUCK et al., 2016, CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017), variando de 12% a 50%, de acordo com o tipo de produção explorada, o sistema de criação e o método de diagnóstico (Tabela 1).

**Tabela 1.** Prevalência de *N.caninum* em relação à distribuição geográfica e teste diagnóstico utilizado (Adaptado de Dubey & Schares 2011).

País	Região	N	Positivos (%)	Teste	Referência
Argentina	-	4190	14.2	IFAT	Moore et al. (2009)
	-	1042	25.7	IFAT	Moore et al. (2008)
	-	90	73	IFAT	Moré et al. (2008a)
Brasil	Mato Grosso	1098	62.5	IFAT	Andreotti et al. (2010) <sup>a</sup>
	Minas Gerais	559	91.2	IFAT	Guedes et al. (2008)
	Pará	120	19.2	IFAT	Minervino et al. (2008)
	Rio de Janeiro	563	23.3	ELISA	Munhoz et al. (2009) <sup>a</sup>
	Rio de Janeiro	40	23	IFAT	Gaia et al. (2020)
Alemanha	-	1950	1	ELISA	Schares et al. (2009)
México	Nuevo Leon	813	11.6	ELISA	Segura-Correa et al. (2010)
	Veracruz state	863	26	ELISA	Romero-Salas et al. (2010)
Dinamarca	-	1657	0.7	ELISA	Klevar et al. (2010)
Espanha	Galicia	37,090	22.5	ELISA	Eiras et al. (2011) <sup>a</sup>
	-	5196	15.7	IFAT	González-Warleta et al. (2008)
	-	178	7.3	ELISA	Panadero et al. (2010)

**IFAT – imunofluorescência indireta; ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay**

## 2.5 Surtos e Influência na Eficiência Reprodutiva

Os surtos podem ser esporádicos, endêmicos ou epidêmicos. O surto esporádico ocorre em diferentes espécies causando encefalomielite e miocardite, porém os surtos diagnosticados com mais frequência são os abortamentos endêmicos e epidêmicos em vacas, sendo o último mais frequente (SILVA et al., 2019). Surtos epidêmicos ocorrem por infecção primária dos animais, por ingestão de alimento ou água contaminados com oocistos, animias que apresentam fatores imunossupressores são mais acometidos (MCALLISTER et al., 2000). Os abortamentos endêmicos ocorrem com maior frequência nas vacas infectadas congenitamente, sendo possível ocorrer uma nova infecção, porém estudos demonstram que abortamentos repetidos são causados pela reativação de uma infecção latente (ABBITT & RADSE, 2007).

Na maioria dos estudos sobre neosporose bovina, os autores relatam e consideram o impacto negativo da enfermidade sobre os índices reprodutivos (RAGOZO et al., 2003; MELO et al., 2006; KLAUCK et al., 2016). Os animais soropositivos têm menor número de gestações, quatro vezes mais chances de abortar e oito vezes mais chances de parir natimortos (GALVÃO et al., 2011). Esta doença tem sido associada a casos de abortamento esporádico, endêmico e epidêmico em bovinos (CORBELLINI et al., 2000; FORTUNATO, 2010; CERQUEIRA-CEZAR et al., 2017; SILVA et al., 2019), causando perdas na bovinocultura leiteira e de corte. O impacto econômico depende, além do valor dos fetos abortados, dos custos indiretos com

assistência veterinária e testes diagnósticos, aumento do tempo de lactação e do intervalo de partos, queda na produção de leite e descarte de animais (FORTUNATO, 2010).

## 2.6 Patologia e Transmissão da Neosporose

A infecção de um indivíduo pode ocorrer *in utero* ou pela ingestão de oocistos presentes nas fezes do hospedeiro definitivo (DUBEY et al., 2006, SILVA et al., 2019). Diversos autores apontam o cão como principal responsável por este tipo de transmissão, mas canídeos selvagens também podem atuar como hospedeiros definitivos (MCALLISTER et al., 1998; SHANON et al., 2015; ACOSTA et al., 2016; CONSTANTINO et al., 2016; WANG et al., 2016). Quando a infecção é gerada pela ingestão de oocistos, ocorrem surtos de abortamentos, num período de um a dois meses após a infecção, com fetos abortados do terceiro ao oitavo mês de gestação. Fêmeas que abortaram podem parir fetos normais porém na gestação seguinte estes serão soropositivos (SILVA et al., 2019). Novilhas soropositivas são mais propensas a abortarem no início da gestação (WANG et al., 2016).

A transmissão vertical é a principal forma de disseminação de *N. caninum* em bovinos e o abortamento é o sinal clínico mais evidente, se apresentando de forma endêmica sem ocorrência de surtos (ANDERSON, 2007; FORTUNATO, 2010). Porém, a patogenia desta enfermidade nos bovinos é complexa e ainda não é totalmente esclarecida uma vez que alguns animais soropositivos têm abortamento e outros não. Nos animais infectados naturalmente, a imunidade adquirida contra a infecção antes da gestação não é suficiente para prevenir a transmissão transplacentária de *N. caninum* para o feto (MCALLISTER et al., 2000).

A soroprevalência em fetos abortados ou em bezerros nascidos vivos paridos por mães soropositivas é superior a 80% (CAMPERO et al., 2003; DUBEY, 2003). Normalmente quando os animais são infectados congenitamente os abortamentos são endêmicos e não ocorrem surtos.

O microorganismo apresenta tropismo pelo epitélio coriônico e pelos vasos sanguíneos placentários fetais, provocando vasculite, inflamação e degeneração do corioalantóide e necrose dos placentomas. A morte celular ocorre devido à intensa multiplicação dos taquizoítos (DUBEY et al., 2006). Os fetos podem morrer no útero, serem absorvidos, mumificados, nascer mortos, fracos ou clinicamente normais com infecção crônica. As vacas infectadas apresentam diminuição da produção de leite na primeira lactação e maior probabilidade de abortar e serem excluídas do plantel em idade precoce (CERQUEIRA-CEZAR et al., 2017).

Bezerras nascidas de vacas infectadas têm maior probabilidade de nascerem persistentemente infectadas, apresentarem maior risco de abortamento, mas em suas gestações a probabilidade maior é de gerar crias infectadas (RAGOZO et al., 2003; MELO et al., 2006). Os animais infectados horizontalmente podem abortar, produzir bezerros sem infecção ou congenitamente infectados, dependente do estado do seu sistema imunológico e da fase de gestação em que se encontram quando são infectados (PARKINSON, 2009). No Brasil, foi observada uma tendência de animais taurinos apresentarem 2,65 vezes mais chances de adquirir a infecção em relação aos zebuínos e mestiços (MUNHOZ et al., 2009).

Assim como no gado leiteiro, a infecção pode ocorrer em vacas de corte de modo vertical ou horizontal, existindo risco de abortamento, mas muitas vezes os bezerros nascem prematuramente e com baixo peso corporal (SILVA et al., 2019). Bezerros de até dois meses de idade podem apresentar sinais neurológicos, como incapacidade de se colocar em estação, ataxia, diminuição dos reflexos patelares, perda de propriocepção consciente, exoftalmia ou assimetria (DUBEY, 2003).

## 2.7 *Neospora caninum* e Biotécnicas da Reprodução

As biotécnicas da reprodução são utilizadas principalmente para promover o melhoramento genético dos animais, porém seu uso também auxilia no controle de transmissão de doenças. A transmissão da neosporose pela utilização de sêmen de touros soropositivos é pouco provável mesmo tendo sido demonstrada a presença de DNA do parasita no sêmen e no sangue de machos naturalmente infectados (FERRE et al., 2005; CANADA et al., 2006), no entanto não houve a soroconversão de vacas soronegativas, assim a quantidade de parasitas no sêmen seria insuficiente para induzir a doença (SERRANO et al., 2006; SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2007).

A transferência de embriões pode ser um meio para transmissão de doenças, e sendo assim, a IETS preconizou um protocolo para possibilitar o uso desta biotécnica de forma segura. Os primeiros resultados que demonstraram a eficácia da técnica em evitar a transmissão do parasito foram realizados por Baillargeon et al. (2001). Nesta pesquisa, a transferência de embriões provenientes de fêmeas soropositivas para receptoras soronegativas não alterou o estado sorológico das receptoras e seus produtos também foram negativos à sorologia de *N.caninum*. Campero et al. (2003) reforçaram estes resultados, quando em um estudo retrospectivo avaliaram que novilhas nascidas de mães soropositivas, geradas via inseminação artificial, foram 100% soropositivas, enquanto que novilhas nascidas de receptoras soronegativas, mas com uso de embriões (SOV) de doadoras soropositivas se apresentaram negativas a sorologia para neosporose. Estes autores também demonstraram que não houve transmissão da doença entre as doadoras e receptoras pela transferência de embriões (BAILLARGEON et al., 2001; CAMPERO et al., 2003).

A presença de taquizoítos em oócitos e embriões ainda é um assunto controverso, sendo que o uso da PCR como ferramenta para diagnosticar a presença do DNA do parasito nestas estruturas tem sido utilizado para elucidar este tema. Por meio desta técnica de diagnóstico, a presença do parasito foi descartada em 13 oócitos e 30 embriões provenientes de vacas soropositivas superovuladas por Moskwa et al. (2008). Estes autores demonstraram também uma tendência dos animais soropositivos em produzir menos embriões após protocolos de superovulação.

Porém, Silva et al. (2012) demonstraram que os folículos são locais de tropismo para *N. caninum*. Utilizando a PCR, estes autores detectaram o DNA do parasito em aspirados foliculares (coletados por aspiração folicular - OPU) e lavados uterinos de 13 vacas com histórico de abortamento prévio e sorologicamente positivas, com mais de 90% dos aspirados foliculares positivos, sugerindo que a presença de *N. caninum* no ovário e útero é um possível risco de transmissão do parasita através de técnicas de transferência de embriões.

## 2.8 Diagnóstico de Neosporose

O diagnóstico da neosporose pode basear-se em análises histopatológicas pela presença de lesões indicativas, na demonstração do parasito em secções teciduais coradas pela hematoxilina-eosina, análises imunohistoquímicas, na demonstração do parasito e na sorologia (DUBEY & SCHARES, 2006). Para o diagnóstico, deve-se considerar a idade gestacional, o estado de autólise do feto, as lesões inflamatórias e a presença do parasito, assim como a exclusão de outras causas de abortamento bovino (ANDERSON, 2007).

O número de *N. caninum* encontrado em secções de tecidos bovinos é baixo, sendo difícil o reconhecimento de taquizoítos nos cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina (DUBEY & SCHARES, 2006), análises imunohistoquímicas são métodos mais efetivos para a identificação de taquizoítos e cistos nos tecidos fetais (ANDERSON, 2007), a

demonstração da presença de *N. caninum* nas lesões é a melhor evidência da etiologia do abortamento (DUBEY & LINDSAY, 2006).

Os testes de hemaglutinação indireta (HI), Imunofluorescência Indireta (IFAT) e ELISA podem ser empregados em levantamentos sorológicos (DUBEY & SCHARES, 2006). Ressalta-se que os títulos de anticorpos não são elevados por conta da doença aguda, mas são possíveis de serem diagnosticados uma semana a três meses após a infecção (CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017).

A precisão do diagnóstico pela IFAT depende da experiência de quem executa e realiza a leitura dos resultados, mas demonstra ser uma técnica confiável (ORTEGA-MORA et al., 2006). A titulação de 1:200 indica infecção prévia enquanto que títulos superiores, em fêmeas que abortaram, que o abortamento foi causado pelo *N. caninum* (PARKINSON, 2009).

O teste de ELISA, realizado com antígenos preparados com merozoítos, demonstra sensibilidade e especificidade altas a detecção de infecção em cada animal, e 100% de sensibilidade na detecção da infecção no rebanho, mesmo com um número amostral reduzido (ORTEGA-MORA et al., 2006). Ressalta-se também que em fazendas com alta soropositividade, os testes sorológicos em bezerras devem ser realizados antes da primeira amamentação, logo após o nascimento, ou após seis meses de idade.

A PCR é uma técnica de diagnóstico que pode ser usada para a pesquisa do DNA do protozoário e apresenta alta sensibilidade e especificidade. Tal técnica permite a identificação de um único taquizoítos na amostra (BASZLER et al., 1999; COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2002; MOSWKA et al., 2008; SILVA et al., 2012) utilizando o par de primers Np4-Np7 do gene neospora específico Np5 que amplificam uma sequência de 275bp.

Utilizando a PCR em tempo real, o protozoário *N. caninum* pode ser quantificado no sangue e sêmen (SERRANO-MARTÍNEZ et al., 2007), em tecidos fetais como cérebro (COLLANTES-FERNÁNDEZ et al., 2002; REITT et al., 2007; SANCHEZ et al., 2009), fígado, rins e coração (BASZLER et al., 1999). Mesmo quando os fetos se encontram severamente autolisados, não sendo possível a visualização de lesões, a técnica da PCR pode ser utilizada para identificar o agente (NOGAREDA et al., 2009). Atualmente a PCR tem sido utilizada também para identificação do DNA *N. caninum* em oócitos, embriões, aspirados foliculares e lavados uterinos (MOSKWA et al., 2008; SILVA et al., 2012).

## 2.9 Controle da Neosporose

A neosporose é uma enfermidade de difícil controle, e antes de serem tomadas quaisquer medidas, a real situação da propriedade deve ser conhecida. Em explorações nas quais não existem soropositividade para a doença e os abortamentos não são relacionados à neosporose, o principal objetivo é a prevenção da introdução do parasito. Nos rebanhos considerados infectados, o controle da transmissão vertical, pela redução do número de animais seropositivos, é a meta principal, mas também é importante a redução da transmissão horizontal, pelo controle dos hospedeiros definitivos (DUBEY et al., 2007).

As principais medidas de controle são: descarte de animais soropositivos, controle de hospedeiros definitivos e fontes de contaminação horizontal. Estas medidas tomadas de forma conjunta podem levar à diminuição da incidência de abortamentos (PARKINSON, 2009). Uma forma de evitar a entrada ou a permanência da neosporose na exploração é a compra de animais para reposição de criatórios livres da doença, com bom desempenho reprodutivo ou com sorologia negativa para mesma, o que pode ser de difícil realização.

É necessária a separação de carnívoros domésticos (cão) e silvestres do setor produtivo, o que não é viável na maioria das fazendas. Esta medida reduz a transmissão da infecção para o ambiente, se não for realizável, o acesso destes às zonas de armazenamento de alimentos e aos

locais em que se encontram os bovinos deve ser impedido (DUBEY et al., 2007). A presença de cadelas gestantes ou com ninhadas deve ser evitada pois os filhotes excretam mais oocistos no ambiente (GODIM et al., 2005) e carcaças e membranas fetais devem ser prontamente enterradas, evitando o começo de um novo ciclo.

A transferência de embriões (seguindo o procedimento proposto pela IETS) utilizando doadoras soropositivas e receptoras soronegativas é indicada como método de controle da transmissão da neosporose (BAILLARGEON et al., 2001; CAMPERO et al., 2003). Pela detecção de DNA do parasito em aspirados foliculares coletados por OPU foi demonstrado um tropismo do *N.caninum* pelo oócito, sendo assim, a transferência de embriões pode se apresentar como um fator de risco para a transmissão da doença (SILVA et al., 2012)

Não existem tratamentos eficazes para eliminação da doença. O contato prévio com pequeno número de cistos induz a imunidade, porém o animal continua a transmitir a doença para sua prole. Vacinas vêm sendo desenvolvidas para evitar a infecção e o abortamento, porém ainda não se mostraram eficazes no controle da neosporose em bovinos (MARUGAN-HERNANDEZ, et al.2017).

