BERNARDO MARCOZZI BAYEUX

Efeito da categoria (pré púberes, púberes e prenhes) na produção *in vitro* de embriões de novilhas 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

São Paulo

2017

BERNARDO MARCOZZI BAYEUX

**Efeito da categoria (pré púberes, púberes e prenhes) na produção *in vitro*
de embriões de novilhas 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

São Paulo

2017

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

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3502
FMVZ

Bayeux, Bernardo Marcozzi
Efeito da categoria (pré púberes, púberes e prenhes) na produção in vitro de embriões de novilhas da raça Holandesa. / Bernardo Marcozzi Bayeux. -- 2017.
53 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Bos Taurus. 2. Holandesa. 3. OPU. 4. Novilha. 5. Pré púbere. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da categoria (pré púberes, púberes e prenhes) na produção in vitro de embriões de novilhas holandesas.", protocolada sob o CEUA nº 8385300115, sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/04/2016.

We certify that the proposal "Effect of category (pre pubescent , pubescent and pregnant) on in vitro embryos of Holstein heifers .", utilizing 150 Bovines (150 females), protocol number CEUA 8385300115, under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/14/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2015** a **04/2016**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **08 a 16 meses**

N: **150**

Linhagem: **Holandesa**

Peso: **250 a 350 kg**

Resumo: Atualmente, a área de reprodução bovina vem sendo explorada com maior intensidade, passando por mudanças e inovações biotecnológicas relevantes, resultado dos interesses de pesquisadores e criadores que visam difundir de forma rápida e lucrativa os materiais genéticos de alto potencial. Técnicas como a transferência de embriões (TE) e a fertilização in vitro (FIV) possibilitam o aumento dos índices reprodutivos das fêmeas, intensificando a seleção dos animais.

Entretanto, os resultados das produções in vitro (aspiração folicular e fecundação in vitro) de embriões em vacas de leite taurinas ainda são muito instáveis. Dessa forma, são necessárias mais pesquisas para o aprimoramento das técnicas, visando maior eficiência reprodutiva e consequentemente maior retorno econômico para o produtor.

Local do experimento: Os trabalhos serão realizados em uma propriedade de produção leiteira no município de Franca (Fazenda Petrópolis) no estado de São Paulo, sobre responsabilidade do médico Veterinário Alexandre Azrak.

São Paulo, 23 de janeiro de 2017

Prof. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BAYEUX, Bernardo Marcozzi

Título: Efeito da categoria (pré púberes, púberes e prenhes) na produção *in vitro* de embriões de novilhas 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: _____

Dedico

Aos meus pais,

Ariel e Cláudia, por serem meus maiores exemplos de vida.

Por todo amor, carinho, apoio incondicional, e todo sacrifício que fizeram para me proporcionar sempre o melhor. Não tenho palavras para expressar meu amor e minha gratidão por vocês! Muito obrigado por tudo!

AGRADEÇO

À **Deus**, por me dar forças para seguir em frente em todos os momentos da minha vida.

Ao **Prof. Pietro**, meu exemplo de competência, sabedoria, profissionalismo, humildade, serenidade e dedicação. Obrigado pela paciência, confiança, pelos ensinamentos e por todo apoio desde o começo. Não tenho palavras para descrever minha alegria e satisfação em fazer parte da sua equipe! Vou levar seus conselhos e ensinamentos para vida toda! Serei sempre grato professor! Muito obrigado!

Ao **Evanil Pires de Campos (Nil)**, pela confiança depositada em meu trabalho e pelo fundamental apoio para que meu projeto de mestrado fosse concretizado! Muito obrigado Nil!

A empresa **WTA-FIV (Yeda e Osnir)** por acreditarem no projeto e fornecerem todos os subsídios necessários para a realização deste trabalho. Agradeço também a excelente equipe (**Aline, Marina e Favati**) por estarem sempre dispostos a me ajudar em todos os experimentos! Muito obrigado

Ao meu amigo-irmão **Rodolfo Mingoti (Badá)**, por ter sido a primeira pessoa a me acolher na universidade, antes mesmo de nos conhecermos pessoalmente. Obrigado pelo carinho, atenção, conselhos, puxões de orelha e pelas inúmeras oportunidades que tive de aprender algo com você. Sempre me forçando a aprender e evoluir como técnico e como pessoa! Para mim você é um grande exemplo. Sem dúvidas, devo a você grande parte deste trabalho. Muito obrigado meu irmão! Conte sempre comigo!

Aos meus amigos do departamento **Rômulo** (Doidão), **Marcos** (Colli), **Flávia** (Fráaviaa) pelo carinho, amizade e por sempre me tratarem tão bem! Sou muito grato a vocês! A dupla inseparável **Carlos Eduardo** (Dado), e **Felipe** (Felipão) muito obrigado pelo companheirismo amizade e risadas! Aos novos amigos **Guilherme** (Gaúcho) e **Walter** (Tuba) e **Lisbek**! E a todos outros amigos do VRA que de alguma maneira fizeram parte desta caminhada!

Aos amigos **Emiliana** (Mili) por ter confiado em meu trabalho e me ajudado desde o começo com os experimentos de aspiração, **Bruno Monteiro** (Brunão) pela paciência, conselhos e risadas, **Laís** (Kokota), **Bruno Freitas** (Karboxy) e **Júlia**.

Ao meu amigo e parceiro de trabalho **Luciano Mundim de Carvalho**, pela parceria, apoio, paciência e por todos os ensinamentos! Admiro muito sua competência, seu caráter e humildade! Muito obrigado!

Ao amigo **Alexandre Hênryli de Souza** (Alex), pelo total apoio e amizade desde o início do projeto. Agradeço imensamente por todos os ensinamentos, conselhos pessoais e toda ajuda dispensada em meu trabalho! Tenho muita admiração, carinho e respeito por você! Muito obrigado!

Ao meu amigo **Alexandre José Azrak** por todos ensinamentos e por toda contribuição desde o início da minha carreira, desde a época de estágios da faculdade até hoje, sempre se propondo a me ajudar! Muito Obrigado Lê!

