LAÍSA GARCIA DA SILVA

**Produção *in vitro* de embriões de novilhas Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade
tratadas ou não com FSH**

São Paulo

2020

LAÍSA GARCIA DA SILVA

Produção in vitro de embriões de novilhas Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade tratadas ou não com FSH

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2020

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

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3894
FMVZ

Silva, Laísa Garcia da
Produção *in vitro* de embriões de novilhas Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade tratadas ou não com FSH / Laísa Garcia da Silva. – 2020.
67 f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. FSH. 2. PIVE. 3. TE. 4. IGF-1. 5. Novilha. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE NOVILHAS DA RAÇA NELORE DE 12 E 24 MESES TRATADAS OU NÃO COM FSH", protocolada sob o CEUA nº 2369060917 (ID 006468), sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli e equipe; Laisa Garcia da Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 17/04/2019.

We certify that the proposal "In vitro embryo production of 12 to 24 months old Nelore (*Bos indicus*) heifers treated or not with FSH", utilizing 60 Bovines (60 females), protocol number CEUA 2369060917 (ID 006468), under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli and team; Laisa Garcia da Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/17/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [09/2018](#) a [10/2018](#)

Área: [Reprodução Animal](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [12 a 24 meses](#)

N: [60](#)

Linhagem: [Nelore](#)

Peso: [150 a 400 kg](#)

Local do experimento: IZ sertãozinho

São Paulo, 06 de setembro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Laísa Garcia

Título: Produção *in vitro* de embriões de novilhas Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade tratadas ou não com FSH

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico

Aos meus pais, Auriolino Mariano e Ozemar Garcia, que sempre foram meus exemplos de perseverança, e que sempre me deram apoio e amor nos momentos em que mais precisei;

E ao meu avô Leondino Mariano (*in memorian*), que de algum lugar está acompanhando e abençoando a minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus**, por ter guiado meus caminhos para que eu chegasse tão longe.

À minha mãe, **Ozemar**, por ser meu alicerce em todos os momentos. Ao meu pai, **Auriolino**, por sempre me apoiar e me inspirar a trabalhar com a pecuária. À minha irmã, **Leticia**, por todo seu amor e paciência comigo a vida toda. Amo vocês incondicionalmente!

À minha tia, **Jô**, que abriu as portas de sua casa pra mim, agradeço o cuidado, proteção e carinho que teve comigo durante toda a vida e, especialmente, durante o meu mestrado. Assim como meu primo **Walmor**.

Aos meus avós, **Leondino** (*in memorian*), dedico as minhas vitórias ao senhor, onde quer que esteja, por ter me inspirado a seguir um caminho que só me traz realizações; **Esmeralda**, por todo seu carinho e cuidado; **Maria**, por me inspirar a ser forte e batalhadora como ela; **Walmor**, por transmitir a sua serenidade e paciência.

Aqui deixo minha gratidão à toda minha **família**, que apesar de imensa cabe toda no meu coração. Obrigada pelo apoio e carinho de sempre (Tia Regina, Tio Wilson, Tio Walmir, Tio Reginaldo, Tio Carlinhos, Tia Fátima e por aí vai...).

Ao **Professor Pietro**, por ter me recebido e me proporcionado tantas oportunidades de trabalho, que me fizeram crescer pessoal e profissionalmente. E por ser nossa inspiração para realizar nossas atividades sempre buscando a excelência.

Às instituições, empresas e seus colaboradores que colocaram todos seus esforços na execução deste projeto, **Naiara Nantes**, **Fábio Monteiro** (**Instituto de Zootecnia de Sertãozinho-SP**), **Bernardo Marcozzi**, **Luciano Mundim** (**Bovigênese**), **Osnir Watanabe**, **Yeda Watanabe**, **Aline Jacob** (**WTA e Vitrogen**), à **NeoGen**, ao pecuarista **Lúcio**; ao **Prof. Guilherme Nogueira** e colaboradores do **Laboratório de Endocrinologia Animal da FMVA - UNESP campus Araçatuba**.

Aos professores **Lílian Rigatto** e **Rafael Bisinotto**, e ao médico veterinário **Rogério Peres**, pelo apoio profissional em minha carreira.

Aos professores **Mayra**, **Marcílio**, **Claudia**, **Camila**, **Ricardo**, **Ed**, **Eneiva Carla**, **André**, **Guilherme**, **Rubens**, **Viviani**, funcionários e alunos do **VRA** de São Paulo e Pirassununga, muito obrigada pela convivência e aprendizado.

À **Harumi**, por toda ajuda e esforços prestados junto ao PPGRA.

Aos meus **amigos**, afinal, o que seriam de nós sem estes irmãos que escolhemos para a vida. Muito obrigada aos amigos que fiz ao longo dessa estrada e que contribuíram para o meu crescimento pessoal, a **Letícia Liberato (Let Cabrita)**, **Priscila Dias (Pri)**, **Laura Madalosso (Laurinha)** e **Bruna Bacco (Bruninha bablopes)**.

Um agradecimento especial aos amigos que a USP me deu: **Flavinha**, **Dami**, **Laís**, **Marcão**, **Walter**, **Romulo**, **Badá**, **Bernardo**, **Mari Ortolan**, **Gaúcho**, **Bruna**, **Pallú**, vocês deixaram a minha vida na salinha e nas fazendas mais leve e divertida, e me ensinaram muito, podem acreditar!!

Aos pietrossauros **Bruna Guerreiro**, **Bruno Karboxy**, **Emiliana**, **Júlia**, **Alex**, **Márcio**, pelas orientações e amizade.

E, por último e não menos importante, aos **profissionais** envolvidos com a **pecuária** nacional (veterinários, gestores, vaqueiros, entre tantos outros colaboradores) que colaboraram com diversas pesquisas, e contribuem com a melhoria da atividade através de seus esforços diários, faça chuva ou faça sol por esse Brasil afora. Esse trabalho foi feito para vocês!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Saiba que são suas decisões, e não suas condições, que determinam seu destino.”

Anthony Robbins

RESUMO

SILVA, L. G. **Produção *in vitro* de embriões de novilhas Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade tratadas ou não com FSH.** 2020. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A utilização de novilhas jovens para a produção *in vitro* de embriões (PIVE) acelera o ganho genético dos rebanhos, diminuindo o intervalo de gerações. Entretanto, doadoras jovens possuem competência oocitária inferior à de doadoras adultas, sendo menos eficientes na PIVE. No presente estudo buscou-se avaliar a eficiência da aspiração folicular (OPU), da PIVE e da prenhez/transferência de embrião (P/TE) de novilhas Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade, tratadas ou não com FSH. Ainda, buscou-se relacionar essas variáveis com a concentração plasmática de IGF1 das doadoras no momento da OPU. Foram utilizadas 46 novilhas de 12 meses e 45 novilhas de 24 meses de idade, submetidas a um delineamento fatorial 2x2 (*cross-over*). Todos os animais receberam protocolo de sincronização no dia 0. As novilhas do grupo FSH receberam duas doses de 30mg de FSH no dia 4 e duas doses de 20mg de FSH no dia 5 em intervalos de 12 horas, totalizando 100mg de FSH. No dia 7, todas as novilhas foram submetidas à OPU. Esse protocolo se repetiu com intervalo de 40 dias, invertendo-se os animais nos grupos de tratamento. Os embriões produzidos foram vitrificados (n=202) e posteriormente transferidos em receptoras sincronizadas. As análises estatísticas foram feitas utilizando o PROC GLIMMIX e PROC CORR (SAS®). Não foi observada interação Idade×FSH para as variáveis estudadas. As novilhas de 24 meses (N-24) tiveram maior número de oócitos recuperados (N-12= 16,6±1,2; N-24= 20,8±1,5; P=0,02), número de oócitos viáveis (N-12= 12,5±1,0; N-24= 15,4±1,1; P=0,06), número de clivados (N-12= 9,2±0,7; N-24= 12,0±1,0; P=0,02), número de embriões produzidos/OPU (N-12= 3,4±0,4; N-24= 6,4±0,7; P=0,0004) e taxa de blastocisto (N-12= 20,9%; N-24= 29,9%; P=0,02) quando comparadas às novilhas de 12 meses (N-12). O tratamento com FSH (NFSH) aumentou a quantidade de folículos médios (NC= 1,1±0,2; NFSH= 15,7±1,7; P<0,0001) e grandes (NC= 0,2±0,1; NFSH= 4,2±0,6; P<0,0001) e a taxa de oócitos viáveis (NC= 72,7%; NFSH= 78,8%; P=0,02), porém diminuiu a quantidade de oócitos recuperados (NC= 21,2±1,5; NFSH= 16,2±1,1; P=0,01) e a taxa de recuperação (NC= 92,9%; NFSH= 51,8%; P<0,0001) em relação às novilhas do grupo controle (NC). Não se verificou efeito de tratamento

com FSH sobre número e taxa de blastocistos. Não houve efeito de categoria e FSH na P/TE. A concentração plasmática de IGF1 foi maior para novilhas de 24 meses (N-12= 224,2ng/ml; N-24= 358,3ng/ml; $P<0,0001$), porém, não foi influenciada pelo tratamento com FSH. Houve correlação positiva entre IGF1 e taxa de oócitos viáveis ($r=0,0678$; $P=0,05$). Observou-se interação Idade $\times$ IGF1 ($P=0,0004$) para P/TE, em que apenas os embriões de novilhas de 24 meses apresentaram aumento na P/TE conforme o aumento da IGF1. Os resultados do presente estudo permitem concluir que novilhas de 24 meses são mais eficientes na PIVE que novilhas de 12 meses de idade, e a P/TE de novilhas de 24 meses aumenta conforme a elevação das concentrações circulantes de IGF1 da doadora. Ainda, o tratamento com FSH melhora a taxa de oócitos viáveis em novilhas Nelore, porém não tem efeitos sobre a PIVE e a P/TE.

Palavras-chave: FSH, PIVE, TE, IGF1, Novilha.

ABSTRACT

SILVA, L. G. *In vitro* embryo production of 12- and 24-month-old Nellore heifers (*B. indicus*) treated or not with FSH. 2020. 67p. Dissertation (Master of Science) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The use of young heifers for in vitro embryo production (IVEP) accelerates genetic gain of herds, reducing the generation interval. However, young donors have lower oocyte competence than adult donors, being less efficient in IVEP. The present study aimed to evaluate the efficiency of follicular aspiration (OPU), IVEP and pregnancy / embryo transfer (P / ET) of 12- and 24-month-old Nellore heifers (*Bos indicus*), treated or not with FSH. Furthermore, it was aimed to relate these variables to donor's plasma IGF1 concentration at the time of OPU. For this experiment, 46 12-month and 45 24-month-old heifers were submitted to a 2x2 factorial arrangement design (cross-over). All animals received a synchronization protocol on day 0. Heifers from FSH group received two doses of 30mg of FSH on day 4 and two doses of 20mg of FSH on day 5 within 12-hour intervals, totalizing 100mg of FSH. On day 7, all heifers were submitted to OPU. After a 40-day interval the described protocol was repeated, switching animals of treatment groups. The produced embryos were vitrified (n= 202) and later transferred to synchronized recipients. Statistical analyzes were performed using PROC GLIMMIX and PROC CORR (SAS®). No Age $\times$ FSH interactions were observed for the studied variables. 24-month-old heifers (H-24) had higher number of recovered oocytes (H-12= 16.6 ± 1.2 ; H-24= 20.8 ± 1.5 ; P= 0.02), number of viable oocytes (H-12= 12.5 ± 1.0 ; H-24= 15.4 ± 1.1 ; P= 0.06), number of cleaved embryos (H-12= 9.2 ± 0.7 ; H-24= 12.0 ± 1.0 ; P= 0.02), number of produced embryos / OPU (H-12= 3.4 ± 0.4 ; H-24= 6.4 ± 0.7 ; P= 0.0004) and blastocyst rate (H-12= 20.9%; H-24= 29.9%; P= 0.02) when compared to 12-month-old heifers (H-12). Treatment with FSH (HFSH) increased the number of medium (HC= 1.1 ± 0.2 ; HFSH= 15.7 ± 1.7 ; P<0.0001) and large follicles (HC= 0.2 ± 0.1 ; HFSH= 4.2 ± 0.6 ; P<0.0001) and the viable oocytes rate (HC= 72.7%; HFSH= 78.8%; P= 0.02), but decreased the number of recovered oocytes (HC= 21.2 ± 1.5 ; HFSH= 16.2 ± 1.1 ; P= 0.01) and recovery rate (HC= 92.9%; HFSH= 51.8% ; P<0.0001) when compared to heifers from control group (HC). There was no effect of FSH treatment on blastocysts number and rate. There was no effect of age or FSH on P / ET. Plasma IGF1 concentration was higher for 24-month-old heifers (H-12=

224.2ng/ml; H-24= 358.3ng/ml; $P<0.0001$), however, was not influenced by treatment with FSH. There was a positive correlation between IGF1 and viable oocytes rate ($r= 0.0678$; $P= 0.05$). Age $\times$ IGF1 ($P= 0.0004$) interaction was observed for P / ET, in which P / ET of embryos from 24-month-old heifers was raised as the IGF1 concentration increased. The results of the present study allow us to conclude that 24-month-old heifers are more efficient in IVEP than 12-month-old heifers, and P / ET of 24-month-old heifers is enhanced as the donor's circulating IGF1 concentrations increases. In addition, treatment with FSH improves viable oocytes rate in Nellore heifers, but has no effect on IVEP and P / TE.