## 3 CAPÍTULO I

### **Avaliação da Transferência de Embriões como Meio de Transmissão do *Neospora caninum* em Bovinos**

#### **3.1 Resumo**

Dentre as biotécnicas reprodutivas, a transferência de embriões se destaca por acelerar a seleção genética ao permitir um maior número de descendentes de uma fêmea de alto mérito. É necessário, porém, um rigoroso controle sanitário para garantir a eficiência reprodutiva desta técnica. No contexto das enfermidades que podem impactar negativamente os resultados esperados, encontra-se a neosporose bovina, que tem como agente etiológico, o *Neospora caninum*, um protozoário que pode causar perdas embrionárias precoces e abortamento em vacas leiteiras. Neste sentido, o presente estudo objetivou avaliar a técnica da transferência de embriões como meio de transmissão da neosporose e comparar quanti e qualitativamente a produção de embriões de doadoras soropositivas e soronegativas. Para tanto, foram utilizadas quatro doadoras (duas soropositivas e duas soronegativas) e quarenta receptoras soronegativas da raça Girolando. Os embriões,coletados de doadoras superovuladas, sem passarem pelo protocolo de lavagem seriada em tripsina proposto pela IETS, foram transferidos para receptoras soronegativas e também enviados para análise por PCR para identificação do *N. caninum*. Amostras do lavado uterino também foram investigadas pela técnica de PCR para presença do agente. Não foi observada diferença entre o número total de estruturas coletadas de doadoras soropositivas e soronegativas (40 e 51;  $P=0.64$ ), no entanto, houve diferença significativa no percentual de embriões congeláveis (25% e 74%,  $P<0,0001$ ) e transferíveis (27,5% e 78,4%,  $P<0,0001$ ). As receptoras de embriões provenientes de doadoras soropositivas e soronegativas apresentaram taxa de prenhez (60 e 57,1%,  $P=0,57$ ) e de perda gestacional (50% e 43,8%,  $P=0,79$ ) semelhantes. Não houve também alteração do status sorológicos das receptoras, independente do status da doadora, assim como não foram identificados o DNA do protozoário em embriões e amostras do lavado uterino realizado para a coleta de embriões. Assim, demonstra-se que a técnica de transferência de embriões é segura e pode ser utilizada



em programas de controle da neosporose, no entanto, há um comprometimento da qualidade dos embriões produzidos a partir de doadoras soropositivas.

**Palavras-chave:** TE, Perdas gestacionais, Taxa de prenhez, Bovinos, Neosporose.

### 3.2 Abstract

Among the reproductive biotechniques, Embryo Transfer stands out for accelerating genetic selection by allowing a greater number of offspring to a female of high merit. However, a rigorous sanitary control is necessary to guarantee the reproductive efficiency of this technique. In the context of diseases that can negatively impact the expected results, there is bovine neosporosis, whose etiological agent, *Neospora caninum*, a protozoan that can cause early embryonic loss and abortion in dairy cows. In this sense, the present study aimed to evaluate the embryo transfer technique as a means of transmission of neosporosis and to compare quantitatively and qualitatively the production of embryos from seropositive and seronegative donors. For this purpose, four donors (two seropositive and two seronegative) and forty seronegative Girolando breed recipients were used. After superovulation, collection and morphological evaluation of the embryos, without going through the serial washing in trypsin protocol proposed by the IETS, part of them was transferred to seronegative recipients and part was sent for PCR analysis to identify *N. caninum*. Uterine wash samples were also investigated using the PCR technique for the presence of the agent. No difference was observed between the total number of structures collected from seropositive and seronegative donors (40 and 51;  $P = 0.64$ ), however, difference was observed in the number of freezeable (25% and 74%,  $P < 0.0001$ ) and transferable (27.5% and 78.4%,  $P < 0.0001$ ). Embryo recipients from seropositive and seronegative donors had similar pregnancy rates (60 and 57.1%,  $P = 0.57$ ) and gestational loss (50% and 43.8%,  $P = 0.79$ ). There was also no change in the serological status of the recipients, regardless of the status of the donor, as well as the protozoan DNA in embryos and the uterine wash performed for the collection of embryos were not identified. Thus, it is demonstrated that the embryo transfer technique is safe and can be used in Neosporosis control programs, however, there is a compromise in the quality of embryos obtained from seropositive donors.

**Keywords:** ET, Pregnancy losses, Pregnancy rate, Cattle, Neosporosis.

### 3.3 Introdução

A pecuária bovina brasileira se destaca por ter o maior rebanho comercial e ser o maior exportador de carne bovina do mundo (USDA 2021). O setor é ainda o segundo maior produtor de bezerros (USDA, 2021) e o sexto em produção de leite (USDA, 2020). Apesar da alta produção de leite (23.505.000 toneladas), o país sempre foi um tradicional importador de lácteos e a produtividade do rebanho é considerada baixa (4,02 kg/vaca/dia) (USDA, 2020). A produção por vaca por ano apresentou aumento comparando os dois últimos censos, quando mesmo com um menor número de animais houve um aumento na produção de leite (Anuário do Leite EMBRAPA, 2020). Esta evolução se deu por investimentos em tecnologia, nutrição, genética e saúde animal (Anuário do Leite EMBRAPA, 2020).

A implantação de um programa sanitário em um rebanho bovino leiteiro possibilita maior eficiência reprodutiva. As medidas preventivas devem consistir em utilização de biotécnicas da reprodução (inseminação artificial e transferências de embriões) livres de

patógenos, monitoramento e vacinação de enfermidades como brucelose, tuberculose e leptospirose (DEL FAVA et al., 2004).

Além destas enfermidades, a neosporose tem sido apontada como importante fator de abortamento bovino sendo responsável por até 26% dos abortamentos (GARCIA-VASQUEZ et al., 2005) em um estudo realizado no México. O prejuízo causado pelas perdas relacionadas foi estimado em U\$ 700 por animal (DEMIR et al., 2020), em um estudo realizado na Turquia, fazendo-se necessário o uso de medidas de controle específico para *N. caninum*.

As biotécnicas da reprodução mais utilizadas na bovinocultura leiteira, Inseminação Artificial (IA) e Transferência de Embriões (TE) [SOV – Superovulação e FIV – Fertilização *In Vitro*], têm como objetivo o melhoramento genético do rebanho. A TE permite que uma doadora de alto mérito genético aumente o número de bezerros que produziria em sua vida útil e o Brasil se destaca na implementação desta técnica com 364.802 embriões produzidos em 2018, sendo 23.219 produzidos por superovulação (VIANA, 2019).

Pesquisas demonstraram que a TE, mesmo sendo realizada com embriões provenientes de doadoras soropositivas para *N. caninum*, não transmite a doença, se realizada conforme preconizado pela IETS (BAILLARGEON et al., 2001; CAMPERO et al., 2003). Mas a presença de taquizoítos em oócitos e embriões ainda é controverso, sendo que o uso da PCR como ferramenta para diagnosticar a presença do DNA do parasito nestas estruturas tem sido utilizado para elucidar este tema. Por meio desta técnica de diagnóstico, Moskwa et al. (2008) reportaram que a presença do parasito foi descartada em 13 estruturas não fecundadas e 30 embriões provenientes de doadoras soropositivas superovuladas e observaram uma tendência dos animais soropositivos produzirem menos embriões em protocolos de superovulação.

Porém, estruturas semelhantes a taquizoítos de *N. caninum* foram observadas por microscopia óptica em embriões cultivados *in vitro* com a presença do parasito, assim como foi identificado o aparecimento de grânulos escuros no citoplasma, bloqueio da clivagem e ruptura da zona pelúcida (ZP) (D'ANGELO et al., 2006). Esses resultados sugerem que pode existir uma interação entre o parasita e a ZP e assim uma transmissão por biotécnicas poderia ser possível.

Silva et al. (2012) demonstraram que os folículos são locais de tropismo para *N. caninum*. Utilizando a técnica de PCR, detectaram o DNA do parasito em aspirados foliculares (coletados por aspiração folicular guiada por ultrassom – Ovum Pick Up) e lavados uterinos de 13 vacas com histórico de abortamento prévio e sorologicamente positivas, com mais de 90% dos aspirados foliculares positivos. Estes autores sugeriram que a presença de *N. caninum* no ovário e útero representa um possível risco de transmissão do parasita pela TE. Até o momento não foram realizadas pesquisas que avaliem a resposta superovulatória, a qualidade e grau de desenvolvimento dos embriões coletados após superovulação de doadoras soropositivas para *N. caninum*. Diante do exposto, este experimento foi desenvolvido para avaliar a técnica da transferência de embriões como meio de transmissão da neosporose assim como comparar quanti e qualitativamente a produção de embriões provenientes de doadoras soropositivas e soronegativas. Adicionalmente, este estudo objetivou comparar as taxas de prenhez e de perda gestacional assim como o status sorológico de receptoras que receberam embriões provenientes de doadoras soropositivas e soronegativas.

### **3.4 Material e Métodos**

#### **3.4.1 Condições gerais do experimento**

Este estudo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) do Instituto de Zootecnia (IZ) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) sob o processo nº 23083.034967/2017-74 (ANEXO).

O presente experimento foi desenvolvido no Setor de Bovinocultura de Leite da UFRRJ localizado na BR 465 – Km 07 (Antiga Rodovia Rio-São Paulo), em Seropédica, região da baixada fluminense, entre julho de 2018 e setembro de 2019. O rebanho era constituído por vacas da raça Girolando, de grupos genéticos variando de 1/2 a 5/8 Holandês.

Foram selecionados 75 animais e mantidos em regime de pasto com rotação estacional de piquetes e suplementação mineral durante todo o ano, dentre os quais foram selecionadas quatro vacas como doadoras e 40 novilhas como receptoras.

A sorologia para detecção de anticorpos anti-*Neospora caninum* foi realizada no laboratório de Coccídios e Cocidioses da UFRRJ e a detecção de DNA de *Neospora caninum* pela PCR no Laboratório de Biologia Estrutural (LBE) do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz-RJ).

#### **3.4.2 Controle sanitário e sorologia**

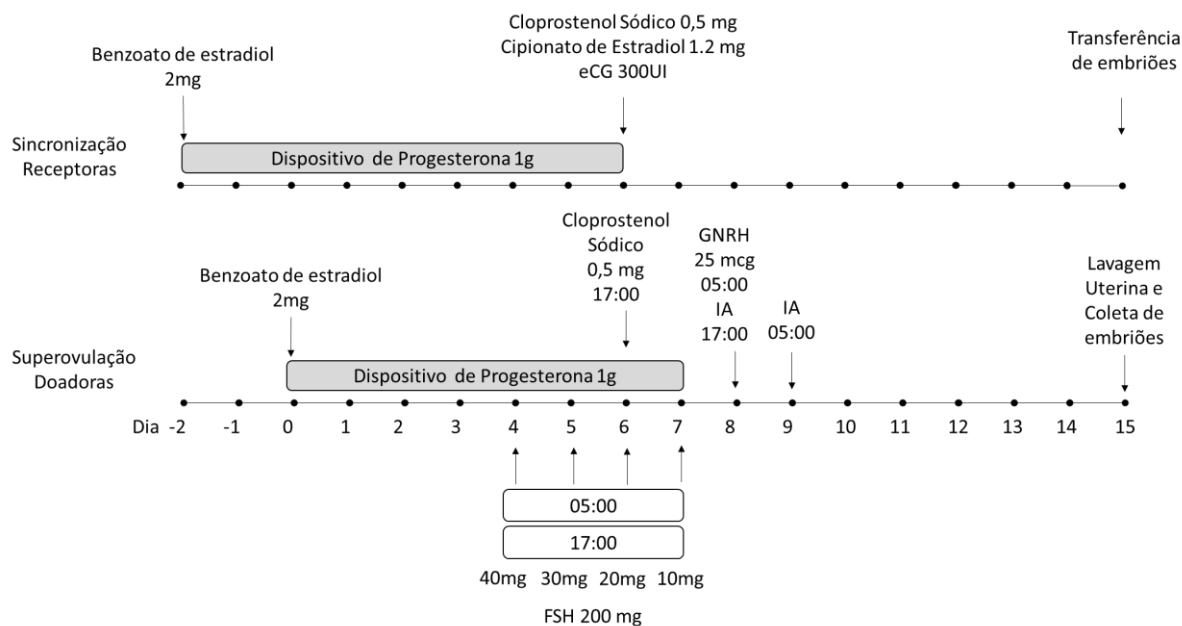
O controle sanitário do rebanho foi realizado por equipe de funcionários e bolsistas do Setor com vacinação contra e vacinação contra raiva e febre aftosa em todo o rebanho, seguindo o calendário do programa nacional de erradicação e prevenção da febre aftosa e programa nacional de controle da raiva dos herbívoros. O controle de brucelose e tuberculose foi estabelecido como preconizado pelo PNCEBT (Programa Nacional de Controle e Erradicação de Brucelose e Tuberculose), pela realização de exames, vacinação contra brucelose com a cepa B19 em fêmeas com idade entre três e oito meses, realizados por Veterinário devidamente habilitado para realização dos mesmos. O rebanho tinha histórico de sorologia positiva para *N. caninum* ao teste de imunofluorescência indireta (IFAT) realizada no ano de 2016, sendo que testes foram realizados novamente antes do início de cada rodada de superovulação do experimento.

Os 75 animais foram sorologicamente avaliados por IFAT, sendo as amostras sanguíneas coletadas com tubo vacutainer pela veia caudal, e as análises realizadas de acordo com a técnica descrita por Yamane et al. (1997), com um ponto de corte de 1:200. A leitura foi realizada em um microscópio com sistema de epifluorescência e ampliação de 400X. As reações foram consideradas positivas quando à fluorescência periferal foi observada em mais de 50% dos taquizoítas. Do total dos animais testados, dois soropositivos e dois soronegativos em três testes consecutivos com intervalos de 30 dias foram selecionados para serem doadoras de embrião. Somente foram selecionadas receptoras que se apresentassem negativas ao IFAT.

#### **3.4.3 Seleção de doadoras, superovulação, coleta e manipulação de embriões**

As doadoras foram selecionadas, em um primeiro momento, com base em suas características fenotípicas e produtivas, em comum acordo com os gestores do Setor de Bovinocultura de Leite da UFRRJ. Posteriormente, o peso dos animais foi acompanhado durante quatro semanas consecutivas, sendo separadas como doadoras, apenas vacas que apresentassem boa condição corporal (ECC > 3,0 em escala variando de 1 a 5, com intervalos de 0,25, conforme descrito por Ferguson et al., 1994), que estivessem mantendo ou ganhando peso entre as pesagens, e que não apresentassem patologias no sistema reprodutivo e tortuosidade de cervix avaliadas por palpação retal e ultrassonografia.

O início do protocolo de superovulação foi denominado dia zero (D0). Este protocolo foi iniciado em dia aleatório do ciclo estral, com aplicação de 2mg de Benzoato de Estradiol (BE, RIC-BE® Tecnopec Ltda. – São Paulo / SP) por via intramuscular (I.M.) e por introdução de dispositivo vaginal contendo 1g de progesterona (P4, PRIMER® Tecnopec Ltda. – São Paulo / SP). A exceção do dispositivo de P4, todos os outros hormônios foram administrados por via I.M. Após 4 dias (D4), iniciou-se a administração de 200 mg de hormônio folículo estimulante (FSH, Folltropin V® Vetoquinol – São Paulo/SP) divididos em oito doses decrescentes, aplicadas duas vezes ao dia com intervalos de 12 horas (05:00h e 17:00h – D4, D5, D6 e D7). Conjuntamente com a segunda aplicação de FSH do terceiro dia de superovulação, foi administrado um análogo de PGF2α (0.5 mg de cloprostenol, SINCROCIO® Ourofino- Cravinhos / SP) sendo o dispositivo intravaginal de P4 retirado no dia 7 às 17:00 horas. A ovulação foi induzida com uma dose de 25 µg de Gonadorelina (GnRH, FERTAGYL® MSD – São Paulo / SP), 12 horas após a última aplicação de FSH (D8), e as inseminações artificiais (IA) realizadas 12 e 24 horas após, com sêmen congelado de dois touros de central, dependendo do grupo genético da doadora, conforme ilustrado na Figura 2. Foram realizadas duas rodadas de superovulação com intervalos de 60 dias entre os tratamentos superovulatórios.



**Figura 2.** Protocolo de sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo em receptoras e protocolo de superovulação das doadoras. FSH = Hormônio Folículo Estimulante, GnRH = Hôrmônio Liberador de Gonadotrofinas, IA = Inseminação Artificial, eCG = Gonadotrofina Coriônica Equina.