A **Camila Moraes**, por ter feito parte da minha vida, por ter me apoiado, me acompanhado e me incentivado a seguir em frente nos momentos mais difíceis. Muito obrigado por tudo que fez por mim! Serei para sempre grato!

Aos meus queridos irmãos **Felipe (Benê), Fernandão, Franklin, Renanzinho, Rodrigo, Pedrão e Vagner** por fazerem parte da minha vida. Muito obrigado pela amizade, apoio, incentivo, e por sempre torcerem por mim em todos os momentos! Muito obrigado! Amo vocês!

Ao proprietário da fazenda Petrópolis, **Renato Maurício de Paula**, e seu filho **Leonardo** por gentilmente cederem os animais e a estrutura para que o experimento fosse realizado! Muito obrigado. Agradeço também a competente equipe de funcionários da fazenda (**Gal, Gilberto, Diogo e Sr Zaul**) o companheirismo e ajuda de vocês foi essencial para que este trabalho tenha sido realizado! Ao veterinário **Ricardo Rosique**, Obrigado!

A todos os professores do VRA pela contribuição em meu desenvolvimento pessoal e profissional (**Camila Vannucchi, Cláudia Barbosa, Ed Hoffman, Marcílio Nichi, Mário Binelli, Mayra Helena**,) e tantos outros que tive o prazer de conhecer!

A querida **Harumi**, por toda atenção e ajuda durante estes dois anos de mestrado! Sempre educada, alegre e muito prestativa! Agradeço também a **Roberta e Lóide** por serem sempre prestativas! Muito obrigado!

Aos amigos **Luiz Gustavo e Kelly** por toda ajuda, ensinamentos e companheirismo durante toda minha carreira.

RESUMO

Bayeux, B. M. **Efeito da categoria (pré púberes, púberes e prenhes) na produção *in vitro* de embriões de novilhas da raça Holandesa.** [Effect of category (prepubertal pubertal and pregnant) on *in vitro* embryo production in Holstein heifers]. 2017. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a produção *in vitro* de embriões (PIVE) em novilhas da raça Holandesa. Um total de 179 novilhas de três categorias [novilhas pré púberes (PP), n = 60; novilhas púberes (PU), n = 60 e novilhas prenhes (PR), n = 59] foram submetidas à aspiração folicular (OPU) sem sincronização prévia da onda de crescimento folicular. Realizaram-se seis sessões de OPU com dez animais de cada categoria por réplica. O total de estruturas recuperadas e a quantidade e qualidade de oócitos foram registrados. Os oócitos viáveis foram submetidos à PIVE e foi avaliado o desenvolvimento embrionário (taxa de clivagem e de blastocisto). Foi utilizado sêmen de um único touro e de mesma partida para fertilização dos oócitos. As variáveis foram analisadas pelo procedimento GLIMMIX do SAS®. Novilhas PU apresentaram maior população folicular quando comparadas às novilhas PP e PR (PP = $13,7^b \pm 1,43$; PU = $20,2 \pm 1,64^a$; PR = $14,0 \pm 1,74^b$; P = 0,0002). Não foi verificada diferença na taxa de recuperação de oócitos entre os grupos experimentais (PP = 66,6%; PU = 75,4%; PR = 62,9%; P = 0,26). No entanto, houve maior número de oócitos recuperados em novilhas PU quando comparado às demais categorias (PP = $9,75 \pm 1,29^b$; PU = $15,6 \pm 1,42^a$; PR = $9,85 \pm 1,60^b$; P = 0,002). Não houve diferença na taxa de oócitos viáveis (PP = 48,5%; PU = 58,9% e PR = 58,3%; P = 0,41), entretanto, a taxa de clivagem foi inferior em novilhas PP (PP = 28,2%^c; PU = 55,2%^b; PR = 67,8%^a; P < 0,0001). Além disso, a taxa de blastocisto (PP = 2,3%^c; PU = 11,9%^b; PR = 20,3%^a; P < 0,0001) e o número de embriões produzidos por OPU (PP = $0,13 \pm 0,05^c$; PU = $0,90 \pm 0,17^b$; PR = $1,76 \pm 0,32^a$; P < 0,0001) foi inferior em novilhas PP. Os dados do presente estudo são indicativos de que novilhas PR apresentam maior eficiência na PIVE quando comparadas às novilhas PP e PU. Ainda, observa-se que os resultados da PIVE em novilhas PP são significativamente inferiores às novilhas PU.

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

ABSTRACT

Bayeux, B. M **Effect of category (prepubertal pubertal and pregnant) on *in vitro* embryo production in Holstein heifers.** 2017. 53 f. Dissertation (Masters in Sciences) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The objective of the present study was to evaluate the *in vitro* embryo production in Holstein heifers. A total of 179 heifers of three categories [prepubertal heifers (PP), n = 60; pubertal heifers (PU), n = 60 and; pregnant heifers (PR), n = 59] were submitted to Ovum Pick-Up (OPU) at random stages of the estrous cycle. Six OPU sessions were conducted with ten animals of each category per session. The total number of retrieved structures as well as the quantity and quality of the oocytes were registered. The viable oocytes were submitted to *in vitro* embryo production and the embryonic development (cleavage and blastocyst rates) was assessed. Semen from a single sire was used for oocytes' fertilization. The variables were analyzed using the GLIMMIX procedure of SAS®. PU heifers presented greater follicular population when compared to the PP and PR heifers (PP = $13.7^b \pm 1.43$; PU = 20.2 ± 1.64^a ; PR = 14.0 ± 1.74^b ; P = 0.0002). No difference was observed among the experimental groups regarding the oocyte recovery rate (PP = 66.6%; PU = 75.4%; PR = 62.9%; P = 0.26). However, PU heifers had more recovered oocytes when compared to the other categories (PP = 9.75 ± 1.29^b ; PU = 15.6 ± 1.42^a ; PR = 9.85 ± 1.60^b ; P = 0.002). There was no significant differences on the viable oocytes rate (PP = 48.5%; PU = 58.9% and PR = 58.3%; P = 0.41). Moreover, the cleavage rate was lower in PP heifers (PP = 28.2%^c; PU = 55.2%^b; PR = 67.8%^a; P < 0.0001). The blastocyst rate (PP = 2.3%^c; PU = 11.9%^b; PR = 20.3%^a; P < 0.0001) and the number of produced embryos per OPU (PP = 0.13 ± 0.05^c ; PU = 0.90 ± 0.17^b ; PR = 1.76 ± 0.32^a ; P < 0.0001) was lower for PP heifers. The data of the present study indicate that PR heifers present higher efficacy on the *in vitro* embryo production when compared to PP and PU heifers. Furthermore, it is observed that the IVEP results in PP heifers is significantly inferior to PU heifers.