Keywords: FSH, IVEP, ET, IGF1, Heifer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Modelo hipotético do estudo em relação a OPU, PIVE, TE e IGF1 de novilhas de 12 e 24 meses tratadas ou não com FSH.....	28
Figura 2 -	Desenho esquemático do delineamento experimental em <i>cross-over</i> , no qual novilhas de 12 e 24 meses são sincronizadas e aspiradas por duas vezes num intervalo de 40 dias, sendo tratadas ou não com FSH.....	31
Figura 3 -	Desenho experimental do protocolo dos diferentes grupos experimentais.....	31
Figura 3 -	Desenho experimental do protocolo de sincronização das receptoras para a transferência de embriões.....	36

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Proporção (%) de folículos pequenos, médios e grandes de acordo com o tratamento (controle vs. FSH).....	39
Gráfico 2 - Relação do número total de folículos aspirados (n, eixo y) com a concentração plasmática de IGF1 (ng/ml, eixo x) no momento da OPU em (A) novilhas da raça Nelore (Bos indicus) de 12 e 24 meses de idade (n=90); (B) somente em novilhas de 12 meses (n=46), e (C) somente em novilhas de 24 meses de idade (n=44)....	47
Gráfico 3 - Relação do número blastocistos produzidos por OPU (n, eixo y) com a concentração plasmática de IGF1 (ng/ml, eixo x) em (A) novilhas da raça Nelore (Bos indicus) de 12 e 24 meses de idade (n=90); (B) somente novilhas de 12 meses (n=46), e (C) somente em novilhas de 24 meses de idade (n=44).....	48
Gráfico 4 - Relação da taxa de blastocisto (n, eixo y) com a concentração plasmática de IGF1 (ng/ml, eixo x) em (A) novilhas da raça Nelore (Bos indicus) de 12 e 24 meses de idade (n=90); (B) somente em novilhas de 12 meses (n=46), e (C) somente em novilhas de 24 meses de idade (n=44).....	49
Gráfico 5 - Relação do número de oócitos viáveis recuperados por OPU (n, eixo y) com a concentração plasmática de IGF1 (ng/ml, eixo x) em (A) novilhas da raça Nelore (Bos indicus) de 12 e 24 meses de idade (n=90); (B) somente em novilhas de 12 meses (n=46), e (C) somente em novilhas de 24 meses de idade (n=44).....	50
Gráfico 6 - Relação da taxa de oócitos viáveis (n, eixo y) recuperados por OPU com a concentração plasmática de IGF1 (ng/ml, eixo x) em (A) novilhas da raça Nelore (Bos indicus) de 12 e 24 meses de idade (n=90); (B) somente em novilhas de 12 meses (n=46), e (C) somente em novilhas de 24 meses de idade (n=44).....	51

Gráfico 7 - Relação do número de prenhez/transferência de embrião (n, eixo y) com a concentração plasmática de IGF1 (ng/ml, eixo x) da doadora [novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) com 12 meses (n=46) e 24 meses de idade (n=44)] no momento da OPU..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de folículos pequenos (FP), médios (FM) e grandes (FG) em novilhas de 12 e 24 meses de idade da raça Nelore (Bos indicus) tratadas ou não com FSH. Dados apresentados por média $\pm$ erro padrão da média.....	38
Tabela 2 -	Número de folículos aspirados, oócitos recuperados e embriões produzidos por OPU em novilhas de 12 e 24 meses de idade da raça Nelore (Bos indicus) tratadas ou não com FSH. Dados apresentados por média $\pm$ erro padrão da média ou em porcentagem.....	40
Tabela 3 -	Número de prenhez/transferência de embrião (P/TE) aos 30 e 60 dias de gestação e perda gestacional (entre 30 e 60 dias) de embriões produzidos in vitro de novilhas Nelore de 12 e 24 meses tratadas ou não com FSH antes da OPU. Dados apresentados em porcentagem.....	45
Tabela 4 -	Concentração plasmática de IGF1 em novilhas de 12 e 24 meses da raça Nelore (Bos indicus) tratadas ou não com FSH. Dados apresentados por média $\pm$ erro padrão da média.....	46

SUMÁRIO

1 -	INTRODUÇÃO.....	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	QUALIDADE OOCITÁRIA E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM FÊMEAS JOVENS.....	21
2.2	UTILIZAÇÃO DO FSH EM PROTOCOLOS PARA OPU.....	24
2.3	RELAÇÃO DE IGF1 COM A PIVE E A TE.....	26
3	HIPÓTESES.....	27
4	OBJETIVOS.....	29
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	30
5.1	LOCAL DO EXPERIMENTO E PERÍODO DE EXECUÇÃO.....	30
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	30
5.3	COLETA DE SANGUE E ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE IGF1.....	32
5.4	ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRAFIA (OPU).....	32
5.5	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	34
5.5.1	Maturação <i>in vitro</i>	34
5.5.2	Fecundação <i>in vitro</i>	34
5.5.3	Cultivo <i>in vitro</i>	35
5.5.4	<i>Feeding</i> e avaliação da taxa de desenvolvimento embrionário.....	35
5.6	MANEJO REPRODUTIVO DAS RECEPTORAS.....	35
5.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	36
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
6.1	OPU-PIVE.....	38
6.2	TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES PRODUZIDOS.....	44
6.3	RELAÇÃO ENTRE IGF1 E A QUALIDADE OOCITÁRIA, PRODUÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.....	46
7	CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

A produtividade e a rentabilidade da pecuária de corte e de leite estão altamente correlacionadas com a seleção genética e eficiência reprodutiva. Com o advento da avaliação genômica é possível identificar precocemente indivíduos de maior potencial genético e produtivo (HEYES et al., 2009). Tecnologias reprodutivas, tais como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), têm sido aplicadas mundialmente para acelerar o ganho genético dos rebanhos de corte e de leite. Atualmente, a PIVE representa 92,1% dos embriões produzidos no Brasil, e 66% dos embriões produzidos no mundo (VIANA et al., 2018), demonstrando a importância dessa biotecnologia da reprodução para a atividade pecuária.

Atualmente, existe tecnologia para antecipar a idade à primeira concepção de fêmeas zebuínas submetidas à programas reprodutivos que utilizam a IATF (FREITAS, 2015). Todavia, com a utilização da PIVE é possível multiplicar fêmeas jovens pré-púberes geneticamente superiores, e que ainda não se tornaram gestantes, reduzindo o intervalo entre gerações e acelerando o ganho genético (KATHIR et al., 1996; ARMSTRONG et al., 1997; PRESICCE et al., 1997; MAJERUS et al., 1999; LANDRY et al., 2016).

Estudos realizados com bezerras utilizavam a técnica de aspiração por laparoscopia (LOPU; ARMSTRONG et al., 1992; BATISTA et al., 2016; BALDASSARE et al., 2018), que requer os cuidados de um procedimento cirúrgico. Posteriormente, foram realizadas pesquisas com a técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (OPU; BROGLIATTI; ADAMS, 1996; MAJERUS et al., 1999). Mais recentemente, foi desenvolvida guia específica de tamanho adequado para fêmeas jovens com o intuito de melhorar a eficiência da PIVE nessa categoria (ELLIFF et al., 2019).

Estudos evidenciaram que fêmeas jovens apresentam maior número de folículos nos ovários em comparação com fêmeas adultas (ERICKSON et al., 1966; DESJARDINS; HAFS 1969), o que pode favorecer os resultados com a PIVE nessa categoria. Entretanto, a qualidade oocitária inferior à de animais adultos é um obstáculo que pode comprometer a eficiência dessa biotecnologia em animais jovens (MAJERUS et al., 1999).

A competência oocitária pode ser influenciada pelo tratamento hormonal (PRESICCE et al., 1997), idade (MAJERUS et al., 1999; BATISTA et al., 2016), tamanho do folículo (LONERGAN et al., 1994; KAUFFOLD et al., 2005) e status reprodutivo (BARUSELLI et al., 2016; GUERREIRO, 2015; BAYEUX, 2017).

Com o objetivo de melhorar a qualidade dos oócitos recuperados na OPU, o tratamento hormonal com hormônio folículo-estimulante (FSH; PRESICCE et al., 1997;

VIEIRA et al., 2014; VIEIRA et al., 2016; BATISTA et al., 2016; ZACARIAS et al., 2018), FSH associado ao hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH) ou ao hormônio luteinizante (LH; FRY et al., 1998; MACLELLAN et al., 1996; BLONDIN et al., 2002) e somatotropina recombinante bovina (rBST; OROPEZA et al., 2004; ELLIFF et al., 2019) foram estudados em doadoras de embrião. O FSH é utilizado em protocolos para OPU com finalidade de aumentar o tamanho dos folículos aspirados, que segundo KAUFFOLD et al. (2005), é desejável para melhorar a competência oocitária.

A relação com parâmetros metabólicos, como a Insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF1), é importante para a compreensão dos fatores que interferem na eficiência da produção de embriões nas diferentes categorias. Estes hormônios têm função ovariana e contribuem para a proliferação celular, melhorando a qualidade oocitária e o desenvolvimento embrionário (HERRLER et al., 1998; MOREIRA et al., 2000).

Desta forma, torna-se necessário estudar a relação dos parâmetros metabólicos, qualidade oocitária e produção de embriões de fêmeas jovens. Ainda, é importante avaliar o efeito do tratamento com FSH como estratégia para melhorar a eficiência da técnica de OPU-PIVE em animais jovens.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUALIDADE OOCITÁRIA E PRODUÇÃO DE EMBRIÕES EM FÊMEAS JOVENS

Para atingir maior potencial produtivo dos rebanhos de corte é interessante o emprego do melhoramento genético dos animais jovens bem como as tecnologias para selecionar indivíduos com mérito genético superior e multiplicá-los em um curto espaço de tempo. Isto é possível com a tecnologia da OPU/PIVE de animais jovens associada à genômica, que prediz valores genéticos com alta precisão utilizando marcadores (GODDARD; HAYES, 2007). Com a utilização de animais jovens para PIVE o intervalo entre gerações é reduzido, acelerando o ganho genético do rebanho (MAJERUS et al., 1999).

Fêmeas bovinas apresentam a máxima população de folículos antrais aos 4 meses (RAWLINGS et al., 2003), apresentam declínio até os 8 meses de idade (ERICKSON et al., 1966), se mantendo constante durante a vida adulta e diminuindo até a senescência (DESJARDINS; HAFS, 1969). Além de maior população de folículos antrais, foi verificado que a concentração sanguínea do hormônio Anti-Mulleriano (AMH), que é um marcador endócrino para população folicular, é mais elevado em bezerras quando comparado a animais adultos (BARUSELLI et al., 2015).

Fêmeas jovens de 9 meses de idade apresentam maior número de oócitos obtidos por meio da OPU quando comparadas a novilhas púberes de 18 meses (LANDRY et al., 2016), o que contribui para o sucesso da utilização da técnica de PIVE. Ainda, estudos evidenciaram que a contagem de folículos antrais está correlacionada com a produção de embriões *in vivo* (IRELAND et al., 2008) e *in vitro* (SANTOS et al., 2016).

Entretanto, fêmeas jovens não apresentam resultados consistentes na PIVE devido à baixa competência de desenvolvimento do oócito, produzindo menor quantidade de embriões por OPU quando comparado a animais adultos (ARMSTRONG et al., 1997; MAJERUS et al., 1999; BARUSELLI et al., 2016; LANDRY et al., 2016). A raça Nelore (*Bos indicus*) é conhecida por possuir maior população folicular (BATISTA et al., 2014), e também por apresentar maior eficiência na produção de embriões que raças taurinas (PONTES et al., 2011; GIMENES et al., 2015; WATANABE et al., 2017). Todavia, novilhas de 8 a 12 meses desta raça também apresentam menor eficiência na PIVE que animais adultos (BATISTA et al., 2016, dados não publicados, citado por BARUSELLI et al., 2016).