Exames ultrassonográficos, com um transdutor linear e frequência de 7.5 MHz (MINDRAY® D2200 VET) foram realizados sete dias após a primeira IA para avaliar a resposta superovulatória das doadoras, escaneando os ovários para identificação e contagem de corpos lúteos (CL) e de folículos anovulatórios.

A lavagem uterina foi realizada em doadoras que responderam ao protocolo de superovulação, ou seja, que apresentavam dois ou mais CLs, sete dias após a primeira IA. As doadoras foram contidas em tronco, tricotomizadas, com limpeza da pele com soluções antissépticas e um bloqueio epidural foi realizado (2 ml, Lidovet® Bravet – Rio de Janeiro/RJ). A coleta foi realizada pela técnica transcervical empregando cateter de Foley fixado no corpo

do útero com insuflação do cuff. A lavagem foi realizada simultaneamente nos dois cornos uterinos com 1 litro de solução salina tamponada com fosfato (PBS) e massagem do útero por palpação retal. Após a coleta, o copo coletor (filtro) contendo os embriões foi encaminhado imediatamente ao laboratório para procedimentos de localização, manipulação e classificação morfológica dos embriões, e a sonda foi mantida fixada à cervix para repetir o processo de lavagem uterina, se necessário. O meio contendo os embriões foi cuidadosamente vertido em placa de petri (100 mm) sendo esta levada ao estereomicroscópio sob uma perspectiva de 10-15 vezes para localização das estruturas coletadas. Quando localizadas, as estruturas foram transferidas para outra placa de petri (35 mm) contendo meio holding (PBS + 0,4% de albumina sérica bovina – BSA). Após o término da lavagem uterina, todas as doadoras receberam duas doses de prostaglandina (0.5 mg de cloprostenol, SINCROCIO® Ourofino- Cravinhos / SP) com intervalo de 7 dias.

#### **3.4.4 Avaliação morfológica dos embriões**

Os embriões foram avaliados e classificados sempre pelo mesmo técnico de acordo com o manual da IETS (STRINGFELLOW & GIVENS, 2010). Para avaliação dos embriões foram considerados o estágio de desenvolvimento (Não fertilizado, 2-8 células, 8-16 células, Mórula inicial - MI, Mórula compacta - MC, Blastocisto inicial - BI, Blastocisto - BL e Blastocisto expandido - BX) e a qualidade dos embriões (grau I - Excelente, grau II - Bom, grau III - Regular e grau IV – Ruim ou Degenerado). Os embriões classificados como graus I e II foram denominados embriões “congeláveis” e as estruturas avaliadas como graus I, II e III como transferíveis.

#### **3.4.5 Seleção e sincronização de receptoras e transferência de embriões**

As receptoras foram selecionadas e separadas do rebanho sendo mantidas em pastejo rotacionado com água e sal mineral a vontade. As novilhas selecionadas como receptoras foram somente incluídas no programa quando se apresentaram negativas a um segundo teste de IFAT com 30 dias de diferença, sendo que os testes foram realizados previamente a cada rodada de superovulação. O peso das receptoras também foi acompanhado durante quatro semanas consecutivas, sendo escolhidos apenas animais que apresentavam boa condição corporal (ECC > 3,0), que estivessem mantendo ou ganhando peso entre as pesagens, e ainda que não apresentassem patologias no sistema reprodutivo e sem tortuosidade de cervix avaliado por palpação retal e ultrassonografia.

As receptoras tiveram os ciclos estrais sincronizados com os das doadoras utilizando protocolos de sincronização de ovulação (Figura 2), para terem um CL e um útero com um tempo de desenvolvimento compatível com os embriões coletados das doadoras. O protocolo de sincronização das receptoras teve início dois dias antes do protocolo de superovulação das doadoras, sendo, portanto, iniciado no D-2. Para tanto, foram administrados nas receptoras 2mg de Benzoato de Estradiol (BE, RIC-BE® Tecnopec Ltda. – São Paulo / SP) por via intramuscular (I.M.) e introdução de dispositivo intravaginal contendo 1g de progesterona (P4, PRIMER® Tecnopec Ltda. – São Paulo / SP) no D-2. A exceção deste dispositivo, todos os outros hormônios foram administrados por via I.M. No dia 6, foi administrado um análogo de PGF2 $\alpha$  (0.5 mg de cloprostenol, SINCROCIO® Ourofino- Cravinhos / SP), mais 1,2 mg de cipionato de estradiol (E.C.P.® ZOETIS – Campinas / SP) e 300 U.I. de gonadotrofina coriônica equina (eCG, Sincro eCG Ourofino – Cravinhos/SP) sendo o dispositivo intravaginal de progesterona retirado nesse mesmo dia, conforme ilustrado na Figura 2.

As receptoras foram avaliadas no dia 14 por ultrassonografia transretal para verificação da resposta ovulatória, mensuração e localização do corpo lúteo (ovário direito ou esquerdo).

Foram aproveitadas para TE apenas receptoras apresentando CL com diâmetro superior a 13 mm. As transferências (inovulações) foram realizadas com embriões a fresco de qualidade I ou II e se iniciaram após a coleta da última doadora. Os animais foram devidamente contidos no tronco, a região perineal foi lavada com água e sabão neutro e seca com papel toalha. Foi realizado bloqueio epidural com 2 ml de lidocaína (Lidovet® Bravet – Rio de Janeiro/RJ) sendo a transferência realizada sempre por um mesmo técnico, com experiência, do lado ipsilateral ao CL previamente avaliado.

#### **3.4.6 Diagnóstico de gestação e avaliação da perda gestacional**

O diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia 23 dias após a transferência embrionária considerado o trigésimo dia de gestação, com um transdutor linear e frequência de 7.5 MHz (MINDRAY® D2200 VET). Só foram consideradas gestantes as fêmeas que apresentaram o embrião com batimento cardíaco na imagem ultrassonográfica. Para o diagnóstico de perda gestacional, foram realizadas avaliações ultrassonográficas transretais aos 60, 90, 180 e 270 dias de gestação. Foi considerada como perda gestacional, a situação na qual uma fêmea em que havia sido observado um embrião viável (batimento cardíaco) no primeiro diagnóstico (30 dias) não apresentava feto nas demais avaliações (aos 60, 90, 180 e 270 dias).

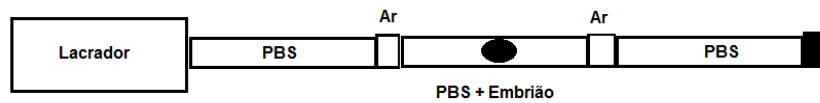
#### **3.4.7 Avaliações sorológicas das receptoras gestantes e dos bezerros**

Os animais diagnosticados gestantes foram alocados em um pasto isolado com água e sal mineral à vontade, e passaram por testes sorológicos (IFAT) com 90 e 180 dias de gestação e após o parto (≈285 dias). Os bezerros nascidos vivos passaram por sorologia imediatamente após o parto.

#### **3.4.8 Análise dos embriões e do lavado uterino por PCR para detecção de *N. caninum***

Com intuito de avaliar a técnica de TE como meio de transmissão do *N. caninum*, 38 embriões (17 embriões da primeira rodada e 21 da segunda) foram transferidos para receptoras soronegativas sincronizadas e 53 estruturas (23 da primeira rodada de superovulação e 30 oriundos da segunda) foram enviadas para avaliação por PCR.

Parte dos embriões da primeira rodada de superovulação foi alocada em palhetas de 0,25 ml contendo meio holding (PBS + 0,4% de BSA) conforme ilustrado na Figura 3. Logo após o envase, as palhetas foram enviadas ao Laboratório de Biologia Estrutural (LBE) do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ) para serem avaliados por PCR como descrito anteriormente (BASZLER et al., 1999; SANCHEZ et al., 2009). O primeiro e o último PBS proveniente do procedimento de lavagem uterina para coleta dos embriões, assim como o meio de lavagem presente na placa de petri para a procura e classificação dos mesmos, também foram acondicionados e enviados para avaliação por PCR.



**Figura 3.** Esquema de alocação dos embriões em palhetas de 0,25 ml contendo três colunas de meio holding (PBS + 0,4% BSA) separadas por duas colunas de ar, sendo que os embriões permanecem na coluna central. PBS = Solução salina tamponada com fosfato; BSA = Album

O DNA das amostras foi extraído com kit comercial seguindo as instruções do fabricante (Kit de extração da Qiagen DNeasy® Blood & Tissue - Spin Column), os embriões foram avaliados em conjunto, enquanto que o PBS das lavagens foi centrifugado e avaliados separadamente. Posteriormente, o DNA foi amplificado utilizando o par de primers Np4-Np7 do gene *Neospora* específico Np5 que amplificam uma sequência de 275bp. Para o preparo das soluções (mix) para amplificação em um termociclador pelo PCR foram utilizados: solução tampão (5 µl), dNTPS (2mM) (5 µl), iniciador Fb (50 pmol) (0,5 µl), iniciador Rb (50 pmol) (5 µl), Taq DNA polimerase (5/U µl) (5 µl), amostra de DNA (3 µl) e água para PCR (35,5 µl) totalizando 50 µl. Os produtos originados pela PCR foram transferidos para gel de agarose em uma concentração de 2% e levados a cuba de eletroforese com as amostras colocadas em cada poço correspondente. A eletroforese ocorreu a 100 volts, 400 mA, durante 1 hora e 30 minutos.

### 3.4.9 Análise Estatística

Para avaliar a significância das taxas de prenhez, perda gestacional, classificação e qualidade dos embriões e o efeito do touro, foi utilizado o teste de qui-quadrado com nível de significância de 5%. Quando as frequências esperadas foram menores do que 5 foi utilizado a correção de Yates para utilização do teste qui-quadrado. Se ainda assim a utilização deste teste não foi possível, pela presença da frequência esperada igual a 0, o teste de Fisher foi utilizado, também com nível de significância de 5%.

### 3.5 Resultados e Discussão

As receptoras e doadoras pertenciam a um rebanho que passou por triagem sorológica para serem incluídas no experimento. Dos 75 animais avaliados por imunofluorescência indireta, 18 testaram positivo resultando em uma prevalência de 24%. Estes dados corroboram os levantamentos sorológicos previamente realizados no rebanho da UFRRJ assim como a prevalência encontrada no Brasil (CERQUEIRA-CÉZAR et al., 2017; GAIA et al., 2020).

O acompanhamento sorológico das receptoras realizado aos 90 e 180 dias de gestação e também após ao parto mostrou que nenhuma se apresentou soropositiva após a TE. A transferência de embriões de doadoras soropositivas ou soronegativas não foi capaz de soroconverter receptoras soronegativas, mesmo que os embriões não tivessem passado pelo protocolo de lavagens seriadas. Sozinho este resultado demonstra que a biotécnica não é uma via de transmissão ou, que se presentes, os taquizoítas estavam em número insuficiente para transmitir a doença. Na literatura, resultados semelhantes foram demonstrados, porém, somente com o uso da lavagem seriada com tripsina (BAILARGEON et al., 2001; CAMPERO et al., 2003). É importante ressaltar também que, com este resultado, pode-se afirmar que não houve transmissão por ingestão de oocistos presentes no ambiente.

Um dos fatores que pode influenciar a resposta superovulatória é o touro utilizado na inseminação artificial (MIKKOLA et al., 2020; JEMAL et al., 2021), sendo que no presente experimento foram utilizados dois touros para a inseminação das quatro doadoras. Não foram encontradas diferenças no número de embriões produzidos, no estágio de desenvolvimento e no número de embriões congeláveis ou transferíveis quando comparados os touros I e II (Tabela 2). Apesar de ser reportado na literatura que touros diferentes podem produzir respostas superovulatórias diferentes (MIKKOLA et al., 2020; JEMAL et al., 2021) este fato não foi observado no presente experimento. Isto pode ser explicado pela capacidade semelhante de fertilização entre os dois touros.

**Tabela 2.** Efeito do touro sobre a qualidade e o estágio de desenvolvimento embrionário de doadoras soropositivas e soronegativas para *N. caninum* submetidas a duas rodadas de superovulação (SOV).

	QUALIDADE EMBRIONÁRIA					Total
	Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV		
Touro I	21	0	2	19	-	42
Touro II	21	6	1	21	-	49
	ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO					Total
	8-16 células	MC	BI	BL	Degenerados	
Touro I	19	13	6	04	0	42
Touro II	18	20	5	03	3	49

MC = mórula compacta; BI = blastocisto inicial; BL = blastocisto.

Foram selecionadas quatro doadoras, duas soropositivas e duas soronegativas, sendo realizadas duas rodadas de superovulação com posterior lavagem uterina para coleta de embriões com intervalo de 60 dias entre elas. Todas as doadoras responderam as duas superovulações com uma média de 12,4 e 11,4 corpos lúteos e estruturas coletadas por doadora, respectivamente (Tabela 3).

A taxa média de recuperação embrionária (número de estruturas localizadas / número de corpos lúteos) foi de 91,9%. Observa-se que na segunda rodada de superovulação, foram identificados pela ultrassonografia 18 corpos lúteos na doadora 161, no entanto foram encontradas 24 estruturas. Este fato incoerente pode ser explicado pela dificuldade em realizar uma contagem precisa do número de corpos lúteos em doadoras que apresentam resposta superovulatória muito elevada.



**Tabela 3.** Análise individual do número de corpos lúteos e total de estruturas coletadas de doadoras soropositivas e soronegativas para *N. caninum* submetidas a duas rodadas de superovulação (SOV).

Doadora	Sorologia <i>N.caninum</i>	CORPOS LÚTEOS			ESTRUTURAS COLETADAS		
		Primeira SOV	Segunda SOV	Total	Primeira SOV	Segunda SOV	Total
227	Positiva	14	11	25	14	9	23
249	Positiva	9	11	20	6	11	17
161	Negativa	12	18	30	8	24	32
200	Negativa	16	8	24	15	4	19
Total Soropositivas		23	22	45 <sup>a</sup>	20	20	40 <sup>a</sup>
Total Soronegativas		28	26	54 <sup>a</sup>	23	28	51 <sup>a</sup>
Total		51	48	99	43	48	91

Letras sobrescritas iguais dentro da mesma coluna não apresentam diferença estatística (P>0,05).

Não foi observada diferença significativa entre doadoras soropositivas e soronegativas para o número médio de corpos lúteos (11,3 vs 13,5, respectivamente) assim como para o total de estruturas recuperadas (10,0 vs 12,8, respectivamente).

Estes dados corroboram os resultados de Baillargeon et al. (2001) que, ao superovularem 22 doadoras (11 soropositivas e 11 soronegativas), encontraram uma média de 11,5 e 7,5 embriões viáveis por doadora soropositiva e soronegativa, respectivamente, não sendo observada diferença significativa entre os grupos. Apesar de utilizar uma diferente metodologia de testagem sorológica (ELISA), em ambos os trabalhos foi demonstrado que animais soropositivos possuem uma resposta adequada a protocolos de superovulação para coleta e transferência de embriões. A seleção de doadoras em bom estado de saúde e adequada condição corporal pode ter favorecido estes resultados. Estes dados também podem demonstrar uma incapacidade do *N.caninum* em interferir na resposta superovulatória e na recuperação dos embriões.

No total foram recuperadas 91 estruturas, 43 na primeira e 48 na segunda rodada de superovulação. Todas as estruturas foram avaliadas pelo mesmo técnico em relação ao estágio de desenvolvimento (Tabela 4) e à qualidade (Tabela 5). Os estágios de desenvolvimento encontrados foram: estruturas não fertilizadas (NF), 8-16 células, mórula compacta (MC), blastocisto inicial (BI) e blastocisto (BL), sendo os estágios de 8-16 células, MC e BI os mais prevalentes representando 89% das estruturas, conforme mostrado na Tabela 4. A maior prevalência dos estágios encontrados corroboram a literatura e estão dentro do esperado, uma vez que condizem com o número de dias de desenvolvimento após a inseminação (HORPER et al., 2018; ERDEM et al., 2020).