Key-words: Prepubertal. Heifers. OPU. Holstein. *Bos taurus*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	FISIOLOGIA EM FÊMEAS JOVENS	15
2.2	COMPETÊNCIA OOCITÁRIA.....	19
2.3	CONCLUSÃO	21
3	HIPÓTESE	22
4	OBJETIVO.....	23
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
5	DESENHO HIPOTÉTICO	24
6	MATERIAL E MÉTODOS	25
6.1	LOCAL E PERÍODO DE EXECUÇÃO	25
6.2	ANIMAIS E INSTALAÇÕES.....	26
6.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	27
6.4	AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS	29
6.5	ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRAFIA (OPU).....	29
6.6	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE)	31
6.6.1	Maturação <i>in vitro</i>	31
6.6.2	Fertilização <i>in vitro</i>	32
6.6.3	Cultivo <i>in vitro</i>	33
6.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
6.8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
7	CONCLUSÃO	46
8	CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS	47
9	REFERÊNCIAS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho hipotético da produção <i>in vitro</i> de embriões de acordo com a categoria da doadora.....	24
Figura 2 - Desenho esquemático do delineamento experimental. Novilhas da raça Holandesa de três categorias (pré púberes, púberes e prenhes) submetidas à 6 réplicas de Ovum pick-up (OPU). Franca, setembro de 2015 a março de 2016	28
Figura 3 - Desenho esquemático da produção <i>in vitro</i> de embriões. Laboratório WTA FIV – Cravinhos/SP, setembro de 2015 a março de 2016	28
Figura 4 - Proporção de folículos pequenos, médios e grandes conforme categoria	37
Figura 5 - Total de oócitos recuperados e de oócitos viáveis conforme categoria	40
Figura 6- Proporção de oócitos viáveis (Grau I, II e III) conforme categoria.	41
Figura 7 - Número de blastocisto produzido por OPU conforme categoria	43
Figura 8 - Taxa de blastocisto por oócitos recuperados e por oócitos viáveis conforme categoria.....	43
Figura 9 - Quantidade de blastocisto por doadora de acordo com a idade (em meses)	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estatística descritiva relacionada às aspirações foliculares	27
Tabela 2 - Produção <i>in vitro</i> de embriões de novilhas pré púberes, púberes e prenhes da raça Holandesa (<i>Bos taurus</i>). Dados apresentados em porcentagens, médias e erro padrão da média ($\bar{x} \pm EPP$).....	38

1 INTRODUÇÃO

A avaliação genômica permite a identificação de animais geneticamente superiores logo após o seu nascimento para direcioná-los para testes de progênie ou mesmo para programas de produção *in vitro* de embriões (COUTINHO et al., 2010; BATISTA et al., 2015). Essa inovação tecnológica acelera e aumenta a confiabilidade da seleção genética tradicional baseada na expressão fenotípica, 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 de saúde animal. A partir da identificação precoce das melhores fêmeas, torna-se possível a intensificação do uso da PIVE nessa categoria animal mesmo antes da puberdade.

Programas de OPU-PIVE em novilhas pré púberes permitem rápido avanço genético dos rebanhos leiteiros, pela redução do intervalo entre gerações. No entanto, essa categoria animal apresenta baixa competência no desenvolvimento de blastocistos (PRESICCE et al., 1997; CAMARGO et al., 2005; ZARAZA et al., 2010; GUERREIRO, 2015). A fim de viabilizar a aplicação dessa biotecnologia na raça Holandesa, são necessários estudos prospectivos para compreensão dos fatores biológicos envolvido na utilização de doadoras jovens para produção de embriões, e assim acelerar o ganho genético de rebanhos leiteiros.

Estudos recentes realizados em animais da raça Nelore evidenciaram reduzida eficiência na PIVE em novilhas pré púberes quando comparadas a novilhas púberes, havendo aumento no número de blastocistos produzidos, bem como o a taxa de

blastocisto de acordo com a idade do animal e conforme os animais foram se tornando cíclicos (BARUSELLI et al., 2016).

Outra inovação tecnológica pode estar relacionada à produção *in vitro* de embriões de fêmeas jovens gestantes. Alguns estudos relatam a possibilidade de produção de embriões de fêmeas no início da gestação (MEINTJES et al., 1995). No entanto, não foram encontrados estudos que comparam a eficiência da PIVE em novilhas Holandesas gestantes em relação a outras categorias.

Sendo assim, são imprescindíveis estudos que colaboram para melhor compreensão dos fenômenos fisiológicos envolvidos na competência oocitária e no desenvolvimento embrionário de animais jovens. Essas informações podem corroborar para aperfeiçoar a eficiência das biotecnologias da reprodução, em especial na produção *in vitro* de embriões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FISIOLOGIA EM FÊMEAS JOVENS

A diferenciação sexual começa durante a vida fetal, e o desenvolvimento dos órgãos reprodutivos continua até após o início da puberdade (ATKINS; POHLER; SMITH, 2013). O início da puberdade é considerado como a primeira oportunidade da novilha em conceber e que, deve ser definido como a primeira demonstração de estro e ovulação, seguida por uma fase luteínica de duração normal (ATKINS; POHLER; SMITH, 2013; PERRY, 2016).