A competência oocitária é adquirida quando há diminuição das atividades transcricionais (FAIR et al., 1995), durante a fase de crescimento e maturação do oócito (BLONDIN et al., 2012). A aquisição da competência do oócito depende de vários fatores, dentre eles o diâmetro folicular representa papel fundamental (LONERGAN et al., 1994; BLONDIN; SIRARD, 1995; SENEDA et al., 2001; KAUFFOLD et al., 2005). A presença de genes relacionados à competência oocitária aumenta conforme o diâmetro folicular, tanto no oócito como nas células do *cumulus* (CAIXETA et al., 2009).

Animais pré-púberes têm ondas de crescimento folicular mais curtas (EVANS et al., 1994), e possuem grande quantidade de folículos pequenos (menores que 3 mm; ERICKSON et al., 1966). Folículos pequenos, em sua maioria, contem oócitos de baixa qualidade, que por sua vez não chegam ao estágio de mórula quando produzidos por fecundação *in vitro* (BLONDIN; SIRARD, 1995). Além disso, o fluido folicular de animais jovens possui menor quantidade de gotas lipídicas e menor concentração de glicose e ácidos graxos (WARZYCH et al., 2017), não atendendo à demanda energética do oócito.

Os oócitos de animais pré-púberes são menores (GANDOLFI et al., 1998), e sua composição ooplásmica (WARZYCH et al., 2017; MORIN-DORÉ et al., 2017), síntese proteica e metabolismo são distintos de animais adultos (KHATIR et al., 1997; STEEVES; GARDNER, 1999; de PAZ et al., 2000), o que sugere que a composição do oócito interfere na sua capacitação. A baixa competência oocitária de animais pré-púberes também se deve à menor expressão de transportadores de glicose e à insuficiente translação de proteínas, que compromete o posterior desenvolvimento embrionário (OROPEZA et al., 2004). Ainda, importantes componentes ooplásmicos associados às fases de fecundação e clivagem estão comprometidos nesta categoria (DAMIANI et al., 1996; SALAMONE et al., 2001). Corroborando com essas informações, estudos demonstraram que a atividade de quinases associadas à fase de início e conclusão da meiose são mais baixas em animais de 160 a 240 dias de idade (DAMIANI et al., 1996).

Estudos evidenciaram que a cinética de desenvolvimento de embriões derivados de bezerras é diferente daquela de vacas (MAJERUS et al., 2000). Verificou-se que muitas vezes ocorre interrupção do desenvolvimento de embriões de animais jovens antes do estágio de 8 células. Ainda, evidenciou-se maior duração da fase *lag* antes do início da expressão gênica. Essas alterações no desenvolvimento embrionário se devem à imaturidade da regulação do crescimento folicular antes dos animais atingirem a puberdade. Apesar dessas diferenças, a

qualidade dos embriões que se desenvolveram (número total de células e conteúdo celular) são similares entre animais jovens e adultos (MAJERUS et al., 2000).

Entretanto, foi verificado que a viabilidade dos embriões produzidos por animais pré-púberes é menor após transferência. Alguns trabalhos evidenciaram reduzidas taxas de prenhez para essa categoria em comparação a animais adultos (REVEL et al., 1995; GUERREIRO, 2015). Ainda, foi observada maior perda embrionária após transferência de embriões de bezerras do que quando comparado à embriões de vacas (REVEL et al., 1995).

Frente ao desafio da menor competência oocitária de animais jovens, o presente estudo buscou verificar mais fatores que podem estar envolvidos com a baixa produção de embriões desta categoria.

2.2 UTILIZAÇÃO DO FSH EM PROTOCOLOS PARA OPU

Em busca da melhoria dos índices na PIVE, diversos estudos testaram o tratamento com FSH previamente à OPU (GOODHAND et al., 1999; BLONDIN et al., 2002; SENDAG et al., 2008; VIEIRA et al., 2014). O FSH estimula a proliferação e diferenciação das células da granulosa, fazendo com que os folículos produzam andrógenos (MATSUDA et al., 2012). Além disso, o FSH regula a translação de mRNA materno acumulado no oócito durante a fase de maturação, o que está associado ao aumento nas taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário (FRANCIOSI et al., 2015).

O FSH estimula o crescimento folicular, aumentando a proporção de folículos médios e grandes (CARVALHO et al., 2019). Segundo diversos trabalhos, a qualidade oocitária está diretamente correlacionada com o diâmetro folicular (KAUFFOLD et al., 2005), o que foi comprovado em estudos com tratamento estimulatório com FSH (LONERGAN et al., 1994). O tratamento aumentou o número de oócitos viáveis e o número de embriões produzidos em vacas (NIVET et al., 2012; VIEIRA et al., 2014). Vários trabalhos têm utilizado o FSH também em protocolos de estimulação ovariana em animais jovens (ARMSTRONG et al., 1992; PRESICCE et al., 1997; BLONDIN et al., 2002; BATISTA et al., 2016; MACLELLAN et al., 1997; FRY et al., 1998; ZACARIAS et al., 2018) para melhorar a eficiência da produção de embriões desta categoria, que é conhecida por possuir inferior qualidade oocitária. O tratamento com FSH em bezerras eleva a quantidade de folículos visíveis no ovário (KAWAMOTO et al., 2017; BATISTA et al., 2016), e a qualidade dos oócitos recuperados (KAWAMOTO et al., 2017). Todavia, bezerras tratadas com FSH não melhoraram a produção de embriões (BATISTA et al., 2016; ZACARIAS et al., 2018).

Entretanto, segundo BLONDIN et al. (1996), apesar do tratamento com FSH aumentar o diâmetro folicular e diminuir a atresia, não é o suficiente para garantir a melhoria da qualidade oocitária. A indução de um ambiente pré-ovulatório *in vivo* é necessária para estimular o complexo *cumulus oophorus* (CCO) a completar a maturação citoplasmática (BLONDIN et al., 2002). Nesse período, o LH estimula a expressão de fatores de crescimento que auxiliam na retomada da meiose e na expansão das células do cumulus (ASHKENAZI et al., 2005; SHIMADA et al., 2006).

A pré-maturação oocitária pode ser induzida por meio de um período de carência de FSH (NIVET et al., 2012). Esse período denominado *coasting* (intervalo entre a última aplicação do hormônio superestimulatório e a OPU) seria o período de ausência de

suplementação gonadotrófica em presença de LH endógeno (GINTHER et al., 1998), que é necessário para mimetizar o momento de aquisição de competência oocitária em folículos dominantes em bovinos (SIRARD, 2011).

Diversos estudos usaram períodos de *coasting* diferentes. No estudo de NIVET et al., (2012), o período de *coasting* de 44 horas foi favorável para a obtenção de melhores índices na produção de embriões de vacas em comparação com 20, 68 e 92 horas. Já outros trabalhos utilizaram *coasting* de 20-24 horas em bezerras (KAWAMOTO et al., 2017) e 40 horas em vacas (BLONDIN et al., 1997).

Já outros estudos investigaram a indução de um ambiente pré-ovulatório *in vivo* para melhorar a qualidade oocitária, administrando uma aplicação de LH após um período de *coasting* de 48 horas em um protocolo de estimulação longa com FSH (BLONDIN et al., 2002). Uma alternativa para garantir sinalização de LH, que, segundo LANDRY et al. (2018), é necessária para a viabilidade do folículo, seria associar ao tratamento de FSH uma dose de GnRH previamente à OPU (FRY et al., 1998; MACLELLAN et al., 1997). Contudo, a utilização de GnRH neste protocolo não melhorou a produção de embriões de bezerras (FRY et al., 1998).

Com base na literatura, torna-se relevante investigar a eficiência de animais jovens na OPU/PIVE, e estabelecer estratégias para melhorar a utilização desta técnica e possibilitar a aceleração do ganho genético dos rebanhos de corte.

2.3 RELAÇÃO DE IGF1 COM A PIVE E A TE

Além dos conhecidos efeitos metabólicos do IGF1, esse fator de crescimento tem efeitos diretos sobre a função ovariana em bovinos, regulando a esteroidogênese e apoptose das células da granulosa durante o desenvolvimento folicular (SPICER et al., 1988; MANI et al., 2010). Esse hormônio promove a melhoria da qualidade oocitária e do desenvolvimento embrionário (MOREIRA et al., 2000), diminuindo a apoptose e aumentando a proliferação celular (HERRLER et al., 1998). A concentração sanguínea de IGF1 pode ser influenciada pelo condições de manejo nutricional (BREIER et al., 1986; MCGUIRE et al., 1992).

A concentração circulante de IGF1 pode ser aumentada após aplicação de rBST (BURATINI et al., 2000; COOKE et al., 2013), o que eleva a quantidade de folículos (BURATINI et al., 2000). O aumento da concentração de IGF1 foi associado com a antecipação da puberdade em novilhas *Bos taurus* tratadas por 14 semanas com rBST (dos 7 aos 13 meses de idade; COOKE et al., 2013), independentemente de taxa de crescimento, da dieta nutricional, do teor de gordura corporal e dos níveis circulantes de leptina. O IGF1 tem influência sobre a secreção de GnRH (D'OCCHIO et al., 2018), que está ligado ao evento da puberdade.

A concentração intra-folicular de IGF1 é alterada de acordo com o diâmetro do folículo. Segundo WALTERS et al. (2006), o efeito estimulatório de IGF1 na proliferação folicular, diferenciação e qualidade oocitária são dose e estágio dependentes, quando adicionado ao meio de cultura *in vitro*. Em mulheres que recebem estimulação com FSH (NARDO et al., 2001), a concentração de IGF1 intrafolicular é aumentada (FRIED et al., 1998), melhorando a qualidade oocitária.

Diversos estudos analisaram o efeito da utilização deste hormônio no meio de cultura *in vitro* ou *in vivo*. Quando o IGF1 foi administrado intraovariano, não se obteve melhora da competência oocitária (OROPEZA et al., 2004). Também, não se observou nenhum efeito da adição de IGF1 no meio de cultura sobre o desenvolvimento embrionário (BLOCK et al., 2008). No entanto, estudos demonstram o efeito positivo do aumento de IGF1 na qualidade oocitária (VELAZQUEZ et al., 2005), no número de embriões produzidos *in vivo* (HERRLER et al., 1994), e na sobrevivência do embrião após a TE (BLOCK et al., 2003).

3 HIPÓTESES

A PIVE de doadoras da raça Nelore (*Bos indicus*) de 24 meses de idade apresenta maior eficiência que a PIVE de doadoras Nelore de 12 meses. Ainda, o tratamento com FSH aumenta a eficiência da PIVE, principalmente em novilhas de 12 meses de idade.

A prenhez por transferência de embrião (P/TE) de novilhas de 12 meses é inferior quando comparado à P/TE de novilhas de 24 meses de idade. Além disso, embriões produzidos de doadoras tratadas com FSH apresentam maior P/TE, principalmente os embriões de doadoras de 12 meses de idade.

A concentração plasmática de IGF1 tem relação com a qualidade oocitária e a PIVE, sendo superior para novilhas de 24 meses de idade.

Figura 1 - Modelo hipotético do estudo em relação a OPU, PIVE, TE e IGF1 de novilhas de 12 e 24 meses tratadas ou não com FSH.

4 OBJETIVOS

No presente estudo, os objetivos foram avaliar em doadoras da raça Nelore (*Bos indicus*):

- A PIVE de novilhas de 12 e 24 meses de idade;
- A eficiência do tratamento prévio à OPU com FSH na PIVE;
- O número de receptoras P/TE conforme os tratamentos;
- A relação entre a concentração plasmática de IGF1 e a qualidade oocitária, a produção de embriões e a P/TE.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado conforme os princípios éticos de experimentação animal estabelecidos pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – FMVZ –USP (protocolo número 2369060917).

5.1 LOCAL DO EXPERIMENTO E PERÍODO DE EXECUÇÃO

O experimento foi realizado no Instituto de Zootecnia de Sertãozinho - SP, entre os meses de setembro e outubro do ano de 2018. Todos os animais foram mantidos em um mesmo lote, com acesso à água *ad libitum* e pasto de *Brachiaria brizantha*.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Um total de 46 novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) foram utilizadas no experimento. Vinte e quatro novilhas de 12 meses, que apresentavam peso de $219,2 \pm 4,7$ kg [média $\pm$ EPM (erro padrão da média)] e ECC= $3,8 \pm 0,1$ [média $\pm$ EPM (erro padrão da média)] (escala 1-9, WHITMAN, 1975), e 22 novilhas de 24 meses, que apresentavam peso de $338,0 \pm 5,0$ kg e ECC= $4,7 \pm 0,1$, foram submetidas a um delineamento *cross-over*, recebendo um protocolo de sincronização para o procedimento de OPU por duas vezes, com intervalo de 40 dias (Figura 2).