Quando comparado o número de embriões de acordo com o estágio de desenvolvimento, entre doadoras soropositivas e soronegativas, foi observada diferença significativa nos estágios de 8-16 células (P<0,01), MC (P=0,047), BI (P=0,03) e BL (P=0,01). Pelo conhecimento dos autores, este é o primeiro estudo que compara o desenvolvimento e a qualidade de embriões coletados de doadoras superovuladas e naturalmente infectadas com *N.caninum*. Foi demonstrado que o cocultivo de embriões FIV com taquizoítas do parasita podem interromper a clivagem de embriões em desenvolvimento (D'ANGELO et al., 2006). Além disso, sua presença em aspirados foliculares demonstra o tropismo do parasita pelo trato reprodutivo (SILVA et al., 2012), desta forma sua provável presença e capacidade deletéria podem ter influenciado no desenvolvimento dos embriões. Não houve diferença significativa para não fertilizados (P=0,58), assim, mesmo podendo interferir na clivagem, talvez não tenha a capacidade de impedir a fertilização.

**Tabela 4.** Classificação dos embriões oriundos de doadoras soropositivas e soronegativas para *N. caninum* de acordo com o estágio de desenvolvimento.

<b>Doadora</b>	<b>Sorologia <i>N. caninum</i></b>	<b>Não fertilizados</b>	<b>8-16 células</b>	<b>Mórula compacta</b>	<b>Blastocisto inicial</b>	<b>Blastocisto</b>	<b>Total</b>
<i>Dados referentes a duas rodadas de superovulação</i>							
227	Positiva	0	16	7	0	0	23
249	Positiva	2	11	3	1	0	17
161	Negativa	1	7	17	4	3	32
200	Negativa	0	3	6	6	4	19
Soropositivas		2	27	10	1	0	40
Soronegativas		1	10	23	10	7	51
Total		3 (3,3%)	37 (40,7%)	33 (36,2%)	11 (12,1%)	7 (7,7%)	91

A Tabela 5 apresenta a classificação dos embriões coletados de doadoras soropositivas e soronegativas para *N. caninum* levando em consideração a qualidade embrionária. A porcentagem de embriões congeláveis (Grau I e II) e transferíveis (Grau I, II e III) para doadoras soropositivas foi de 25% e 27,5%, respectivamente, e para as soronegativas foi de 74,5% e 78,4%, respectivamente. Foi observada diferença significativa entre animais soropositivos e soronegativos para as duas variáveis ( $P < 0,0001$ ).

**Tabela 5.** Classificação dos embriões oriundos de doadoras soropositivas e soronegativas para *N. caninum* de acordo com a qualidade.

<b>Doadora</b>	<b>Sorologia <i>N. caninum</i></b>	<b>Grau I</b>	<b>Grau II</b>	<b>Grau III</b>	<b>Grau IV</b>	<b>Total</b>
<i>Dados referentes a duas rodadas de superovulação</i>						
227	Positiva	6	0	1	16	23
249	Positiva	3	1	0	13	17
161	Negativa	18	5	1	8	32
200	Negativa	15	0	1	3	19
Soropositivas		9 (22,5%)	1 (2,5%)	1 (2,5%)	29 (72,5%)	40
Soronegativas		33 (64,7%)	5 (9,8%)	2 (3,9%)	11 (21,6%)	51
Total		42	6	3	40	91

Não foram encontrados na literatura estudos que tenham avaliado o impacto do status sorológico para *N. caninum* de doadoras sobre a qualidade dos embriões produzidos *in vivo*. Quando embriões FIV foram cultivados com taquizoítas, os mesmos apresentaram grânulos escuros no citoplasma, bloqueio de clivagem e aumento do espaço perivitelínico com 48 horas de cultivo e, após 96 horas, foi observada também a ruptura de zona pelúcida (D'ANGELO et al., 2006). Estas alterações morfológicas impactariam diretamente a classificação dos embriões em relação a sua qualidade, demonstrando assim, com ineditismo, que mesmo que não exista diferença no número total de estruturas produzidas por doadoras soropositivas e soronegativas, houve um comprometimento da porcentagem de embriões congeláveis e transferíveis. Isto pode impactar os resultados de um programa comercial de transferência de embriões.

Foram realizadas duas rodadas de sincronização de receptoras. Na primeira rodada, 24 receptoras foram submetidas à sincronização da ovulação sendo que 17 (70,1%) apresentaram corpo lúteo maior que 13 mm no D14 (um dia antes da transferência de embrião). Na segunda rodada, 28 animais foram sincronizados sendo que 24 (85,7%) apresentaram um CL maior que 13 mm no D14. A eficiência total do protocolo de sincronização das receptoras foi de 78,8% (41/52). O que está de acordo com a literatura, que relata taxa de sincronização a protocolos de ovulação em tempo fixo por volta de 80% (BARUSELLI et al., 2019).

Dos 38 embriões transferidos, 10 foram provenientes de doadoras soropositivas e 28 de soronegativas, resultando em 22 gestações. As taxas de prenhez foram de 60% (6/10) e 57,1% (16/28) para receptoras que receberam embriões de doadoras soropositivas e soronegativas, respectivamente. Não foi observada diferença significativa entre as taxas de prenhez aos 30 dias ( $P=0.57$ ) (Tabela 6). Estudos demonstram que a taxa de prenhez em programas de transferência de embriões pode ser impactada por diferentes fatores como, qualidade dos embriões transferidos, ECC e manejo das receptoras (AMBROSE et al., 2010). No presente experimento, somente foram incluídas receptoras sem patologias no sistema reprodutivo (avaliadas por palpação retal e ultrassonografia), com boa condição corporal (ECC >3), que estivessem ganhando ou mantendo o peso, sendo que estes animais foram mantidos em pasto isolado do rebanho com água e sal mineral *ad libitum*. Além disso, foram transferidos somente embriões classificados como Grau I e II. Todos estes fatores podem ter contribuído para a igualdade nas taxas de prenhez, e talvez a transferência de todos os embriões viáveis (incluindo os avaliados como grau III) poder ia ter gerado diferença entre os grupos.

**Tabela 6.** Diagnóstico de gestação aos 30 dias e perdas gestacionais em receptoras soronegativas inovuladas com embriões oriundos de doadoras soropositivas e soronegativas para *N.caninum*.

Sorologia <i>N. caninum</i> das doadoras	Taxa de prenhez aos 30 dias	Perda Gestacional - 30 a 90 dias	Perda Gestacional - 90 a 270 dias	Perda Gestacional Total
Soropositivas	60.0% <sup>a</sup> (6/10)	16.7% <sup>a</sup> (1/6)	33.3% <sup>a</sup> (2/6)	50.0% <sup>a</sup> (3/6)
Soronegativas	57.1% <sup>a</sup> (16/28)	25.0% <sup>a</sup> (4/16)	18.8% <sup>a</sup> (3/16)	43.8% <sup>a</sup> (7/16)
Total	57.9% <sup>a</sup> (22/38)	22.7% <sup>a</sup> (5/22)	22.7% <sup>a</sup> (5/22)	45.5% <sup>a</sup> (10/22)

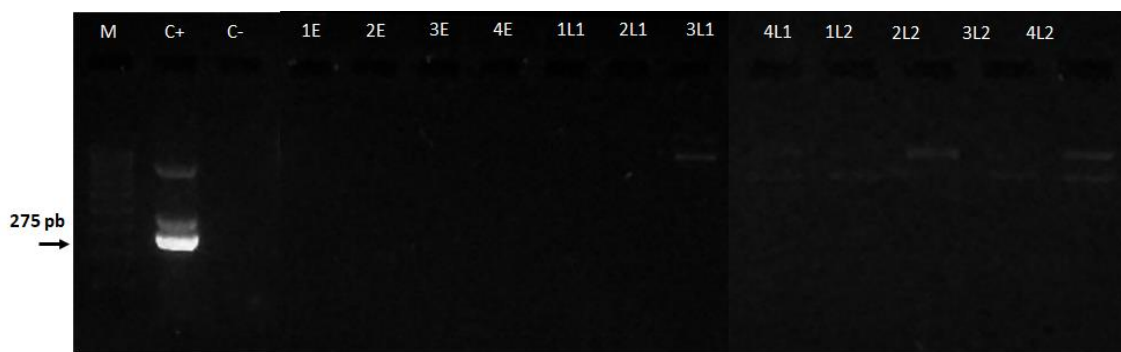
Letras sobrescritas iguais dentro da mesma coluna não apresentam diferença estatística ( $P>0,05$ ).

Não foi observada diferença estatística quando comparadas as perdas gestacionais de 30 a 90 dias ( $P=0,81$ ), de 90 a 270 dias ( $P=0,98$ ) e total ( $P=0,79$ ) entre receptoras que receberam

embriões oriundos de doadoras soropositivas e soronegativas. Assim como ocorreu na taxa de prenhez, a transferência dos embriões de melhor qualidade e a seleção de novilhas como receptoras podem ter contribuído para esta igualdade nas perdas gestacionais. O acompanhamento sorológico das receptoras demonstrou que a biotécnica não é uma via de transmissão, outra possibilidade é de que os taquizoítas estariam em número insuficiente para transmitir a doença.

A igualdade nas taxas de prenhez e nas perdas gestacionais em receptoras soronegativas que foram inovuladas com embriões de doadoras soropositivas e soronegativas já foi reportado em outros estudos (BAILLARGEON et al., 2001; CAMPERO et al., 2003), porém este é o primeiro estudo, de conhecimento do autor, que aplica a técnica sem antes utilizar qualquer protocolo de lavagem dos embriões preconizadas pela IETS (12 lavagens com passagens em solução de 0,25% de tripsina na quinta e sexta lavagem). Desta forma, demonstra-se que a transferência de embriões pode ser utilizada como método de controle da neosporose com segurança.

Os embriões não aproveitados na transferência avaliados por PCR, assim como o primeiro e o último lavado uterino. Não foram amplificados pares de bases em nenhuma das amostras analisadas (Figura 4).



**Figura 4.** Eletroforese das amostras do meio de coleta de embriões do primeiro e o último lavado uterino, assim como do meio da placa de petri e embriões da primeira superovulação. M, Marcador; C+, Controle positivo; C-, Controle negativo; E, Embriões; L1, PBS do primeiro lavado uterino; L2, PBS do segundo lavado uterino; 1,2,3 e 4, identificação das doadoras; pb, protein bases (Pares de bases).

O emprego da PCR permitiu comprovar a presença do *N.caninum* nos folículos ovarianos de fêmeas bovinas de sorologia positiva (SILVA et al., 2012) mas a mesma técnica não permitiu a identificação do parasito em 30 embriões de doadoras também positivas (MOWSKA et al., 2008), assim como neste experimento. Podemos assumir que, mesmo que tenha tropismo pelo folículo ovariano, o parasito não se adere ao embrião em desenvolvimento, ou que o processo de lavagem uterina retira os taquizoítas que podem estar aderidos, uma vez que foi encontrada diferença na qualidade dos embriões de doadoras soropositivas e soronegativas.

Nenhum dos 12 bezerros oriundos das transferências apresentou alterações dignas de nota e todos testaram negativos ao IFAT para *N. caninum*. Os dados do presente estudo corroboram os de Baillargeon et al. (2001) e Campero (2003) nos quais bezerros nascidos de animais soronegativos também apresentaram sorologia negativa independente da sorologia da doadora do embrião.

### 3.7 Conclusões

O presente estudo permitiu as seguintes conclusões: i) a técnica de transferência de embriões realizada a partir de doadoras soropositivas para *N. caninum* é segura do ponto de vista sanitário e pode ser utilizada em programas de controle desta enfermidade; ii) O status sorológico da doadora não tem efeito na resposta superovulatória e no número de estruturas recuperadas, no entanto, afeta a qualidade dos embriões produzidos; iii) o status sorológico da doadora não afeta a taxa de prenhez e nem a perda gestacional quando os embriões são transferidos para receptoras soronegativas.

## 4 CAPÍTULO II

### **Efeito do Aumento da Progesterona sobre o Perfil Endócrino, Tamanho Embrionário e Perda Gestacional em Receptoras de Embriões Bovinos Fertilizados *in vitro* ou Produzidos por Transferência Nuclear**

#### 4.1 Resumo

Este estudo teve como objetivo avaliar as diferenças na progesterona e PSPB circulantes de receptoras bovinas inovuladas com embrião de transferência nuclear de células somáticas (TNCS) ou por fertilização *in vitro* (FIV). Além disso, o efeito do aumento da progesterona circulante (P4) foi testado pela produção de corpo lúteo acessório (CL) em receptoras para os dois tipos de embriões. Um total de 123 receptoras holandesas nulíparas foram randomizadas para receber um embrião de FIV ou TNCS e para receber ou não gonadotrofina coriônica humana (hCG; 3.300 UI nos dias 5 e 12) Dia 0 é o dia de tratamento de GnRH no final da sincronização de ovulação, para causar ovulação e aumentar a P4 circulante. Assim, foram criados quatro grupos: FIV sem hCG (n = 30), FIV com hCG (n = 29), TNCS sem hCG (n = 28) e TNCS com hCG (n = 36). Ultrassonografia e coletas de sangue foram realizadas nos dias 5, 12, 19 e 21, e os diagnósticos de prenhez por ultrassom e avaliação da proteína B específica da gestação (PSPB) foram realizadas nos dias 28, 33, 42, 47, 54 e 63. O tratamento com hCG causou ovulação (Dia 5 - 96,9% [63/65]; Dia 12 - 83,1% [54/65]) e aumentou a P4 circulante (Dia 19 -  $20,8 \pm 1,3$  vs.  $10,1 \pm 1,1$  ng / mL). No entanto, não alterou o PSPB circulante em receptoras de embriões FIV ou TNCS, embora o hCG tendesse a aumentar as prenhez por TE (P/TE) para receptoras de embriões TNCS nos dias 28 (P = 0,07) e 42 (P = 0,09). A P/TE foi semelhante para FIV e embriões TNCS nos dias 28 e 33, no entanto, a relação P/TE foi maior para FIV do que TNCS no dia 42 e mais tarde, devido a maiores (P = 0,05) perdas de gestação no TNCS (44,4%) do que embriões FIV (15,0%) dos dias 33-42. Receptoras de embriões TNCS e FIV tinham PSPB circulante semelhante no dia 28, no entanto, no dia 33 (P = 0,01) e em todos os momentos posteriores, receptoras de embriões TNCS tinham maior PSPB do que embriões FIV. De especial interesse, as receptoras de embriões FIV que mantiveram a prenhez tiveram maior PSPB nos dias 28 (P = 0,006) e 33 (P = 0,003) do que aquelas que tiveram perda de gestação. Em contraste, as receptoras de embriões TNCS que mais tarde perderam a gestação tiveram maior (P = 0,01) PSPB no dia 33 do que as receptoras de embriões TNCS que mantiveram. Assim, o aumento da P4 circulante pode melhorar a fertilidade em receptoras de embriões TNCS, como evidenciado pela tendência do tratamento com hCG para aumentar P/TE de embriões TNCS neste experimento, embora sejam necessárias pesquisas adicionais. Além disso, embora a redução na concentração do PSPB possa prever a perda gestacional em

receptoras de embriões FIV, como mostrado em outras situações fisiológicas, a maior circulação de PSPB no dia 33 foi um preditor da perda subsequente em receptoras de embriões TNCS.

