BRUNA MARTINS GUERREIRO

Produção *in vitro* de embriões de doadoras pré-púberes da raça Holandesa

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção 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
2015

Nº CLASSIFICAÇÃO
Nº TOMBO 033966

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.3105
FMVZ

Guerreiro, Bruna Martins
Produção *in vitro* de embriões de doadoras pré-púberes da raça Holandesa / Bruna Martins
Guerreiro. -- 2015.
64 f. :il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Pré-púbere. 2. Novilha. 3. OPU. 4. Holandesa. 5. *Bos taurus*. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Produção *in vitro* de embriões de doadoras pré-púberes da raça Holandesa", protocolado sob o nº 2941/2013, utilizando 120 (cento e vinte) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 13/3/2013.

We certify that the Research "In vitro embryo production of prepubertal Holstein fonors", protocol number 2941/2013, utilizing 120 (one hundred and twenty) bovine, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 3/13/2013.

São Paulo, 18 de março de 2013.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: GUERREIRO, Bruna Martins

Título: Produção *in vitro* de embriões de doadoras pré-púberes da raça Holandesa

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Aos meus **queridos pais, José Antônio Guerreiro e Lucélia Martins Guerreiro**, pelo carinho, amor incondicional, confiança e apoio durante as várias fases da minha vida.*

*A minha **irmã, Bianca Martins Guerreiro**, pela amizade, carinho e companheirismo.*

*Ao meu **namorado, Bruno Gonzalez de Freitas**, meu amigo, meu amor de alma, por todo apoio e principalmente por ser insubstituível na minha vida.*

*Ao meu grande amigo, **Carlos Alberto Rodrigues**, por ser meu exemplo pessoal e profissional.*

Dedico

Agradeço

A Deus por sempre colocar em meu caminho, durante cada fase da minha vida, pessoas maravilhosas que contribuíram na minha formação pessoal e profissional.

*Aos meus **amados pais** por serem meus exemplos de perseverança e força. Obrigada por sempre acreditarem, confiarem e me apoiarem nos momentos mais difíceis da minha vida mesmo sem conseguir entender o meu gosto por essa vida profissional “maluca”. Sem vocês eu não estaria aqui hoje. Amo muito vocês.*

*A toda minha **família**, por ser minha base, minha estrutura, meu tesouro, que fazem com que a vida tenha realmente sentido.*

*Ao meu **namorado Buni**, por ser meu companheiro, parceiro de todos os momentos, por ter entrado e mudado completamente minha vida. Por ser essa pessoa maravilhosa com um coração enorme que me ensina diariamente como ser uma pessoa melhor. Obrigada pela cumplicidade, compreensão, conselhos e todo apoio nas horas difíceis. Obrigada por estar sempre comigo, você faz todas as dificuldades se tornarem simples. Meu amor de alma, você foi o melhor presente que a vida me deu.*

*Ao querido **Prof. Pietro**, exemplo serenidade, profissionalismo e dedicação. Esses valiosos anos de convívio foram ricos em conselhos e ensinamentos que foram essenciais para meu crescimento pessoal e profissional. Obrigada pela oportunidade de poder trabalhar com o senhor, pela confiança, paciência e apoio. Foi um privilégio tê-lo como orientador, serei sempre grata ao senhor.*

*Ao meu **grande amigo Carlos Alberto Rodrigues (Carlão)**, por ter confiado e acreditado no meu potencial de trabalho. Obrigada pelo aprendizado diário, conselhos e pelas inúmeras oportunidades que me concedeu. Obrigada por todo apoio que me deu desde o primeiro dia de estágio até hoje. Sem dúvidas, devo a você grande parte da minha carreira profissional. Você é meu exemplo de sucesso, persistência, competência e profissionalismo. Minha gratidão será eterna a você. Muito obrigada, sem você não teria conseguido chegar até aqui.*

*A minha **grande amiga Laís Vieira**, meu exemplo de competência. Obrigada pelos ensinamentos, pelos conselhos, pelo apoio e pela paciência que sempre teve comigo.*

Com certeza você colaborou muito para meu crescimento pessoal e profissional. Muito obrigada Kots!

*Aos queridos **amigos do grupo**, Manoel, Gustavo, Brunão, Mili, Jú, Marcião, Evandro, Badá, Gui. Desde o primeiro dia cada um de vocês me recebeu com carinho e sempre foram pacientes e atenciosos comigo. Obrigada pelo constante aprendizado, por todas as conversas, conselhos e pelas aventuras de curral. É uma honra para mim poder trabalhar com vocês. Muito obrigada!*

*Ao meu **amigo Augusto Castro Netto (Fininho)**, por ter colaborado intensamente na execução desse trabalho. Obrigada pelas conversas, risadas e principalmente pela paciência comigo e minhas novilhas. Sem você nada disso teria acontecido! Agradeço também a Bioembryo Biotecnologia da Reprodução Animal Aplicada por contribuírem com a realização da produção *in vitro* de embriões durante todo experimento.*

*Ao meu **grande amigo Péricles (Naim)**, por todos ensinamentos diários. Tenho grande admiração pessoal e profissional por você. Obrigada pelos conselhos, pelas conversas e pela companhia (histórias, cervejas e cambotas).*

*Aos meus **amados amigos**, Gabriela Faria (Preta), Marina Mendonça (Girinha), Claudia Nagatsuyu (Japinha), João Guilherme (Moitinha) e Isabela Beloti (Ac), pelas inúmeras risadas, encontros e pelos momentos incríveis que vivemos juntos. Obrigada pela alegria e por fazerem com que a vida em São Paulo ficasse mais gostosa. Amo muito vocês!*

*À **Ana Coca Navaro (Margarida)** minha amiga e segunda mãe, por todo carinho e pelo apoio que sempre me deu. Agradeço por ter me recebido em sua casa e na sua vida como se fosse sua filha. Obrigada por ser essa pessoa maravilhosa e essencial na minha. Carrego você sempre no meu coração. Te amo!*

*À minha **amiga de infância Aline Costa Otávio (Linão)**, pelos vários anos de amizade, por todos bons momentos vividos e por me acolher no seu apartamento durante esses dois anos. Se não fosse por você eu não teria condições de fazer o mestrado.*

*Aos **amigos do departamento**, Miguel, Camila, Prof^a. Cláudia, Prof^a. Camila, Prof^a. Mayra, Prof. Rubens, Prof^a. Carla, Prof. Visintin, Prof. Ricardo, Prof. André, Prof^a. Annelise, Prof. Ed, muito obrigada pelos conhecimentos transmitidos durante as disciplinas, pelo apoio e pela excelente convivência durante esse período.*

*Ao **Roberto Jank Jr.**, pela oportunidade de permanecer quase dois anos na Fazenda Agrindus. Esse período foi extremamente importante para minha formação profissional. Agradeço por permitir um crescimento pessoal e profissional que não encontrarei em nenhum outro lugar. Obrigada por ter disponibilizado a fazenda e os animais para que este estudo pudesse ser realizado.*

*Aos **meus queridos amigos da Fazenda Agrindus**, Beco, Thiago, Micky, Laércio, Tulina, Guilherme, Lucas (Flor), Tuta e Antônio (Tonho) pelos ensinamentos, pela grande ajuda e pelo companheirismo durante minha permanência na fazenda. Muito obrigada por tudo!*

*Aos **companheiros de fazenda**: Ceci e Rafael Caputo pela ajuda incessante, seja embaixo de sol ou de chuva, de domingo a domingo na realização desse e de outros estudos. Sem vocês não conseguiria ter realizado meus experimentos. Muito obrigada pelo apoio, convívio, risadas, por serem essas pessoas tão especiais.*

*À querida **Harumi**, por toda ajuda que me deu nesse tempo de VRA. Sem dívidas, devo a você um pedacinho dessa dissertação. Muito obrigada!*

*Às queridas **Thais e Roberta** por todo apoio que me deram durante o mestrado.*

*À **USP** por fornecer subsídios essenciais para minha formação acadêmica.*

*À **FAPESP** pelo apoio financeiro durante a fase do mestrado (Processo 2012/ 25290-9).*

*E por fim, agradeço às **amadas vacas de leite**, por serem minhas queridas companheiras. Obrigada pela participação de cada uma neste estudo e em tantos outros que já acompanhei. Sem vocês nada disso aconteceria! Muito obrigada malhadas!*

RESUMO

GUERREIRO, B. M. **Produção in vitro de embriões de doadoras pré-púberes da raça Holandesa.** [In vitro embryo production of prepubertal Holstein donors]. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A produção *in vitro* de embriões em vacas Holandesas de alta produção (*Bos taurus*) ainda apresenta baixa eficiência quando comparada à de fêmeas *Bos indicus*. Nesse contexto, a utilização de novilhas de 8-10 meses de idade como doadoras de oócitos pode ser uma alternativa para melhorar a eficiência dessa biotecnologia e acelerar o ganho genético pela redução do intervalo de gerações dos rebanhos. Entretanto, as informações acerca da produção *in vitro* de embriões originados de doadoras pré-púberes são controversas na literatura. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a aspiração folicular, seguida da produção *in vitro* (PIVE) de embriões de doadoras pré-púberes da raça Holandesa e posteriormente, a taxa de concepção após a transferência dos embriões. Um total de 120 doadoras de quatro categorias animais: novilhas pré-púberes (PP, n = 30), novilhas púberes (PU, n = 30), vacas lactantes (VL, n = 30) e vacas não lactantes (VNL, n = 30) foi submetido à aspiração folicular (OPU), sem sincronização prévia da onda de crescimento folicular. Realizaram-se seis sessões de OPU com cinco animais de cada categoria, ou seja, vinte doadoras por sessão. Imediatamente antes da OPU, os folículos ovarianos foram quantificados e classificados de acordo com o diâmetro [folículos pequenos (FP = < 6 mm), folículos médios (FM = 6 a 10 mm) e folículos grandes (FG = > 10 mm)]. Posteriormente, todos os folículos ≥ 2 mm foram puncionados e o total de estruturas recuperadas, quantidade e qualidade de oócitos viáveis foram registrados. Os oócitos viáveis foram submetidos à produção *in vitro* e o desenvolvimento embrionário (taxa de clivagem e de blastocisto) foi avaliado. Sêmen sexado do mesmo touro e partida foi utilizado para fertilização dos oócitos de todas as categorias de doadoras. Os embriões produzidos (n = 206) foram transferidos em receptoras cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) de corte. Número de folículos no dia da OPU, proporção de folículos conforme o diâmetro, número de oócitos totais e viáveis recuperados, taxa de recuperação, taxa de clivagem, número de embriões produzidos por OPU e taxa de blastocisto foram variáveis analisadas pelo procedimento GLIMMIX do SAS® e a taxa de concepção pelo teste exato de Fisher. Não foi observada diferença entre os grupos

experimentais quanto ao número total de folículos aspirados (PP: $18,3 \pm 2,1$; PU: $17,3 \pm 1,2$; VL: $14,0 \pm 1,0$; VNL: $17,7 \pm 1,7$; $P = 0,08$). Entretanto, verificou-se que as doadoras PP apresentaram maior proporção de folículos pequenos (PP: $58,4\%$ ^a; PU: $45,7\%$ ^b; VL: $41,7\%$ ^b; VNL: $50,6\%$ ^b; $P < 0,0001$) quando comparado às demais categorias. Apesar do semelhante número de oócitos totais recuperados (PP: $14,2 \pm 2,2$; PU: $13,1 \pm 1,1$; VL: $9,8 \pm 1,1$; VNL: $14,6 \pm 1,7$; $P = 0,12$), PP apresentaram quantidades intermediárias de oócitos viáveis (PP: $10,5 \pm 1,8$ ^{ab}; PU: $8,3 \pm 0,8$ ^{ab}), sendo que VNL obtiveram maior número de oócitos viáveis ($11,5 \pm 1,4$ ^a; $P = 0,03$) quando comparadas às VL ($6,5 \pm 0,9$ ^b). Ainda, doadoras PP apresentaram menor taxa de clivagem (PP: $68,6\%$ ^b; PU: $98,8\%$ ^a; VL: $87,6\%$ ^a; VNL: $90,1\%$ ^a; $P < 0,0001$), menor número de embriões produzidos por sessão de OPU (PP: $0,5 \pm 0,2$ ^b; PU: $1,1 \pm 0,2$ ^b; VL: $1,2 \pm 0,4$ ^b; VNL: $4,2 \pm 0,6$ ^a; $P < 0,0001$) e menor taxa de blastocisto (PP: $4,8\%$ ^c; PU: $12,7\%$ ^b; VL: $18,0\%$ ^b; VNL: $36,5\%$ ^a; $P < 0,0001$) quando comparada às demais categorias. Por fim, observou-se diferença na taxa de concepção após transferência de embriões oriundos de doadoras novilhas e vacas [PP: $0,0\%$ (0/15) ^b; PU: $9,7\%$ (3/28) ^b; VL: $28,6\%$ (10/25) ^a; VNL: $32,7\%$ (36/74) ^a; $P < 0,05$]. Dessa forma, conclui-se que doadoras pré-púberes da raça Holandesa apresentam baixa competência para produção *in vitro* de embriões, sendo vacas não lactantes a categoria mais eficiente para programas de PIVE. Ainda, embriões de novilhas pré-púberes apresentam taxas de concepção inferiores a de embriões de vacas lactantes e não lactantes. Entretanto, taxas de concepção semelhantes foram verificadas entre embriões de novilhas pré-púbere e púberes.

Palavras-chave: Pré-púbere. Novilha. OPU. Holandesa. *Bos taurus*.