Para a execução dos procedimentos, as novilhas foram conduzidas ao curral de manejo, permanecendo em um curral de descanso quando não eram manejadas. Para a sincronização e OPU, elas eram mantidas em tronco de contenção individualmente até o término do procedimento.

As novilhas foram submetidas a um delineamento *cross-over*, no qual cada categoria de idade (12 e 24 meses) foi dividida em dois grupos experimentais (controle e FSH), e receberam protocolo de sincronização prévio à OPU (Figura 2).

Figura 2 - Desenho esquemático do delineamento experimental em *cross-over*, no qual novilhas de 12 e 24 meses são sincronizadas e aspiradas por duas vezes num intervalo de 40 dias, sendo tratadas ou não com FSH.

Para a sincronização, no dia 0, todas as novilhas receberam 1 mg de benzoato de estradiol (BE; RIC BE®, Agener União, São Paulo), 0,54mg de cloprostenol sódico (PGF; Estron®, Agener União, São Paulo) e um dispositivo intravaginal contendo 0,36g de progesterona (P4; Primer PR®, Agener União, São Paulo), que foi retirado no momento da OPU, permanecendo por 7 dias (Figura 3). Na primeira réplica, os animais do grupo FSH-Controle receberam 100mg de FSH, que foi administrado em 4 doses decrescentes (Dia 4: duas aplicações de 30mg em intervalo de 12 horas; Dia 5: duas aplicações de 20mg em intervalo de 12 horas) enquanto os animais do grupo Controle-FSH não recebiam nenhum tratamento neste momento. O período de *coasting* (tempo entre a última aplicação de FSH e a OPU) adotado foi de 44 horas (40 a 48 horas; BLONDIN et al., 2002). Para a segunda réplica, as novilhas do grupo FSH-Controle receberam, além da sincronização, o tratamento com FSH da forma descrita acima, e as novilhas do grupo FSH-Controle receberam apenas a sincronização prévia à OPU.

Figura 3 - Desenho experimental do protocolo dos diferentes grupos experimentais.

5.3 COLETA DE SANGUE E ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO DE IGF1

Em todas as réplicas, os animais entravam de forma aleatória no tronco de contenção para a realização dos procedimentos. Imediatamente antes da OPU, foi colhida amostra de sangue de todas as novilhas. A coleta foi realizada com tubo à vácuo com ativador de coagulação (Vacutainer®, Becton-Dickinson e Company, EUA) acoplado à agulha 21G (Terumo®, Bélgica) e canhão. As amostras de sangue foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm (1700 g; centrífuga KASVI, São Paulo, SP). O plasma foi separado e acondicionado em tubos esterilizados (Tubos Eppendorf 3810X standard®, Eppendorf, Alemanha) com identificação e, em seguida, armazenados em freezer a -21°C até posterior análise da concentração de IGF1.

As amostras de plasma foram analisadas no Laboratório de Endocrinologia Animal da FMVA -UNESP (Araçatuba-SP). A dosagem de IGF1 foi realizada por teste de ELISA *in house*. O coeficiente de variação inter-ensaio foi de 15,1% e 22,9%, e o intra-ensaio foi de 8,8% e 10,9%, para alto e baixo controle.

5.4 ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRAFIA (OPU)

Para a sessão de OPU, as novilhas foram contidas individualmente em um tronco, onde recebiam anestesia epidural (1,5ml de lidocaína, Lidovet®, Bravet), realizada no espaço sacrococcígeo (entre a última vértebra sacral e primeira coccígea). Após insensibilização da região caudal, foi feita remoção manual das fezes da ampola retal e higienização mecânica da vulva e região perineal.

Posteriormente, uma guia de aspiração folicular de tamanho adequado à novilhas (Guia de aspiração folicular, WTA, Cravinhos) com probe micro convexa (6,5MHz, EC9-5, Sonoscape – S8, China) foi introduzida até o fundo de saco vaginal. Foi feito o escaneamento dos ovários antes de iniciar a OPU, para verificar a presença de corpo lúteo (CL). Durante a sessão de OPU, foi feita a contagem dos folículos à medida que eram puncionados. Os folículos também eram classificados de acordo com o diâmetro [pequenos (<5mm); médios (5-8mm); grandes (>8mm)].

Todas as sessões de OPU foram realizadas sempre pelo mesmo médico veterinário. Utilizou-se um sistema com agulha descartável (21 G; 0.9 x 50 mm; WTA, Cravinhos), acoplado à linha de aspiração de Teflon (1,7mm x 110cm, WTA, Cravinhos). O sistema era conectado à

uma bomba de vácuo, para gerar uma pressão negativa entre 12 a 15 mL por minuto (85-90 mmHg), com aquecedor de tubo de 50 mL (WTA, Cravinhos).

Todos os folículos visíveis (≥ 2 mm) foram aspirados, e o fluido folicular contendo os oócitos era depositado durante a OPU em tubo cônico de 50 mL contendo 15 mL de PBS (DPBS®; Nutricell Nutrientes Celulares) e heparina sódica (5000UI/L (Parinex®, Hypolabor) mantido a 37°C. O material coletado era conduzido ao laboratório da fazenda, onde o conteúdo aspirado foi vertido em filtro coletor para FIV com malha de 75 μ m (WTA, Cravinhos) e lavado com PBS, até a obtenção de um líquido translúcido, com o sedimento contendo os oócitos recuperados. Em seguida, o conteúdo do filtro foi vertido em placas de cultivo celular de 60 mm contendo PBS acrescido de heparina a 37°C para a realização da procura, lavagem, classificação e seleção dos CCOs com auxílio de estereomicroscopia (OPTIKA) com aumento de 8-20X.

A classificação dos CCOs em viáveis ou inviáveis foi feita pela avaliação morfológica de características citoplasmáticas do oócito e o número de camadas de células do cumulus. Os CCOs considerados viáveis para PIVE eram compactos com mais de três camadas de células do cumulus e oócitos com citoplasma homogêneo (Grau I), CCOs compactos com três camadas ou menos de células do cumulus e oócitos com citoplasma levemente heterogêneo (Grau II), e CCOs parcialmente desnudos e oócitos com citoplasma heterogêneo (Grau III). Oócitos desnudos ou degenerados, oócitos desprovidos de células do cumulus na maior parte da superfície da zona pelúcida ou com citoplasma retraído e vacuolizado, e CCOs com células do cumulus expandidas foram considerados inviáveis para a PIVE (WRIGHT, 1998).

Após classificação, os CCOs foram lavados em solução de TCM 199 (Gibco) suplementada com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco) e em meio de maturação (TCM 199, suplementado com 10% de SFB, 5 μ g/ml FSH, 50 μ g/ml LH e 01 μ g/ml de estradiol). Em seguida foram transportados para um microtubo (WTA) com meio de maturação (MIV) sob óleo mineral (500 μ l MIV + 400 μ l de óleo). Os microtubos foram levados em transportadora de oócitos (Labimix®, WTA) com temperatura de 38,5°C e atmosfera gasosa controlada (6% CO₂ + 5% O₂ + 89% N₂), sendo realizada a maturação durante o transporte com uma pressão hidrostática controlada de 15mmHg.

5.5 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

5.5.1 Maturação *in vitro*

Na chegada ao laboratório, os CCOs foram transferidos dos microtubos para gotas (respeitando a relação de no máximo 20 CCOs por gota), contendo 100 µL de TCM 199 (Gibco, Invitrogen Co.) suplementados com 10% de SFB, 25 mg/mL de bicarbonato de sódio, 22mg/mL de piruvato de sódio, 50 mg/mL de amicacina, 0,5mg/mL de FSH (Pluset®, Hertape Calier, Brasil) e 100UI/mL de hCG (Vetecor®, Hertape Calier, Brasil), que ficavam sob óleo mineral estéril (D'Altomare, São Paulo, SP, Brasil) e incubados a 5% de CO₂, a 38,8° C e alta umidade por 22 e 24 h.

5.5.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

Os CCOs foram lavados e submetidos à fecundação *in vitro* em gotas de 90mL de meio de fecundação *in vitro* sob óleo mineral. Ocorreu fecundação na solução de Tyrode, suplementado com 10mg/mL de heparina, 22mg/mL de piruvato de sódio, 50mg/mL de amicacina, 6mg/mL de BSA livre de ácidos graxos e solução de epinefrina (Penicilina 2 mM, hipotaurina 1 mM e epinefrina 0,25 mM). Para a fecundação *in vitro*, foram utilizadas doses de sêmen convencional de três touros da raça Nelore (*Bos indicus*), sendo as mesmas partidas, mantendo-se o acasalamento para as duas sessões de OPU. As palhetas de sêmen foram descongeladas por 30 segundos em banho-maria a 36° C e o sêmen foi colocado em um gradiente de 400µl de Percoll 90% e 400 µl de Percoll 45%. Os espermatozoides foram centrifugados por 6 min a 800g, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi ressuspensionado com 1mL de meio de fecundação. Os espermatozoides foram centrifugados por 3 min a 200g e o sobrenadante foi removido. A motilidade e a concentração espermática foram avaliadas e a concentração foi ajustada para 1×10^6 espermatozoides móveis/mL, que foram adicionados a cada gota de fecundação. A fecundação ocorreu durante 18 a 22 horas de incubação nas mesmas condições descritas para a maturação.

5.5.3 Cultivo *in vitro*

Após a fecundação, presumíveis zigotos foram desnudados mecanicamente para retirar o excesso de células do cumulus e transferidos para uma placa contendo micro gotas de 70µL de meio de cultivo. O cultivo ocorreu no fluido de oviduto sintético modificado suplementado com 50mg/mL de amicacina, aminoácidos 0,1 mM, citrato 340,02 mM, citrato 340,02 mM, mioinositol 2775 mM, SFB a 2,5% (vol/vol) e 6mg/mL de BSA (livre de ácidos graxos, SigmaA-8806) a 38,8°C em ar umidificado com 6% de CO₂, 5% de O₂ e 89% de N₂.

5.5.4 *Feeding* e avaliação da taxa de desenvolvimento embrionário

A taxa de clivagem foi registrada 72 horas após a FIV. O primeiro *feeding* (troca do meio) foi realizado neste momento, quando foram trocados 50% do meio de cultura usado por meio fresco. O segundo *feeding* foi realizada no quinto dia de cultura embrionário (120 horas após a FIV). A taxa de blastocistos (número total de blastocistos divididos pelo número total de oócitos recuperados) foi registrada no sétimo dia do cultivo embrionário. Nesse momento, os blastocistos de boa qualidade foram submetidos à técnica de vitrificação (WATANABE, 2014).

5.6 MANEJO REPRODUTIVO DAS RECEPTORAS

Os embriões produzidos com oócitos de novilhas foram transferidos em uma fazenda comercial (BR Pecuária – Terenos-MS). Vacas multíparas [ECC médio (1 a 5): 2,9±0,1] receberam um protocolo de sincronização para transferência de embriões (Figura 4). No dia 0, todas as vacas receberam um dispositivo de P4 intravaginal reutilizado (1,9 g de P4, CIDR®, Zoetis, São Paulo) e 2 mg de BE (Gonadiol®, Zoetis, São Paulo) im. No dia 8, o dispositivo de P4 foi removido e as vacas receberam 25mg de dinoprost (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo), 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG; Folligon®, MSD, São Paulo) e 1mg de cipionato de estradiol (CE; Ferticare Ovulação®, MSD, São Paulo). No dia 17, os ovários foram escaneados para confirmar a ovulação e as vacas com a presença de corpo lúteo (um ou mais) receberam um embrião (n= 202). O diagnóstico de gestação (DG) foi realizado aos 30 dias de gestação. O DG confirmatório com 60 dias foi feito em 197 animais para cálculo da taxa de perda embrionária.

Figura 4 – Desenho experimental do protocolo de sincronização das receptoras para a transferência de embriões.

5.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Informações de cada doadora foram compiladas em uma planilha para análise estatística. Todas as análises foram realizadas utilizando o software Statistical Analysis System (SAS, Version 9.4 for Windows; SAS Inst., Cary, NC) por meio do pacote Enterprise Guide (v 7.1).

Utilizou-se um delineamento experimental cruzado (*cross-over*), em arranjo fatorial 2x2, sendo duas categorias de idade [novilhas de 12 meses (N-12) e novilhas de 24 meses (N-24)] e dois tratamentos [Controle (N-C) e FSH (N-FSH)], totalizando quatro grupos experimentais com quatro repetições. A novilha foi considerada a unidade experimental.