**Palavras-chave:** corpo lúteo acessório; embrião clonado; gonadotrofina coriônica humana; proteína específica B.

#### 4.2 Abstract

This study was designed to evaluate the differences in circulating hormones of bovine recipients that received either a somatic cell nuclear-transfer (SCNT) embryo or an embryo produced by in vitro fertilization (IVF). Further, the effect of increasing circulating progesterone (P4) was tested by production of accessory corpus lutea (CL) in recipients of the two types of embryos. A total of 123 nulliparous Holstein recipients were randomized to receive either an IVF or SCNT embryo and further randomized to receive or not human chorionic gonadotropin (hCG; 3,300 IU on Days 5 and 12 [Day 0 is Day of GnRH treatment at end of synchronization of ovulation] to cause ovulation and increase circulating P4). Thus, four groups were created: IVF+no hCG (n=30), IVF+hCG (n=29), SCNT+no hCG (n=28), and SCNT+hCG (n=36). Ultrasound evaluations and blood samplings were done on Days 5, 12, 19 and 21, and pregnancy diagnoses by ultrasound and evaluation of pregnancy-specific protein B (PSPB) were done on Days 28, 33, 42, 47, 54 and 63. As expected, treatment with hCG caused ovulation (Day 5 - 96.9% [63/65]; Day 12 - 83.1% [54/65]) and increased circulating P4 (Day 19 -  $20.8 \pm 1.3$  vs.  $10.1 \pm 1.1$  ng/mL). However, treatment with hCG did not change circulating PSPB in recipients of IVF or SCNT embryos, although hCG tended to increase pregnancies per ET (P/ET) for recipients of SCNT embryos at Days 28 (P = 0.07) and 42 (P = 0.09). The P/ET was similar for IVF and SCNT embryos at Days 28 and 33, however, P/ET was greater for IVF than SCNT on Day 42 and later, due to greater (P = 0.05) pregnancy losses in SCNT (44.4%) than IVF embryos (15.0%) from Days 33-42. Recipients of SCNT and IVF embryos had similar circulating PSPB on Day 28, however, on Day 33 (P = 0.01) and at all later times, recipients of SCNT embryos had greater PSPB than IVF embryos. Of special interest, recipients of IVF embryos that maintained the pregnancy had greater PSPB on Days 28 (P = 0.006) and 33 (P = 0.003) than IVF embryos that later had pregnancy loss. In contrast, recipients of SCNT embryos that later lost the pregnancy had greater (P = 0.01) PSPB on Day 33 than recipients of SCNT embryos that maintained the pregnancy. Thus, increasing circulating P4 may improve fertility in recipients of SCNT embryos as evidenced by the tendency for hCG treatment to increase P/ET of SCNT embryos in this experiment, although additional research with greater numbers of recipients are needed. Further, although reduced PSPB may predict pregnancy loss in recipients of IVF embryos, as shown in other physiologic situations, greater circulating PSPB on Day 33 was a predictor of subsequent pregnancy loss in recipients of SCNT embryos, perhaps indicating excessive trophoblast binucleate cell numbers or activity preceding pregnancy loss of SCNT embryos.

**Keywords:** Accessory corpus luteum; clone embryo; human chorionic gonadotropin; pregnancy-specific protein B.

### 4.3. Introdução

Desde a produção do primeiro mamífero clonado usando o núcleo de uma célula somática adulta (WILMUT et al., 1997), as técnicas de clonagem baseadas na transferência nuclear de células somáticas (TNCS) têm sido estudadas e utilizadas para multiplicar animais de alto mérito genético (PAGE & AMBANDY, 2004; BORDIGNON et al, 2017). Apesar da pesquisa e do potencial prático da TNCS, a técnica ainda é ineficiente e aproximadamente 10% dos embriões transferidos resultam em bezerros que se desenvolvem com sucesso (PANARACE et al., 2006).

Embora as taxas de prenhez (P/TE) após a transferência de embriões TNCS e fertilizados *in vitro* (FIV) sejam geralmente semelhantes aos 30 dias de gestação, as receptoras de TNCS apresentam maior perda gestacional a partir deste período (WELLS, 2005; PANARACE et al., 2006). Foi proposto que a compreensão das diferenças que ocorrem durante o desenvolvimento e manutenção da prenhez de embriões TNCS e FIV deve aumentar a sobrevivência dos bezerros e melhorar os resultados usando a técnica de TNCS (FABER et al., 2004). As falhas no desenvolvimento e função da placenta após a transferência de embriões TNCS são a principal causa das baixas taxas de prenhez e natalidade obtidas durante o processo de clonagem, observando-se um baixo número de placentomas que são de tamanho aumentado e anormais (WELLS, 2005; CHAVATTE-PALMER et al., 2012). Além disso, uma alta incidência de doenças embrio / fetais, como hidropis fetalis, edema placentário e hidralantóides são observadas em gestações TNCS que são perdidas após 90 dias de gestação (PANARACE et al, 2006).

Devido o papel crítico da progesterona (P4) no desenvolvimento embrionário / fetal e na manutenção da gestação, o aumento das concentrações circulantes de P4, foi proposto como uma estratégia potencial para reduzir a perda gestacional (STRONGE et al, 2005; WILTBANK et al., 2014; YAN et al., 2016). Esta ideia é apoiada pelo desenvolvimento embrionário aprimorado observado após adoção de estratégias que aumentem a P4 circulante, seja pela produção de um CL acessório ou por tratamento com P4 exógena (FORDE et al., 2009; BAZER et al., 2012). No entanto, o aumento da P4 circulante teve um efeito surpreendentemente variável na perda gestacional, embora, dois estudos recentes tenham observado diminuição desta perda em receptoras de embriões FIV que tinham um CL acessório produzido por administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou tratamento com GnRH. Até onde sabemos, o efeito do aumento da P4 circulante pela produção de um CL acessório não foi avaliado como uma estratégia para diminuir a perda gestacional de embriões clonados.

Diferenças morfológicas entre embriões TNCS e FIV foram relatadas ao longo da gestação, geralmente com restrição de crescimento até o final do segundo mês e ganho de peso fetal excessivo durante os últimos meses de gestação (PANARACE et al., 2006; GERGER et al., 2017). Além disso, os níveis de glicoproteínas associadas à prenhez (PAGs) são mais elevados em receptoras de TNCS que desenvolveram distúrbios placentários e esse efeito pode ser promovido por um aumento no transporte através da barreira placentária ou aumento na meia-vida dos PAGs na circulação materna (CHAVATTE-PALMER e al., 2006; KLISCH et al., 2006; CONSTANT et al., 2011; CHAVATTE- PALMER et al., 2012). Particularmente, o nível de proteína B específica da prenhez (PSPB), produzida por células binucleadas do trofoblasto, foi transitoriamente mais alto no dia 35 de gestação naqueles conceptos que não se desenvolveram até o dia 90 (WELLS, 2005).

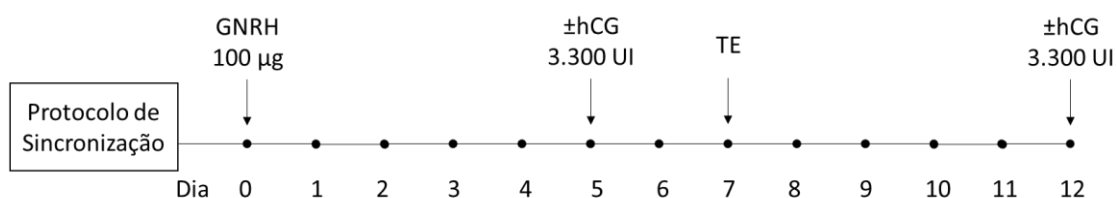
Assim, o objetivo do presente experimento foi estudar perfis de hormônios circulantes e tamanho do embrião usando ultrassonografia em receptoras bovinas que receberam um embrião TNCS ou um embrião FIV. Além disso, foi avaliado o momento da perda da gestação e a associação dos perfis hormonais e características embrionárias com a perda gestacional. Adicionalmente, o efeito do aumento de P4 circulante na taxa de prenhez (P/TE) e na perda de

gestação foi avaliado pela formação de CL acessório por tratamento com hCG em receptoras dos dois tipos de embriões. As hipóteses deste estudo foram: 1) O tratamento com hCG nos dias 5 e 12 de gestação produzirá CL acessório, aumentará as concentrações de P4 circulante, aumentará P/TE e reduzirá a perda de gestação em receptoras de embriões FIV e TNCS; 2) As receptoras que recebem embriões TNCS e embriões FIV terão taxas de prenhez semelhantes (P/ET) no dia 30 de gestação, a perda subsequente será maior em TNCS; 3) Embriões TNCS são menores em comparação com os de FIV, mas as receptoras apresentam maiores concentrações de PSPB circulante.

## 4.4 Material e Métodos

### 4.4.1 Animais e tratamentos

Receptoras nulíparas da raça Holandesa ( $n = 123$ ) com média de  $3,05 \pm 0,2$  de escore de condição corporal (ECC; escala de 1 a 5) e  $17,6 \pm 2,9$  meses de idade foram submetidas a um protocolo de sincronização da ovulação. Resumidamente, no Dia -8 todas as novilhas receberam um dispositivo intravaginal contendo 1,38 g de P4 (CIDR, Zoetis, Florham Park, NJ) que foi removido cinco dias depois (Dia -3) concomitante com administração i.m. de 500 µg de cloprostenol (PGF; Estroplan, Parnell, Overland Park, KS). Além disso, as novilhas receberam outra PGF 24 horas depois (Dia -2). Finalmente, no dia 0, 100 µg de acetato de gonadorelina (GnRH; Gonabreed, Parnell, Overland Park, KS) foram administrados. Novilhas que responderam ao protocolo de sincronização e tiveram um CL de 13 mm no dia 5 foram randomizadas para receber um embrião FIV ( $n = 59$ ) ou TNCS ( $n = 64$ ) no dia 7. Adicionalmente, as novilhas foram randomizadas para receber 3.300 UI de hCG (Chorulon, Merck Animal Health, Summit, NJ) nos dias 5 e 12 ( $n = 65$ ) ou não receber hCG ( $n = 58$ ), conforme mostrado na Figura 5. Portanto, foram obtidos quatro grupos experimentais: FIV sem hCG ( $n = 30$ ), FIV com hCG ( $n = 29$ ), TNCS sem hCG ( $n = 28$ ) e TNCS com hCG ( $n = 36$ ).



**Figura 5.** Protocolo de sincronização da ovulação e tratamento com GnRH e hCG em receptoras bovinas para transferência de embriões TNCS e FIV. GnRH = Hormônio Liberador de Gonadotrofina; hCG = Gonadotrofina Coriônica Humana; TE = Transferência de Embriões; UI = Unidades Internacionais; TNCS = transferência Nuclear de Células Somáticas; FIV = Fertilização in vitro.

### 4.4.2 Dosagem de P4 e PSPB

A coleta de sangue foi realizada por punção venosa (coccígea) em tubos de sangue com vácuo (Vacuette, 9 mL; Greiner Bio-One North America Inc., Monroe, NC) para determinação das concentrações circulantes de P4 e PSPB. As amostras de sangue foram centrifugadas a 2.000 x g por 15 min a 4°C e o soro transferido para frascos, congelado e armazenado a -20°C até o momento do ensaio.



Amostras de soro para determinação de P4 foram coletadas nos dias 5, 12, 19, 21, 28, 33, 42, 47, 54 e 63 e as concentrações de P4 foram determinadas usando um kit de radioimunoensaio em fase sólida (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, CA). Os coeficientes de variação intra e interensaios médios para os ensaios P4 foram de 8,6% e 7,4%, e a sensibilidade foi de 0,08 ng / mL.

Amostras de soro para determinação de PSPB foram coletadas nos dias 28, 33, 42, 47, 54 e 63 e as concentrações de PSPB foram determinadas usando um ensaio ELISA quantitativo disponível comercialmente (Biopryn, BioTracking LLC, Moscou, ID), como descrito por KLISCH et al., 2006 e CHAVATE-PALEMER et al., 2006. Os coeficientes de variação intra e interensaios médios para os ensaios PSPB foram de 3,2% e 11,2%, e a sensibilidade foi de 0,06 ng / mL.

#### **4.4.3 Avaliações ultrassonográficas e mensuração do embrião e da vesícula amniótica**

As novilhas foram submetidas a exames ultrassonográficos nos dias 5, 7, 12, 19, 21, 28, 33, 42, 47, 54 e 63 realizados com transdutor linear de 7,5 MHz (M5, Mindray, Shenzhen, China). As informações sobre o CL (lado e tamanho) foram registradas durante cada avaliação ultrassonográfica. O diagnóstico inicial de prenhez foi realizado no dia 28 com base na detecção de batimento cardíaco embrionário por ultrassom e feito posteriormente nos dias 33, 42, 47, 54 e 63 de gestação. Durante cada diagnóstico, cinco vídeos do embrião e da vesícula amniótica associada foram gravados para medições posteriores.

As análises dos vídeos gravados, do embrião e da vesícula amniótica (diâmetro dos eixos longitudinal e transversal), foram realizadas por dois pesquisadores experientes que desconheciam os grupos (tratamentos). Separadamente, cada pesquisador escolheu dois dos cinco vídeos gravados e fez medições do embrião e da vesícula amniótica. Cada pesquisador criou duas medidas diferentes dos eixos longitudinal e transversal do embrião e da vesícula amniótica para cada vídeo selecionado. As medições foram feitas no software Kinovea versão 0.8.15. O coeficiente de variação foi calculado para cada receptor (desvio padrão entre pesquisadores / média) e foram utilizados apenas dados com coeficiente de variação inferior a 10,0%. Os resultados que não atendiam a esse requisito foram analisados por um terceiro pesquisador.

#### **4.4.4 Análise estatística**

As análises estatísticas foram realizadas usando o Statistical Analysis System (SAS, Versão 9.4 para Windows SAS Institute Inc., Cary, NC). Variáveis discretas foram analisadas por regressão logística usando o procedimento de modelo linear generalizado misto (GLIMMIX) do SAS e ajustadas a uma distribuição binária (taxa de ovulação após o dia 5 e dia 12, P/TE e perda de gestação) ou distribuição exponencial (número de CLs nos dias 5, 12 e 19). Além disso, a opção `ddfm = kenwardroger` foi incluída na declaração do modelo para ajustar os graus de liberdade das variâncias. Variáveis contínuas foram analisadas usando o procedimento de modelo linear misto (MIXED). Todas as respostas variáveis (concentração circulante de P4 e PSPB do dia 5 até o dia 63) foram testadas quanto à normalidade dos resíduos de acordo com o teste de Shapiro-Wilk obtido pelo procedimento PROC UNIVARIATE do SAS. Quando a não normalidade foi detectada, os dados foram transformados em log. Se a normalidade dos resíduos ainda não tivesse sido alcançada, a análise não paramétrica para dados transformados classificados foi realizada com o procedimento RANK do SAS.

A seleção do modelo que melhor se ajusta a cada resposta de variável de interesse foi realizada encontrando o modelo com o menor valor para o Akaike Information Criterion

Corrected (AICC) usando o procedimento de eliminação reverso que removeu variáveis independentes com  $P > 0,10$  do modelo. Para todas as variáveis discretas e contínuas, o tratamento foi considerado como um efeito fixo e foi usado no modelo final para todas as análises. As covariáveis testadas foram repetição, ECC, qualidade/estágio do embrião e técnico realizando a TE.

O teste post hoc de diferença significativa de Tukey para comparações múltiplas foi realizado quando as variáveis independentes tinham mais de dois níveis. As diferenças foram consideradas significativas para  $P \leq 0,05$ , enquanto uma tendência foi designada quando  $P \leq 0,10$  e  $P > 0,05$ . Os resultados estão expressos como médias mínimas quadradas  $\pm$  erro padrão da média (LSM  $\pm$  SEM), a menos que indicado de outra forma.