ABSTRACT

GUERREIRO, B. M. **In vitro embryo production of prepubertal Holstein donors.** [Produção *in vitro* de embriões em doadoras pré-púberes da raça Holandesa]. 2015. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The *in vitro* embryo production of high productive dairy cows (*Bos taurus*) presents low efficiency in comparison to *Bos indicus* females. In this context, the use of heifers of 8-10 months age as oocyte donors could be an alternative in order to improve results of this biotechnology and accelerate the genetic gain by the reduction of the interval between generations. However, informations about the *in vitro* production of embryos coming from prepubertal donors are controversial at literature. Thus, the objective of the present study was to evaluate the *in vivo* ovum pick-up (OPU), followed by *in vitro* embryo production of prepubertal Holstein donors and the conception rate after embryo transfer. The study was performed at Santa Rita farm, with a completely randomized experimental design, performed in six consecutive replicates with distinct animals. A total of 120 donors of four animal categories: prepubertal heifers (PP, n = 30), pubertal heifers (PU, n = 30), lactating cows (LC, n = 30) and non-lactating cows (NLC, n = 30) were submitted to OPU without previous synchronization of follicular wave. Six OPU sessions were performed with five animals of each category i.e., 20 donors *per* session. Immediately before the OPU, all follicles were quantified and classified according to their diameter [small (SF $\leq$ 6 mm), medium (MF = 6 to 10 mm) and large (LF $\geq$ 10 mm) follicles]. Subsequently, all visible follicles ($\geq$ 2 mm) were punctured and the total recovered structures, quantity and quality of viable oocytes were registered. All viable oocytes were submitted to the *in vitro* embryo production and their development (cleavage and blastocyst rate) was evaluated. Sex-sorted sperm from the same bull and semen batch were used for the oocytes fertilization of all donor categories. The embryos produced (n = 206) were transferred in crossbred recipients (*Bos taurus* x *Bos indicus*). Number of follicles at OPU day, proportion of follicles according to its diameter, number of total and viable oocytes, recovery rate, clivage rate, number of embryos produced *per* OPU and blastocyst rate were the variables analyzed by the GLIMMIX procedure of SAS® and conception rate by the Fisher's exact test. No difference was observed between the experimental groups, regarding the total number of aspirated follicles (PP: 18.3 ± 2.1 ; PU:

17.3 ± 1.2; LC: 14.0 ± 1.0; NLC: 17.7 ± 1.7; P = 0.08). However, PP donors presented higher proportion of small follicles (PP: 58.4%^a; PU: 45.7%^b; LC: 41.7%^b; NLC: 50.6%^b; P < 0.0001) in comparison to other categories. Despite the similar number of total recovered oocytes (PP: 14.2 ± 2.2; PU: 13.1 ± 1.1; LC: 9.8 ± 1.1; NLC: 14.6 ± 1.7; P = 0.12), PP presented intermediate quantity of viable oocytes (PP: 10.5 ± 1.8^{ab}; PU: 8.3 ± 0.8^{ab}) and NLC produced more viable oocytes (11.5 ± 1.4^a; P = 0.03) in comparison to LC (6.5 ± 0.9^b). Still, PP donors presented lower clivage rate (PP: 68.6%^b; PU: 98.8%^a; LC: 87.6%^a; NLC: 90.1%^a; P < 0.0001), fewer embryos produced *per* OPU session (PP: 0.5 ± 0.2^b; PU: 1.1 ± 0.2^b; LC: 1.2 ± 0.4^b; NLC: 4.2 ± 0.6^a; P < 0.0001) and lower blastocyst rate (PP: 4.8%^c; PU: 12.7%^b; LC: 18.0%^b; NLC: 36.5%^a; P < 0.0001) in comparison to other categories. Lastly, it was observed a different conception rate among heifers and adult cows [PP: 0.0% (0/15)^b; PU: 9.7% (3/28)^b; LC: 28.6% (10/25)^a; NLC: 32.7% (36/74)^a; P < 0.05]. Thus, it is concluded that prepubertal Holstein donors present low competence for in vitro embryo production, being non-lactating cows the most efficient category for IVEP. Yet, PP embryos resulted in inferior conception rate in comparison to LC and NLC embryos. However, similar conception rate was verified between PP and PU embryos.

Keywords: Prepubertal. Heifers. OPU. Holstein. Bos taurus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Modelo hipotético da produção <i>in vitro</i> e taxa de concepção de embriões conforme a categoria da doadora.....	26
Figura 2 -	Desenho esquemático do delineamento experimental. Fêmeas da raça Holandesa de quatro categorias animais foram submetidas à sessão de <i>ovum pick-up</i> (OPU) concomitantemente. Descalvado, setembro a outubro de 2012 e 2013.....	31
Figura 3 -	Proporção de folículos pequenos (< 6 mm), médios (6 a 10 mm) e grandes (> 10 mm) imediatamente antes da OPU em doadoras novilhas pré-púberes, púberes, vacas lactantes e não lactantes da raça Holandesa.....	39
Figura 4 -	Média de oócitos viáveis obtidos após OPU e classificados de acordo com a qualidade em grau I, II e III, de doadoras novilhas pré-púberes, púberes, vacas lactantes e não lactantes da raça Holandesa.....	40
Figura 5 -	Taxa de oócitos viáveis (Nº oócitos viáveis / nº de oócitos totais) em doadoras novilhas pré-púberes, púberes, vacas lactantes e não lactantes da raça Holandesa submetidas à OPU.....	40
Figura 6 -	Taxa de blastocistos (Nº de blastocistos / nº de oócitos viáveis) após PIVE em doadoras novilhas pré-púberes, púberes, vacas lactantes e não lactantes da raça Holandesa.....	42
Figura 7 -	Taxa de concepção de receptoras cruzadas após transferência de embriões de doadoras novilhas pré-púberes, púberes, vacas lactantes e não lactantes da raça Holandesa.....	46

Figura 8 -	Modelo hipotético da resposta à aspiração folicular, PIVE e taxa de concepção de embriões produzidos a partir de doadoras da raça Holandesa de categorias distintas.....	52
Figura 9 -	Modelo hipotético dos possíveis fatores envolvidos na baixa competência de desenvolvimento embrionário de doadoras novilhas pré-púberes da raça Holandesa.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Desenvolvimento oocitário em fêmeas pré-púberes e adultas após a maturação <i>in vitro</i> e taxa de prenhez após transferência dos embriões.....	23
Tabela 2 -	Estatística descritiva relacionada às aspirações foliculares.....	30
Tabela 3 -	Sumário da quantidade de folículos aspirados, oócitos e embriões obtidos após OPU-PIVE em doadoras novilhas pré-púberes, púberes, vacas lactantes e não lactantes da raça Holandesa. Dados apresentados como porcentagem e média $\pm$ erro padrão médio.....	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	FISIOLOGIA EM FÊMEAS JOVENS	19
2.2	COMPETÊNCIA OOCITÁRIA PARA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES <i>IN VITRO</i> EM FÊMEAS PRÉ-PÚBERES	21
3	HIPÓTESES	26
3.1	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES DE NOVILHAS PRÉ-PÚBERES DA RAÇA HOLANDESA	26
3.2	TAXA DE CONCEPÇÃO APÓS TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES ORIUNDOS DE NOVILHAS PRÉ-PÚBERES DA RAÇA HOLANDESA.....	26
4	OBJETIVO	28
5	MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1	FAZENDA E ANIMAIS	29
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
5.3	AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS.....	31
5.4	ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRAFIA (OPU)	31
5.5	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE)	33
5.5.1	Maturação <i>in vitro</i>	33
5.5.2	Fertilização <i>in vitro</i>	33
5.5.3	Cultivo <i>in vitro</i>	34
5.5.4	Feeding e avaliação da taxa de desenvolvimento embrionário	35
5.6	MANEJO REPRODUTIVO DAS RECEPTORAS.....	35
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6.1	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES DE NOVILHAS PRÉ-PÚBERES DA RAÇA HOLANDESA	37
6.2	TAXA DE CONCEPÇÃO DE RECEPTORAS CRUZADAS APÓS TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES ORIUNDOS DE NOVILHAS PRÉ-PÚBERES DA RAÇA HOLANDESA.....	46
7	CONCLUSÕES	48
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS	50
	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

O crescimento exponencial da população mundial gera dúvidas referentes à disponibilidade futura de alimentos. Nesse contexto, a maximização da produção agropecuária mostra-se ponto chave para a resolução dessa questão. Atualmente, o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 218 milhões de cabeças (FAOSTAT, 2014). Apesar da grande dimensão do rebanho, a pecuária leiteira brasileira apresenta baixa eficiência e ocupa apenas o quarto lugar no ranking mundial de produção de leite (FAOSTAT, 2014). Dentre os gargalos que inviabilizam o aumento na produtividade das fazendas leiteiras brasileiras está a baixa eficiência reprodutiva e a reduzida utilização de biotecnologias da reprodução para o melhoramento genético dos rebanhos.

Entre as biotecnologias disponíveis, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) pode ser considerada uma importante ferramenta para acelerar o ganho genético dos rebanhos. A PIVE permite a multiplicação expressiva do material genético de mérito superior e consequentemente, possibilita crescimento rápido e com qualidade da pecuária leiteira. Entretanto, diferentemente dos resultados obtidos em fêmeas *Bos indicus* (PONTES et al., 2010), a PIVE em vacas leiteiras de alta produção (*Bos taurus*) ainda apresenta resultados insatisfatórios. Além de apresentarem menor população folicular (BATISTA et al., 2014), vários fatores intrínsecos e extrínsecos (estado metabólico, estresse térmico e nutrição; BARUSELLI et al., 2012; DEMETRIO et al., 2007; RODRIGUES et al., 2004; SALES et al., 2011) tem sido relacionados à menor competência oocitária, o que pode justificar a baixa eficiência da técnica em rebanhos leiteiros.

Nesse contexto, a utilização de novilhas pré-púberes como doadoras de oócitos pode ser uma alternativa para melhorar a eficiência da PIVE na raça Holandesa e acelerar o ganho genético dos rebanhos. Fêmeas jovens apresentam população de folículos antrais (PFA) presentes nos ovários (DESJARDINS; HAFS, 1969; ERICKSON, 1966; REVEL et al., 1995) superior às fêmeas adultas, fato que pode favorecer o desempenho dessa categoria animal na PIVE. Trabalhos anteriores sugerem que doadoras com elevada PFA produzem mais embriões por sessão de aspiração quando comparadas àquelas com baixa população folicular (PONTES et al., 2009; GUERREIRO et al., 2014). Entretanto, apesar da maior PFA, entraves tem sido observados na capacidade de desenvolvimento dos oócitos provenientes de animais pré-púberes, tema esse que necessita ser melhor estudado.

Com o advento da avaliação genômica, na atualidade é possível identificar precocemente indivíduos de maior potencial genético dentro do plantel. Essa inovação tecnológica acelera e aumenta a confiabilidade da seleção genética tradicional baseada no fenótipo, principalmente quando são aplicadas em animais jovens (COUTINHO et al., 2010). Ainda, permite determinação de parentesco, identificação de defeitos genéticos e seleção de animais geneticamente superiores baseada em características produtivas, reprodutivas e sanitárias. A partir da identificação precoce das melhores fêmeas, torna-se possível a intensificação do uso da PIVE nessa categoria animal mesmo antes da puberdade. Dessa forma, é possível obter descendentes de fêmeas bovinas pré-púberes, maximizando o potencial reprodutivo da doadora.

O emprego de programas de OPU-PIVE em novilhas pré-púberes resulta em rápido avanço genético dos rebanhos leiteiros pela redução do intervalo de geração dos rebanhos. No entanto, essa categoria animal parece apresentar baixa competência para produção de blastocistos (PRESICCE et al., 1997; CAMARGO et al., 2005; ZARAZA et al., 2010). Na tentativa de viabilizar a aplicação dessa biotecnologia na raça Holandesa, estudos prospectivos são necessários para melhor entendimento dos fatores biológicos envolvidos na utilização de doadoras jovens para produção de embriões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FISIOLOGIA EM FÊMEAS JOVENS

A dinâmica folicular ovariana e as mudanças no perfil de secreção de gonadotrofinas são bem caracterizadas em fêmeas púberes, porém pouco reportada em pré-púberes. Diante disso, torna-se necessário compreender o desenvolvimento folicular ovariano da novilha após o nascimento e os mecanismos endócrinos envolvidos na maturação sexual para estabelecer qualquer programa reprodutivo dentro das propriedades.

Diferenças anatômicas no trato reprodutivo são observadas entre fêmeas jovens e adultas. Estudos mostraram que o peso da vagina e cervix aumenta gradualmente até os 4 meses de idade e mais rapidamente à primeira ovulação (DESJARDINS; HAFS, 1969). Também é observado crescimento significativo no tamanho do útero do nascimento à puberdade. Ainda, o tamanho dos ovários eleva-se aos 4 meses, mantem-se até 8 meses e aumenta ainda mais após surgimento do corpo lúteo. Ao nascimento, bezerras possuem 75.000-300.000 folículos primordiais presentes nos ovários (ARMSTRONG, 2001), sendo visualizada máxima população de folículos antrais aos 4 meses de idade (RAWLINGS et al., 2003), seguido de declínio até 8 meses e posterior constância até a senescência (ERICKSON, 1966; DESJARDINS; HAFS, 1969).

Animais pré-púberes apresentam o padrão de desenvolvimento folicular em ondas assim como adultos (PIERSON; GINTHER, 1987). Estudos foram indicativos de que essas fêmeas possuem três ondas de crescimento folicular em um período de 18 dias de avaliação (ADAMS et al., 1994; EVANS et al., 1994). Os eventos de emergência, seleção folicular e regressão do folículo dominante também são observados, mas existem algumas diferenças quantitativas antes e após a puberdade (GINTHER et al., 1989; ADAMS et al., 1994): 1. todas as ondas foliculares são anovulatórias em novilhas pré-púberes; 2. a duração das fases de crescimento e seleção do folículo dominante ($4,7 \pm 0,3$ vs $6,1 \pm 0,3$ dias / $5,1 \pm 0,3$ vs $5,8 \pm 0,5$ dias, respectivamente) e do primeiro subordinado ($2,2 \pm 0,2$ vs $2,4 \pm 0,2$ dias / $1,8 \pm 0,2$ vs $2,1 \pm 0,3$ dias) são mais curtas; 3. a média do diâmetro do folículo dominante ($11,2 \pm 0,2$ vs $15,8 \pm 0,5$ mm) e do primeiro subordinado ($7,1 \pm 0,3$ vs $8,2 \pm 0,4$ mm) na fase de seleção é menor; 4. e o intervalo entre ondas foliculares também é menor ($8,0 \pm 0,4$ vs $9,7 \pm 0,2$ dias).