O crescimento mais acentuado do ovário de novilhas acontece até o quinto mês de vida (crescimento alométrico). A velocidade de desenvolvimento diminui entre o quinto e o oitavo mês. A partir deste momento, o crescimento é reduzido até 12º mês de idade (crescimento isométrico; DESJARDINS; HAFS, 1969). Outros autores também relatam o padrão bifásico de crescimento uterino em fêmeas bovinas em que o diâmetro do útero aumenta rapidamente entre a segunda e décima semana de idade (9 a 14mm - crescimento alométrico) e continua a crescer lentamente até os seis meses de idade (16mm - crescimento isométrico) (HONARAMOOZ et al., 2004). Este padrão bifásico de crescimento tem uma correlação positiva com o tamanho do maior folículo presente (HONARAMOOZ et al., 2004).

Em fêmeas bovinas, há aumento do número de folículos maiores ou iguais a 3mm de diâmetro, presentes no ovário, além de aumento no número de folículos antrais presentes no ovário entre o 2º e 3º mês de vida (DESJARDINS; HAFS, 1969; EVANS; ADAMS; RAWLINGS, 1994; HONARAMOOZ et al., 2004). Porém o diâmetro e número de folículos antrais presentes no ovário aumentam ainda mais a medida que

a novilha está atingindo a maturidade (ERICKSON, 1966; CUSHMAN et al., 2000). A população folicular antral (PFA) está altamente correlacionada com a concentração sérica de hormônio anti-mulleriano (AMH); BALDRIGHI et al., 2014; BATISTA et al., 2014). Este dado está de acordo com Guerreiro et al., (2014) em que obtiveram resultados que indicaram que a concentração plasmática de AMH pode ser um fator preditivo para a performance da PIV.

Uma positiva correlação foi observada entre todos os parâmetros quantitativos (ex. total de folículos aspirados, total de complexo cumulus-oócito (CCOs) recuperados, número de CCOs cultivados e números de embriões produzidos por OPU exceto para variáveis relacionadas à competência para o desenvolvimento *in vitro* (ex. taxas de clivagem e blastocisto).

Sendo a concentração plasmática de AMH intimamente relacionada à quantidade de embriões produzidos por OPU e não pela proporção de embriões produzidos baseados no total de CCOs cultivadas (GUERREIRO et al., 2014). Haja vista que a competência oocitária está altamente influenciada pela maturidade sexual da doadora (WARZYCH et al., 2017).

O fator limitante para início da puberdade está relacionado com falha hipotalâmica em secretar quantidades suficientes de Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) para que ocorra a liberação de gonadotrofinas (Hormônio Folículo Estimulante; (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH) ; DAY et al., 1984; SENGHER, 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.

Devido ao baixo nível de estradiol (E2), o centro tônico aumenta a sensibilidade ao feedback negativo e produz pequenas concentrações de GnRH, que resulta em 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 aumentará a produção de E2. Ao atingir um certo limiar em relação aos níveis de E2, há uma descarga de GnRH pelo centro pré-ovulatório (feedback positivo) que aumenta a pulsatilidade de LH (DAY et al., 1987) e consequentemente a ovulação será desencadeada.

Após atingir a puberdade, o estabelecimento do novo padrão pulsátil de LH (alta frequência e amplitude) leva em torno de dois meses para se estabelecer. 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 E2 para estimular o centro pré-ovulatório a secretar pulsos de GnRH de alta amplitude (JAINUDEEN, M.R., HAFEZ, 1993; SENGHER, 1999).

Entretanto, diferenças no ambiente folicular como distribuição de proteínas, concentração LH e E2 foram relatadas entre vacas e novilhas (KHATIR et al., 1997). Neste contexto estudos mais recentes relatam diferenças no conteúdo de ácidos graxos (AG) e aminoácidos presentes no fluido folicular (FF) (BENDER et al., 2010; WARZYCH et al., 2017).

Rizos et al., (2002) também encontraram diferenças na composição do FF e divergência na atividade metabólica das células foliculares, entre novilhas e vacas lactantes. Estes mesmos autores relataram que a atividade das células foliculares afeta o metabolismo energético do CCOs e influencia a qualidade do mesmo, uma vez

que a qualidade do oócito é o fator chave determinante da eficiência na conversão a blastocistos *in vitro*.

As relações da alteração nos padrões de liberação de FSH de acordo com o desenvolvimento da maturidade sexual não são claras em novilhas pré púberes. Entretanto, a emergência da onda folicular em pré púberes se dá da mesma forma que púberes e está associada a um pico prévio de FSH (ADAMS et al., 1992; ADAMS; EVANS; RAWLINGS, 1994).

Estudos sugerem que o desenvolvimento da competência oocitária está fortemente relacionado à idade da doadora (REVEL et al., 1995; ARMSTRONG, 2001; CAMARGO et al., 2005). Corroborando com esses dados, Freitas,(2015) sugeriu que novilhas da raça Nelore de 14 meses de idade apresentaram altas taxas de concepção quando foram submetidas à inseminação artificial em tempo fixo, o que indica que a genética e o estado nutricional dos animais são fatores que influenciam na idade à puberdade.

2.2 COMPETÊNCIA OOCITÁRIA

A qualidade dos oócitos, submetidos a maturação *in vitro*, é um fator determinante para a consistência dos resultados da PIVE (RIZOS et al., 2005). Estes mesmo autores relatam que a qualidade oocitária é o fator de maior influência na taxa de blastocisto. Alguns fatores como status fisiológico e reprodutivo da doadora, tamanho do folículo e integridade das células do cumulus, influenciam diretamente no desenvolvimento dos oócitos a blastocistos (LONERGAN et al., 1994a; BUTLER et al., 2011; MAILLO et al., 2012).

O desenvolvimento folicular é controlado por relações entre esteroides e fatores de crescimento intrafoliculares, fatores extra ovarianos, além de alterações no eixo hipotalâmico hipofisário (DE LOS REYES et al., 2006). Alguns autores relataram que a concentração de esteroides no fluido folicular pode ser usada para determinar o status de desenvolvimento do folículo, alterações na relação entre estrógeno e progesterona são um indicativo de atresia dos folículos (SUNDERLAND et al., 1994). Estudos mais recentes encontraram diferenças entre a concentração de esteroides e características histológicas entre vacas gestantes ou não (DE LOS REYES et al., 2006). Com a utilização de inibidores da secreção de esteroides, MOOR; D.J., 1989 e DELOUKAS et al., 2001 confirmaram que a maturação dos oócitos requer um ambiente esteroide intrafolicular específico que atua em sinergia com as gonadotrofinas.