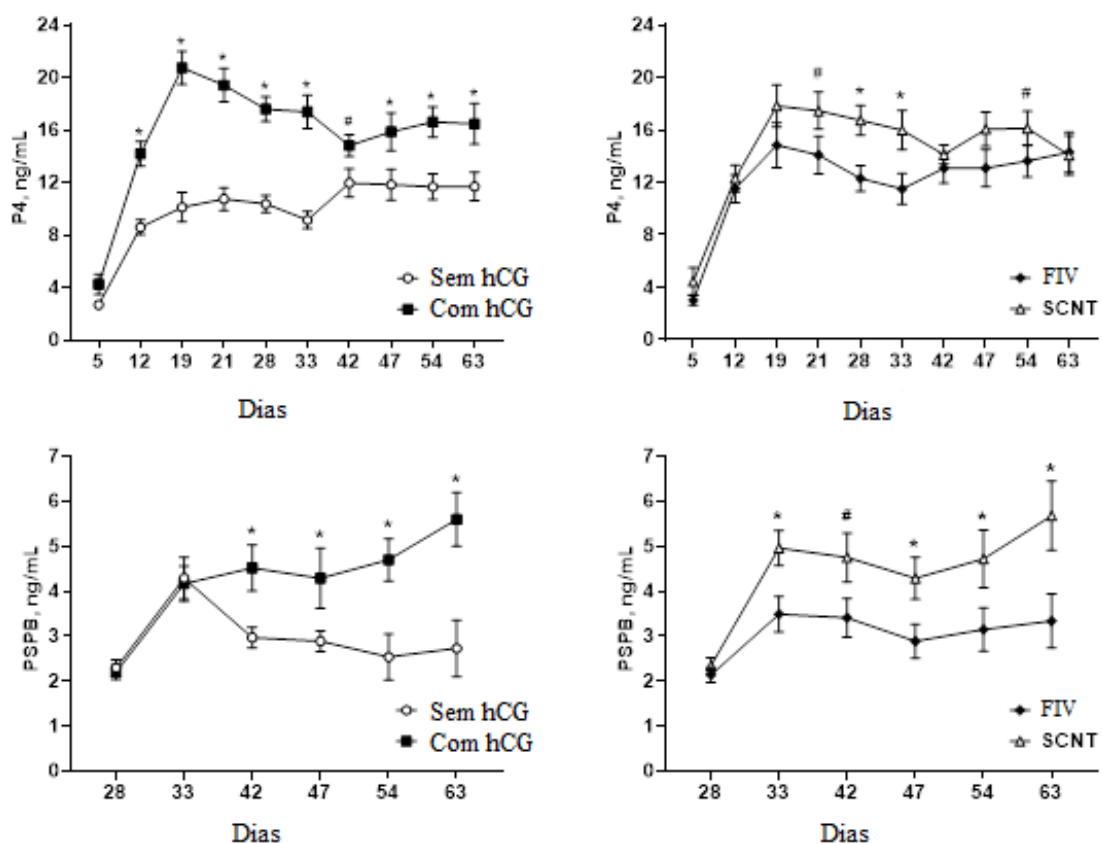
#### 4.5 Resultados

O número de corpos lúteos e a concentração de P4 circulante no dia 5 foram semelhantes entre os tratamentos sem hCG e com hCG com média de 1,0 CL e 3,7 ng/mL, respectivamente (Tabela 7). No entanto, a incidência de ovulação após o dia 5 foi maior para novilhas tratadas com hCG (96,9%; 63/65), produzindo aumento do número de CL no D12 ( $1,98 \pm 0,12$  CLs;  $n = 65$ ), bem como um aumento na concentração de P4 circulante no D12 ( $14,20 \pm 0,94$  ng/mL;  $n = 65$ ) em comparação com as novilhas não tratadas (0%; 0/58,  $1,0 \pm 0,13$  CL e  $8,6 \pm 0,56$  ng/mL;  $n = 58$ , respectivamente). Efeitos semelhantes foram observados após o tratamento com hCG no dia 12. Assim, considerando apenas novilhas gestantes (diagnosticadas pela primeira vez no dia 28), no dia 19 as novilhas tratadas com hCG tiveram maior número de CLs no D19 ( $2,80 \pm 0,20$  CL;  $n = 25$ ) e concentrações de P4 ( $20,75 \pm 1,27$  ng/mL;  $n = 25$ ) produzidas pela ovulação após hCG no D12 (83,1%; 54/65). O grupo sem hCG teve menor incidência de ovulação (1,72%; 1/58), número de CLs no dia 19 ( $1,0 \pm 0,24$  CL;  $n = 18$ ) e concentrações de P4 ( $10,13 \pm 1,12$  ng/mL;  $n = 18$ ). Os perfis de concentrações circulantes de P4 do dia 5 até o dia 63 em novilhas prenhes que receberam ou não hCG estão ilustrados na Figura 6.

**Tabela 7.** Avaliação ovariana de receptoras holandesas nulíparas tratadas ou não com gonadotrofina coriônica humana (hCG) nos dias 5 e 12 após a sincronização da ovulação (Dia -8: inserção de um implante intravaginal de progesterona [P4] contendo 1,38 g; Dia -3: retirada de o implante de P4 e administração de 500  $\mu$ g de cloprostenol [PGF]; Dia -2: administração de um segundo PGF; Dia 0: 100  $\mu$ g de acetato de gonadorelina [GnRH]).

Variáveis	Sem hCG	Com hCG	Valor de P
Número de CLs dia 5, (n)	$1.0 \pm 0.13$ (n = 58)	$1.0 \pm 0.12$ (n = 65)	1.0
Ovulação após o dia 5, (n/n)	0% (0/58)	96.92% (63/65)	<.0001
Número de CLs dia 12, (n)	$1.0 \pm 0.13$ (n = 58)	$1.98 \pm 0.12$ (n = 65)	0.0002
Ovulação após dia 12, (n/n)	1.72% (1/58)	80.0% (52/65)	<.0001
Número de CLs dia 19 (Gestantes), (n)	$1.0 \pm 0.24$ (n = 18)	$2.8 \pm 0.20$ (n = 25)	0.002

CL = corpo lúteo.



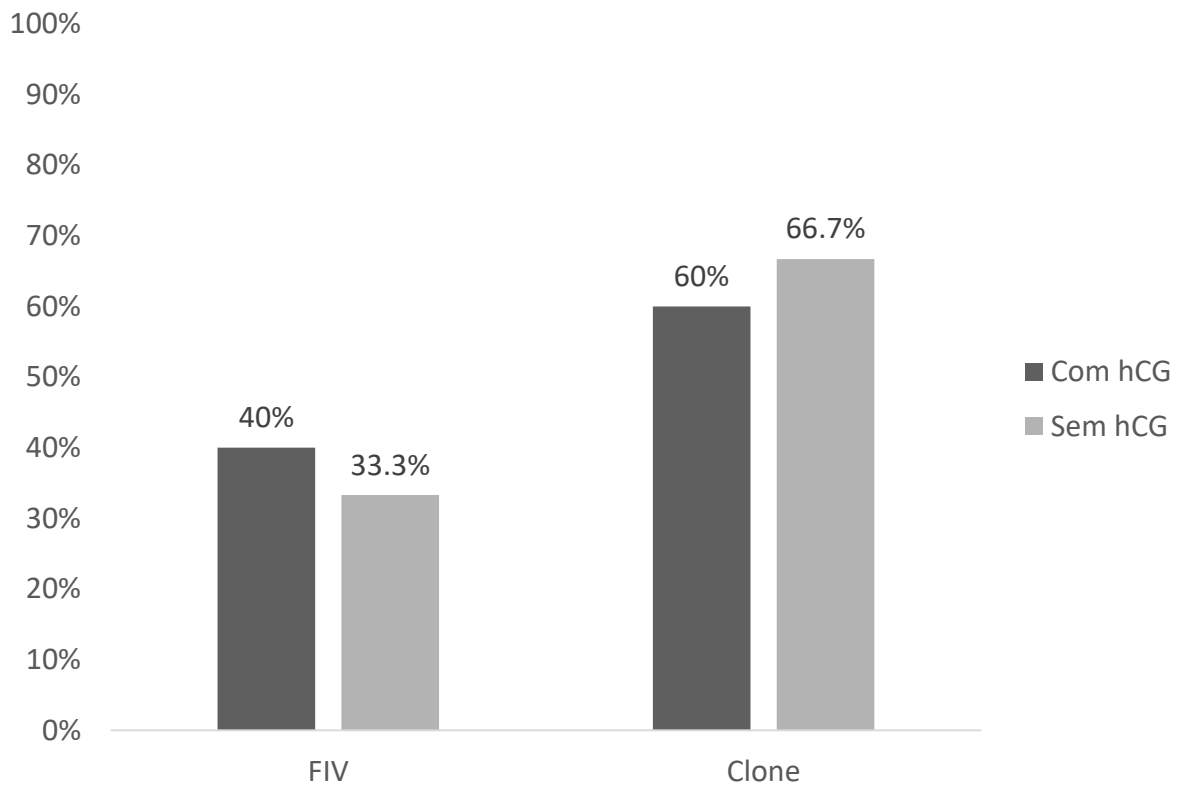
**Figura 6.** Concentrações circulantes de progesterona (P4) e do PSPB do dia 5 até o dia 63 após a ovulação (Dia 0) em receptoras de embriões gestantes recebendo ou não 3.300 IU de gonadotrofina coriônica humana (hCG) nos dias 5 e 12 do ciclo estral.

No geral, não houve diferença nas taxas de prenhez (P/TE) no dia 28 ou dia 33 para embriões FIV (37,3%) vs TNCS (31,6%) (Tabela 8). O grupo TNCS com hCG teve uma tendência para maior P/TE em comparação com TNCS sem hCG (41,7%; n = 36 vs. 21,4%; n = 28). Resultados semelhantes foram obtidos no dia 42 (TNCS sem hCG: 7,1%; SCNT com hCG: 22,2%). No entanto, embriões FIV tiveram maior P/TE nos dias 42, 47, 54 e 63 (~ 26%) em comparação com embriões TNCS (~ 13%). As perdas de gestação foram maiores para TNCS em comparação com embriões FIV (61,9%; 13/21 vs. 36,4%; 8/22) e o tratamento com hCG não reduziu as perdas de gestação em embriões TNCS ou FIV (Figura 7). Além disso, o grupo TNCS teve uma tendência para maior perda de gestação em comparação com embriões FIV entre os dias 33 e 42.

**Tabela 8.** Taxa de prenhez (P/TE) e perda gestacional de acordo com o tipo de embrião (FIV vs. TNCS) em diferentes fases da gestação.

<b>Taxa de Prenhez (%)</b>	<b>Dia 28</b>	<b>Dia 33</b>	<b>Dia 42</b>	<b>Dia 47</b>	<b>Dia 54</b>	<b>Dia 63</b>
FIV	37.3 (22/59)	33.9 (20/59)	28.81 (17/59)	27.12 (16/59)	25.42 (15/59)	23.73 (14/59)
TNCS	32.8 (21/64)	28.1 (18/64)	15.63 (10/64)	14.06 (9/64)	12.5 (8/64)	12.5 (8/64)
Valor de P	0.60	0.49	0.08	0.08	0.07	0.1
<b>Perda Gestacional (%)</b>	<b>D28-33</b>	<b>D33-42</b>	<b>D42-47</b>	<b>D47-54</b>	<b>D54-63</b>	<b>D33-63</b>
FIV	9.09 (2/22)	15.0 (3/20)	5.88 (1/17)	6.25 (1/16)	6.67 (1/15)	30.0 (6/20)
TNCS	14.29 (3/21)	44.4 (8/18)	10.0 (1/10)	11.11 (1/9)	0.0 (0/8)	55.56 (10/18)
Valor de P	0.60	0.06	0.69	0.68	0.98	0.12

FIV = Fertilização in vitro; TNCS = Transferência nuclear de célula somática.



**Figura 7.** Perda gestacional entre os dias 28 e 63 de gestação em receptoras (n = 41) tratadas ou não com hCG (Gonadotrofina coriônica equina) e que receberam embriões clonados ou fertilizados *in vitro*.

Apesar das receptoras de embriões TNCS e FIV terem PSPB circulante semelhante no dia 28, as receptoras de TNCS tiveram maior PSPB (Figura 6) do que embriões FIV do dia 33 ( $P = 0,01$ ) até o dia 63 ( $P = 0,03$ ). De particular interesse, as receptoras de embriões FIV que mantiveram a gestação tiveram maior PSPB no dia 28 ( $P = 0,006$ ) e no dia 33 ( $P = 0,003$ ) quando comparadas aquelas que receberam embriões FIV, mas que mais tarde tiveram perda de gestação. Por outro lado, as receptoras de embriões TNCS que mais tarde tiveram perda de gestação tiveram maior PSPB ( $P = 0,01$ ) no dia 33 do que as receptoras de embriões TNCS que mantiveram a prenhez. Além disso, o tratamento com hCG não alterou a P/TE em receptoras de embriões TNCS e FIV.

As análises morfológicas foram realizadas no dia 33 para comparar os diâmetros longitudinal e transversal, bem como o volume dos embriões e respectivas vesículas amnióticas (Tabela 9). Não houve diferença entre os embriões FIV ( $n = 20$ ) e TNCS ( $n = 17$ ) para o diâmetro longitudinal ( $P = 0,68$ ) ou transversal ( $P = 0,97$ ) do embrião (acima de 12,06 e 6,20 mm, respectivamente) e para o volume embrionário ( $P = 0,87$ ) ( $\sim 253,04 \text{ mm}^3$ ). Além disso, as vesículas amnióticas foram semelhantes em diâmetro longitudinal ( $P = 0,44$ ) e transversal ( $P = 0,11$ ) (acima de 13,90 e 8,94 mm, respectivamente) e em volume ( $\sim 603,41 \text{ mm}^3$ ;  $P = 0,22$ ). Além disso, o tratamento com hCG não alterou as medições embrionárias Longitudinal: 12,05 mm ( $P = 0,97$ ), Transversal: 6,22 mm ( $P = 0,2$ ) e Volume:  $253,95 \text{ mm}^3$  ( $P = 0,37$ ) ou medição da vesícula amniótica Longitudinal: 13,89 mm ( $P = 0,30$ ), Transversal: 8,99 mm ( $P = 0,13$ ); Volume:  $610,73 \text{ mm}^3$  ( $P = 0,23$ ). As receptoras que mantiveram a gestação até o dia 63 ( $n = 22$ ) foram comparadas àquelas que tiveram perda de gestação ( $n = 15$ ). As medidas embrionárias foram semelhantes (longitudinal ( $P = 0,29$ ); diâmetro transversal ( $P = 0,76$ ; volume ( $P = 0,85$ )) (acima de 12,10 e 6,19 mm, e  $253,40 \text{ mm}^3$ , respectivamente) assim como as medidas da vesícula amniótica também foram semelhantes em diâmetro longitudinal ( $P = 0,60$ ) e transversal ( $P = 0,93$ ) (acima de 13,93 e 8,97 mm, respectivamente), e em volume ( $\sim 607,71 \text{ mm}^3$ ;  $P = 0,94$ ).

**Tabela 9.** Características morfológicas do embrião e sua respectiva vesícula amniótica no 33º dia de gestação de receptoras que receberam embrião fertilizado *in vitro* (FIV) ou produzido por transferência nuclear (TNCS). Cada grupo de embriões (FIV vs. TNCS) foi dividido para receber ou não 3.300 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG) nos dias 5 e 12 após a ovulação.

	Embrião			Vesicula Amniótica		
	Ø Long. mm	Ø Transv. mm	Vol. mm <sup>3</sup>	Ø Long. mm	Ø Transv. mm	Vol. mm <sup>3</sup>
<b>Embrião (n)</b>						
FIV (17)	11.96 ± 0.03	6.20 ± 0.02	250.52 ± 20.81	13.73 ± 0.04	9.30 ± 0.03	649.22 ± 49.26
TNCS (9)	12.16 ± 0.04	6.19 ± 0.02	255.56 ± 22.57	14.07 ± 0.04	8.58 ± 0.03	557.59 ± 53.43
P-valor	0.68	0.97	0.87	0.44	0.11	0.22
<b>hCG (n)</b>						
Não (10)	12.06 ± 0.04	6.41 ± 0.02	267.60 ± 22.32	13.84 ± 0.03	9.33 ± 0.03	655.22 ± 53.49
Sim (16)	12.04 ± 0.03	6.02 ± 0.02	240.29 ± 20.58	13.93 ± 0.05	8.65 ± 0.03	566.24 ± 49.32
P-valor	0.97	0.20	0.37	0.30	0.13	0.23
<b>Prenhez (n)</b>						
*Mantiveram (22)	11.83 ± 0.03	6.24 ± 0.02	250.44 ± 19.84	13.74 ± 0.04	9.0 ± 0.03	604.61 ± 48.01
*Perderam (4)	12.37 ± 0.04	6.14 ± 0.02	256.35 ± 24.02	14.11 ± 0.04	8.94 ± 0.04	610.80 ± 58.15
P-valor	0.29	0.76	0.85	0.60	0.93	0.94

\*As receptoras gestantes no dia 42 foram divididas em dois grupos: as que mantiveram a gestação até o dia 63 e aquelas que tiveram perda gestacional. Long. = Longitudinal; Transv. – Transversal; Vol. = Volume.