Mudanças na concentração circulante de gonadotrofinas são observadas do nascimento a puberdade, porém esses dados referidos na literatura são conflitantes. Estudos relatam aumento na concentração do Hormônio Luteinizante (LH) inicialmente entre 12-20 semanas de idade (SCHAMS et al., 1981; EVANS et al., 1992); outros sugerem haver um declínio do nascimento até 15 semanas (DODSON et al., 1988), com subsequente aumento com 36-52 semanas de idade (SCHAMS et al., 1981; DODSON et al., 1988; EVANS et al., 1992). Concomitantemente, também foram reportados aumento na concentração do Hormônio Folículo Estimulante (FSH; SCHAMS et al., 1981; ADAMS et al., 1992), mas a relação da alteração nos padrões de liberação de FSH com a maturidade sexual não são claros. Entretanto, a emergência da onda folicular em pré-púberes, assim com em animais púberes, está associada a um pico prévio de FSH (ADAMS et al., 1992, 1994).

A falha hipotalâmica em produzir quantidades suficientes de GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofinas) para causar liberação de gonadotrofinas (FSH, LH) é o fator limitante para início da puberdade (SENGER, 1999). Isso é decorrente da liberação de pulsos de GnRH de baixa amplitude e frequência pelos neurônios pré-sinápticos presentes nos centros tônico (*tonic center*) e pré-ovulatório (*surge center*) do hipotálamo. O estabelecimento da puberdade não está associado a capacidade do lobo anterior da hipófise em produzir FSH / LH, mas na ausência de quantidades suficientes de estradiol gonadal para estimular o centro pré-ovulatório a secretar pulsos de GnRH de alta amplitude (JAINUDEEN; HAFEZ, 1993; SENGHER, 1999). Com esse baixo nível de estradiol, o centro tônico fica altamente sensível ao feedback negativo e produz pequenas concentrações de GnRH levando a baixos níveis de gonadotrofinas. Na transição para puberdade, ocorre redução dessa sensibilidade e aumento da produção de GnRH que estimulará o crescimento folicular nos ovários, e consequentemente maior produção de estradiol. Quando o nível de estradiol atinge um certo limiar, há uma descarga de GnRH pelo centro pré-ovulatório (feedback positivo) e a ovulação é desencadeada.

Nesse contexto, dados na literatura sugerem que o início da alta frequência de pulsos de GnRH é influenciado por indicadores de estado metabólico, como a glicose e ácidos graxos livres (KENNEDY et al., 1963; SCHREIHOFFER et al., 1993; MURAHASHI et al., 1996; NAGATANI et al., 1996). Estudos mostraram que aplicação de inibidores metabólicos em fêmeas ovariectomizadas suprime imediatamente a secreção pulsátil de LH (FOSTER., 1994). Ainda, outro sinalizador metabólico importante envolvido no início da puberdade é a leptina (CARRO et al., 1997; CHEUNG et al., 1997; FOSTER; NAGATANI, 1999). Esse hormônio

peptídico produzido pelos adipócitos pode sinalizar aos neurônios pré-sinápticos (GnRH) que o estado nutricional adequado (grau de adiposidade) foi atingido (SENGER, 1999). Parece haver três tipos de neurônios pré-sinápticos que podem estimular a liberação de GnRH: 1. neurônios sensíveis a glicose; 2. neurônios sensíveis a ácidos graxos 3. neurônios sensíveis a leptina. Entretanto, o mecanismo exato de como esses sinais metabólicos sensibilizam os neurônios hipotalâmicos não são claros.

A idade à puberdade é variável entre as espécies e dentro de cada grupo genético. Fêmeas *Bos taurus* tornam-se púberes aos 8-13 meses de idade (SCHAMS et al., 1981; DODSON et al., 1988; EVANS et al., 1992; PRESICCE et al., 1997; MAJERUS et al., 1999), enquanto as fêmeas *Bos indicus* atingem a puberdade mais tardiamente aos 19-36 meses de idade (JAINUDEEN; HAFEZ, 1993; SOUZA et al., 1995; REKWOT et al., 2000; RODRIGUES et al., 2002). Entretanto, estudos recentes sugeriram pela primeira vez que novilhas da raça Nelore (14 meses de idade) podem apresentar elevadas taxas de concepção quando submetidas precocemente à inseminação artificial em tempo fixo (FREITAS et al., 2014), o que indica que o estado nutricional e a genética do animal podem ser fatores importantes que influenciam esse início da puberdade (FRISCH, 1984; SENGER, 1999). No entanto, muitos estudos sugerem que o desenvolvimento da competência oocitária está fortemente relacionado à idade da doadora em ambos genótipos (REVEL et al., 1995; ARMSTRONG, 2001; CAMARGO et al., 2005).

2.2 COMPETÊNCIA OOCITÁRIA PARA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO* EM FÊMEAS PRÉ-PÚBERES

O sucesso de programas de OPU-PIVE é intrinsecamente relacionado ao potencial de desenvolvimento oocitário. Estabelecer a fisiologia dos eventos relacionados à competência do oócito como o reinício da meiose, início das clivagens após a fecundação, desenvolvimento ao estágio de blastocisto (SIRARD et al., 2006) são determinantes para compreender os resultados obtidos na PIVE em fêmeas pré-púberes.

A utilização de fêmeas pré-púberes como doadoras de oócitos permite acelerar o ganho genético através da redução do intervalo de gerações dos rebanhos (LOHUIS, 1995). Fêmeas jovens apresentam maior quantidade de folículos presentes nos ovários quando

comparado às fêmeas adultas (ERICKSON, 1966; DESJARDINS; HAFS, 1969), fato que pode favorecer o desempenho dessa categoria animal na PIVE. Entretanto, estudos na literatura acerca da competência oocitária para PIVE de fêmeas pré-púberes são ainda controversos (Tabela 1; ARMSTRONG et al., 1994; REVEL et al., 1995; KHATIR et al, 1996; ARMSTRONG et al., 1997) e necessitam de melhor compreensão.

Mudanças nucleares e ooplasmáticas necessárias para que oócito desenvolva habilidade de retomar e completar a meiose (competência meiótica) são adquiridas progressivamente durante o crescimento folicular (PAVLOK; LUCAS-HAHN; NIEMANN, 1992; LONERGAN et al., 1994; EPPIG, 1996). Fatores citoplasmáticos incluindo RNAm e proteínas, essenciais para o início do desenvolvimento embrionário antes da ativação do genômia embrionário, são sintetizadas durante o crescimento do oócito e acumulados gradualmente durante os estágios mais tardios do crescimento folicular (TELFORD; WATSON; SCHULTZ, 1990).

Tabela 1 – Desenvolvimento oocitário em fêmeas pré-púberes e adultas após a maturação *in vitro* e taxa de prenhez após transferência dos embriões

Referência	Doadora		Porcentagem (%)		
	Tratamento	Idade (meses)	Taxa Fertilização	Taxa Blastocisto	Taxa Prenhez
Kajirara (1991)	FSH	4,5	48	8	33 (1/3)
Armstrong (1992)	FSH	2,5	50	27	33 (1/3)
	não	Adulto	75	18	
Palma (1993)	não	bezerra		16	
	não	adulto		22	
Revel (1995)	FSH	4	72	9	4 (1/23)
	não	Adulto	62	21	38 (10/26)
Looney (1995)	FSH	> 8	34	0	
	FSH	> 8	64	19	
	não	Adulto	73	32	
Damiani (1996)	FSH	4	51	6	
	não	Adulto	58	33	
Kathir (1997)	não	3-4	67	33	
	não	adulto	83		
Presicce (1997)	não	5	28	0	
	não	7	30	1	
	não	9	82	7	
	não	11	88	24	
	não	adulto	75	28	
	FSH	5	24	0	
	FSH	7	49	17	
	FSH	9	88	15	
	FSH	11	80	23	
	FSH	11	80	23	
Mermillod (1997)	não	3-5	71	12	
	não	adulto	71	32	
Earl (1998)	FSH	3		38	
	FSH	6		46	
Palma (2001)	não	3		19	
	não	adulto		32	
Zaraza (2010)	não	7-10		10	
	não	11-18		21	
	não	adulto		23	
Córdova (2011)	não	9		9	
Dorji (2012)	não	9-10	80	13	
	não	adulto	83	31	
Lv (2014)	FSH	2		13	

Diante disso, a competência citoplasmática, bem como a competência meiótica parecem estar relacionadas ao tamanho do folículo (LONERGAN et al., 1994) e do oócito (HYTTEL et al., 1997). Alguns autores demonstraram que o oócito de animais jovens possuem apenas 118 μm de diâmetro (ERICKSON, 1966), porém estudos posteriores relataram que para os oócitos atingirem capacidade de desenvolvimento embrionário precisam obter 135 μm de diâmetro (FAIR et al., 1995; ARLOTTO et al., 1996). Outros estudos também sugeriram que oócitos oriundos de folículos inferiores a 2 mm são menos competentes para desenvolver-se a blastocisto do que os oócitos de folículos de diâmetro superior, podendo não se desenvolver além do estágio de oito células (PAVLOK; LUCAS-HAHN; NIEMANN, 1992). Embora existam relatos de que não há diferenças nas taxas de clivagem e blastocistos entre folículos menores ou maiores do que 4 mm (SENEDA et al., 2001), há indícios que folículos maiores do que 8 mm em animais pré-púberes apresentam maior competência para o desenvolvimento a blastocisto (KAUFFOLD et al., 2005).

Anormalidades como incapacidade de reassumir ou completar a maturação meiótica também estão associados à idade materna (ARMSTRONG, 2001). Fêmeas muito jovens parecem possuir menor capacidade de desenvolvimento embrionário quando comparadas às fêmeas púberes (REVEL et al., 1995; KHATIR et al., 1996; TANEJA et al., 2000; CAMARGO et al., 2005). A melhora nas variáveis relacionadas à competência oocitária (taxas de clivagem e blastocisto) parece acompanhar o aumento da idade da fêmea (PRESICCE et al., 1997; MAJERUS et al., 1999). Dessa forma, a idade da doadora é um importante fator que pode influenciar o potencial de desenvolvimento do oócito e a eficiência da PIVE (MAJERUS et al., 1999; ARMSTRONG, 2001).

Através da análise de microscopia eletrônica de transmissão foi possível avaliar os componentes estruturais e citoquímicos de oócitos de fêmeas jovens e adultas (DE PAZ et al., 2001). Nesse estudo, observou-se variação na distribuição de carboidratos presentes na membrana plasmática e nos vacúolos intracelulares, o que indica haver diferenças fisiológicas e químicas entre as categorias durante a maturação *in vitro*. Mudanças metabólicas nas células do cumulus / oócito podem ser mais ativas em pré-púberes devido ao maior número de gotas lipídicas nas células do cumulus, microvilos na superfície e número de vesículas de endocitose no citoplasma. Ainda, sugeriu-se que a função mitocondrial é prejudicada em fêmeas jovens devido ao número inferior de mitocôndrias existentes no citoplasma. Entretanto, não foram observadas diferenças na composição da zona pelúcida. Dessa forma,

diferenças ultraestruturais entre oócitos de fêmeas jovens e adultas podem refletir diretamente na produção de embriões.

Oócitos de fêmeas pré-púberes parecem possuir menor capacidade para desenvolvimento a blastocisto quando comparado às fêmeas púberes (KAJIHARA et al., 1991; LÉVESQUE; SIRARD, 1994; KHATIR et al., 1997; ZARAZA et al., 2010). Embora exista semelhança nas taxas de fertilização e clivagem entre essas categorias (REVEL et al., 1995; KHATIR et al., 1996), embriões de doadoras jovens possuem menor capacidade de desenvolver-se além de 16 células (SEIDEL et al., 1971; CAMARGO et al., 2005). Estudos sugerem que os possíveis mecanismos que reduzem o potencial de desenvolvimento do oócito de pré-púberes estão associados à alteração na síntese proteica, maturação citoplasmática incompleta ou atrasada e déficit metabólico (LONERGAN et al., 1994; DUBY et al., 1995; DAMIANI et al., 1996; DAMIANI; FISSORE; DUBY, 1998; GANDOLFI et al., 1998; STEEVES et al., 1999; SALAMONE et al., 2001).

3 HIPÓTESES

3.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE NOVILHAS PRÉ-PÚBERES DA RAÇA HOLANDESA

□ A produção *in vitro* de embriões de doadoras novilhas pré-púberes é **inferior** à de novilhas púberes, vacas lactantes e vacas não lactantes (Figura 1);

3.2 TAXA DE CONCEPÇÃO APÓS TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES ORIUNDOS DE NOVILHAS PRÉ-PÚBERES DA RAÇA HOLANDESA

□ A taxa de concepção das receptoras é **menor** quando os embriões são oriundos de doadoras novilhas pré-púberes, comparada aos embriões de novilhas púberes, vacas lactantes e vacas não lactantes (Figura 1).