Além do status reprodutivo e concentração de esteroides, a idade da doadora influencia diretamente na taxa de blastocistos (LANDRY et al., 2016). Neste sentido estudos mais recentes demonstraram reduzida capacidade de desenvolvimento até a fase de blastocistos, de oócitos provenientes de animais pré púberes

(ARMSTRONG et al., 1994; ARMSTRONG; KOTARAS; EARL, 1997). Outros estudos demonstraram que com a utilização de protocolos de superestimulação, oócitos de novilhas pré púberes tem maior capacidade de desenvolvimento até blastocisto (REVEL et al., 1995; PÉREZ O'BRIEN et al., 2014). Oócitos provenientes de animais adultos, possuem mitocôndrias com maiores tamanho e número, quando comparado a oócitos de bezerras, oócitos de bezerras possuem maior volume de gotículas de lipídeos (DE PAZ, P. et al., 2001).

Em estudo realizado para avaliar o efeito da glicose no oócitos murinos, Downs; Mastropolo (1994) observaram que altas concentrações de glicose (111 mM) estimularam a maturação oocitária, além disso observaram que a glicose não teve efeito sobre os oócitos desnudos, além de que a maturação induzida por FSH é dependente da presença de glicose. Estes resultados apontam que a conversão de oócitos até o estágio de blastocisto é dependente do estado metabólico da doadora; Os níveis séricos de glicose, além de estarem diretamente relacionados a maturação oocitária, podem ter relação com a ligações do tipo GAP entre as células do cumulus e os oócitos, alterando o aporte de nutrientes necessários para a maturação oocitária (ZIELKE; ZIELKE; OZAND, 1984; GARDNER; LEESE, 1987; GARDNER; LANE, 1998; KRISHER; BAVISTER, 1998) Em estudo realizado comparando oócitos provenientes de animais adultos e pré púberes, Steeves; Gardner, (1999), relataram que o metabolismo da glicose e da glutamina são importantes durante a maturação do oócito bovino. Os mesmos autores encontraram diferenças nas taxas metabólicas entre oócitos de novilhas pré púberes e vacas adultas em função do menor tamanho dos oócitos de pré púberes.

Outro fator importante para o aporte de energia para maturação e competência oocitária é o IGF-1. Receptor IGF1 é expresso na granulosa e oócito, e tem efeitos

tróficos importantes sobre o oócito. O aumento do IGF1 está associado a maior atividade de GLUT1 nas células da granulosa e oócito, e este fator é essencial para a maturação oocitária (ZHOU; BIEVRE; BONDY, 2000).

Outro efeito importante sobre o ambiente folicular é a categoria da doadora, em novilhas pré púberes e vacas, existem diferenças na qualidade dos oócitos. É sabido que o ambiente folicular de novilhas (glicose e teor de gordura inferior no FF) determina a qualidade reduzida de seus oócitos, e limitado potencial de maturação (WARZYCH et al., 2017). Estes mesmos autores relataram que as demandas energéticas dos oócitos das novilhas podem ser restritas devido a um baixo número de grânulos lipídicos, exercendo um efeito negativo sobre o desenvolvimento do futuro embrião.

2.3 CONCLUSÃO

Apesar da dificuldade em realizar a PIVE de animais jovens, a adequação de técnicas que validem e melhorem a rentabilidade deste processo pode permitir que a mesma se torne uma realidade no campo. Mais estudos devem ser conduzidos para que seja possível melhorar esta tecnologia, e permitir o uso de animais cada vez mais jovens, com intuito de acelerar o ganho genético e diminuir intervalo entre gerações.

3 HIPÓTESE

A produção *in vitro* de embriões de novilhas pré púberes é ***inferior*** à de novilhas púberes e prenhes.

4 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a qualidade e a competência oocitária na produção *in vitro* de embriões de novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*) de diferentes categorias (pré púberes, púberes e prenhes).

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos do presente trabalho foram avaliar:

- O número de folículos aspirados;
- Proporção do diâmetro folicular na aspiração
- O número de oócitos recuperados
- A taxa de recuperação dos oócitos
- A morfologia e classificação dos oócitos recuperados
- A taxa de clivagem
- A taxa de blastocisto sete dias após a aspiração
- O número de embriões produzidos por OPU

5 DESENHO HIPOTÉTICO

Figura 1 - Desenho hipotético da produção *in vitro* de embriões de acordo com a categoria da doadora

6 MATERIAL E MÉTODOS

A condução do presente estudo 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 (aprovado sob o protocolo de número 83853000115).

6.1 LOCAL E PERÍODO DE EXECUÇÃO

O presente estudo foi realizado durante os meses de setembro de 2015 a março de 2016. Os animais pertenciam e estavam alojados na fazenda Petrópolis, localizada no município de Franca, estado de São Paulo.

Toda PIVE foi realizada em parceria com a empresa WTA-FIV, situada em Cravinhos-SP, sendo todas as aspirações foliculares realizadas pelo mesmo médico veterinário (Tabela 1). Para todas as fertilizações *in vitro* foram utilizadas doses de sêmen de um único touro e de mesma partida.

6.2 ANIMAIS E INSTALAÇÕES

O rebanho de novilhas da propriedade era composto de aproximadamente 380 animais. Cento e setenta e nove novilhas da raça holandesa preto e branco de 3 categorias foram utilizadas como doadoras de oócitos, sendo 60 PP; 60 PU; e 59 PR.

Para a inclusão dos animais no experimento, foram respeitados critérios de seleção de acordo com a sua categoria, incluindo idade, ciclicidade e status reprodutivo das novilhas.

As novilhas PP que foram utilizadas possuíam entre 8 e 10 meses de idade; as novilhas PU possuíam entre 12 e 14 meses, sem inseminação prévia e as novilhas PR maiores que 14 meses foram diagnosticadas por ultrassonografia, entre 30 e 90 dias de gestação.

Quanto ao alojamento e a alimentação dos animais, o manejo já estabelecido na propriedade em que foi realizado o experimento foi mantido, sendo que as novilhas ficavam alojadas em piquetes com áreas de sombreamento, pastagem de Tifton e água ad libitum.