Os dados foram testados quanto a homogeneidade das variâncias por meio do teste de Bartlett e quanto à normalidade dos resíduos por meio do procedimento Univariate empregando o teste de Shapiro-Wilk. Entretanto, quando a normalidade não foi atendida, os dados foram transformados para: LogN, Log(a+1), SQRT, Inversa, Arsin e Arsin (SQRT). Outliers foram removidos quando necessário.

Os dados foram analisados utilizando o procedimento GLIMMIX. No modelo estatístico, foi considerado o esquema fatorial com efeitos fixos de duas categorias de idade (12 meses ou 24 meses), dois tratamentos (Controle ou FSH) e as interações. População folicular foi utilizada como covariável no modelo. Réplica e Touro foram incluídos no modelo como fator aleatório. Nos casos em que as interações foram significativas, comparações foram feitas considerando os dois fatores (interação Idade×FSH). Quando não houve interação, os fatores foram avaliados separadamente por efeito principal idade e efeito principal FSH). A comparação das médias foi realizada por meio do comando LSMEANS, utilizando-se o teste de Tukey – Kramer.

Para análise de correlação, a significância foi verificada pelos valores críticos de rho (Spearman) e seu respectivo nível de significância (P-value), conforme realizado no procedimento CORR do SAS 9.4.

Para cálculo de prenhez/transferência de embrião (P/TE) aos 30 e 60 dias de gestação e perda gestacional (%) foram analisados pelo procedimento GLIMMIX ajustando para distribuição Binomial e função link = Logit, utilizando os efeitos fixos Categoria, Tratamento (FSH) e interação Idade×Tratamento.

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5% ($P \leq 0,05$). Foi considerada tendência quando encontrados valores entre 0,05 a 0,1.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 OPU-PIVE

No presente estudo, uma novilha de 12 meses foi removida das análises por ser considerada outlier na análise estatística. Uma novilha não foi contabilizada para a segunda sessão de OPU por vir a óbito. Não houve interação entre os efeitos fixos (Idade e FSH) para número de folículos pequenos (FP; $P=0,11$) e médios (FM; $P=0,84$) aspirados.

Tabela 1 – Número de folículos pequenos (FP), médios (FM) e grandes (FG) em novilhas de 12 e 24 meses de idade da raça Nelore (*Bos indicus*) tratadas ou não com FSH. Dados apresentados por média $\pm$ erro padrão da média.

	12 meses		24 meses		Valor de P		
	Controle	FSH	Controle	FSH	Idade	FSH	Idade $\times$ FSH
N	23	23	22	22	-	--	
FP	20,7 $\pm$ 2,1	13,9 $\pm$ 1,8	25,4 $\pm$ 2,8	11,7 $\pm$ 1,7	0,56	<0,0001	0,11
FM	0,8 $\pm$ 0,2	15,0 $\pm$ 2,6	1,4 $\pm$ 0,2	16,4 $\pm$ 2,2	0,59	<0,0001	0,84
FG	0,1 $\pm$ 0,1	2,9 $\pm$ 0,8	0,4 $\pm$ 0,1	5,5 $\pm$ 1,0	0,02	<0,0001	0,07

Não houve diferença na quantidade de folículos pequenos ($P=0,56$) e médios ($P=0,59$) para novilhas de 12 e 24 meses de idade (Tabela 1). Porém, o número de folículos grandes ($>8\text{mm}$) foi maior em novilhas de 24 meses ($3,0\pm0,6$) quando comparado às novilhas de 12 meses ($1,5\pm0,4$; $P=0,02$). Esse resultado está de acordo com os achados de ADAMS et al. (1994), no qual as ondas foliculares de novilhas pré-púberes são mais curtas e o diâmetro do folículo dominante e do primeiro subordinado são menores, justificando o maior número de folículos grandes para animais mais velhos.

No presente trabalho, novilhas tratadas com FSH tiveram menor proporção de folículos pequenos (N-C = 94,6% vs N-FSH = 39,1%; $P<0,0001$, Gráfico 1). Em contrapartida, o tratamento com FSH aumentou a proporção de folículos médios (N-C = 4,6% vs N-FSH =

48,1%; $P < 0,0001$, Gráfico 1), e grandes (N-C = 0,8% vs N-FSH = 12,8%; $P < 0,0001$). Verificou-se uma tendência para interação Idade $\times$ FSH para número de folículos grandes (FG; $P = 0,07$; Tabela 1), demonstrando que o tratamento aumentou ainda mais o diâmetro folicular em animais de 24 meses. Esses resultados corroboram com diversos trabalhos na literatura, que demonstram o efeito estimulatório do FSH sobre folículos pequenos (menores que 3mm) favorecendo o crescimento de um pool de folículos. Com isso, ocorre aumento da quantidade de folículos médios (VIEIRA et al., 2014; LANDRY 2016) e da proporção de folículos médios e grandes no dia da OPU (CARVALHO et al., 2019).

Gráfico 1 – Proporção (%) de folículos pequenos, médios e grandes de acordo com o tratamento (controle vs. FSH).

Tabela 2 – Número de folículos aspirados, oócitos recuperados e embriões produzidos por OPU em novilhas de 12 e 24 meses de idade da raça Nelore (*Bos indicus*) tratadas ou não com FSH. Dados apresentados por média $\pm$ erro padrão da média ou em porcentagem.

	12 meses		24 meses		Valor de <i>P</i>		
	Controle	FSH	Controle	FSH	Idade	FSH	P Idade×FSH
N	23	23	22	22	-	-	-
Total de folículos aspirados, n	21,5 $\pm$ 2,0	31,7 $\pm$ 3,1	27,1 $\pm$ 2,7	33,6 $\pm$ 2,7	0,17	0,002	0,48
Total de oócitos recuperados, n	18,5 $\pm$ 1,9	14,7 $\pm$ 1,4	23,9 $\pm$ 2,4	17,6 $\pm$ 1,6	0,02	0,01	0,48
Taxa de recuperação oocitária, %	91,4%	51,3%	94,4%	52,3%	0,76	<0,0001	0,88
Oócitos viáveis, n	13,6 $\pm$ 1,7	11,4 $\pm$ 1,0	16,9 $\pm$ 1,7	13,9 $\pm$ 1,5	0,06	0,09	0,82
Taxa de oócitos viáveis, %	73,9%	79,5%	71,6%	78,0%	0,48	0,02	0,88
Total de embriões clivados, n	9,6 $\pm$ 1,1	8,8 $\pm$ 1,0	12,9 $\pm$ 0,9	11,2 $\pm$ 1,5	0,02	0,31	0,71
Taxa de clivagem, %	74,9%	76,9%	82,1%	79,0%	0,41	0,93	0,65
Blastocistos por OPU, n	3,3 $\pm$ 0,6	3,5 $\pm$ 0,6	6,9 $\pm$ 0,9	5,9 $\pm$ 1,2	0,0004	0,64	0,46
Taxa de blastocistos sobre o total de oócitos, %	19,2%	22,8%	30,3%	29,5%	0,02	0,69	0,55

Não houve interação para nenhuma das variáveis resposta em relação à OPU/PIVE (Tabela 2), portanto, os resultados serão apresentados por efeitos principais de idade [Novilhas de 12 meses (N-12) vs Novilhas de 24 meses (N-24)] e de tratamento com FSH [Novilhas tratadas com FSH (N-FSH) vs novilhas do grupo controle (N-C)].

Não houve diferença no número de folículos aspirados entre as categorias de idade estudadas (N-12: $26,7 \pm 2,0$; N-24: $30,4 \pm 2,0$; $P = 0,17$). Esses dados estão em conformidade com os achados de GUERREIRO (2015), a qual não encontrou diferença na quantidade de folículos entre as categorias de novilhas pré-púberes (8 a 10 meses) e púberes (12 a 14 meses), e vacas lactantes e não-lactantes da raça Holandesa. Outros estudos também demonstram que a população folicular de fêmeas bovinas se mantém constante dos 8 meses de idade até a vida adulta (ERICKSON et al., 1966). Entretanto, estudos com categorias semelhantes da raça Nelore (*Bos indicus*) demonstraram que novilhas de 8 a 12 meses tiveram menor quantidade de folículos aspirados quando comparadas a novilhas de 18 a 22 e de 22 a 26 meses de idade (BATISTA et al. 2016, dados não publicados, citado por BARUSELLI et al., 2016). Contudo, esses resultados são indicativos de que novilhas jovens possuem quantidade considerável de folículos nos ovários, reforçando a possibilidade de utilizar novilhas de 12 meses de idade como doadoras de oócitos em programas de OPU/PIVE, o que possibilitaria reduzir o intervalo de gerações e acelerar o ganho genético do rebanho.

A quantidade de oócitos recuperados foi superior para animais de 24 meses (N-12 = $16,6 \pm 1,2$ vs N-24 = $20,8 \pm 1,5$; $P=0,02$), apesar de a população de folículos ser semelhante entre as categorias. Porém, a taxa de recuperação foi semelhante entre novilhas de 12 e 24 meses de idade (71,3% vs. 73,4%, respectivamente; $P=0,76$). Outros estudos também reportaram semelhança entre novilhas de 8 a 10 meses e de 12 a 14 meses da raça Holandesa (*Bos taurus*) para número de oócitos obtidos na OPU (GUERREIRO, 2015).

Verificou-se tendência para o número de oócitos viáveis, o qual foi maior para novilhas de 24 meses de idade (N-12 = $12,5 \pm 1,0$ vs N-24 = $15,4 \pm 1,1$; $P=0,06$). Esse resultado pode estar relacionado ao maior número de oócitos recuperados para a categoria. Entretanto, não houve diferença na taxa de oócitos viáveis entre novilhas de 12 e 24 meses de idade (76,7% vs. 74,8%, respectivamente; $P= 0,48$).

Ainda, foi observado que as novilhas de 24 meses tiveram maior número de embriões clivados (N-12 = $9,2 \pm 0,7$ vs N-24 = $12,0 \pm 1,0$; $P=0,02$). Este dado pode ser relacionado com a

quantidade de oócitos recuperados e total de oócitos viáveis obtidos na OPU, que foram superiores para novilhas mais velhas. Entretanto, não houve diferença para taxa de clivagem (N-12 = 75,9% vs N-24 = 80,5%; $P=0,41$).

Foi verificado que as novilhas de 24 meses de idade produziram maior número de embriões por OPU (N-12 = $3,4 \pm 0,4$ vs N-24 = $6,4 \pm 0,7$; $P=0,0004$) e tiveram maior taxa de blastocisto sobre o total de oócitos (N-12 = 20,9% vs N-24 = 29,9%; $P=0,02$) do que as novilhas de 12 meses. Apesar de as duas categorias utilizadas no presente estudo possuírem a mesma quantidade de folículos, os resultados foram indicativos de que a categoria de animais mais jovens tem menor competência para a PIVE. Diversos autores reportaram que animais abaixo dos 12 meses de idade possuem qualidade oocitária inferior e reduzida competência de desenvolvimento a blastocisto (REVEL et al., 1995; PRESICCE et al., 1997). Estudo com a raça Nelore corrobora com os resultados do presente estudo, no qual novilhas de 8 a 12 meses de idade tiveram menor eficiência na PIVE quando comparadas com novilhas de 18 a 22 e 22 a 26 meses de idade, obtendo-se menor número de clivagens, número e taxa de blastocistos (BATISTA et al., 2016, dados não publicados; citado por BARUSELLI et al., 2016). Os oócitos de animais pré-púberes são menores (GANDOLFI et al., 1998), e sua composição ooplásmica (WARZYCH et al., 2017; MORIN-DORÉ et al., 2017), síntese proteica e metabolismo são distintos de animais adultos (KHATIR et al., 1997; STEEVES; GARDNER, 1999; de PAZ et al., 2000). Esses achados suportam que os oócitos de animais jovens apresentam menor competência, o que pode justificar a menor eficiência na PIVE dessa categoria.

O tratamento com FSH já foi estudado por diversos grupos de pesquisa em busca da melhor eficiência dos animais nos programas de OPU/PIVE (ARMSTRONG et al., 1994; BLONDIN et al., 1996; GOODHAND et al., 1999; BLONDIN et al., 2002; LANDRY et al., 2016; VIEIRA et al., 2014; BATISTA et al., 2016; ZACARIAS et al., 2018). No presente trabalho, o tratamento com FSH aumentou a quantidade de folículos disponíveis para aspiração (N-C = $24,3 \pm 1,7$ vs N-FSH = $32,7 \pm 2,1$; $P=0,002$). BATISTA et al. (2016) verificaram maior número de folículos visualizados no dia da OPU em bezerras da raça Holandesa (*Bos taurus*).