Figura 1 - Modelo hipotético da produção *in vitro* e taxa de concepção de embriões conforme a categoria da doadora

4 OBJETIVO

Para testar as hipóteses, o presente estudo teve como objetivo avaliar a competência de desenvolvimento *in vitro* de oócitos aspirados de doadoras novilhas pré-púberes da raça Holandesa, comparativamente às novilhas púberes, vacas lactantes e vacas não lactantes. As seguintes variáveis foram analisadas:

- ☐ número de folículos antrais no dia da OPU
- ☐ proporção de folículos conforme o diâmetro
- ☐ número de oócitos totais e viáveis recuperados
- ☐ taxa de recuperação
- ☐ taxa de clivagem
- ☐ número de embriões produzidos por OPU
- ☐ taxa de blastocisto

Ainda, avaliar a taxa de concepção de receptoras cruzadas (*Bos taurus* x *Bos indicus*) após a transferência dos embriões oriundos das diferentes categorias de doadoras utilizadas no presente estudo.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 FAZENDA E ANIMAIS

O estudo avaliou 120 aspirações foliculares para posterior produção *in vitro* de embriões em fêmeas da raça Holandesa de quatro categorias animais (novilhas pré-púberes, PP; novilhas púberes, PU; vacas lactantes, VL e vacas não lactantes, VNL), totalizando 30 fêmeas por categoria. Os procedimentos foram realizados em uma propriedade de produção leiteira, localizada no município de Descalvado (Fazenda Santa Rita – Agrindus S/A), no estado de São Paulo. Toda PIVE foi realizada em parceria com a empresa Bioembryo Biotecnologia da Reprodução Animal Aplicada, sediada no município de Bauru / SP. Os dados foram coletados durante os meses de setembro a outubro, nos anos de 2012 e 2013, sendo todas as aspirações foliculares realizadas pelo mesmo médico veterinário (Tabela 2). Para todas as fertilizações *in vitro* foram utilizadas doses de sêmen sexado de um único touro e de mesma partida em ambos os anos.

Para a inclusão dos animais no experimento, foram respeitados critérios de seleção de acordo com cada categoria, incluindo idade e ciclicidade (novilhas), produção leiteira e dias em lactação (DEL; vacas lactantes) e período seco (vacas não lactantes). Assim, as novilhas pré-púberes utilizadas possuíam entre 8 e 10 meses de idade e abertura vaginal compatível com o tamanho da guia de aspiração folicular (70 x 50 mm). Novilhas púberes possuíam entre 12 e 14 meses, histórico de demonstração de estro e palpação retal que confirmou a presença de corpo lúteo e nenhuma inseminação prévia. As vacas lactantes estavam entre 130 e 180 DEL, com produção de leite diária mínima de $30 \pm 1,0$ kg e não receberam inseminação artificial prévia para serem utilizadas posteriormente no estudo. As vacas não lactantes apresentavam excelente histórico reprodutivo e período seco superior a 6 meses. Ainda, vacas lactantes e não lactantes utilizadas possuíam diagnóstico de ausência gestacional.

As vacas em lactação permaneceram em sistema confinado tipo *Free-stall*, enquanto novilhas e vacas não lactantes foram mantidas a pasto, recebendo suplementação de acordo com o manejo da propriedade. As fêmeas em lactação eram ordenhadas três vezes ao dia, com intervalo de aproximadamente 8 horas. Ambas as categorias (novilhas e vacas) receberam dietas balanceadas à base de silagem de milho e concentrado de milho e soja, suficientes para

atingir ou exceder os requerimentos nutricionais mínimos das respectivas categorias (NRC, 2001).

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Fêmeas das quatro categorias foram submetidas à OPU durante os meses de setembro a outubro, nos anos de 2012 e 2013 (Tabela 2). Para tal, foram realizadas três sessões de OPU em cada ano (S1, S2, S3 e S4, S5, S6, respectivamente), utilizando cinco animais de cada categoria por sessão (20 doadoras distintas em cada sessão), totalizando 60 aspirações foliculares em cada ano proposto (Figura 2).

Tabela 2 - Estatística descritiva relacionada às aspirações foliculares

Itens	Número
Total de OPU	120
Número de OPUs por Ano	
2012	60
2013	60
Número de OPUs por categoria animal	
Novilha pré-púbere	30
Novilhas púbere	30
Vaca lactante	30
Vaca não lactante	30
Número de touros	1

Figura 2 - Desenho esquemático do delineamento experimental. Fêmeas da raça Holandesa de quatro categorias animais foram submetidas à sessão *ovum pick-up* (OPU) concomitantemente. Descalvado, setembro a outubro de 2012 e 2013

5.3 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS

As novilhas foram avaliadas por meio de ultrassonografia transretal com probe linear de frequência 6,5 MHz (Mindray® DP 2200) 14 dias antes e no dia da aspiração folicular para estabelecer a existência (púberes) ou não de ciclicidade (pré-púberes), caracterizada pela presença de corpo lúteo (CL) em um dos ovários. Posteriormente à avaliação, a abertura vaginal dessas fêmeas foi estimada (70 x 50 mm). Vacas lactantes e não lactantes também foram avaliadas por meio de ultrassonografia transretal para confirmação de ausência gestacional (ausência de uma vesícula embrionária com um embrião viável) 14 dias antes do início do experimento.

5.4 ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRAFIA (OPU)

Os animais foram contidos em um brete e submetidos à anestesia epidural realizada no espaço sacrococcígeo (entre a última vértebra sacral e primeira coccígea) utilizando 3,0 (novilhas) a 5,0 mL (vacas) de lidocaína a 2% sem vasoconstritor (Lidovet®, Bravet). Após a perda dos reflexos da cauda, essa foi presa e procedeu-se a remoção manual das fezes da ampola retal e higienização mecânica da região perineal e vulva com água e secagem com papel toalha.

Em seguida, a probe microconvexa com frequência 5,0 MHz (Aloka SSD – 500) foi introduzida até o fundo de saco da vagina com o auxílio de uma guia de aspiração folicular (Guia de aspiração folicular, 70 x 50 mm, WTA, Brasil). No momento da OPU, os folículos aspirados foram quantificados e classificados de acordo com o diâmetro [folículos pequenos (FP = < 6 mm), folículos médios (FM = 6 a 10 mm) e folículos grandes (FG = > 10 mm)]. Todos os folículos visíveis (≥ 2 mm) foram puncionados. As punções foliculares foram realizadas utilizando-se um sistema com agulha descartável 40 x 10 mm (19 G, B-D) acoplado à linha de aspiração de teflon de 1,7 mm de diâmetro e 80 cm de comprimento (WTA, Watanabe Tecnologia Aplicada) e inserida na guia de aspiração folicular. Todo o sistema de aspiração foi submetido à pressão negativa entre 10 a 20 mL de água/minuto (85 a 90 mmHg) produzida por uma bomba de vácuo com aquecedor de tubo de 50 mL (WTA, Cravinhos, SP, Brasil).

Os folículos visíveis (≥ 2 mm) foram puncionados e o fluido contendo os oócitos foi colhido em tubo cônico de 50 mL (Corning), contendo 15 mL de PBS (DPBS; Nutricell Nutrientes Celulares®), suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB; Gibco Life Technologies) e 5,000 UI/mL de heparina sódica (Parinex®, Hypolabor) mantido a 35-37°C. O tubo de coleta foi conduzido ao laboratório de campo e o conteúdo aspirado foi vertido em filtro de coleta de embriões com malha de 75 μ m (WTA, Cravinhos) e lavado com o mesmo meio descrito anteriormente até 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 100 x 20 mm contendo DPBS acrescido de 1% de SFB a 37 °C para a realização da procura, lavagem, classificação e seleção dos CCOs (complexo *cumulus*-oócito) com auxílio de lupa estéreo microscópica (Nikon) com aumento de 8-20X.

Os CCOs foram morfológicamente classificados como viáveis ou inviáveis de acordo com as características citoplasmáticas do oócito e o número de camadas de células do cumulus. CCOs 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) foram considerados viáveis para a PIVE e utilizados nesse estudo. 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) e descartados desse estudo.

Os CCOs selecionados como viáveis foram acondicionados em criotubos plásticos de 1,5 mL (Corning) contendo meio TCM-199 (acrescido de 25 mM de HEPES, 10% de SFB, 49,4 µg/mL de Piruvato, 100 UI/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina) e mantidos em uma transportadora de oócitos a 35°C até a chegada ao laboratório de PIVE.

5.5 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

5.5.1 Maturação *in vitro*

Antes da maturação *in vitro*, os COCs foram lavados três vezes em HEPES-TCM-199, suplementado com 10% de SFB e 50 µg/mL de gentamicina e uma vez em meio de maturação, composto de bicarbonato tamponado TCM-199 (Gibco Life Technologies) suplementado com 10% de SFB, 50 µg/ml de hormônio luteinizante (LH; Ayerst, Rouses Point), 5 µg/ml de FSH (Folltropin, Vetrepharm, Vetrepharm, Belleville, ON, Canada), 0,1 µg/mL de estradiol (17β estradiol, Sigma-Aldrich Chemical Co.), 22 mg/mL de piruvato de sódio e 50 µg/mL de gentamicina. Os COCs de cada animal foram separadamente cultivados durante 24 h em gotas de 70 µl de meio de maturação sob óleo mineral estéril (D'Altomare, São Paulo, SP, Brasil), respeitando-se a relação de no máximo 20 COCs por gota. As placas foram mantidas em estufa durante 22 horas a 39° C sob atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

5.5.2 Fertilização *in vitro*

Uma hora antes do término do período de maturação, o sêmen sexado (mesma partida de touro da raça Holandês Preto e Branco de fertilidade conhecida) começou a ser preparado para seu uso na fecundação *in vitro*. As palhetas de sêmen de 0,25 mL foram descongeladas em banho-maria a 35°C por 30 segundos e centrifugadas a 1200 rpm por 30 minutos em gradiente de Percoll (45 e 90%), para obtenção dos espermatozóides móveis e remoção do

diluidor e do plasma seminal. O *pellet* formado foi pipetado, tomando-se o cuidado de retirar o máximo possível do Percoll, e seu volume foi calculado. Cinco μL deste *pellet* foram colocados em um microtubo com 250 μL de água para avaliação da concentração espermática em Câmara de Neubauer; outros 5 μL foram depositados em um microtubo com 250 μL de meio FIV (TALP acrescido de heparina, piruvato, gentamicina, BSA-FAF, LH e solução de PHE), para observação da motilidade espermática em microscópio óptico. A partir destes dados (motilidade final, concentração de espermatozóides e volume do pellet) foi realizado o cálculo para a diluição do sêmen em meio FIV, de modo que a dose inseminante fosse de 2 milhões de espermatozoides / mL.

Durante a centrifugação do sêmen, a placa de maturação foi retirada da estufa para lavagem dos COCs em gotas de 200 μL de meio FIV. Os oócitos foram transferidos para a placa de FIV em gotas de 70 μL de meio FIV cobertas com óleo mineral. A deposição da dose inseminante (5 μL de sêmen) foi realizada em cada gota e as placas foram mantidas em estufa por 20 horas, sob as mesmas condições de atmosfera, umidade e temperatura empregadas para a MIV.

5.5.3 Cultivo in vitro

Após o período de fecundação, as estruturas foram transferidas para placa contendo gotas de 100 μL de hialuronidase 2%, onde foram desnudadas com auxílio de pipeta para retirada total das células do cumulus. Após o total desnudamento dos presumíveis zigotos, estes foram lavados em meio CR4 acrescido de 10% SFB e co-cultivados em uma monocamada de células da granulosa em gotas de 50 μL contendo o mesmo meio e cobertas com óleo mineral. As placas de cultivo foram mantidas a 38,5°C com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

5.5.4 Feeding e avaliação da taxa de desenvolvimento embrionário

As renovações de 50% do meio (*feeding*) foram realizadas 72 e 144 horas pós-fecundação. Três (D3) e sete (D7) dias pós-fecundação foram avaliadas as taxas de clivagem (número de estruturas clivadas no D3 / número de oócitos viáveis) e de blastocisto (número de blastocistos no D7 / número de oócitos viáveis). Os embriões foram avaliados morfológicamente e classificados de acordo com os padrões da IETS (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998).

5.6 MANEJO REPRODUTIVO DAS RECEPTORAS

Foram utilizadas como receptoras para os embriões vacas cruzadas ($n = 191$; *B. taurus* x *B. indicus*). As receptoras foram submetidas a protocolo de observação de estro, previamente estabelecido (RODRIGUES et al., 2010), para posterior transferência de embrião (TE). A TE foi realizada no D6, D7 ou D8 após observação do estro. Imediatamente antes da TE, todas as receptoras foram avaliadas por meio de palpação retal para verificar a presença, tamanho e quantidade (1 e ≥ 2) de CL, sendo que apenas os animais com pelo menos um CL receberam embrião (HANZEN et al., 2000). Todos os embriões foram transferidos a fresco, pelo mesmo médico veterinário através do método não cirúrgico para o corno uterino ipsilateral ao CL.

5.7 DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 53 dias após a TE ($60 \pm 1,0$ dia após estro presumido) por palpação retal. A prenhez foi caracterizada pela presença de uma assimetria entre os cornos uterinos, detecção da vesícula amniótica e palpação da membrana alanto-cório. A taxa de concepção foi calculada com base na proporção de vacas prenhes no diagnóstico de gestação com relação ao número de fêmeas que receberam um embrião.

5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de produção *in vitro* de embriões foram analisados utilizando o procedimento GLIMMIX do SAS 9.3 (Statistical Analysis Software, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Para a análise, a distribuição binomial foi assumida para as variáveis resposta categóricas. Os dados contínuos foram analisados para normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias utilizando “Guided Data Analysis”, e transformados quando necessário. Para cada variável resposta, a categoria animal foi considerada efeito fixo e o efeito de sessão de aspiração foi considerado como efeito aleatório no modelo estatístico.

As variáveis resposta foram número de folículos totais, número de oócitos recuperados, proporção de folículos de acordo com o tamanho [número de pequenos (< 6 mm), médios (6 a 10 mm) ou grandes (> 10 mm) / número de folículos totais], taxa de recuperação (número de CCOs recuperados / número de folículos aspirados), número e taxa de oócitos viáveis (número de oócitos viáveis / número de oócitos totais), número de oócitos viáveis de acordo com a classificação de grau de qualidade (I, II e III), número de oócitos atresícos e desnudos, taxa de clivagem (número de embriões clivados / número de oócitos viáveis), taxa de blastocisto (número de blastocistos produzidos / número de oócitos viáveis) e número de embriões por sessão de aspiração folicular.

A proporção de receptoras que estabeleceram gestação após a transferência dos embriões foi expressa em porcentagem e a comparação das taxas de prenhez entre os grupos experimentais foi realizada pelo teste exato de Fisher.