Os animais recebiam também dietas balanceadas a 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).

6.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado em delineamento inteiramente casualizado. Fêmeas das três categorias foram submetidas à OPU durante os meses de setembro de 2015 a março de 2016 (Tabela 1). Para tal, foram realizadas seis sessões de OPU (S1, S2, S3 e S4, S5, S6, respectivamente), utilizando dez animais de cada categoria por sessão (30 doadoras distintas em cada sessão), totalizando 179 aspirações foliculares.

Tabela 1 - Estatística descritiva relacionada às aspirações foliculares

Itens	Quantidade
Total de OPU	179
Total de novilhas submetidas a OPU	179
Número de OPUs por categoria animal	
Novilha pré púbere	60
Novilhas púbere	60
Novilha prenhe	59
Número de touros	1
Número de réplicas	6
Número de técnico para realização da OPU	1
Número de técnicos de laboratório	1
Número de laboratórios para produção <i>in vitro</i> de embriões	1

Figura 2 - Desenho esquemático do delineamento experimental. Novilhas da raça Holandesa de três categorias (pré púberes - PP, púberes - PU e prenhes - PR) submetidas à 6 réplicas de Ovum pick-up (OPU). Franca, setembro de 2015 a março de 2016

Figura 2: ¹OPU - Aspiração Folicular Guiada por Ultrassonografia; ²PIVE - Produção in vitro de Embriões; ³G1 - Grupo 1 - Novilhas Pré púberes; ⁴G2 - Grupo 2 - Novilhas Púberes; ⁵G3 - Grupo 3 - Novilhas Prenhes

Figura 3 - Desenho esquemático da produção in vitro de embriões. Laboratório WTA FIV - Cravinhos/SP, setembro de 2015 a março de 2016

Figura 3 - ¹OPU - Aspiração Folicular Guiada por Ultrassonografia; ²MIV - Maturação in vitro; ³FIV - Fertilização in vitro; ⁴CIV - Cultivo in vitro;

6.4 AVALIAÇÕES ULTRASSONOGRÁFICAS

Foi realizado a 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 em pelo menos uma das avaliações. As novilhas gestantes também foram avaliadas por meio de ultrassonografia transretal para confirmação da gestação (30 a 90 dias).

6.5 ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRAFIA (OPU)

As OPU para produção *in vitro* de embriões (OPU/PIV) foram realizadas em um dia aleatório do ciclo reprodutivo do animal, sendo repetidas de acordo com o delineamento do experimento. Os animais foram contidos e submetidos à anestesia epidural (entre a última vértebra sacral e primeira coccígea) utilizando 3ml de lidocaína a 2% sem vaso constritor (7mg/Kg de peso vivo) (Lidovet®, Bravet). Após a perda dos reflexos da cauda, a mesma 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, uma probe micro convexa com frequência 6,5 MHz (Mindray – DP2200) foi introduzida até o fundo de saco vaginal com o auxílio de uma guia de aspiração folicular (Guia de aspiração folicular, WTA, Cravinhos-SP, 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 OPU foram realizadas com um sistema com

agulha descartável (20 G; 0.9 x 50 mm; Terumo, Europe NV, Belgium), acoplado à linha de aspiração de Teflon de 1,7mm de diâmetro e 110 cm de comprimento (WTA, Cravinhos-SP, Brasil).

Todo o sistema de aspiração foi submetido à pressão negativa entre 12 a 15 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®), e heparina sódica (5000UI/ L (Parinex®, Hypolabor) mantido a 37°C. O tubo de coleta foi conduzido ao laboratório de campo e o conteúdo aspirado foi vertido em filtro coletor para FIV 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 60 mm contendo DPBS acrescido de heparina a 37 °C para a realização da procura, lavagem, classificação e seleção dos CCOs com auxílio de lupa estéreo microscópica (OPTIKA) com aumento de 8-20X.

Os CCOs foram morfologicamente 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.

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

6.6 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

6.6.1 Maturação *in vitro*

Os CCOs obtidos foram selecionados de acordo com o seu grau de qualidade, sendo utilizados CCOs com ou sem células do cumulus, mas de aspecto de granulações citoplasmáticas homogêneas. Na chegada ao laboratório os microtubos com os CCOs foram transferidos para incubadora de bancada (EVE WTA®) para continuar seu processo de maturação por 24 horas com as mesmas condições de temperatura (38,5°C) e baixa tensão de oxigênio (6%CO₂ + 5%O₂ + 89%N₂).

6.6.2 Fertilização *in vitro*

Para a fertilização *in vitro* foram utilizadas amostras de sêmen congelado de touro da raça holandesa preto e branco previamente testado (mesma partida e touro). 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 para obtenção dos espermatozoides 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.

A concentração foi ajustada para 1×10^6 spz/mL. O meio utilizado na fecundação *in vitro* foi o meio Tyrode modificado (TALP) acrescido de soluções de Penicilamida, Hipotaurina e Epinefrina (PHE) e 10 µg/mL de heparina. Os gametas permaneceram incubados em placas com micro gotas de 70 µL cobertas com óleo mineral, por 20-22 horas a 38,5°C com baixa tensão de oxigênio.

6.6.3 Cultivo *in vitro*

Após o tempo de incubação dos gametas, os prováveis zigotos foram lavados para retirar o excesso de células do cumulus e transferidos para uma placa contendo micro gotas de 70µL de meio de cultivo (CR2 modificado acrescido de SFB e BSA), cobertos por óleo mineral de acordo com os protocolos de Watanabe 1998. Estes permaneceram na incubadora de bancada (EVE – WTA®) por um período de 7 a 9 dias mantidos a temperatura de 38,5°C com baixa tensão de oxigênio (6:5:89) e pressão hidrostática de 5mmHg.

Após 72 horas da inseminação (hpi) foi realizado o primeiro feeding (troca de 50% do meio) e a contagem dos zigotos clivados (número de estruturas clivadas/número de oócitos viáveis). Após 120 hpi realizou-se o segundo feeding. A taxa de blastocisto foi realizada em D7 (número de embriões produzidos/número de oócitos viáveis). Os blastocistos em D7 classificados como embriões de boa qualidade foram submetidos a técnica de vitrificação de acordo com a metodologia de Watanabe et al, 2014.