Houve tendência evidenciando que o tratamento com FSH diminuiu o número de oócitos viáveis em ambas as categorias estudadas (N-C = $15,2 \pm 1,2$ vs N-FSH = $12,6 \pm 0,9$; $P=0,08$). Porém, o FSH causou aumento na taxa de oócitos viáveis (N-C = 72,7% vs N-FSH = 78,8%; $P=0,02$), demonstrando que houve melhora na qualidade morfológica dos oócitos recuperados.

Esse resultado corrobora com os achados de diversos estudos que relacionam a melhoria da qualidade oocitária com o aumento do diâmetro folicular (KAUFFOLD et al., 2005; RAMOS et al., 2007; BLONDIN et al., 2012). Segundo CAIXETA et al. (2009), a expressão de genes ligados à qualidade oocitária aumenta conforme o crescimento do folículo.

No entanto, novilhas tratadas com FSH tiveram menor número de oócitos recuperados por OPU (N-C = $21,2 \pm 1,5$ vs N-FSH = $16,2 \pm 1,1$; $P=0,01$), o que pode explicar o menor número de oócitos viáveis. O tratamento também ocasionou menor taxa de recuperação de oócitos (N-C = 92,9% vs N-FSH = 51,8%; $P<0,0001$). A estimulação com FSH aumenta o tamanho do folículo, aumentando também a viscosidade do fluido folicular (EDWARDS et al., 1980), tornando o processo de recuperação de oócitos mais difícil após a punção dos folículos. Sendo assim, folículos menores favorecem a recuperação de oócitos durante a OPU quando comparado com folículos maiores (SENEDA et al., 2001; SENEDA et al., 2005). Visto que o tratamento com FSH melhorou a qualidade morfológica dos oócitos, estudos podem ser feitos na tentativa de melhorar o processo de recuperação dos oócitos fazendo ajustes no procedimento de OPU, como na pressão da bomba de aspiração e calibre da agulha de aspiração.

O número de embriões clivados (N-C = $11,2 \pm 0,8$ vs N-FSH = $9,9 \pm 0,9$; $P=0,31$) e taxa de clivagem (N-C = 78% vs N-FSH = 78%; $P=0,93$) não foram influenciados pelo tratamento. Assim como não houve efeito para número de embriões produzidos por OPU (N-C = $5,1 \pm 0,6$ vs N-FSH = $4,7 \pm 0,7$; $P=0,64$) e taxa de blastocistos sobre o total de oócitos recuperados (N-C = 24,6% vs N-FSH = 26,0%; $P=0,69$), rejeitando uma das hipóteses apresentadas no presente estudo. Apesar dos efeitos positivos do FSH sobre a qualidade morfológica dos oócitos, não houve melhora dos índices da PIVE em nenhuma das categorias estudadas. Outros estudos utilizaram o tratamento com FSH previamente à OPU em vacas (MONTEIRO et al., 2009) e LOPU em bezerras de 3 a 4 meses de idade (BATISTA et al., 2016) e também não evidenciaram melhora da produção de embriões. Novos estudos devem ser realizados a fim de melhorar a eficiência da PIVE em animais jovens, com ajustes nos meios de maturação e cultivo em laboratório, para suprir diferenças fisiológicas dos oócitos dessa categoria.

6.2 TRANSFERÊNCIA DOS EMBRIÕES PRODUZIDOS

Os embriões vitrificados das diferentes doadoras conforme a de idade (N-12 = 70 embriões vs N-24 = 133 embriões) e o tratamento com FSH (N-C = 100 embriões vs N-FSH = 103 embriões) foram transferidos em receptoras da raça Nelore (*Bos indicus*), sendo que cada receptora recebeu uma transferência de um único embrião. Não houve interação entre os efeitos fixos (idade e tratamento) para número de P/TE aos 30 dias, 60 dias e perda gestacional (Tabela 3).

Apesar do reduzido número de embriões produzidos pelas doadoras jovens (12 meses), não houve diferença para número de P/TE aos 30 dias de gestação entre categorias (N-12 = 15,0% vs N-24 = 26,5%; $P=0,34$) e tratamento (N-C = 24,2% vs N-FSH = 25,2%; $P=0,98$). Devido a problemas de manejo da propriedade na qual os embriões foram transferidos, algumas receptoras que foram consideradas prenhes aos 30 dias ($n=5$) não foram submetidas ao DG confirmatório de prenhez aos 60 dias de gestação. O número de P/TE aos 60 dias também não diferiu entre categorias (N-12 = 13,0% vs N-24 = 23,6%; $P=0,29$) e tratamento (N-C = 21,1% vs N-FSH = 22,5%; $P=0,84$). Outros estudos com animais da raça Holandesa (*Bos taurus*) relataram menor taxa de prenhez de embriões de animais jovens em relação a adultos (REVEL et al., 1995; GUERREIRO, 2015). Ainda, a perda gestacional entre 30 e 60 dias (calculada a partir do número de receptoras prenhes que foram submetidas ao DG confirmatório) foi semelhante entre categorias (N-12 = 13,3% vs N-24 = 0,0%; $P=0,11$) e tratamento (N-C = 0,0% vs N-FSH = 8,0%; $P=0,30$). No entanto, REVEL et al. (1995) observaram que há maior perda gestacional para embriões de animais jovens quando comparado à adultos.

Esses dados são indicativos de que a fertilidade dos embriões que se desenvolvem até o final do processo de produção *in vitro* apresentam taxa de gestação semelhante, independentemente dos efeitos de idade da doadora e de tratamento com FSH, corroborando com o estudo de (MAJERUS et al., 2000), que demonstrou que a qualidade (número total de células e conteúdo celular) dos embriões resultantes da PIVE de animais jovens e adultos é semelhante. Esses achados levantam questionamentos de que os efeitos mais relevantes da idade da doadora e do tratamento superestimulatório com FSH são evidenciados durante o processo inicial de produção (fecundação, clivagem e conversão a blastocisto). Outros estudos devem ser realizados para confirmar esses achados.

Tabela 3 – Número de prenhez/transferência de embrião (P/TE) aos 30 e 60 dias de gestação e perda gestacional (entre 30 e 60 dias) de embriões produzidos *in vitro* de novilhas Nelore de 12 e 24 meses tratadas ou não com FSH antes da OPU. Dados apresentados em porcentagem.

	12 meses		24 meses		Valor de <i>P</i>		
	Controle	FSH	Controle	FSH	Idade	FSH	Idade × FSH
N	29	41	70	62	-	-	-
P/TE aos 30d, %	24,1% (7/29)	19,5% (8/41)	24,3% (17/70)	29,0% (18/62)	0,34	0,98	0,67
P/TE aos 60d, %	24,1% (7/29)	14,6% (6/41)	19,7% (13/66)	27,9% (17/61)	0,29	0,84	0,34
Perda gestacional entre 30 e 60d, %	0,0% (0/7)	25,0% (2/8)	0,0% (0/13)	0,0% (0/17)	0,11	0,30	-

6.3 RELAÇÃO ENTRE IGF1 E A QUALIDADE OOCITÁRIA, PRODUÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

Não houve interação entre categoria e tratamento para a concentração plasmática de IGF1 (Tabela 4). Todavia, a concentração de IGF1 foi maior para as novilhas de 24 meses quando comparada às de 12 meses (N-12: 224,2ng/ml; N-24: 358,3ng/ml; $P < 0,0001$). Outros estudos também evidenciaram o aumento da concentração de IGF1 conforme a idade (COOKE et al., 2013).

Tabela 4 – Concentração plasmática de IGF1 em novilhas de 12 e 24 meses da raça Nelore (*Bos indicus*) tratadas ou não com FSH. Dados apresentados por média $\pm$ erro padrão da média.

	12 meses		24 meses		Valor de <i>P</i>		
	Controle	FSH	Controle	FSH	Idade	FSH	Idade $\times$ FSH
N	23	23	22	22	-	-	-
IGF1 (ng/ml)	219,5 $\pm$ 22,3	229,1 $\pm$ 26,9	369,2 $\pm$ 30,1	347,3 $\pm$ 15,6	<0,0001	0,80	0,52

No presente estudo, a diferença encontrada entre as categorias para a concentração plasmática de IGF1 pode também estar associada à condição corporal dos animais. As novilhas de 24 meses apresentaram ECC superior ao das novilhas de 12 meses de idade (4,7 e 3,8, respectivamente; escala de 1 a 9; $P < 0,0001$). A concentração de IGF1 está relacionada com o manejo nutricional (MCGUIRE et al., 1992). Animais submetidos a melhores condições de manejo nutricional apresentam níveis superiores de IGF1 (BREIER et al., 1986). No presente estudo, todas as novilhas foram mantidas a pasto nas mesmas condições de manejo. Novilhas jovens ainda não atingiram a maturidade sexual e de desenvolvimento corpóreo, e apresentam maior exigência nutricional quando comparadas com novilhas que completaram o desenvolvimento corporal (COOKE et al., 2013). Sendo assim, as diferenças encontradas no escore de condição corporal podem justificar, em parte, a maior concentração plasmática de IGF1 nas novilhas de 24 meses.

Não foi observada diferença na concentração plasmática de IGF1 quando os animais receberam o tratamento com FSH (N-C: 292,7ng/ml; N-FSH: 288,2ng/ml; $P = 0,80$). Este

resultado demonstra que o FSH não tem efeito sobre o metabolismo de IGF1 no organismo. FRIED et al. (1998) relatam que o tratamento com FSH em mulheres não tem influência sobre as concentrações plasmáticas de IGF1, tendo efeito apenas na concentração intrafolicular desse hormônio, o que não foi mensurado no presente trabalho

Pelas análises de regressão logística não se observou relação entre as concentrações plasmáticas de IGF1 e o número de folículos aspirados ($r=0,0237$; $P= 0,15$; Gráfico 2), número de blastocisto produzido por OPU ($r=0,0075$; $P= 0,42$; Gráfico 3) e taxa de blastocisto ($r=0,0136$; $P= 0,28$; Gráfico 4) com os dados agrupados ou divididos por categoria de idade.

Gráfico 2 – Relação do número total de folículos aspirados (n, eixo y) com a concentração plasmática de IGF1 (ng/ml, eixo x) no momento da OPU em (A) novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade (n=90); (B) somente em novilhas de 12 meses (n=46), e (C) somente em novilhas de 24 meses de idade (n=44).

Gráfico 3 – Relação do número blastocistos produzidos por OPU (n, eixo y) com a concentração plasmática de IGF1 (ng/ml, eixo x) em (A) novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade (n=90); (B) somente novilhas de 12 meses (n=46), e (C) somente em novilhas de 24 meses de idade (n=44).

Gráfico 4 – Relação da taxa de blastocisto (n, eixo y) com a concentração plasmática de IGF1 (ng/ml, eixo x) em (A) novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade (n=90); (B) somente em novilhas de 12 meses (n=46), e (C) somente em novilhas de 24 meses de idade (n=44).

Verificou-se uma tendência de correlação negativa entre a concentração de IGF1 e o número total de oócitos viáveis no grupo de novilhas de 24 meses ($r=0,08$; $P=0,06$; Gráfico 5-C). Nota-se que quanto maior a concentração do fator de crescimento menor o número de estruturas viáveis coletadas na OPU. A taxa de oócitos viáveis também foi correlacionada negativamente com a concentração plasmática de IGF1 quando os dados estão agrupados ($r=0,07$; $P=0,05$; Gráfico 6), assim como houve uma tendência para correlação negativa para a categoria de 24 meses ($r=0,007$; $P=0,08$; Gráfico 6-C). Entretanto, os valores de “r” para estas correlações é pouco explicativo.

Gráfico 5 – Relação do número de oócitos viáveis recuperados por OPU (n, eixo y) com a concentração plasmática de IGF1 (ng/ml, eixo x) em (A) novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade (n=90); (B) somente em novilhas de 12 meses (n=46), e (C) somente em novilhas de 24 meses de idade (n=44).

Gráfico 6 – Relação da taxa de oócitos viáveis (n, eixo y) recuperados por OPU com a concentração plasmática de IGF1 (ng/ml, eixo x) em (A) novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade (n=90); (B) somente em novilhas de 12 meses (n=46), e (C) somente em novilhas de 24 meses de idade (n=44).