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média ou em porcentagem. Para o nível de significância menor que 0,05 ($P < 0,05$) considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis para uma determinada resposta.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE NOVILHAS PRÉ-PÚBERES DA RAÇA HOLANDESA

A eficiência da PIVE é estritamente relacionada à população de folículos presente nos ovários das doadoras. Relatos na literatura são indicativos de que fêmeas bovinas apresentam mudanças ao longo da vida quanto ao número de folículos visualizados, sendo observada quantidade máxima de folículos de 2 a 4 meses de idade (RAWLINGS et al., 2003), ocorrendo declínio até os 8 meses e constância até a senescência (DESJARDINS; HAFS, 1969; ADAMS et al., 1994). Assim como o presente estudo ($P = 0,08$; Tabela 2), Zaraza (2010) verificaram semelhança entre as categorias de novilhas pré-púberes (7 a 10 meses); novilhas púberes (11 a 18 meses) e vacas não lactantes quanto ao número de folículos aspirados e de oócitos recuperados. Diante disso, sugere-se que novilhas pré-púberes de 8 a 10 meses apresentam semelhante população folicular ovariana quando comparada aos animais adultos. Portanto, a utilização de novilhas pré-púberes de 8 a 10 meses pode ser uma alternativa para acelerar o ganho genético dos rebanhos quando submetidas aos programas de OPU-PIVE.

Verificou-se que novilhas pré-púberes apresentam maior proporção de folículos pequenos (< 6 mm; $P < 0,0001$; Figura 3) e menor proporção de folículos médios (6 a 10 mm; $P < 0,0001$; Figura 3) quando comparadas às demais categorias. Estudos foram indicativos de que fêmeas jovens apresentam ondas de crescimento folicular com menor período de duração e dominância do que as fêmeas adultas (EVANS; ADAMS; RAWLINGS, 1994). A redução da duração da onda de crescimento folicular proporciona diminuição do intervalo entre o recrutamento dos folículos (pico de FSH e início da onda). Dessa forma, como as aspirações foliculares do presente estudo foram realizadas sem sincronização prévia da onda de crescimento folicular, havia maior probabilidade de existir elevada proporção de folículos com diâmetro inferior a 6 mm na categoria de novilhas pré-púberes.

Tabela 3 – Sumário da quantidade de folículos aspirados, oócitos e embriões obtidos após OPU-PIVE em doadoras novilhas pré-púberes, púberes, vacas lactantes e não lactantes da raça Holandesa. Dados apresentados em porcentagem e média $\pm$ erro padrão médio

	Novilhas			Vacas		Valor de P
	Pré-púbere	Púbere	Lactante	Não lactante		
No.	30	30	30	30		.
Total de folículos aspirados	18,3 $\pm$ 2,1	17,3 $\pm$ 1,2	14,0 $\pm$ 1,0	17,7 $\pm$ 1,7		0,08
Total CCO recuperados ¹	14,2 $\pm$ 2,2	13,1 $\pm$ 1,1	9,8 $\pm$ 1,1	14,6 $\pm$ 1,7		0,12
Taxa de recuperação, % ²	77,6 ^a (427/550)	75,9 ^{ab} (394/521)	69,8 ^b (293/420)	74,1 ^{ab} (440/592)		0,04
CCO viáveis	10,5 $\pm$ 1,8 ^{ab}	8,3 $\pm$ 0,8 ^{ab}	6,5 $\pm$ 0,9 ^b	11,5 $\pm$ 1,4 ^a		0,03
CCO atresícos	2,0 $\pm$ 0,3	1,9 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,3		0,34
CCO desnudos	1,8 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,7	1,8 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,3		0,15
Taxa de clivagem, % ³	68,6 ^b (217/316)	98,8 ^a (248/252)	87,6 ^a (176/197)	90,1 ^a (325/361)		< 0,0001
Embriões produzidos por OPU	0,5 $\pm$ 0,2 ^b	1,1 $\pm$ 0,2 ^b	1,2 $\pm$ 0,4 ^b	4,2 $\pm$ 0,6 ^a		< 0,0001
Taxa de blastocisto, % ⁴	4,8 ^c (15/315)	12,7 ^b (31/248)	18,0 ^b (35/194)	36,5 ^a (125/378)		< 0,0001

¹ CCO: complexo cumulus-oócito; ² N°. CCOs totais / N°. CCOs viáveis; ³ N°. embriões clivados / N°. CCOs viáveis; ⁴ N°. blastocistos / N°. CCOs viáveis. Letras minúsculas diferentes ^(a, b e c) na mesma linha diferem entre categoria (P < 0,05).

Figura 3 - Proporção de folículos pequenos (< 6 mm), médios (6 a 10 mm) e grandes (> 10 mm) imediatamente antes da OPU em doadoras novilhas pré-púberes (n = 30), púberes (n = 30), vacas lactantes (n = 30) e não lactantes (n = 30) da raça Holandesa. Dados apresentados em porcentagem

Após o processo de aspiração folicular, verificou-se que novilhas pré-púberes obtiveram taxa de recuperação de CCO superior às vacas lactantes ($P = 0,04$; Tabela 3), sendo as novilhas púberes e vacas não lactantes intermediárias. Esse resultado pode ter sido verificado devido a maior proporção de folículos pequenos observado em novilhas pré-púberes. Estudos prévios reportaram que a punção de folículos menores favorece a recuperação durante a aspiração folicular devido ao reduzido volume e viscosidade do líquido folicular e menor pressão intra-folicular dos folículos pequenos (SENEDA et al., 2001; VIEIRA et al., 2014a).

Não foi observado efeito da categoria animal no número total de oócitos recuperados ($P = 0,12$; Tabela 3). Verificou-se que novilhas pré-púberes não diferem das demais categorias quanto ao número de oócitos viáveis (Tabela 3) e número de oócitos viáveis classificados por qualidade (Figura 4). Já a taxa de oócitos viáveis foi semelhante apenas entre novilhas pré-púberes, vacas lactantes e não lactantes (Figura 5). Entretanto, vacas lactantes apresentam quantidades inferiores de oócitos viáveis ($P = 0,03$; Tabela 3) e taxa de oócitos viáveis ($P < 0,0001$; Figura 5) comparadas às vacas não lactantes. Diante disso, considerando que as doadoras lactantes foram submetidas ao processo de OPU com 130-180 de DEL, sugere-se que a lactação pode ser um fator intrínseco responsável por um estado metabólico peculiar mesmo após o pico de lactação (60 a 100 dias; KAWASHIMA et al., 2012). Esse perfil metabólico é caracterizado por altas concentrações de ácidos graxos não esterificados (AGNES) e β -hidroxibutirato (BHBA) que afetam o ambiente intrafolicular (SARTORI et al.,

2002, 2004; LEROY, 2005; LEROY et al., 2008; WALSH; WILLIAMS; EVANS, 2011) e por um estado transitório de resistência à insulina (SARTORI et al., 2014; Sales, 2011), que reduzem a qualidade oocitária, comprometendo a eficiência reprodutiva após IA (DEMETRIO et al., 2007; BARUSELLI et al., 2012) e após programas de OPU (VIEIRA et al., 2014a).

Figura 4 - Média de oócitos viáveis obtidos após OPU e classificados de acordo com a qualidade em grau I, II e III de doadoras novilhas pré-púberes, púberes, vacas lactantes e não lactantes da raça Holandesa

Figura 5 - Taxa de oócitos viáveis (N° oócitos viáveis / n° de oócitos totais) em doadoras novilhas pré-púberes, púberes, vacas lactantes e não lactantes da raça Holandesa submetidas à OPU. Dados apresentados como porcentagem

Não foram verificadas diferenças nas taxas de oócitos viáveis entre novilhas pré-púberes e vacas não lactantes (Figura 5). Sales (2011) relatou 74,1% de oócitos viáveis provenientes de aspirações intrafoliculares de vacas Holandesas não lactantes alimentadas

com dieta de manutenção ou alta energia. Gimenes (2015) também observou 60-68% de oócitos viáveis quando novilhas púberes da raça Holandesas foram submetidas à OPU em diferentes dias após o início de um protocolo de sincronização da emergência da onda de crescimento folicular. Esses achados foram semelhantes aos do presente estudo.

Relatos consistentes na literatura sugerem não haver diferença entre doadoras pré-púberes e púberes quanto à taxa de clivagem dos embriões (REVEL et al., 1995; MERMILLOD et al., 1996; KHATIR et al., 1997; CAMARGO et al., 2005; ZARAZA et al., 2010). Contudo, no presente estudo foi observada taxa de clivagem inferior em doadoras pré-púberes quando comparado às demais categorias ($P < 0,0001$; Tabela 3). Corroborando esses dados, baixas taxas de clivagem em novilhas pré-púberes foram relatadas por Majerus (1999), Palma (2001) e Dorji (2012). Presicce (1997) sugeriram que a competência de clivagem de oócitos de novilhas pré-púberes inicia-se aos 9 meses de idade e atingem capacidade plena após a puberdade. Dessa forma, taxas de clivagem inferiores podem ser decorrentes das baixas taxas de maturação oocitária encontradas em fêmeas pré-púberes (PALMA et al., 1993; DUBY et al., 1995; DAMIANI et al., 1996).

As primeiras divisões celulares do embrião bovino são reguladas pelo RNAm materno e proteínas acumuladas pelo oócito previamente à retomada da meiose (TELFORD; WATSON; SCHULTZ, 1990). Esse período é marcado pela transição materno-zigótica (estágio de oito células), no qual embriões incompetentes são bloqueados devido à incapacidade de ativação do genoma embrionário (SIRARD et al., 2006). Essa menor capacidade de desenvolvimento que impede o embrião de atingir o estágio de 8 a 16 células (Dia 3 – avaliação da taxa de clivagem) pode ser decorrente a defeitos na aquisição de competência que ocorre concomitantemente com crescimento oocitário e folicular. Estudos indicam que o diâmetro do oócito está diretamente associado a sua capacidade em atingir o estágio de metáfase II (FAIR; HYTTEL; GREVE, 1995) e sustentar o desenvolvimento embrionário (OTOI et al., 1997). Dessa forma, as baixas taxas de clivagem observadas no presente estudo podem estar relacionadas ao tamanho inferior dos oócitos de pré-púberes (112-118 μm) quando comparado aos animais púberes (117-123 μm ; GANDOLFI et al., 1998).

Com relação à produção de embriões, novilhas pré-púberes apresentaram menor número de embriões viáveis por sessão de OPU do que vacas não lactantes, porém não diferiram das demais categorias ($P < 0,0001$; Tabela 3). Menores taxas de produção de blastocistos também foram observadas em doadoras pré-púberes ($P < 0,0001$; Figura 6). Ainda, verificou-se que vacas não lactantes possuem superiores taxas de blastocistos quando

comparadas às demais categorias. Semelhantemente, outros estudos reportaram que a superestimulação e produção de embriões *in vivo* (SARTORI et al., 2002; SARTORI; BASTOS; WILTBANK, 2010) e *in vitro* (VIEIRA et al., 2014a) é mais eficiente quando vacas não lactantes foram utilizadas como doadoras. Assim como discutido anteriormente, a lactação altera o estado metabólico do animal e esse fator pode explicar parcialmente os melhores resultados obtidos na PIVE em vacas não lactantes.

Figura 6 - Taxa de blastocistos (N° de blastocistos / n° de oócitos viáveis) após PIVE em doadoras novilhas pré-púberes, púberes, vacas lactantes e não lactantes da raça Holandesa. Dados apresentados como porcentagem

Verificou-se que as taxas de blastocistos não diferiram entre novilhas púberes e vacas lactantes (Tabela 3). Estudos foram indicativos de que a competência oocitária é similar entre novilhas Holandesas imediatamente antes e depois de atingirem a puberdade (próximo aos 12 meses de idade; Majerus et al., 1999). Outros autores sugeriram que novilhas cruzadas já começam a apresentar taxas de blastocistos semelhantes às vacas a partir dos 9 meses de idade (Camargo et al., 2005). Entretanto, Presicce (1997) observaram que oócitos de fêmeas pré-púberes da raça Holandesa adquirirem competência de desenvolvimento e produzem taxas de blastocistos mais próximas aos adultos quando as novilhas atingem 11 meses de idade. Esses dados da literatura corroboram os encontrados no presente estudo, no qual se observou taxas de blastocistos de novilhas púberes semelhante à de vacas em lactação.

Apesar da baixa eficiência, o uso de oócitos de fêmeas jovens em programas de PIVE tem considerável potencial para reduzir o intervalo de geração dos rebanhos (LOHUIS, 1995; ARMSTRONG; KOTARAS; EARL, 1997). Estudos mostram que oócitos de fêmeas pré-

púberes são capazes de serem maturados e fertilizados *in vitro* assim como os de animais adultos, porém a produção de blastocistos também foi inferior (REVEL et al., 1995; KHATIR et al., 1996; PRESICCE et al., 1997; PALMA; TORTONESE; SINOWATZ, 2001; ZARAZA et al., 2010; CÓRDOVA et al., 2011). Dados semelhantes também são observados em outras espécies como suínos (KOENIG; STORMSHAK, 1993), caprinos (MOGAS et al., 1997) e ovinos (LEDDA et al., 1997).

Apesar do progresso obtido com o passar dos anos, a taxa de blastocistos de doadoras pré-púberes ainda é inferior a de doadoras púberes (KAJIHARA et al., 1991; KUWER; LEMME; NIEMANN, 1999; ZARAZA et al., 2010). Kathir (1997) sugeriram que a baixa competência oocitária de fêmeas jovens não está associada ao fluido folicular, mesmo existindo diferenças entre doadoras pré-púberes e púberes quanto ao perfil proteico. Dessa forma, possíveis mecanismos que reduzem o potencial de desenvolvimento oocitário e embrionário de animais jovens podem ser propostos: tamanho reduzido do folículo e do oócito (descrito anteriormente), alterações ultraestruturais, maturação citoplasmática deficiente, metabolismo debilitado (oócito / embrião) e alteração na síntese proteica (oócito / embrião; LONERGAN et al., 1994; GANDOLFI et al., 1998; STEEVES et al., 1999; DE PAZ et al., 2001; SALAMONE et al., 2001).