#### 4.6 Discussão

O presente estudo fornece informações importantes sobre os principais tópicos na ciência da reprodução, como a tecnologia de produção *in vitro* de embriões (FIV e TNCS), perda de prenhez e uma estratégia inovadora para aumentar as concentrações circulantes de P4 usando dois tratamentos consecutivos de hCG. Basicamente, os embriões TNCS foram usados como um modelo para estudar os resultados temporais e fisiológicos em relação às perdas de gestação devido à alta taxa de perda que este tipo de embrião apresenta (~ 71% de 30 dias de gestação até o nascimento) (PANARACE et al., 2006; SARTORI et al., 2016). Além disso, a indução de CLs acessórios foi utilizada para aumentar a concentração de P4 circulante com o objetivo de melhorar o desenvolvimento inicial do embrião e, consequentemente, reduzir as perdas gestacionais (CARTER et al., 2008; FORDE et al., 2009; LONERGAN, 2011).

A primeira hipótese deste estudo era que a administração de hCG aumentaria o número de CLs acessórios, bem como aumentaria as concentrações circulantes de P4 em receptoras tratadas. Portanto, o dia escolhido para o primeiro tratamento com hCG foi o dia 5 após a ovulação anterior, pois era esperado a presença de um folículo dominante com aproximadamente 13,0 mm emergido durante a primeira onda folicular com base em estudos que descrevem o ciclo estral em novilhas Holandesas (GINTHER et al., 1989; SARTORI et al., 2004). Além disso, Nascimento et al. (2013) descreveram uma taxa de ovulação em torno de 80% após o tratamento com hCG (2.000 UI) no dia 5 do ciclo estral em vacas holandesas em lactação, causando um aumento nas concentrações circulantes de P4 e quase dobrando o número de CLs no dia 12, respectivamente (Controle: 4,32 e 1,16; Tratado: 5,65 ng/mL e 2,26 CLs). Na verdade, o presente estudo induziu ovulação em aproximadamente 97% das novilhas tratadas no dia 5 e essa ótima resposta pode ser explicada pela dose mais alta de hCG (3.300 UI) que foi administrada. Desta forma, o número de CLs e as concentrações circulantes de P4 foram maiores no dia 12 em comparação com o grupo controle, e assim, a primeira hipótese deste experimento foi sustentada.

Curiosamente, a taxa de ovulação causada pelo segundo tratamento com hCG no dia 12 induziu cerca de 83% de ovulação, que foi menor em comparação com a taxa observada após o dia 5. Apesar da taxa de ovulação ainda ser aceitável, acredita-se que duas razões poderiam explicar este resultado. A primeira é que algumas novilhas não tinham um folículo dominante no dia 12, este deve ter pelo menos 10,0 mm de diâmetro para atingir a capacidade ovulatória no momento da administração do indutor de ovulação (SARTORI et al., 2001). Outra explicação é que algumas das novilhas apresentaram regressão lútea do primeiro CL induzido no dia 5 e, conseqüentemente, apenas um CL foi visível no dia 19 do ciclo estral. Neste caso, a novilha ovulou após o dia 12, mas não foi possível detectar dois CLs nos ovários. No entanto, as concentrações circulantes de P4 quase dobraram até o dia 33 deste estudo.

Vários estudos relataram taxa de prenhez satisfatória em receptoras de embriões TNCS e quando esses resultados foram comparados a um embrião fertilizado *in vitro* (FIV), não encontrando diferença estatística entre eles. Por exemplo, Sartori et al. (2016) indicam um P/TE geral de 39,4% (337/856) em receptoras de embriões TNCS. Além disso, outros relatos mostram números semelhantes em receptoras de embriões TNCS (36,8% [1242/3374]) (PANARACE et al., 2006). Para comparar as taxas de prenhez, estudos demonstram que a de embriões FIV está em torno de 41,8% (838/2003) (PEREIRA et al., 2016) e 42,9% (7204/16771) (SARTORI et al., 2016). O presente estudo apresentou P/ET semelhante entre receptoras de TNCS e FIV no primeiro (dia 28) e segundo diagnóstico de gestação (dia 33). No entanto, parece que este resultado foi semelhante entre os grupos porque receptoras de embriões TNCS tratadas com hCG tiveram uma tendência a melhorar o P/TE comparado a receptoras de TNCS não tratadas. Curiosamente, esse efeito potencial não foi observado no grupo de FIV e mostra que o grupo TNCS foi beneficiado pelo aumento nas concentrações circulantes de P4.

Foi relatado que a perda de prenhez em receptoras de embrião TNCS é extremamente alta (acima de 71% [1125/1579] dos 30 dias de gestação até o nascimento) (PANARACE et al., 2006; SARTORI et al., 2016). Além disso, alguns estudos indicam que o período principal de perdas é entre 30 e 60 dias de gestação (PANARACE et al., 2006; GERGER et al., 2017). Portanto, a fim de encontrar o período central mais importante da perda de gestação, o presente estudo realizou diagnósticos de gestação semanais. O grupo TNCS teve uma tendência a apresentar maior perda além disso, o intervalo entre os dias 33 e 42 da gestação parece ser crítico para as receptoras de embriões TNCS para manter a prenhez.

A última hipótese era que os embriões TNCS seriam menores em comparação com os fertilizados *in vitro*, mas teriam concentrações circulantes de PSPB mais altas. De fato, há estudos na literatura que mostram que receptoras de embriões TNCS apresentam maiores concentrações circulantes de PSPB (HEYMAN et al., 2002; CHAVATTE-PALMER et al.,

2006; CONSTANT et al., 2011). Como as células binucleadas são responsáveis pela produção de PSPB, os maiores níveis observados em embriões TNCS poderiam ser explicados por uma atividade exacerbada das células binucleadas, bem como pelo maior número dessas células. Outra possibilidade poderia ser uma meia vida mais longa do PSPB em receptoras de embriões TNCS.

Finalmente, os embriões TNCS tinham o mesmo tamanho em comparação com o grupo controle (embriões FIV). Apesar de alguns estudos relatarem que embriões TNCS são menores do que embriões gerados por inseminação artificial ou embriões FIV, há estudos mostrando que embriões TNCS e FIV tinham o mesmo tamanho entre 30 e 60 dias de gestação.

#### **4.7 Conclusões**

Houve uma tendência de melhora nas taxas de prenhez com o aumento da P4 circulante em receptoras de embriões TNCS, conforme, embora sejam necessárias pesquisas adicionais com maior número de receptoras para melhor compreender estes achados. Além disso, embora PSPB reduzido pareça ser um preditor de perda de prenhez em receptoras de embriões FIV, maior PSPB circulante no dia 33 foi um preditor de perda de gestação subsequente em receptoras de embriões clonados, um trofoblasto binucleado com excessivo número de células ou atividade pode ser o que precede a perda de gestação de embriões TNCS.

### **5 CONCLUSÕES GERAIS**

As perdas gestacionais ocorrem por diferentes fatores em programas de seleção e reprodução da bovinocultura leiteira, estas perdas também ocorrem em programas de transferência de embriões que visam um melhoramento mais acelerado do rebanho. O presente estudo permitiu as seguintes conclusões:

A técnica de transferência de embriões realizada a partir de doadoras soropositivas para *N. caninum* é segura do ponto de vista sanitário e pode ser utilizada em programas de controle desta enfermidade, e o status sorológico da doadora não tem efeito na taxa de prenhez, na perda gestacional, resposta superovulatória e no número de estruturas recuperadas, no entanto, pode afetar a qualidade dos embriões produzidos, assim uma avaliação de custo benefício deve ser realizada antes da implantação em rebanhos comerciais.

O aumento da P4 circulante pode melhorar a fertilidade em receptoras de embriões TNCS, conforme evidenciado pela tendência do tratamento com hCG para aumentar P/TE de embriões TNCS no segundo experimento, embora sejam necessárias pesquisas adicionais com maior número de receptoras. Além disso, embora o PSPB reduzido pareça ser um preditor de perda de prenhez em receptoras de embriões FIV, como mostrado em outras situações fisiológicas, maior PSPB circulante no dia 33 foi um preditor de perda de gestação subsequente em receptoras de embriões clonados, talvez indicando um trofoblasto binucleado com excessivo número de células ou atividade o que precede a perda de gestação de embriões TNCS.



## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBITT, B.; RADSE, D.O. Protozoal abortion in cattle. In R. S. Youngquist & W. R. Threlfall, *Current therapy in large animal Theriogenology*, v. 2, p. 409-413, 2007.

ACOSTA, I.C.L.; CENTODUCATTE, L. A.; SOARES, H.S.; MARCILI, A.; GONDIM, M.F.N.; JUNIOR, J.L.R.; GENNARI, S.M. Occurrence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in dogs from rural properties surrounding a biological reserve, Espírito Santo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v.25, p.536-539, 2016.

ALKAN, H.; KARAŞAHIN, T.; DURSUN, S.; SATILMIŞ, F.; ERDEM, H.; GÜLER, M. Evaluation of the factors that affect the pregnancy rates during embryo transfer in beef heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v.55, p. 421–428, 2020.

AMBROSE D.J.; COLAZO M.G.; KASTELIC, J.P. The applications of timed artificial insemination and timed embryo transfer in reproductive management of dairy cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.383-392, 2010

ANDERSON, M.L. Infectious causes of bovine abortion during mid- to late gestation. **Theriogenology**, v.68, p.474-486, 2007.

BAILLARGEON, P.; FECTEAU, G.; PARÉ, J.; LAMOTHE, P.; SAUVÉ, R. Evaluation of the embryo transfer procedure proposed by the International Embryo Transfer Society as a method of controlling vertical transmission of *Neospora caninum* in cattle. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.218, p.1803-1806, 2001.

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

BASZLER, T.V.; GAY, L.J.C.; LONG, M.T.; MATHISON, B.A. Detection by PCR of *Neospora caninum* in Fetal Tissues from Spontaneous Bovine Abortions. **Journal of Clinical and Microbiology**, v.37, p.4059-64, 1999.

BAZER, F.W.; KIM, J.; SONG, G.; K.A., H.; TEKWE, C.D.; WU, G. Select nutrients, progesterone, and interferon tau affect conceptus metabolism and development. **Annals of the New York Academical Science**, v.1271, p. 88–96, 2012.

BORDIGNON, V. Animal Cloning – State of the Art and Applications. **Moleccular Life Sciences**, p. 1–17, 2017.

CAMPERO, C.M.; MOORE, D.P.; LAGOMARSINO, H.; ODEON, A.C.; CASTRO, M.; VISCA, H. Serological Status and Abortion Rate in Progeny Obtained by Natural Service or Embryo Transfer from *Neospora caninum*-Seropositive Cows. **Journal of Veterinary Medicine**, v.50, p.458–460, 2003.

CANADA, N.; MEIRELES, C.S.; FERREIRA, P.; CORREIA DA COSTA, J.M.; ROCHA, A. Artificial insemination of cows with semen in vitro contaminated with *Neospora caninum* tachyzoites failed to induce neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.139, p.109-114, 2006.

- CARTER, F.; FORDE, N.; DUFFY, P.; WADE, M.; FAIR, T.; CROWE, M.A. Effect of increasing progesterone concentration from Day 3 of pregnancy on subsequent embryo survival and development in beef heifers. **Reproduction Fertility and Development**, v.20, p. 368–75, 2008.
- CERQUEIRA-CÉZAR, C.K.; CALERO-BERNAL, R.; DUBEY, J.P; GENNARI<sup>2</sup>, S.M. All about neosporosis in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 26, n. 3, 2017.
- CHAVATTE-PALMER, P.; CAMOUS, S.; JAMMES, H, LE CLEAC'H, N.; GUILLOMOT, M.; LEE, R.S.F. Review: Placental perturbations induce the developmental abnormalities often observed in bovine somatic cell nuclear transfer. **Placenta**, v.33, p. 99–104, 2012.
- CHAVATTE-PALMER, P.; DE SOUSA, N.; LAIGRE, P.; CAMOUS, S.; PONTER, A.A.; BECKERS, J.F. Ultrasound fetal measurements and pregnancy associated glycoprotein secretion in early pregnancy in cattle recipients carrying somatic clones. **Theriogenology**, v.66, p.829–40, 2006.
- COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; ZABALLOS, A.; ÁLVAREZ-GARCÍA, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Quantitative Detection of *Neospora caninum* in Bovine Aborted Fetuses and Experimentally Infected Mice by Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.4, p.1194–1198, 2002.
- CONSENTINI, C.E.C; WILTBANK, M.C.; SARTORI R. Factors That Optimize Reproductive Efficiency in Dairy Herds with an Emphasis on Timed Artificial Insemination Programs. **Animals**, v.11, n.2, e301, 2021.
- CONSTANT, F.; CAMOUS, S.; CHAVATTE-PALMER, P.; HEYMAN, Y.; DE SOUSA, N.; RICHARD, C. Altered secretion of pregnancy-associated glycoproteins during gestation in bovine somatic clones. **Theriogenology**, v. 76, p. 1006–21, 2011.
- CONSTANTINO, C.; PELLIZZARO, M.; EVARISTO DE PAULA, E.F.; VIEIRA, T.S.W.J.; BRANDÃO, A.P.D.; FERREIRA, F.; COSTA VIEIRA, R.F.; LANGONI, H.; BIONDO, A.W. Serosurvey for *Leishmania spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* and *Neospora caninum* in neighborhood dogs in Curitiba-Paraná, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 25, p.504-510, 2016.
- CORBELLINI, L.G.; DRIEMEIER, D.; CRUZ, C.; DIAS, M.M. Aborto Bovino por *Neospora caninum* no Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v.30, p.863-868, 2000.
- D'ANGELO, M.; GALUPPO, A.G.; ZERIO, N.M.C.; MELO, G.M.; PITUCO, E.M.; OKUDA, L.H. Estudo morfológico de embriões bovinos fertilizados *in vitro* expostos experimentalmente à *neospora caninum*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.73, n.2, p.211-214, 2006.
- DEL FAVA, C.; VASCONCELLOS, S.A.; D'ANGELINO, J.L.; MORAIS, Z.M.; FIGUEIREDO, L.A.; RAZOOK, A.G.; CYRILLO, J.N.S.G; OLIVEIRA, J.V.; REICHERT, R.H. Coeficientes Reprodutivos e Soropositividade para *Leptospira spp.* em um Rebanho Bovino de Corte no Estado de São Paulo, Brasil. **ARS Veterinária**, v.20, p.052-061, 2004.
- DEMIR, P.A; EŞKI, F.; ÜTÜK, A.E. Estimating the total economic costs of *Neospora caninum* infections in dairy cows in Turkey. **Tropical Animal Health and Production**, v.52, p.3251–3258, 2020.

- DISKIN, M.G.; WATERS, S.M.; PARR, M.H.; KENNY, A. Pregnancy losses in cattle: potential for improvement. **Reproduction, Fertility and Development**, v.28, p.83–93, 2016.
- DUBEY, J.P. Neosporosis in cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.21, p.473-83, 2005.
- DUBEY, J.P. Review of *Neospora caninum* and neosporosis in animals. **The Korean Journal of Parasitology**, v.41, p.1-16, 2003.
- DUBEY, J.P.; BUXTON, D.; WOUDA, W. Pathogenesis of bovine neosporosis. **Journal of Comparative Pathology**, v.134, p. 267-289, 2006.
- DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S. Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.22, p.645-671, 2006.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Diagnosis of bovine neosporosis. **Veterinary Parasitology**, v.140, p.1-34, 2006.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals-The last five years. **Veterinary Parasitology**, v.180, p.90-108, 2011.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G.; ORTEGA-MORA, L.M. Epidemiology and control of neosporosis and *Neospora caninum*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, p.323-367, 2007.
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Anuário do Leite. **Embrapa gado de Leite**, Juiz de Fora, 2020.
- ERDEM, H.; KARASAHIN, T.; ALKAN, H.; DURSUN, S.; SATILMIS, F.; GULER, M. Effect of embryo quality and developmental stages on pregnancy rate during fresh embryo transfer in beef heifers. **Tropical Animal Health and Production**, v.52, p.2541–2547, 2020.
- FABER, D.C.; FERRE, L.B.; METZGER, J.; ROBL, J.M.; KASINATHAN, P. Agro-economic impact of cattle cloning. **Cloning Stem Cells**, v.6, p. 198–207, 2004.
- FERGUSON, J.D.; GALLIGAN, D.T.; THOMSEN, N. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.77, p.2695-2703, 1994.
- FERRE, I.; ADURIZ, G.; DEL-POZO, I.; REGIDOR-CERRILLO, J.; ATXAERANDIO, R.; COLLANTES-FERNÁNDEZ, E.; HURTADO, A.; UGARTE-GARAGALZA, C.; ORTEGA-MORA, L. M. Detection of *Neospora caninum* in the semen and blood of naturally infected bulls. **Theriogenology**, v.63, p.1504-1518, 2005.
- FORDE, N.; CARTER, F.; FAIR, T.; CROWE, M.A.; EVANS, A.C.O.; SPENCER, T.E. Progesterone-Regulated Changes in Endometrial Gene Expression Contribute to Advanced Conceptus Development in Cattle. **Biology of Reproduction**, v.81, 784–94, 2009.
- FORTUNATO M.C.S. **Estudo Retrospectivo de Neospora Caninum como Causa de Aborto numa Exploração de Bovinos de Leite da Região da Moita do Ribatejo**. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, 2010. 98 f., Tese (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária.