6.7 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).

Imediatamente antes da OPU, todos os folículos visíveis foram quantificados e classificados de acordo com o diâmetro: pequenos ($< 6\text{mm}$), médios (6 a 10 mm) e grandes ($> 10\text{mm}$). As variáveis resposta foram quantidade de folículos, tamanho de folículos aspirados, quantidade de oócitos recuperados, quantidade de oócitos viáveis, quantidade de oócitos viáveis de acordo com a classificação de grau de qualidade (I, II e III), quantidade de oócitos clivados e quantidade de blastocistos por sessão de aspiração folicular. Em sequência, foram calculadas a proporção de folículos de acordo com o tamanho [quantidade de pequenos ($< 6\text{ mm}$), médios (6 a 10 mm) ou grandes ($> 10\text{ mm}$) / quantidade de folículos totais]. Por fim foram analisadas as taxa de recuperação (quantidade de oócitos recuperados / quantidade de folículos aspirados); taxa de viáveis (quantidade de oócitos viáveis / quantidade de oócitos recuperados); taxa de clivagem sobre total (quantidade de oócitos clivados / quantidade de oócitos recuperados), taxa de clivagem sobre viáveis (quantidade de oócitos clivados / quantidade de oócitos viáveis), taxa de blastocistos sobre total (quantidade de blastocistos / quantidade de oócitos recuperados), taxa de blastocistos sobre viáveis (quantidade de blastocistos / quantidade de oócitos viáveis), taxa de desenvolvimento embrionário (quantidade de blastocistos / quantidade de oócitos clivados).

Para as análises, a distribuição binomial foi assumida para as variáveis de resposta categóricas. Os dados contínuos foram analisados para normalidade dos

resíduos e homogeneidade das variâncias utilizando “Guided Data Analysis” e transformados quando necessário. Os efeitos fixos incluídos no modelo foram categoria (novilhas pré púbere, púbere e prenha), réplica (1 a 6) e suas interações. O total de oócitos viáveis foi utilizado como covariável. O efeito da doadora foi considerado como efeito aleatório.

Para construção da equação de predição de blastocitos, foi realizada uma análise de regressão linear, utilizando o procedimento PROC REG do SAS. O modelo da regressão utilizado foi o seguinte: $y = \alpha + \beta x$. Em que: Y = total de blastocistos; α = intercepto; β = coeficiente linear; X = idade em meses.

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.

6.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de novilhas como doadoras de oócitos é uma alternativa para acelerar o ganho genético pela redução do intervalo entre gerações. Nesse contexto, este estudo objetivou avaliar a PIVE de novilhas PP da raça Holandesa frente a outras categorias. Os dados desse estudo confirmam a hipótese de que novilhas PP apresentam menor eficiência na PIVE quando comparadas a novilhas PU e PR. Outros estudos também confirmaram que novilhas PP apresentam reduzida PIVE (PRESICCE et al., 1997; BARUSELLI et al., 2016; WARZYCH et al., 2017, GUERREIRO, 2015).

No presente estudo, foi verificado que novilhas PU apresentaram maior população folicular quando comparadas às novilhas PP e PR ($PP = 13,7 \pm 1,43^b$; $PU = 20,2 \pm 1,64^a$; $PR = 14,0 \pm 1,74^b$; $P = 0,0002$). Corroborando com esse estudo, encontram-se relatos na literatura descrevendo que fêmeas bovinas apresentam mudanças ao longo da vida quanto ao número de folículos visualizados, sendo observada quantidade máxima de folículos com dois a quatro meses de idade (RAWLINGS et al., 2003). Ainda, achados de literatura comprovam o declínio do número de folículos até os oito meses de idade e linearidade dos oito meses até a senescência (DESJARDINS; HAFS, 1969; ADAMS et al., 1994).

Verificou-se que novilhas PP e PU apresentaram maior proporção de folículos pequenos (< 6 mm) em relação às novilhas PR ($PP = 75,2\%^{ab}$, $PU = 75,4\%^b$, $PR = 58,3\%^a$; $P < 0,0001$; Figura 4). Como discutido por Guerreiro, 2015, dados de Evans; Adams; Rawlings, (1994) demonstraram que fêmeas jovens apresentam ondas de crescimento folicular com menor período de duração e dominância do que as fêmeas adultas. Esses autores sugerem que 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) para o início de uma nova onda de crescimento folicular. Seguindo esta linha de raciocínio, ao se realizar a OPU em dia aleatório do ciclo estral em fêmeas jovens, metodologia utilizada no presente estudo, há maior probabilidade de se encontrar novilhas no estágio inicial da onda de crescimento folicular e, dessa forma, obter maior frequência de folículos pequenos (< 6 mm) no dia da aspiração.

Figura 4 - Proporção de folículos pequenos, médios e grandes conforme categoria.

Tabela 2 - Produção in vitro de embriões de novilhas pré púberes, púberes e prenhes da raça Holandesa (*Bos taurus*). Dados apresentados em porcentagens, médias e erro padrão da média ($\bar{x} \pm EPP$)