Oócitos oriundos de folículos de pequeno diâmetro podem apresentar redução da competência de desenvolvimento (LONERGAN et al., 1994; ARLOTTO et al., 1996) e comprometer a eficiência da PIVE. Dados na literatura sugerem que as alterações moleculares e transcriptômicas que serão necessárias para o oócito iniciar e concluir a meiose parecem ocorrer mais intensamente durante as fases finais do crescimento folicular (GANDOLFI; GANDOLFI, 2001; SIRARD, 2012; LABRECQUE; SIRARD, 2014). Nesse sentido, outros estudos confirmaram que oócitos oriundos de folículos com diâmetro superior a 6 mm desenvolvem-se com maior competência a blastocisto quando comparado aos folículos entre 2 a 6 mm de diâmetro (LONERGAN et al., 1994). Resultados semelhantes foram relatados em animais pré-púberes após superestimulação, quando folículos maiores que 8 mm foram utilizados para PIVE (KAUFFOLD et al., 2005). Essa melhora na competência oocitária pode ser justificada pelos diferentes perfis de expressão gênica observados em folículos de tamanhos diferentes (MOUROT et al., 2006). No presente experimento foi verificado que novilhas pré-púberes apresentam maior proporção de folículos pequenos e menor proporção de folículos médios, o que pode justificar em parte a baixa taxa de blastocistos em novilhas pré-púberes.

Diferenças nos componentes estruturais e citoquímicos observadas entre oócitos de animais jovens e adultos vão determinar papel essencial na qualidade e desenvolvimento do embrião (DUBY et al., 1995; DAMIANI et al., 1996; DAMIANI; FISSORE; DUBY, 1998a; GANDOLFI et al., 1998; SALAMONE et al., 2001). De Paz (2001) relataram existir variação entre essas categorias quanto à distribuição de carboidratos presentes na membrana plasmática e nos vacúolos intracelulares dos oócitos, o que sugere haver diferenças fisiológicas e químicas entre essas categorias durante a maturação. Os mesmos autores, também relataram que o transporte de metabólitos entre as células do cumulus / oócito pode ser mais ativo em pré-púberes devido ao maior número de estruturas como gotas lipídicas nas células do cumulus, microvilos na superfície do oócito e vesículas de endocitose no citoplasma. Ainda, os autores também relataram que a síntese energética pode estar prejudicada em fêmeas jovens devido ao número inferior de mitocôndrias existentes no ooplasma. Essas alterações presentes nos oócitos de fêmeas jovens podem estar associadas à reduzida capacidade de desenvolvimento a blastocisto apresentado por essa categoria no presente estudo.

Através da transferência nuclear foi possível confirmar que as diferenças morfológicas verificadas entre oócitos de doadoras jovens e adultas acarretam em deficiências ooplasmáticas (MERMILLOD; RENARD; HEYMAN, 1996). Estudos sugerem que a menor capacidade de desenvolvimento oocitário de fêmeas pré-púberes pode ser atribuída ao atraso na migração de organelas durante a maturação *in vitro*, ao influxo de cálcio deficiente após a fertilização (DAMIANI et al., 1996) e a reduzida expressão de proteínas (LÉVESQUE; SIRARD, 1994; GANDOLFI et al., 1998; SALAMONE et al., 2001). Outros autores também relatam haver menor atividade de fatores que iniciam e finalizam a meiose nos oócitos dessa categoria (DAMIANI; FISSORE; DUBY, 1998b). Assim, mesmo apresentando taxas de maturação meióticas semelhante aos adultos, alterações observadas na maturação citoplasmática oocitária em doadoras pré-púberes prejudicam a eficiência da PIVE nessa categoria.

A capacidade de desenvolvimento oocitário é dependente de aporte energético adequado. A glicose entra nas células através do auxílio de transportadores (GLUTs 1-8; PANTALEON; KAYE, 1998; AUGUSTIN et al., 2001). No entanto, estudos em ratos relatam que o IGF-I (Fator de crescimento semelhante à insulina - 1) e GH (Hormônio do crescimento) podem afetar a expressão de RNAm GLUT-1 e consequentemente, a captação de glicose pelos embriões (ZHOU; BIEVRE; BONDY, 2000). Oropeza (2004) observaram que a aplicação intraovariana de IGF-I em pré-púberes promove condições oocitárias favoráveis para estimular posteriormente a transcrição de GLUT-1 durante a ativação do

genoma embrionário. Nesse estudo, os embriões que apresentavam maior expressão de RNAm para GLUT-1 foram associados a maior proporção de embriões que progrediram para o estágio de blastocisto. Diante disso, esses autores sugeriram que os oócitos de doadoras pré-púberes parecem possuir deficiência na expressão de transportadores de glicose e insuficiente tradução proteica, o que pode justificar parcialmente as baixas taxas de clivagem verificadas no presente estudo nessa categoria.

Embriões bovinos aumentam significativamente a captação de glicose durante o estágio de 8 a 16 células (TELFORD; WATSON; SCHULTZ, 1990; RIEGER; LOSKUTOFF; BETTERIDGE, 1992). Há indícios de que a diminuição do transporte de glicose durante esse início do desenvolvimento embrionário está associada à programação da morte celular pela ativação da cascata de apoptose (RILEY; MOLEY, 2006). Estudos relatam haver quantidades superiores de apoptose no núcleo de embriões de doadoras pré-púberes quando comparado aos animais adultos (ZARAZA et al., 2010). A baixa expressão de GLUT-8 verificada nos oócitos das fêmeas pré-púberes pode justificar a alta incidência de apoptose observada no núcleo dos blastocistos dessa categoria. Ainda, com o aumento da idade a proporção de apoptose diminuiu e a capacidade de desenvolvimento dos oócitos melhorou. Diante disso, sugere-se que as menores taxas de blastocistos observadas em novilhas pré-púberes quando comparadas às púberes verificadas no presente estudo, podem estar parcialmente associadas à quantidade de células apoptóticas presente no núcleo dos embriões.

Mecanismos moleculares envolvidos na competência de desenvolvimento a blastocisto podem ser explicados pela avaliação do perfil de expressão gênica. Estudos sugerem haver diferença na expressão de 416 genes entre os oócitos de doadoras jovens e adultas (PATEL et al., 2007). Quanto ao embrião, etapas biológicas como primeira clivagem, ativação do genoma embrionário, compactação e blastulação (8 a 16 células) requererem eficiente expressão de genes maternos e / ou do genoma embrionário (TONG et al., 2000). Dorji (2012) sugeriram que embriões de doadoras pré-púberes apresentam disfunção mitocondrial devido a reduzida quantidade de RNAm e expressão proteica de COX5 (subunidade de COX – enzima da cadeia respiratória na mitocôndria), que resulta no aumento da apoptose no estágio de 8 a 16 células. Também foi verificado *down regulation* nos receptores de IGF-1R (mediador da ação de IGF-I e II no desenvolvimento embrionário inicial). Essas alterações podem contribuir para menor competência de desenvolvimento dos embriões verificada em animais jovens.

6.2 TAXA DE CONCEPÇÃO DE RECEPTORAS CRUZADAS APÓS TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES ORIUNDOS DE NOVILHAS PRÉ-PÚBERES DA RAÇA HOLANDESA

A taxa de concepção das receptoras que receberam embriões produzidos *in vitro* originados de doadoras novilhas pré-púberes foi inferior à taxa observada após transferência de embriões originados de vacas lactantes e não lactantes ($P < 0,05$; Figura 7). Entretanto, essa taxa de concepção foi semelhante quando comparada aos embriões oriundos de novilhas púberes. Esses dados confirmam parcialmente a hipótese inicial do presente estudo. Da mesma forma, outros autores também verificaram baixa taxa de concepção de receptoras da raça Holandesa quando embriões de novilhas púberes produzidos *in vivo* foram transferidos, sugerindo que essa categoria pode ser menos eficiente em programas de TE (VIEIRA et al., 2014b). No presente estudo, a taxa de concepção de embriões produzidos *in vitro* originados de vacas lactantes e não lactantes foi semelhante. Outros autores Chebel; Demétrio; Metzger (2008) e Maillo (2012) também reportaram taxas de concepção semelhantes em receptoras que receberam embriões produzidos *in vivo* oriundos de vacas lactantes e não lactantes. Vale ressaltar que, apesar do reduzido número de embriões por sessão de OPU observado em doadoras lactantes, os embriões dessa categoria produziram taxas de concepção de 28,6% nas receptoras. Portanto, embriões oriundos de doadoras lactantes e não lactantes da raça Holandesa apresentam a mesma eficiência em estabelecer a gestação em receptoras cruzadas.

Figura 7 - Taxa de concepção de receptoras cruzadas após transferência de embriões de doadoras novilhas pré-púberes, púberes, vacas lactantes e não lactantes da raça Holandesa. Dados apresentados como porcentagem

Embriões de doadoras jovens não diferem de animais adultos quanto ao tamanho e tempo de formação, porém sua competência de desenvolvimento após a transferência em receptoras parece ser comprometida (REVEL et al., 1995). Os dados na literatura mostram que as taxas de concepção dos embriões de doadoras pré-púberes após transferência variam entre 5-50% (REVEL et al., 1995; ARMSTRONG et al., 1997; EARL et al., 1998; FRY, 1998; MAJERUS et al., 1999; TANEJA et al., 2000). Ainda, esses estudos relatam haver elevada perda gestacional no primeiro trimestre de gestação, podendo ser duas vezes maior do que embriões originados de fêmeas adultas (30-100%; ARMSTRONG et al., 1994; REVEL et al., 1995; FRY, 1998). Diante disso, o diagnóstico de gestação tardio realizado no presente estudo (60 dias de gestação) pode ter comprometido a avaliação da taxa de prenhez das receptoras que receberam os embriões das novilhas pré-púberes devido às altas taxas de perda gestacional precoce verificada nessa categoria.

Por fim, o presente estudo apresentou algumas limitações quanto a análise da taxa de concepção devido ao número reduzido de embriões produzidos pelas doadoras novilhas pré-púberes ($n = 15$). A quantidade reduzida de embriões pode ser justificada pela dificuldade de produção de embriões *in vitro* nas categorias mais jovens. Ainda, é importante reforçar que a taxa de concepção do grupo de receptoras com embriões de doadoras pré-púberes pode ter sido prejudicada pelo fato do diagnóstico de gestação ter sido realizado tardiamente (60 dias após a TE), sendo necessária a antecipação do mesmo em estudos posteriores. Assim, não se permite concluir que os embriões de animais jovens são incapazes de estabelecer uma gestação em receptoras cruzadas. Diante disso, novos estudos prospectivos devem ser realizados para confirmar essa informação utilizando maior número de embriões oriundos de doadoras pré-púberes.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo confirmam a hipótese de que a taxa de produção de blastocisto de novilhas pré-púberes é inferior às novilhas púberes, vacas lactantes e não lactantes.

A hipótese de que a taxa de concepção das receptoras é menor quando os embriões são oriundos de doadoras novilhas pré-púberes foi parcialmente confirmada. A taxa de concepção de embriões de novilhas pré-púberes foi inferior a de vacas lactantes e não lactantes. Entretanto, foi semelhante a de novilhas púberes.

Portanto, com base nos resultados do presente estudo pode-se concluir que:

- novilhas pré-púberes apresentam número de folículos aspirados semelhante às demais categorias.
- a proporção de folículos pequenos foi superior e a de folículos médios foi inferior em novilhas pré-púberes.
- o número de oócitos totais recuperados não diferiu entre as categorias.
- novilhas pré-púberes possuem quantidade semelhante de oócitos viáveis quando comparadas às outras categorias. Entretanto, vacas lactantes possuem menor quantidade de oócitos viáveis que as vacas não lactantes.
- a taxa de recuperação oocitária foi superior em novilhas pré-púberes quando comparadas às vacas lactantes, não diferindo das demais categorias.
- a taxa de oócitos viáveis foi semelhante em novilhas pré-púberes, vacas lactantes e vacas não lactantes. Entretanto, foi superior às novilhas púberes. Ainda, vacas não lactantes apresentaram taxa de oócitos viáveis superior às novilhas púberes e vacas lactantes.
- a taxa de clivagem foi inferior em novilhas pré-púberes comparada às novilhas púberes, vacas lactantes e vacas não lactantes. Ainda, verificou-se que vacas não lactantes possuíram taxa de clivagem superior às demais categorias.
- novilhas pré-púberes apresentaram menor número de embriões produzidos por sessão de aspiração quando comparadas às vacas não lactantes. Entretanto, não diferiram das demais categorias.
- novilhas pré-púberes apresentaram a menor taxa de produção de blastocisto. Ainda, verificou-se que vacas não lactantes possuíram taxa de blastocisto superior às demais categorias.

- embriões originados de doadoras novilhas pré-púberes apresentaram menor taxa de concepção que embriões originados de vacas lactantes e não lactantes. Entretanto, a taxa de concepção foi semelhante quando comparado aos embriões originados de novilhas púberes.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS

A necessidade de maximizar a produção agropecuária para suprir a demanda alimentícia futura é eminente, porém a pecuária leiteira brasileira ainda apresenta baixa eficiência. Esse importante incremento na produtividade está diretamente associado à melhora do manejo e a implantação de biotecnologias da reprodução nas fazendas leiteiras. Diante disso, a utilização de doadoras pré-púberes tem considerável potencial para acelerar o ganho genético através da redução do intervalo de geração dos rebanhos (LOHUIS, 1995). Entretanto, os dados do presente estudo sugerem que animais jovens apresentam baixa eficiência para PIVE (Figura 9).