GAIA, V.G.; GRILLO, G.F.; MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B.; SILVA, A.F. Association between *Neospora caninum* seropositivity and reproductive disorders in girolando cows. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária Zootecnia**, v.72, n.6, p. 2069-2076, 2020.

GALVÃO, G. da S.; GONDIM, L.F.P.; PEREIRA, M.J.S.; OLIVEIRA, U.V.; MUNHOZ, A.D. Soropositividade para *Neospora caninum* e Associação ao Abortamento e Natimortos em Rebanhos Leiteiros do Sudeste da Bahia, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.33, p.234-237, 2011.

GARCIA-VAZQUEZ, Z.; ROSARIO-CRUZ, R.; RAMOS-ARAGON, A.; CRUZ-VAZQUEZ, C.; MAPES-SANCHEZ, G. *Neospora Caninum* seropositivity and association with abortions in dairy cows in Mexico. **Veterinary Parasitology**, v.134, p.61-65, 2005.

GERGER, R.P.C.; ZAGO, F.C.; RIBEIRO, E.S.; GAUDENCIO NETO, S.; MARTINS, L.T.; AGUIAR, L.H. Morphometric developmental pattern of bovine handmade cloned concepti in late pregnancy. **Reproduction Fertility and Development**, v.29, p.950-67, 2017.

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.1, p. 223-230, 1989.

GODIM, L.F.P.; MCALLISTER, M.M.; GAO, L. Effects of host maturity and prior exposure history on the production of *Neospora caninum* oocysts by dogs. **Veterinary Parasitology**, v.134, p.33-39, 2005.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J.P. Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses from Cattle Cloned Embryos. **Biology of Reproduction**, v.66, p.6-13, 2002.

JEMAL, H.; DEGEFA, T.; ALI, S.; LEMMA, A. Influence of breed on the quality of in vivo produced embryos from Boran and Holstein Friesian cross dairy breed in Ethiopia. **Ethiopian Veterinarian Journal**, v.25, p. 43-59, 2021.

KLAUCK, V.; MACHADO, G.; PAZINATO, R.; RADAVELLI, W.M.; SANTOS ,D.S.; BERWAGUER, C.; BRAUNIG, P.; VOGEL, F.F.; DA SILVA, A.S. Relation between *Neospora caninum* and abortion in dairy cows: Risk factors and pathogenesis of disease. **Microbial Pathogens**, v.92, p.46-49, 2016.

KLISCH, K.; BOOS, A.; FRIEDRICH, M.; HERZOG, K.; FELDMANN, M.; SOUSA, N.M. The glycosylation of pregnancy-associated glycoproteins and prolactin-related protein-I in bovine binucleate trophoblast giant cells changes before parturition. **Reproduction**, v.132, p.791-8, 2006.

LONERGAN, P. Influence of progesterone on oocyte quality and embryo development in cows. **Theriogenology**, v. 76, p.1594-601, 2011.

LÓPEZ-GATIUS, F.; SANTOLARIA, P.; YÁÑIZ, J.L.; GARBAYO J.M.; ALMERÍA S. The use of beef bull semen reduced the risk of abortion in *Neospora*-seropositive dairy cows. **Journal of Veterinary Medicine**, v.52, p.88-92, 2005.

LUCY, MC. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 1277-1293, 2001.

MARTINS, N.E.X.; FRESCHI, C.R.; BAPTISTA, F.; MACHADO, R.Z.; COSTA FREITAS, F.L.; ALMEIDA, K.S. Ocorrência de Anticorpos *anti-Neospora caninum* em vacas lactantes do município de Araguaína, estado do Tocantins, Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, p. 231-238, 2011.

MARUGAN-HERNANDEZ, V. *Neospora caninum* and Bovine Neosporosis: Current Vaccine Research. **Journal of Comparative Pathology**, v. 157, p.193-200, 2017.

McALLISTER, M.M.; BJORKMAN, C.; ANDERSON-SPRECHER, R.; ROGERS, D. G. Evidence of point-source exposure to *Neospora caninum* and protective immunity in a herd of beef cows. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.217, p. 881-887, 2000.

McALLISTER, M.M.; DUBEY, J.P.; LINDSAY, D.S.; JOLLEY, W.R.; WILLS, R.A.; MCGUIRE, A.M. Dogs are definitive hosts of *Neospora caninum*. **International Journal of Parasitology**, v.28, p.1473–1479, 1998.

MELO, D.P.G.; SILVA, A.C.; ORTEGA-MORA, L.M.; BOAVANTURA, C.M. Prevalência de anticorpos anti- *Neospora caninum* em bovinos das microrregiões de Goiânia e Anápolis, Goiás. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.15, p.105-109, 2006.

MIKKOLA, M.; HASLER, J.F.; TAPONEN, J. Factors affecting embryo production in superovulated *Bos Taurus* cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.32, p.104–124, 2020.

MORRELL, E.L.; CAMPERO, C.E.; CANTÓN G.J.; ODEÓN, A.C.; MOORE D.P.; ODRIOZOLA E.; PAOLICCHI F.; FIORENTINO, M.A. Current trends in bovine abortion in Argentina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, p. 12-19, 2019.

MOSKWA, B; GOZ`DZIK, K.; BIEN, J.; CABJ, W. Studies on *Neospora caninum* DNA detection in the oocytes and embryos collected from infected cows. **Veterinary Parasitology**, v.158, p. 370–375, 2008.

MUNHOZ, A.D.; PEREIRA, M.J.S.; FLAUSINO, W.; LOPES, C.W.G. *Neospora caninum* seropositivity in cattle breeds in the South Fluminense Paraíba Valley, state of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.29, p.29-32, 2009.

NASCIMENTO, A.B.; BENDER, R.W.; SOUZA, A.H.; AYRES, H.; ARAUJO, R.R.; GUENTHER, J.N. Effect of treatment with human chorionic gonadotropin on day 5 after timed artificial insemination on fertility of lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.96, p. 2873–82, 2013.

NOGAREDA, C.; LÓPEZ-GATIUS, F.; GARCÍA-ISPIERTO, I.; PABLÓN, M.; BECH-SABAT, G.; SANTOLARIA, P.; YÁÑIZ, J. L.; ALMERÍA, S. Neosporosis bovina en explotaciones de alta producción lechera del nordeste de España. Apoyo laboratorial y perspectiva clínica. **Boletín de Anembe**, v.84, p.10-16, 2009.

ORTEGA-MORA, L.M.; FERNÁNDEZ-GARCIA, A.; GÓMEZ-BAUTISTA, M. Diagnosis of bovine neosporosis: recent advances and perspectives. **Acta Parasitologica**, v.51, p.1-14, 2006.

PAGE, R.L.; AMBADY, S. Animal cloning applications in agriculture. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**, v.23, p.27–31, 2004.

PANARACE, M.; AGÜERO, J.I.; GARROTE, M.; JAUREGUI, G.; SEGOVIA, A.; CANÉ, L. How healthy are clones and their progeny: 5 years of field experience. **Theriogenology**, v.67, p.142–51, 2007.

PARKINSON, T. Specific infectious diseases causing infertility and subfertility in cattle. IN D.E. NOAKES, T.J. PARKINSON & G.C.W. **Veterinary Reproduction and Obstetrics**, v.9, p.476-516, 2009.

PEREIRA, M.H.C.; WILTBANK, M.C.; VASCONCELOS, J.L.M. Expression of estrus improves fertility and decreases pregnancy losses in lactating dairy cows that receive artificial insemination or embryo transfer. **Journal of Dairy Science**, v.99, p.2237–47, 2016.

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

RAGOZO, A.M.A.R.; PAULA, V.S.O.; SOUZA, S.L.P.; BERGSMASCHI, D.P.; GENNARI, S.M. Ocorrência de anticorpos anti-*Neospora caninum* em soros bovinos procedentes de seis estados brasileiros. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 12, p.33-37, 2003.

RANI, P.; DUTT, R.; SINGH, G.; CHANDOLIA1, R.K. Embryonic Mortality in Cattle- A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.7, p. 2319-7706, 2018.

REITT, K.; HILBE, M.; VOEGTLIN, A.; CORBOZ, L.; HAESSIG, M.; POSPISCHIL, A. Etiology of bovine abortion in Switzerland from 1986-1995 – a retrospective study with emphasis on detection of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* by PCR. **Journal of Veterinary Medicine**, v.54, p.15-22, 2007.

ROPER, D. A.; SCHRICK, F. N.; LANNETT EDWARDS, J.; HOPKINS, F. M.; PRADO, T. M.; WILKERSON JOHN, B.; SAXTON, A. M.; YOUNG, C. D.; SMITH, W. B. Factors in cattle affecting embryo transfer pregnancies in recipient animals. **Animal Reproduction Science**, v. 199, p.79-83, 2018.

SANCHEZ, G.F.D.; BANDA, R.V.M.; SAHAGUN, R.A.; LEDESMA, M.N.; MORALES, S.E. Comparison between immunohistochemistry and two PCR methods for detection of *Neospora caninum* in formalin-fixed and paraffin-embedded brain tissue of bovine fetuses. **Veterinary Parasitology**, v.164, p.328–332, 2009.

SANTOS, I.A.; MAGALHÃES, V.C.S.; COSTA, S.C.L.; MUNHOZ A.D. Avaliação dos índices zootécnicos em vacas mestiças com *Neospora caninum* no sudeste da Bahia, Brasil: uma análise em um rebanho leiteiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, 36:421-424, 2014.

SARTORI, R.; FRICKE, P.M.; FERREIRA, J.C.; GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C. Follicular deviation and acquisition of ovulatory capacity in bovine follicles. **Biology of Reproduction**, v.65, p.1403–9, 2001.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.M.; WILTBANK, M.C. Comparison of Ovarian Function and Circulating Steroids in Estrous Cycles of Holstein Heifers and Lactating Cows. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.905–20, 2004.

SARTORI, R.; PRATA, A.B.; FIGUEIREDO, A.C.S.; SANCHES, B.V.; PONTES, G.C.S.; VIANA, J.H.M. Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. **Animal Reproduction**, v.13, p.300–12, 2016.

SERRANO, E.; FERRE, I.; OSORO, K.; ADURIZ, G.; MATEOS-SANZ, A.; MARTÍNEZ, A.; ATXAERANDIO, R.; HIDALGO, C.O.; ORTEGA-MORA, L.M. Intrauterine *Neospora caninum* inoculation of heifers. **Veterinary Parasitology**, v.135, p.197–203, 2006.

SERRANO-MARTÍNEZ, E.; FERRE, I.; MARTÍNEZ, A.; OSORO, K.; MATEOS-SANZ, A.; DEL-POZO, I.; ADURIZ, G.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C. O.; ORTEGA-MORA, L. M. Experimental neosporosis in bulls: parasite detection in semen and blood and specific antibody and interferon-gamma responses. **Theriogenology**, v.67, p.1175-1184, 2007.

SHANNON, L.; DONAHOE S.; LINDSAY A., KROCKENBERGER, M.; PHALEN D.; ŠLAPETA, J. A review of neosporosis and pathologic findings of *Neospora caninum* infection in wildlife. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v.4, p.216–238, 2015.

SILVA, A.F.; RANGELA, L.; ORTIZA, C.G.; MORALES, E.; ZANELLAB, E.L.; CASTILLO-VELÁZQUEZA, U; GUTIERREZA, C.G. Increased incidence of DNA amplification in follicular than in uterine and blood samples indicates possible tropism of *Neospora caninum* to the ovarian follicle. **Veterinary Parasitology**, v.188, p.175– 178, 2012.

SILVA, L. S.; ALMEIDA, A. R. G.; PINTO NETO, A.; MARTINEZ, A. C. Neosporosis and its epidemiology: a review. **Scientific Electronic Archives**, v. 12, April 2019.

SOKOL-BORRELLI, S.L.; COOMBS, R.S.; BOYLE, J.P. A Comparison of Stage Conversion in the Coccidian Apicomplexans *Toxoplasma gondii*, *Hammondia hammondi*, and *Neospora caninum*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.10, 2020.

STRINGFELLOW, D.A.; GIVENS, M.D. *Manual of the International Embryo Transfer Society (IETS)*. 4th ed. Champaign, IL: IETS, 2010.

STRONGE, A.J.H.; SREENAN, J.M.; DISKIN, M.G.; MEE, J.F.; KENNY, D.A.; MORRIS, D.G. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. **Theriogenology**, v.64, p.1212–24, 2005.

United States Department of Agriculture. USDA Foreign Agricultural Service. Disponível em <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/>>. Acesso em Dezembro de 2016.

VIANA, J.H.M. Produção e Transferência de Embriões Bovinos em 2018. **Jornal O Embrião**, 2019.

WANG S., YAO Z., ZHANG N., WANG D., MA J., LIU S., ZHENG B., ZHANG B., LIU K. & ZHANG H. Serological study of Neospora caninum infection in dogs in central. China. **Parasitology Journal**, v.23, p.1-5, 2016.

WELLS, D.N. Animal cloning: Problems and prospects. **OIE Revue Scientifique et Technique**, v.24, p. 251–64, 2005.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A.E.; MCWHIR, J.; KIND A.J.; CAMPBELL K.H.S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v.385, p.810–803, 1997.

WILTBANK, M.C.; BAEZ G. M.; GARCIA-GUERRA A.; TOLEDO M.Z.; MONTEIRO P.J.L.; 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, p.239–253, 2016.

WILTBANK, M.C.; SOUZA, A.H.; CARVALHO, P.D.; CUNHA, A.P.; GIORDANO, J.O.; FRICKE, P.M. Physiological and practical effects of progesterone on reproduction in dairy cattle. **Animal Reproduction Science**, v.8, p.70–81, 2014.

YAMANE, I.; KOKUHO, T.; SHIMURA, K.; ETO, M.; SHIBAHARA, T.; HARITANI, M.; OUCHI, Y.; SVERLOW, K.; CONRAD, P. A. In vitro isolation and characterization of a bovine Neospora species in Japan. **Research in Veterinary Science**, v.63, p.77-80, 1997.

YAN, L.; ROBINSON, R.; SHI, Z.; MANN, G. Efficacy of progesterone supplementation during early pregnancy in cows: A meta-analysis. **Theriogenology**, v. 85, p.1390–8, 2016.



## ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE ZOOTECNIA

COMISSÃO DE ETICA NO USO DE ANIMAIS –  
CEUA/UFRRJ/IZ

### DECLARAÇÃO

Declaro que o projeto intitulado “Avaliação do procedimento de transferência de embriões em bovinos naturalmente infectados com o parasita *Neospora caninum*”, processo nº 23083.034967/2017-74, sob responsabilidade de Dr. Marco Roberto Bourg de Mello está de acordo com as normas do uso de animais em atividades de ensino e pesquisa do CONCEA e foi aprovado na XXI Reunião da CEUA/UFRRJ/IZ em 21/02/2018.

Seropédica, 23 de fevereiro de  
2018

Prof. Rodrigo Vasconcelos de  
Oliveira

Coordenador da CEUA-IZ