Observou-se interação Idade×IGF1 ($P = 0,0004$) para P/TE (Gráfico 7). Os embriões de novilhas de 24 meses apresentaram aumento na P/TE conforme o aumento da IGF1. Entretanto, esse aumento na P/TE não foi verificado nos embriões das novilhas de 12 meses. Na literatura, há estudos que comprovaram que o tratamento com IGF1 *in vitro* tem um leve efeito no aumento da produção embrionária, e uma maior sobrevivência embrionária após transferência (BLOCK et al., 2003). Estes efeitos estão relacionados ao maior desenvolvimento embrionário de embriões produzidos de doadoras que apresentam maiores concentrações circulantes de IGF1 (MOREIRA et al., 2002). Ainda, existem relatos de que a exposição dos oócitos à altas concentrações de IGF1 *in vitro* é capaz de aumentar a proliferação da massa celular interna durante a transição de mórula para blastocisto (VELAZQUEZ et al., 2012). Essa exposição ao IGF1 eleva o número de transcritos de RNA ligados à expansão e desenvolvimento de blastocistos após a eclosão

(BLOCK et al., 2008). Segundo THATCHER et al. (2006), existe uma faixa ideal da concentração de IGF1 que está relacionada com a maior fertilidade de vacas de alta produção de leite. Valores acima ou abaixo da faixa ideal de IGF1 podem implicar na diminuição da fertilidade.

Gráfico 7 – Relação do número de prenhez/transferência de embrião (n, eixo y) com a concentração plasmática de IGF1 (ng/ml, eixo x) da doadora [novilhas da raça Nelore (*Bos indicus*) com 12 meses (n=46) e 24 meses de idade (n=44)] no momento da OPU.

7 CONCLUSÕES E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS

A hipótese de que a PIVE de doadoras da raça Nelore (*Bos indicus*) de 24 meses de idade apresenta maior eficiência que a PIVE de doadoras Nelore de 12 meses foi confirmada. Entretanto, não se verificou interação Idade×tratamento, rejeitando a hipótese de que o tratamento com FSH melhora a eficiência da PIVE principalmente em animais jovens.

A hipótese de que a P/TE de embriões de novilhas de 12 meses é inferior quando comparado à P/TE de embriões de novilhas de 24 meses de idade foi rejeitada. Além disso, foi também rejeitada a hipótese de que embriões produzidos de doadoras tratadas com FSH apresentam maior P/TE, principalmente os embriões de doadoras de 12 meses de idade.

Confirmou-se a hipótese de que a concentração do IGF1 seria superior para novilhas de 24 meses de idade. Foi rejeitada a hipótese de que a concentração plasmática de IGF1 tem relação com a qualidade oocitária e a PIVE. Entretanto, verificou-se uma correlação positiva entre os níveis circulantes de IGF1 e P/TE de novilhas de 24 meses.

No presente estudo, a taxa de oócitos viáveis foi maior em animais tratados com FSH, o que indica melhora da qualidade morfológica dos oócitos nas doadoras tratadas. Essa melhora pode ser relacionada ao aumento do diâmetro dos folículos, como observado em outros estudos (KAUFFOLD et al., 2005; LONERGAN et al., 1994; BLONDIN; SIRARD, 1995).

Além disso, foi observado que as novilhas de 24 meses do presente trabalho apresentaram melhor ECC, maior produção de embriões *in vitro* e maiores níveis plasmáticos de IGF1 que novilhas de 12 meses de idade. Na literatura há relatos de que os níveis plasmáticos de IGF1 estão relacionados com a nutrição (BREIER et al., 1986). Ainda, no presente estudo foi verificada correlação positiva entre IGF1 das doadoras de oócitos de 24 meses com o número de P/TE. Estes achados destacam a importância do manejo nutricional adequado para as diversas categorias de doadoras, com estratégias nutricionais direcionadas as novilhas jovens (abaixo de 24 meses), otimizando assim a eficiência reprodutiva de fêmeas jovens.

Todavia, ainda são necessários mais estudos que avaliem a melhoria da eficiência da OPU/PIVE em animais jovens. Sendo assim, possíveis ajustes no processo de OPU, como aumento na pressão da bomba de aspiração e do calibre da agulha de aspiração poderiam elevar a quantidade de oócitos recuperados. Na PIVE, modificações nos meios de maturação e cultivo *in*

vitro poderiam ser testados para contornar diferenças fisiológicas dos oócitos dessa categoria, elevando a produção de embriões por doadora.

O aumento da eficiência da PIVE para sua utilização em conjunto com ferramentas genômicas para seleção de animais jovens, possibilita acelerar o ganho genético dos rebanhos pela multiplicação de animais de mérito genético superior em um menor intervalo de tempo, viabilizando ainda mais o emprego dessa biotecnologia nas fazendas produtoras de carne em todo o mundo.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G. P.; EVANS, A. C.; RAWLINGS, N. C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 100, n. 1, p. 27-33, 1994.

ASHKENAZI, H.; CAO, X.; MOTOLA, S.; POPLIKER, M.; CONTI, M.; TSAFRIRI, A. Epidermal growth factor family members: endogenous mediators of the ovulatory response. *Endocrinology*, v. 146, p. 77-84, 2005.

ARMSTRONG, D. T.; HELM, P.; IRVINE, B.; PETERSEN, B. A.; STUBBINGS, R. B.; MCLEAN, D.; STEVENS, G.; SEAMARK, R. F. Pregnancies and live birth from *in vitro* fertilization of calf oocytes collected by laparoscopic follicular aspiration. *Theriogenology*, v. 38, p. 667-678, 1992.

ARMSTRONG, D. T.; IRVINE, B. J.; EARL, C. R.; MCLEAN, D.; SEAMARK, R. F. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo production from calf oocytes. *Theriogenology*, v. 42, n. 7, p. 1227–1236, 1994.

ARMSTRONG, D. G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Reviews of Reproduction*, v. 2, n. 3, p. 139-146, 1997.

BALDASSARE, H.; CURRIN, L.; MICHALOVIC, L.; BELLEFLEUR, A. M.; GUTIERREZ, K.; MONDADORI, R. G.; GLANZNER, W. G.; SCHUERMANN, Y.; BOHRER, R. C.; DICKS, N.; LOPEZ, R.; GRAND, F. S.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; GOURDON, J.; BORDIGNON, V. Interval of gonadotropin administration for *in vitro* embryo production from oocytes collected from Holstein calves between 2 and 6 months of age by repeated laparoscopy. *Theriogenology*, v. 116, p. 64-70, 2018.

BARUSELLI, P. S.; BATISTA, E.O.S.; VIEIRA, L.M.; SOUZA, A.H. Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. *Animal Reproduction*, v.12, n.3, p.487-497, 2015.

BARUSELLI, P. S.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; FERREIRA, R. M.; GUERREIRO, B. G.; BAYEUX, B. M.; SALES, J. N. S. Factors that interfere with oocyte quality for in vitro production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. *Animal Reproduction*, v. 13, n. 3, p. 264-272, 2016.

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

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

BAYEUX, B. M. Efeito da categoria (pré púberes, púberes e prenhes) na produção *in vitro* de embriões de novilhas da raça Holandesa. 2017. Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo. 2017.

BLOCK, J.; DROST, M.; MONSON, R. L.; RUTLEDGE, J. J.; RIVERA, R. M.; PAULA-LOPES, F. F.; OCON O. M.; KRININGER C. E.; LIU, J.; HANSEN, P. J. Use of insulin-like growth factor-I during embryo culture and treatment of recipients with gonadotropin-releasing hormone to increase pregnancy rates following the transfer of in vitro-produced embryos to heat-stressed, lactating cows. *Journal of Animal Science*, v.81, n.6, p.1590-1602, 2003.

BLOCK, J.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; HERRMANN, D.; HANSEN, P. J. Effects of insulin-like growth factor-1 on cellular and molecular characteristics of bovine blastocysts produced in vitro. *Molecular Reproduction Development*, v. 75, n. 5, p. 895-903, 2008.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular Reproduction Development*, v.41, n. 1, p. 54-62, 1995.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.; SIRARD, M. A. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 46, n.7, p. 1191–1203, 1996.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; GUILBAULT, L.; SIRAD, M. A. In vitro production of bovine embryos: Developmental competence acquired before maturation. *Theriogenology*, v. 47, n. 5, p. 1061–1075, 1997.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 66, n. 1, p. 38-43, 2002.

BLONDIN, P.; VIGNEAULT, C.; NIVET A. L.; SIRARD, M. A. Improving oocyte quality in cows and heifers - What have we learned so far? *Animal Reproduction*, v. 9, n. 3, p. 281-289, 2012.

BREIER, B. H.; BASS, J. J.; BUTLER, J. H.; GLUCKMAN, P. D. The somatotrophic axis in young steers: influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulating concentrations of insulin-like growth factor 1. *Journal of Endocrinology*, v. 111, n. 2, p. 209-215, 1986.

BROGLIATTI, G. M.; ADAMS, G. P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, v. 45, n. 6, p. 1163-1176, 1996.

BURATINI JR, J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BÓ, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Theriogenology*, v. 54, n. 3, p. 421-431, 2000.

CAIXETA, E. S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M. M.; JUNIOR, J. B.; DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to

identify marker genes for developmental competence. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 21, n. 5, p. 655-664, 2009.

CARVALHO, J. G. S.; DE CARVALHO, N. A. T.; BAYEUX, B. M.; WATANABE, Y. F.; WATANABE, O. Y.; MINGOTI, R. D.; BARUSELLI, P. S. Superstimulation prior to the ovum pick-up improves the in vitro embryo production in nulliparous, primiparous and multiparous buffalo (*Bubalus bubalis*) donors. *Theriogenology*, v. 138, p. 164-168, 2019.

COOKE, R. F.; BOHNERT, D. W.; FRANCISCO, C. L.; MARQUES, R. S.; MUELLER, C. J.; KEISLER, D. H. Effects of bovine somatotropin administration on growth, physiological, and reproductive responses of replacement beef heifers. *Journal of Animal Science*, v. 91, n. 6, p. 2894-2901, 2013.

DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; CIBELLI, J. B.; LONG, C. R.; BALISE, J. J.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Molecular Reproduction Development*, v. 45, n., p. 521– 534, 1996.

DE PAZ, P.; SANCHEZ, A. J.; DE LA FUENTE, J.; CHAMORRO, C. A.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; ANEL, L. Ultrastructural and cytochemical comparison between calf and cow oocytes. *Theriogenology*, v. 1, n. 1, p. 1107–1116, 2000.

DESJARDINS C.; HAFS, H.D. Maturation of bovine female genitalia from birth through puberty. *Journal of Animal Science*, v. 28, p. 502-507, 1969.

D'OCCHIO, M. J.; BARUSELLI, P. S.; CAMPANILE, G. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. *Theriogenology*, v. 125, p. 277-284, 2019)

EDWARDS, R. G.; STEPTOE, P. C.; FOWLER, R. E.; BAILIE, J. Observations on preovulatory human ovarian follicles and their aspirates. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, v. 87, n. 9, p. 769-779, 1980.

ELLIFF, F. M.; FERES, L. F.; BAYEUX, B. M.; COLLI, M. H. A.; GUIMARÃES, E. C.; BARUSELLI, P. S. Effect of treatment with follicle-stimulating hormone on in vitro embryo

production of Gyr (*Bos indicus*) calves, pubertal heifers and adult cows. 45th Annual Conference of the International Embryo Technology Society, 20 to 23th, January, 2019, New Orleans, Louisiana, 2019 (abstract).

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*, v. 25, n. 3, p. 800–805, 1966.

EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 102, p. 463-470, 1994.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction Development*, v. 42, n. 4, p. 437-442, 1995.

FRANCIOSI, F.; MANANDHAR, S.; CONTI, M. FSH regulates mRNA translation in mouse oocytes and promotes developmental competence. *Endocrinology*, v. 157, n. 2, p. 872-882, 2015.

FREITAS, B. G. Influência do desenvolvimento corporal na resposta aos programas de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo em novilhas Nelore de 14 meses de idade. Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo. 2015.

FRIED, G.; WRAMSBY, H.; TALLY, M. Transforming growth factor- β 1, insulin-like growth factors, and insulin-like growth factor binding proteins in ovarian follicular fluid are differentially regulated by the type of ovarian hyperstimulation used for in vitro fertilization. *Fertility and Sterility*, v. 70, n. 1, p. 129-134, 1998.

FRY, R. C.; SIMPSON, T. L.; SQUIRES, T. J. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology*, v. 49, p. 1077-1082, 1998.

GANDOLFI, F.; MILANESI, E.; POCAR, P.; LUCIANO, A.M.; BREVINI, T.A.L.; ACOCELLA, F.; LAURIA, A.; ARMSTRONG, D.T. Comparative Analysis of Calf and Cow

Oocytes During In Vitro Maturation. *Molecular Reproduction Development*, v. 49, p. 168–175, 1998.

GIMENES, L. U.; FERRAZ, M.L.; FANTINATO-NETO, P.; CHIARATTI, M. R.; MESQUITA, L. G.; SA FILHO, M. F.; MEIRELLES, F. V.; TRINCA, L. A.; RENNO, F. P.; WATANABE, Y. F.; BARUSELLI, P. S. The interval between the emergences of pharmacologically synchronized ovarian follicular waves and ovum pickup does not significantly affect in vitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. *Theriogenology*, v. 83, n. 3, p. 385-393, 2015.