Visto a importância dessa categoria para o melhoramento genético, estudos prospectivos adicionais são necessários para o desenvolvimento de métodos que auxiliem a melhora na produção *in vitro* de embriões em novilhas pré-púberes da raça Holandesa. O protocolo de sincronização da ovulação associado à superestimulação previamente a OPU, pode ser uma ferramenta para melhorar a técnica, uma vez que o FSH promove aumento do tamanho e número de folículos visíveis, sincroniza o estágio de desenvolvimento folicular e aumenta a competência oocitária (ARMSTRONG, 2001). Estudos observaram que taxas de blastocistos de 19% foram obtidas quando novilhas com 8 meses de idade foram superestimuladas previamente a OPU (LOONEY et al., 1995). Posteriormente, outros autores sugeriram que a utilização de FSH poderia dobrar a taxa de blastocistos em novilhas de 9 meses de idade (PRESICCE et al., 1997). Esse incremento pode ser justificado pela alteração epigenética promovida pela aplicação de FSH, que altera o status epigenético do oócito de animais jovens mantendo-o semelhante aos dos adultos (DIEDERICH et al., 2012).

A utilização de bezerras como doadoras de oócitos pode ser uma alternativa para promover redução no intervalo de geração dos rebanhos de forma ainda mais acentuada do que novilhas pré-púberes. Estudos relataram sucesso na PIVE quando bezerras foram superestimuladas com FSH previamente a OPU, observando taxa de produção de blastocistos semelhante a animais adultos (ARMSTRONG et al., 1992; 1994; EARL et al., 1998; LV et al., 2014). Entretanto, outros autores sugeriram haver baixa eficiência na produção de blastocistos quando oócitos de fêmeas muito jovens foram utilizados (KAJIHARA et al., 1991; LOONEY et al., 1995; REVEL et al., 1995; DAMIANI et al., 1996), mesmo tratadas com FSH. Diante disso, estudos prospectivos são necessários para confirmar tais informações.

Por fim, devido ao comprometimento na competência de desenvolvimento embrionário de doadoras jovens (Figura 10), modificações no sistema de produção *in vitro* de embriões podem ser realizadas. Durante o cultivo *in vitro* (CIV), ocorrem danos celulares causados por ação dos radicais livres produzidos pelas células, devido às elevadas concentrações de oxigênio presente no meio de cultivo (CHWA et al., 2006). Assim, agentes antioxidantes são importantes para diminuir o estresse oxidativo e otimizar a produção de embriões. Estudos recentes sugeriram que a adição ao meio de cultivo de agentes antioxidantes como ácido ascórbico, cisteamina, polifenol bioativo pode aumentar o potencial de desenvolvimento de oócitos de fêmeas jovens ao estágio de blastocisto (TATEMOTO et al., 2001; CÓRDOVA et al., 2010; MERTON et al., 2013; DELL'AQUILA et al., 2014; LV et al., 2014). Outros autores também observaram efeito positivo na capacidade de desenvolvimento oocitário quando leptina foi acionada ao meio de maturação (JIA et al., 2014). Dessa forma, melhorar a suplementação dos meios de cultivo da PIVE pode promover incremento na eficiência da produção de embriões em doadoras pré-púberes.

Figura 8 - Modelo hipotético da resposta à aspiração folicular, PIVE e taxa de concepção de embriões produzidos a partir de doadoras da raça Holandesa de categorias distintas

Figura 9 - Modelo hipotético dos possíveis fatores envolvidos na baixa competência de desenvolvimento embrionário de doadoras novilhas pré-púberes da raça Holandesa. Adaptado, De Paz (2001).

REFERÊNCIAS

- 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, jan. 1994.
- ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 1, p. 177–188, 1992.
- ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J. L.; FIRST, N. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 943–956, 1996.
- ARMSTRONG, D. T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 06, p. 1303–1322, 2001.
- ARMSTRONG, D. T.; HOLM, 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, n. 4, p. 667–78, out. 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. 1227–36, jan. 1994.
- ARMSTRONG D.T.; B.J. IRVINE; C.R. EARL, D. M. AND R. F. S. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. **Theriogenology**, v. 42, 1994.
- ARMSTRONG, D. T.; KOTARAS, P. J. AND EARL, C. R. Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 333–339, 1997.
- AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; NAVARRETE-SANTOS, A.; WRENZYCKI, C.; GANDOLFI, F.; NIEMANN, H.; FISCHER, B. Glucose transporter expression is developmentally regulated in in vitro derived bovine preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 3, p. 370–6, nov. 2001.
- BARUSELLI, P. S.; SÁ FILHO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SALES, J. N. S.; GIMENES, L. U.; VIEIRA, L. M.; MENDANHA, M. F.; BÓ, G. A. Manipulation of follicle development to ensure optimal oocyte quality and conception rates in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47 Suppl 4, p. 134–41, ago. 2012.
- BATISTA, E. O. S.; MACEDO, G. G.; SALA, R. V; ORTOLAN, M. D. D. V; SÁ FILHO, M. F.; DEL VALLE, T. A; JESUS, E. F.; LOPES, R. N. V. R.; RENNÓ, F. P.; BARUSELLI, P. S. Plasma antimullerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 3, p. 448–52, jun. 2014.

- CAMARGO, L. S. A.; VIANA, J. H. M.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M.; VALE FILHO, V. R. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 85, n. 1-2, p. 53–9, jan. 2005.
- CARRO, E.; PINILLA, L.; SEOANE, L. M.; CONSIDINE, R. V.; AGUILAR, E.; CASANUEVA, F. F.; DIEGUEZ, C. Influence of endogenous leptin tone on the estrous cycle and luteinizing hormone pulsatility in female rats. **Neuroendocrinology**, v. 66, n. 6, p. 375–7, dez. 1997.
- CHEBEL, R. C.; DEMÉTRIO, D. G. B.; METZGER, J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 98–106, 2008.
- CHEUNG, C. C.; THORNTON, J. E.; KUIJPER, J. L.; WEIGLE, D. S.; CLIFTON, D. K.; STEINER, R. A. Leptin is a metabolic gate for the onset of puberty in the female rat. **Endocrinology**, v. 138, n. 2, p. 855–8, fev. 1997.
- CHWA, M.; ATILANO, S. R.; REDDY, V.; JORDAN, N.; KIM, D. W.; KENNEY, M. C. Increased stress-induced generation of reactive oxygen species and apoptosis in human keratoconus fibroblasts. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 47, n. 5, p. 1902–10, maio 2006.
- CÓRDOVA, B.; MORATÓ, R.; DE FRUTOS, C.; BERMEJO-ÁLVAREZ, P.; PARAMIO, T.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MOGAS, T. Effect of leptin during in vitro maturation of prepubertal calf oocytes: embryonic development and relative mRNA abundances of genes involved in apoptosis and oocyte competence. **Theriogenology**, v. 76, n. 9, p. 1706–15, dez. 2011.
- CÓRDOVA, B.; MORATÓ, R.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, T.; MOGAS, T. Effect of the addition of insulin-transferrin-selenium and/or L-ascorbic acid to the in vitro maturation of prepubertal bovine oocytes on cytoplasmic maturation and embryo development. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1341–8, nov. 2010.
- COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F. AND JORGE, E. C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 123–147, 2010.
- 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 and Development**, v. 45, n. 4, p. 521–34, dez. 1996.
- DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; DUBY, R. T. Biochemical and physiological maturation of cow and calf oocytes. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 310, jan. 1998a.
- DAMIANI, P.; FISSORE, R. A.; DUBY, R. T. Biochemical and physiological maturation of cow and calf oocytes. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 310, 1 jan. 1998b.
- DE PAZ, P.; SANCHEZ, A. J.; DE LA FUENTE, J.; CHAMORRO, C. A.; ALVAREZ, M.; ANEL, E. AND ANEL, L. Ultrastructural and cytochemical comparison between calf and cow oocytes. **Theriogenology**, v. 1, n. 01, p. 1107–1116, 2001.

- DELL'AQUILA, M. E.; ARIU, F.; MARTINO, N. A.; MINERVINI, F.; CARDINALI, A.; BOGLIOLO, L. 308 verbascode treatment during in vitro maturation improves the embryo development of prepubertal ovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 1, p. 243, dez. 2014.
- DEMETRIO, D. G. B.; SANTOS, R. M.; DEMETRIO, C. G. B.; VASCONCELOS, J. L. M. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 11, p. 5073–82, nov. 2007.
- DESJARDINS, C.; HAFS, H. D. Maturation of bovine female genitalia from birth through puberty. **Journal of Animal Science**, v. 28, n. 4, p. 502–7, abr. 1969.
- DIEDERICH, M.; HANSMANN, T.; HEINZMANN, J.; BARG-KUES, B.; HERRMANN, D.; ALDAG, P.; BAULAIN, U.; REINHARD, R.; KUES, W.; WEISSGERBER, C.; HAAF, T.; NIEMANN, H. DNA methylation and mRNA expression profiles in bovine oocytes derived from prepubertal and adult donors. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 144, n. 3, p. 319–30, set. 2012.
- DODSON, S.E.; MCLEOD, B.J.; HARESIGN, W.; PETERS A.R. AND LAMMING, G. E. Endocrine changes from birth to puberty in the heifer. **Journal of Reproduction and Fertility**, 1988.
- DORJI; OHKUBO, Y.; MIYOSHI, K.; YOSHIDA, M. Gene expression profile differences in embryos derived from prepubertal and adult Japanese Black cattle during in vitro development. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 2, p. 370–81, jan. 2012.
- DUBY, R. T.; DAMIANI, P.; LOONEY, C. R.; LONG, C. R.; BALISE, J. J.; ROBL, J. M. Cytological characterization of maturation and fertilization in prepubertal calf oocytes. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 202, jan. 1995.
- EARL, C.R.; FRY, R.C.; MACLELLAN, L.J.; KELLY, J.M.; ARMSTRONG, D. T. **In vitro fertilization and developmental potential of prepubertal calf oocytes.** (Eichenlaub-Ritter, Ed.) In Lauria AM (ed), Gametes: Development and Function. Sero Symposia. **Anais...Rome**: 1998
- EPPIG, J. J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, n. 4, p. 485–9, jan. 1996.
- ERICKSON, B. H. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. **Jornal of Animal Science**, p. 800–805, 1966.
- EVANS, A. C.; CURRIE, W. D.; RAWLINGS, N. C. Effects of naloxone on circulating gonadotrophin concentrations in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 96, n. 2, p. 847–55, nov. 1992.
- EVANS, A. C. O.; ADAMS, G. P. AND RAWLINGS, N. C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **Journal of Reproduction and Fertility**, n. June, 1994.

- FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, n. 4, p. 437–442, dez. 1995.
- FAOSTAT. Food Agriculture Organization of United Nations. **FAOSTAT**, 2014.
- FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CHIARATTI, M. R.; FERRAZ, M. L.; ARAÚJO, A. B.; RODRIGUES, C. A.; WATANABE, Y. F.; VIREQUE, A. A.; JOAQUIM, D. C.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V.; BARUSELLI, P. S. The low fertility of repeat-breeder cows during summer heat stress is related to a low oocyte competence to develop into blastocysts. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 5, p. 2383–2392, 2011.
- FOSTER, D. L. **Puberty in the sheep**. In: Knobil E Neill JD (eds.), *The Physiology of Reproduction*. **Anais...**New York: Raven Press: 1994
- FOSTER, D. L.; NAGATANI, S. Physiological perspectives on leptin as a regulator of reproduction: role in timing puberty. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 2, p. 205–15, fev. 1999.
- FRISCH, R. E. Body fat, puberty and fertility. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 59, n. 2, p. 161–88, maio 1984.
- FRY, R.C.; SIMPSON T.L. AND SQUIRES, T. J. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. **Theriogenology**, n. 2, p. 1077–1082, 1998.
- GANDOLFI, F.; MILANESI, E.; POCAR, P.; LUCIANO, A. M.; BREVINI, T. A.; ACOCCELLA, F.; LAURIA, A.; ARMSTRONG, D. T. Comparative analysis of calf and cow oocytes during in vitro maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 49, n. 2, p. 168–75, fev. 1998.
- GANDOLFI, T. A.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255–76, 1 abr. 2001.
- GIMENES, L. U.; FERRAZ, M. L.; FANTINATO-NETO, P.; CHIARATTI, M. R.; MESQUITA, L. G.; SÁ FILHO, M. F.; MEIRELLES, F. V.; TRINCA, L. A.; RENNÓ, F. P.; WATANABE, Y. F.; BARUSELLI, P. S. The interval between the emergence 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. 385–93, fev. 2015.
- GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 223–30, set. 1989.
- GUERREIRO, B. M.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.; RODRIGUES, C. A.; CASTRO NETTO, A.; SILVEIRA, C. R. A.; BAYEUX, B. M.; DIAS, E. A. R.; MONTEIRO, F. M.; ACCORSI, M.; LOPES, R. N. V. R.; BARUSELLI, P. S. Plasma anti-

- mullerian hormone: an endocrine marker for in vitro embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 49, p. 96–104, out. 2014.
- HANZEN, C.; PIETERSE, M.; SCENCZI, O.; DROST, M. Relative accuracy of the identification of ovarian structures in the cow by ultrasonography and palpation per rectum. **Veterinary Journal (London, England: 1997)**, v. 159, n. 2, p. 161–70, mar. 2000.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23–32, jan. 1997.
- JAINUDEEN, M.R., HAFEZ, E. S. E. **Cattle and buffalo. In: Hafez, E.S.E. Reproduction in farm animals**. six ed. Lea–Febiger, Philadelphia,: [s.n.]. p. 315–329, 1993.
- JIA, Z.; ZHANG, J.; ZENG, W.; ZHU, Y.; XUE, J.; XUAN, B.; TIAN, J. Effects of administration of estradiol and progesterone on ovarian stimulation response, and in vitro developmental competence of oocytes in CIDR-treated calves. **Animal Biotechnology**, v. 25, n. 3, p. 179–87, jan. 2014.
- KAJIHARA, Y.; BLAKEWOOD, E. G.; MYERS, M. W.; KOMETANI, N.; GOTO, K.; GODKE, R. A. maturation and fertilization of follicular oocytes obtained from calves. **Theriogenology**, v. 35, n. 1, p. 220, jan. 1991.
- KAUFFOLD, J.; AMER, H. 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 and Development**, v. 51, n. 3, p. 325–332, 2005.
- KAWASHIMA, C.; MATSUI, M.; SHIMIZU, T.; KIDA, K.; MIYAMOTO, A. Nutritional factors that regulate ovulation of the dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 1, p. 10–6, jan. 2012.
- KENNEDY, G. C.; MITRA, J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. **The Journal of Physiology**, v. 166, p. 408–18, abr. 1963.
- 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 Rproduction and Fertility**, v. 111, n. 2, p. 267–75, nov. 1997.
- KHATIR, H.; LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Prepubertal bovine oocyte: a negative model for studying oocyte developmental competence. **Molecular Reroduction and Development**, v. 45, n. 2, p. 231–9, out. 1996.
- KOENIG, J. L.; STORMSHAK, F. Cytogenetic evaluation of ova from pubertal and third-estrous gilts. **Biology of Reproduction**, v. 49, n. 6, p. 1158–62, dez. 1993.
- KUWER, A.; LEMME, E.; NIEMANN, H. Developmental capacity of cumulus oocyte complexes collected from prepubertal cattle with and without gonadotropin stimulation employing ultrasound-guided follicular aspiration. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 323, 1 jan. 1999.

- LABRECQUE, R.; SIRARD, M.-A. The study of mammalian oocyte competence by transcriptome analysis: progress and challenges. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 2, p. 103–116, fev. 2014.
- LEDDA, S.; BOGLIOLO, L.; CALVIA, P.; LEONI, G.; NAITANA, S. Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, n. 1, p. 73–8, jan. 1997.
- LEROY, J. L. M. R. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. **Reproduction**, v. 130, n. 4, p. 485–495, 2005.
- LEROY, J.; VAN SOOM, A.; OPSOMER, G.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? Part II. Mechanisms linking nutrition and reduced oocyte and embryo quality in high-yielding dairy cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 5, p. 623–632, 2008.
- LÉVESQUE, J. T.; SIRARD, M. A. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 34, n. 2, p. 133–9, jan. 1994.
- LOHUIS, M. M. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 51–60, jan. 1995.
- 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 and Development**, v. 37, n. 1, p. 48–53, jan. 1994.
- LOONEY, C. R.; DAMIANI, P.; LINDSEY, B. R.; LONG, C. R.; GONSETH, C. L.; JOHNSON, D. L.; DUBY, R. T. Use of prepubertal heifers as oocyte donors for IVF: Effect of age and gonadotrophin treatment. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 269, jan. 1995.
- LV, X. Q.; XUE, J. H.; ZHU, Y. L.; LIANG, H. B.; XUAN, B. H. Effect of repeat hormone stimulation on the yield and in vitro development of juvenile calf oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 26, n. 1, p. 217, 5 dez. 2014.
- MAILLO, V.; RIZOS, D.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; KELLY, A. K.; GARRETT, M.; LONERGAN, P. Influence of lactation on metabolic characteristics and embryo development in postpartum Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 95, n. 7, p. 3865–76, jul. 2012.
- 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. 1169–79, nov. 1999.
- MERMILLOD, P.; RENARD, J. P.; HEYMAN, Y. Assessment of cytoplasmic competence of prepubertal calf oocytes by use of nuclear transfer. **Theriogenology**, 1996.

- MERTON, J. S.; KNIJN, H. M.; FLAPPER, H.; DOTINGA, F.; ROELEN, B. A J.; VOS, P. L. A M.; MULLAART, E. Cysteamine supplementation during in vitro maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 365–71, 1 set. 2013.
- MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; IZQUIERDO, M. D.; PARAMIO, M. T. Developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. **Theriogenology**, v. 47, n. 6, p. 1189–203, 15 abr. 1997.
- MOUROT, M.; DUFORT, I.; GRAVEL, C.; ALGRIANY, O.; DIELEMAN, S.; SIRARD, M.-A. The influence of follicle size, FSH-enriched maturation medium, and early cleavage on bovine oocyte maternal mRNA levels. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, n. 11, p. 1367–79, nov. 2006.
- MURAHASHI, K.; BUCHOLTZ, D. C.; NAGATANI, S.; TSUKAHARA, S.; TSUKAMURA, H.; FOSTER, D. L.; MAEDA, K. I. Suppression of luteinizing hormone pulses by restriction of glucose availability is mediated by sensors in the brain stem. **Endocrinology**, v. 137, n. 4, p. 1171–6, abr. 1996.
- NAGATANI, S.; BUCHOLTZ, D. C.; MURAHASHI, K.; ESTACIO, M. A.; TSUKAMURA, H.; FOSTER, D. L.; MAEDA, K. I. Reduction of glucose availability suppresses pulsatile luteinizing hormone release in female and male rats. **Endocrinology**, v. 137, n. 4, p. 1166–70, abr. 1996.
- NRC. NUTRIENT REQUIREMENTS OF DAIRY CATTLE. **7th ed. Washington, DC.; Natl. Acad. Sci.**, 2001.
- OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMA, N.; TACHIKAWA, S.; SUZUKI, T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v. 48, n. 5, p. 769–74, 1 out. 1997.
- PALMA, G. A.; CLEMENT-SENCEWALD, A.; KREFFT, H. In vitro production of cattle embryos from calf oocytes. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 278, jan. 1993.
- PALMA, G. A.; TORTONESE, D. J.; SINOWATZ, F. Developmental capacity in vitro of prepubertal oocytes. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v. 30, n. 5, p. 295–300, out. 2001.
- PANTALEON, M.; KAYE, P. L. Glucose transporters in preimplantation development. **Reviews of Reproduction**, v. 3, n. 2, p. 77–81, maio 1998.
- PATEL, O. V.; BETTEGOWDA, A.; IRELAND, J. J.; COUSSENS, P. M.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W. Functional genomics studies of oocyte competence: evidence that reduced transcript abundance for follistatin is associated with poor developmental competence of bovine oocytes. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 133, n. 1, p. 95–106, jan. 2007.
- PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, n. 1, p. 63–7, jan. 1992.

- PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; ERENO-JUNIOR, J. C.; UVO, S.; BARREIROS, T. R. R.; OLIVEIRA, J. A.; HASLER, J. F.; SENEDA, M. M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690–697, 2009.
- PONTES, J. H. F.; SILVA, K. C. F.; BASSO, A. C.; RIGO, A. G.; FERREIRA, C. R.; SANTOS, G. M. G.; SANCHES, B. V.; PORCIONATO, J. P. F.; VIEIRA, P. H. S.; FAIFER, F. S.; STERZA, F. A. M.; SCHENK, J. L.; SENEDA, M. M. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. **Theriogenology**, v. 74, n. 8, p. 1349–1355, 2010.
- PRESICCE, G.A.; JIANG, S.; SIMKIN, M.; ZHANG, L.; LOONEY, C.R.; GODKE, R.A. AND YANG, X. Age and hormonal dependence of acquisition of oocyte competence for embryogenesis in prepubertal calves. **Biology of Reproduction**, v. 392, p. 386–392, 1997.
- 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, n. 3-4, p. 259–270, out. 2003.
- REKWOT, P.; OGWU, D.; OYEDIPE, E.; SEKONI, V. Effects of bull exposure and body growth on onset of puberty in Bunaji and Friesian x Bunaji heifers. **Reproduction, Nutrition, Development**, v. 40, n. 4, p. 359–67, jan. .
- 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. 115–20, jan. 1995.
- REVEL, F.; MERMILLOD, P.; PEYNOT, N.; RENARD, J.P. AND HEYMAN, Y. Low developmental capacity of in vitro matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, 1995.
- RIEGER, D.; LOSKUTOFF, N. M.; BETTERIDGE, K. J. Developmentally related changes in the metabolism of glucose and glutamine by cattle embryos produced and co-cultured in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, n. 2, p. 585–95, jul. 1992.
- RILEY, J. K.; MOLEY, K. H. Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 131, n. 5, p. 823–35, maio 2006.
- RODRIGUES, C. A.; TEIXEIRA, A. A.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; MANCILHA, R. F.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of fixed-time embryo transfer on reproductive efficiency in high-producing repeat-breeder Holstein cows. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2-4, p. 110–117, 2010.
- RODRIGUES, H. D.; KINDER, J. E.; FITZPATRICK, L. A. Estradiol regulation of luteinizing hormone secretion in heifers of two breed types that reach puberty at different ages. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 603–9, mar. 2002.

RODRIGUES, C. A.; AYRES, E. L. REIS, M. NICHI, G. A. BÓ, AND P. S. B. Taxa de concepção de embriões frescos e criopreservados transferidos em vacas holandesas de alta produção. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 159, 2004.

SÁ FILHO, M. F.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; PENTEADO, L.; GIMENES, L. U.; FERREIRA, R. M.; AYRES, H.; CASTRO E PAULA, L. A; SALES, J. N. S.; BARUSELLI, P. S. Equine chorionic gonadotropin improves the efficacy of a progestin-based fixed-time artificial insemination protocol in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2-4, p. 182–7, abr. 2010.

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. 1768, p. 1761–1768, 2001.

SALES, J. N. DE S. **Efeito da dieta com alta energia nos parâmetros metabólicos, endócrinos e reprodutivos de vacas *Bos indicus* e *Bos taurus***. 2011. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo 2011. 161 p. Tese (Doutorado em Ciências).

SANGSRITAVONG, S.; COMBS, D. K.; SARTORI, R.; ARMENTANO, L. E.; WILTBANK, M. C. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17beta in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2831–42, nov. 2002.

SARTORI, R.; BASTOS, M. R.; WILTBANK, M. C. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 22, n. 1, p. 151–158, 2010.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J. M.; SHAVER, R. D.; ROSA, G. J. M.; WILTBANK, M. C. Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of Holstein heifers and lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 4, p. 905–20, abr. 2004.

SARTORI, R.; SARTOR-BERGFELT, R.; MERTENS, S. A.; GUENTHER, J. N.; PARRISH, J. J.; WILTBANK, M. C. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2803–12, nov. 2002.

SCHAMS, D.; SCHALLENBERGER, E.; GOMBE, S.; KARG, H. Endocrine patterns associated with puberty in male and female cattle. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 30, p. 103–10, jan. 1981.

SCHREIHOFFER, D. A.; AMICO, J. A.; CAMERON, J. L. Reversal of fasting-induced suppression of luteinizing hormone (LH) secretion in male rhesus monkeys by intragastric nutrient infusion: evidence for rapid stimulation of LH by nutritional signals. **Endocrinology**, v. 132, n. 5, p. 1890–7, maio 1993.

SEIDEL, G. E.; LARSON, L. L.; SPILMAN, C. H.; HAHN, J.; FOOTE, R. H. Culture and transfer of calf ova. **Journal of Dairy Science**, v. 54, n. 6, p. 923–6, jun. 1971.

- 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, 3 jul. 2001.
- SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. 2ed. ed. [s.l: s.n.].1999.
- SIRARD, M.-A. Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47 Suppl 4, p. 148–55, ago. 2012.
- SIRARD, M.-A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126–136, 2006.
- SOUZA, E.M; MILAGRES, J.C; SILVA, M.A; REGAZZI, A.J; CASTRO, A. G. C. Influências genéticas e de meio ambiente sobre a idade ao primeiro parto em rebanhos de Gir leiteiro. **Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 24, p. 926–935, 1995.
- STEEVES, T. E.; GARDNER, D. K.; ZUELKE, K. A.; SQUIRES, T. S.; FRY, R. C. In vitro development and nutrient uptake by embryos derived from oocytes of pre-pubertal and adult cows. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, n. 1, p. 49–56, set. 1999.
- TANEJA, M.; PETER E. J.B.; VELDE, A. V. .; JU, J.; SCHREIBER, D.; TRIPP, M.W.; LEVINE, H.; ECHELARD, Y.;RIESEN, J. AND YANG, X. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo—Influence of Donor Animal Variation and Repeated Gonadotropin Stimulation. **Biology of Reproduction**, v. 213, p. 206–213, 2000.
- TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, n. 1, p. 90–100, maio 1990.
- THOMPSON, E. A.; J., B.; NORTHSTONE, K. . The use of homeopathic products in childhood: data generated over 8.5 years from the avon longitudinal study of parents and children (ALSPAC). **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 16, n. 1, p. 69–79, 2010.
- TONG, Z. B.; GOLD, L.; PFEIFER, K. E.; DORWARD, H.; LEE, E.; BONDY, C. A.; DEAN, J.; NELSON, L. M. Mater, a maternal effect gene required for early embryonic development in mice. **Nature Genetics**, v. 26, n. 3, p. 267–8, nov. 2000.
- 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. 318–24, 15 jul. 2014a.
- VIEIRA, L. M.; RODRIGUES, C. A.; MENDANHA, M. F.; SÁ FILHO, M. F.; SALES, J. N. S.; SOUZA, A. H.; SANTOS, J. E. P.; BARUSELLI, P. S. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 204–12, 15 jul. 2014b.

- WALSH, S. W.; WILLIAMS, E. J.; EVANS, A. C. O. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal Reproduction Science**, v. 123, n. 3-4, p. 127–138, 2011.
- WILTBANK, M.; LOPEZ, H.; SARTORI, R.; SANGSRITAVONG, S.; GÜMEN, A. Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 17–29, 2006.
- WRIGHT, J. Photomicrographic illustration of embryo codes. Savoy, IL: International Embryo Transfer Society, 1998. 167–170 p. (Manual of the International Embryo Transfer).
- ZARAZA, J.; OROPEZA, A; VELAZQUEZ, M. A; KORSAWE, K.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J. W.; NIEMANN, H. Developmental competence and mRNA expression of preimplantation in vitro-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. **Theriogenology**, v. 74, n. 1, p. 75–89, 1 jul. 2010.
- ZHOU, J.; BIEVRE, M.; BONDY, C. A. Reduced GLUT1 expression in Igf1-/- null oocytes and follicles. **Growth hormone & IGF research** – official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society, v. 10, n. 3, p. 111–7, jun. 2000.