GINTHER, O. J.; BERGFELT, D. R.; KULICK, L. J.; KOT, K. Pulsatility of systemic FSH and LH concentrations during follicular-wave development in cattle. *Theriogenology*, v. 50, n. 4, p. 507-519, 1998.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Genomic selection. *Genomic selection. Journal of Animal breeding and Genetics*, v. 124, n. 6, p. 323-330, 2007.

GOODHAND, K. L.; WATT, R. G.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M.; BROADBENT, P. J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. *Theriogenology*, v. 51, n. 5, p. 951–961, 1999.

GUERREIRO, B. M. Produção *in vitro* de embriões de doadoras pré púberes da raça Holandesa. 2015. Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2015.

HAYES, B. J.; BOWMAN, P. J.; CHAMBERLAIN, A. J.; GODDARD, M. E. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *Journal of Dairy Science*, v. 92, n. 2, p. 433-443, 2009.

HERRLER, A.; KRUSCHE, C. A.; BEIER, H. M. Insulin and insulin-like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biology of Reproduction*. v. 59, n. 6, p. 1302-1310, 1998.

IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMME, A. P. N.; WARD F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, J. J.; Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biology of Reproduction*, v.79, p. 1219-1225, 2007.

KAUFFOLD, J.; AMER, A. H.; BERGFELD, U.; WEBER, W.; SOBIRAJ, A. The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. *Journal of Reproduction Development*, v. 51, n. 3, 325-332, 2005.

KAWAMOTO, T. S.; ZACARIAS, T. A.; GUIMARÃES, A. L. S.; SCALIANTE, J. L.; RODRIGUES, S. A. D.; FIGUEIREDO, R. A. Serum FSH, AMH related to number and morphology of oocytes in superovulated 4 to 7 months old Nelore breed females (*Bos Taurus Indicus*). Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, Agosto 17 - 19, 2017. Abstracts.

KHATIR, H.; CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MERMILLOD, P. Characterization of calf follicular fluid and its ability to support cytoplasmic maturation of cow and calf oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, vol. 111, n. 2, p. 267–275, 1997.

LANDRY, D. A.; BELLEFLEUR, A.; LABRECQUE, R.; GRAND, F.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M. Effect of cow age on the in vitro developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments. *Theriogenology*, v. 86, n. 5, p. 1240–1246, 2016.

LANDRY, D. A.; ROSSI-PERAZZA, L.; LAFONTAINE, S.; SIRARD, M.S. Expression of atresia biomarkers in granulosa cells after ovarian stimulation 1 in heifers. *Reproduction and Fertility*, v. 156, p. 239–248, 2018.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture in vitro. *Molecular Reproduction Development*, v. 37, n. 1, p. 48-53, 1994.

MAJERUS, V.; DE ROOVER, R.; ETIENNE, D.; KAIDI, S.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology*, v. 52, n. 7, p. 1169-1179, 1999.

MAJERUS, V.; LEQUARREÂ, A. S.; FERGUSON, E. M.; KAIDI, S.; MASSIP, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Characterization of embryos derived from calf oocytes: kinetics of cleavage, cell allocation to inner cell mass, and trophectoderm and lipid metabolism. *Molecular Reproduction and Development*, v. 57, p. 346-352, 2000.

MACLELLAN, L. J.; WHYTE, T. R.; MURRAY, A.; FITZPATRICK, L. A; EARL, C. R.; ASPDEN, W. J.; KINDER, J. E.; GROTTJAN, H. E.; WALSH, I.; TRIGG, T.E.; D'OCCHIO, M.J. Superstimulation of ovarian follicular growth with FSH, oocyte recovery, and embryo production from zebu (*Bos indicus*) calves: Effects of treatment with a GnRH agonist or antagonist. *Theriogenology*, v. 49, p. 1317-1329, 1996.

MANI, A. M.; FENWICK, M. A.; CHENG, Z.; SHARMA, M. K.; SINGH, D.; WATHES, D. C. IGF1 induces up-regulation of steroidogenic and apoptotic regulatory genes via activation of phosphatidylinositol-dependent kinase/AKT in bovine granulosa cells. *Reproduction*, v. 139, n. 1, p. 139-151, 2010.

MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKURA, S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*, v. 58, n. 1, p. 44-50, 2012.

MCGUIRE, M. A.; VICINI, J. L.; BAUMAN, D. E.; VEENHUIZEN, J. J. Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. *Journal of Animal Science*, v. 70, n. 9, p. 2901-2910, 1992.

MONTEIRO, F. M.; FERREIRA, M. M. G.; POTIENS, J. R.; EBERHARDT, B. G.; TRINCA, L. A.; BARROS, C. M. Influence of superovulatory protocols on in vitro production of Nelore (*Bos indicus*) embryos. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45, n. 5, p. 860-864, 2009.

MOREIRA, F.; RISCO, C. A.; PIRES, M. F. A.; AMBROSE, J. D.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. *Journal of Dairy Science*, v. 83, n. 6, p. 1237-1247, 2000.

MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W. W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. *Theriogenology*, v. 57, n. 4, p. 1371-1387, 2002.

MORIN-DORÉ, L.; BLONDIN, P.; VIGNEAULT, C.; GRAND, F. X.; LABRECQUE, R.; SIRARD, M. A. Transcriptomic evaluation of bovine blastocysts obtained from peri-pubertal oocyte donors. *Theriogenology*, v. 93, p. 111-123, 2017.

NARDO, L. G.; BELLANCA, S. A.; BURRELLO, N.; LONGO, G.; D'AGATA, R.; NARDO, F.; CALOGERO, A. E. Concentrations of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF binding protein-3 in the follicular fluid of women undergoing ovarian hyperstimulation with different gonadotropin preparations. *Gynecological Endocrinology*, v. 15, n. 6, p. 413-420, 2001.

NIVET, A. L.; BUNEL, A.; LABRECQUE, R.; BELANGER, J.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. FSH withdrawal improves developmental competence of oocytes in the bovine model. *Reproduction*, v. 143, n. 2, p. 165-171, 2012.

OROPEZA, A.; WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; HADELER, K. G.; NIEMANN, H. Improvement of the developmental capacity of oocytes from prepubertal cattle by intraovarian insulin-like growth factor-I application. *Biology of Reproduction*, v. 70, n. 6, p. 1634–1643, 2004.

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

PRESICCE, G. A.; JIANG, S.; SIMKIN, M.; ZHANG, L.; LOONEY, C. R.; GODKE R. A.; YANG, X. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. *Biology of Reproduction*, v. 56, n. 2, p. 386-392, 1997.

RAMOS, A. A.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. A.; POLISSENI, J.; HENRY, M. Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção *in vitro* de embriões em vacas Gir. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 2, p. 380-386, 2007.

RAWLINGS, N. C.; EVANS, A. C. O.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P. M. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 259–270, 2003.

REVEL, F.; MERMILLOD, P.; PEYNOT, N.; RENARD, J. P.; HEYMAN, Y. Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 103, n. 1, p. 115–120, 1995.

RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J. F.; O'FARRELL, K. J.; MACSIURTAIN, M.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. *Theriogenology*, v. 63, n. 3., p. 939-949, 2005.

RUBIN, K. C. P.; SENEDA, M. M. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, v. 75, p. 1640–1646, 2011.

SALAMONE, D. F.; DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; ROBL, J. M.; DUBY, R. T. Biochemical and developmental evidence that ooplasmic maturation of prepubertal bovine oocytes is compromised. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 1761–1768, 2001.

SANTOS, G. M. G; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. R.; MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. High numbers of antral

follicles are positively associated within vitro embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 165, p. 17–21, 2016.

SENDAG, S.; CETIN, Y.; ALAN, M.; HADELER, K. G.; NIEMANN, H. Effects of eCG and FSH on ovarian response, recovery rate and number and quality of oocytes obtained by ovum pick-up in Holstein cows. *Animal Reproduction Science*, v. 106, n. 1-2, p. 208-214, 2008.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. *Animal Reproduction Science*, v. 67, n. 1-2, p. 37-43, 2001.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; ANDRADE, E.R., BINELLI, M., MAX, M.C., OLIVEIRA, J.A., GARCIA, J.M. Relationship between follicle size after FSH treatment and efficiency of oocyte recovery. *Animal Reproduction*, v.2, n.3, p.178-182, 2005.

SIRARD, M. A. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 28, n. 6, p. 483–488, 2011.

SHIMADA, M.; HERNANDEZ-GONZALEZ, I.; GONZALEZ-ROBAYNA, I.; RICHARDS, J. S. Paracrine and autocrine regulation of epidermal growth factor-like factors in cumulus oocyte complexes and granulosa cells: key roles for prostaglandin synthase 2 and progesterone receptor. *Molecular Endocrinology*, v. 20, p. 1352-1365, 2006.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E.; CANNING, S. F.; HAMMOND, J. M. Relationship between concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in follicular fluid and various biochemical markers of differentiation in bovine antral follicles. *Biology of reproduction*, v. 39, n. 3, p. 573-580, 1988.

SPICER, L. J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S. E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. *Journal of Animal Science*, v.71, n.5, p. 1232-1241, 1993.

STEEVES, T.E.; GARDNER, D.K. Metabolism of glucose, pyruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. *Molecular Reproduction and Development*, v. 54, p. 92–101, 1999.

THATCHER, W. W.; BILBY, T. R.; BARTOLOME, J. A.; SILVESTRE, F.; STAPLES, C. R.; SANTOS, J. E. P. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology*, v.65, n.1, p. 30-44, 2006.

VELAZQUEZ, M. A.; NEWMAN, M.; CHRISTIE, M. F.; CRIPPS, P. J.; CROWE, M. A.; SMITH, R. F.; DOBSON, H. The usefulness of a single measurement of insulin-like growth factor-1 as a predictor of embryo yield and pregnancy rates in a bovine MOET program. *Theriogenology*, v. 64, n. 9, p. 1977-1994, 2005.

VELAZQUEZ, M. A.; HADELER, K. G.; HERRMANN, D.; KUES, W. A.; ULBRICH, S. E.; MEYER, H. H.; RÉMY, B.; BECKERS, J. F.; SAUERWEIN, H.; NIEMANN, H. In vivo oocyte developmental competence is reduced in lean but not in obese superovulated dairy cows after intraovarian administration of IGF1. *Reproduction*, v. 142, n. 1, p. 41-52, 2012.

VIANA, J. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: is it a turning point? *Embryo Technology Newsletter*, v. 36, n. 4, p. 8-19, 2018.

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

VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; NETTO, A. C.; GUERREIRO, B. M.; SILVEIRA, C. R. A.; FREITAS, B. G.; BRAGANÇA, L. G. M.; MARQUES, K. N. G.; SÁ FILHO, M. F.; BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Efficacy of a single intramuscular injection of porcine FSH in hyaluronan prior to ovum pick-up in Holstein cattle. *Theriogenology*, v. 85, n. 5, p. 877-886, 2016.

WALTERS, K. A.; BINNIE, J. P.; CAMPBELL, B. K.; ARMSTRONG, D. G.; TELFER, E. E. The effects of IGF-I on bovine follicle development and IGFBP-2 expression are dose and stage dependent. *Reproduction*, v. 131, n. 3, p. 515-523, 2006.

WARZYCH, E.; PAWLAK, P.; PSZCZOLA, M.; CIESLAK, A.; LECHNIAK, D. Prepubertal heifers versus cows: The differences in the follicular environment. *Theriogenology*, v. 87, p. 36–47, 2017.

WATANABE, Y. F.; SOUZA, A. H.; MINGOTI, R. D.; FERREIRA, R. M.; BATISTA, E. O. S.; DAYAN, A.; WATANABE, O.; MEIRELLES, F. V.; NOGUEIRA, F.G.; FERRAZ, J. B. S.; BARUSELLI, P. S. Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. *Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)*; Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, Agosto, 17 - 19, 2017.

WHITMAN, RICHARD WARREN. Weight change, body condition and beef-cow reproduction. *Dissertação*. Colorado State University. Libraries, 1975.

WRIGHT, J. Photomicrographic illustration of embryo codes. Savoy, YL: International Embryo Transfer Society, p. 167-170. *Manual of the International Embryo Transfer*, 1998.

ZACARIAS, T. A.; KAWAMOTO, T. S.; SCALIANTE JR, J. R.; SILVA GUIMARÃES, A. L.; FRANCO, M. M.; FIGUEIREDO, R. A. Hormonal stimulation in 4 to 7 months old Nelore (*Bos taurus indicus*) females improved ovarian follicular responses but not the in vitro embryo production. *Theriogenology*, v. 118, p. 130-136, 2018.