Item	Categoria			P value
	Pré púberes	Púberes	Prenhes	
N	60	60	59	-
Total de folículos, n	13,7 $\pm$ 1,43 ^b	20,2 $\pm$ 1,64 ^a	14,0 $\pm$ 1,74 ^b	0,0002
Total de óocitos recuperados, n	9,75 $\pm$ 1,29 ^b	15,6 $\pm$ 1,42 ^a	9,85 $\pm$ 1,60 ^b	0,02
Total de óocitos viáveis, n	4,67 $\pm$ 0,57 ^b	9,10 $\pm$ 0,95 ^a	5,63 $\pm$ 1,09 ^b	<0,0001
Taxa de recuperação ¹ , %	66,6%	75,4%	62,9%	0,26
Taxa de viáveis ² , %	48,5%	58,9%	54,1%	0,41
Total de clivados, n	1,27 $\pm$ 0,18 ^b	4,53 $\pm$ 0,56 ^a	4,31 $\pm$ 0,89 ^a	<0,0001
Taxa de clivagem ³ , % (Sobre total)	14,6% ^c	32,8% ^b	41,1% ^a	<0,0001
Taxa de clivagem ⁴ , % (Sobre viáveis)	28,2% ^c	55,2% ^b	67,8% ^a	<0,0001
Total de blastocistos, n	0,13 $\pm$ 0,05 ^c	0,90 $\pm$ 0,17 ^b	1,76 $\pm$ 0,32 ^a	<0,0001
Taxa de blastocistos ⁵ , % (Sobre total)	1,4% ^c	8,1% ^b	20,3% ^a	<0,0001
Taxa de blastocistos ⁶ , % (Sobre viáveis)	2,3% ^c	11,9% ^b	26,9% ^a	<0,0001
Taxa de desenvolvimento embrionário ⁷ , %	7,5% ^b	20,5% ^b	44,5% ^a	<0,0001

¹Nº. Óocitos recuperados / Nº. Total de folículos aspirados; ²Nº. Óocitos viáveis / Nº. Óocitos recuperados; ³Nº. Clivados / Nº. Óocitos recuperados; ⁴Nº. Clivados / Nº. Óocitos viáveis; ⁵Nº. Blastocistos / Nº. Óocitos recuperados; ⁶Nº. Blastocistos / Nº. Óocitos viáveis; ⁷Nº. Blastocistos / Nº. Clivados; Letras minúsculas diferentes (a, b e c) na mesma linha diferem entre categoria ($P < 0,05$).

No presente estudo, as novilhas PR apresentaram maior proporção de folículos médios e grandes (Figura 4). Resultados de Bagg et al., (2007), demonstram que ocorre melhoria da competência do desenvolvimento oocitário com o aumento do tamanho dos folículos. Este achado corrobora com estudos anteriores realizados em bovinos e suínos, que relatam que ocorre elevação na produção de blastocisto em animais PP com o aumento das dimensões do folículo; (MARCHAL et al., 2002; KAUFFOLD et al., 2005). Esses achados podem justificar o aumento da eficiência da PIVE em novilhas gestantes.

Não foi verificada diferença na taxa de recuperação de oócitos entre os grupos experimentais (PP = 66,6%; PU = 75,4%; PR = 62,9%; $P = 0,26$ – Tabela 2). No entanto, houve maior número de oócitos recuperados em novilhas PU quando comparado às demais categorias (PP = $9,75 \pm 1,29^b$; PU = $15,6 \pm 1,42^a$; PR = $9,85 \pm 1,60^b$; $P = 0,002$). A taxa de recuperação oocitária do presente estudo foi semelhante à observada por Guerreiro, (2015), que encontrou taxas de 77,6% para PP e de 75,9% para PU. Entretanto, diferentemente do presente estudo, Guerreiro, (2015) encontrou semelhante número de oócitos recuperados para novilhas PP e PU (PP = $14,2 \pm 2,2$; PU = $13,1 \pm 1,1$). Essa variação entre os estudos pode ser explicada pela diferença de manejo entre as propriedades e os animais experimentais. A variação de idade e/ou peso que ocorre na puberdade de novilhas é influenciada pelo manejo nutricional. Falhas em planos nutricionais durante o período pré púbere atrasam a puberdade ao prejudicar o desenvolvimento do sistema endócrino e reprodutivo (DAY et al., 1986). Outra possibilidade para explicar o baixo número de oócitos recuperados em novilhas PP pode ser baseada nos estudos de Armstrong et al., 1997. Esses autores discutem

que o uso da OPU não tem sido eficaz em animais jovens, atribuindo esse fato às limitações no tamanho das sondas vaginais e na dificuldade da palpação retal.

Figura 5 - Total de oócitos recuperados e de oócitos viáveis conforme categoria.

Nesse estudo, verificou-se que novilhas PU apresentaram maior quantidade de oócitos viáveis (PP = $4,67 \pm 0,57^b$; PU = $9,10 \pm 0,95^a$; e PR = $5,63 \pm 1,09^b$; $P < 0,0001$; Figura 5 e Tabela 2) e maior proporção de oócitos Grau I quando comparadas às novilhas prenhes (PP = $75,8\%^a$; PU = $75,2\%^a$ e PR = $58,3\%^b$; $P < 0,0001$ – Figura 6). Este achado não era esperado, uma vez que ambas categorias apresentavam maior proporção de folículos pequenos ($< 6\text{mm}$). Lonergan et al., (1994b) demonstraram clara relação entre o tamanho do folículo e a qualidade do oócito em termos de morfologia, uma vez que oócitos provenientes de folículos pequenos ($< 6\text{ mm}$) possuíam menor quantidade de células do *cumulus* (duas ou três camadas de células *cumulus* – folículos entre 2 - 6mm = $46,8\%^b$; folículos $> 6\text{mm}$ = $70,2\%^a$; $P > 0,001$).

Figura 6- Proporção de oócitos viáveis (Grau I, II e III) conforme categoria.

Watanabe (dados não publicados) verificou que a taxa de produção de embriões no dia 7 foi inferior em oócitos classificados como Grau I quando comparados com oócitos Grau III [Grau I = 29% (28/96) v.s. Grau III = 3% (34/99)]. Dessa maneira, ainda que controladas as variáveis, como veterinário, equipamentos, e técnico de laboratório, supõem-se que o critério adotado na classificação de oócitos é subjetivo.

Em relação aos parâmetros qualitativos, não houve diferença na taxa de oócitos viáveis entre as categorias estudadas (PP = 48,5%; PU = 58,9% e PR = 58,3%; $P < 0,41$). Achados semelhantes foram obtidos por Gimenes et al., (2015), que observaram 53,8% a 68,6% de taxa de oócitos viáveis quando novilhas PU da raça Holandesa foram submetidas à OPU em diferentes dias após o início da emergência da onda de crescimento folicular.

Por outro lado, as taxas de clivagem sobre o total de oócitos recuperados (PP = 14,6%^c; PU = 32,8%^b; PR = 41,1%^a; $P < 0,0001$) e sobre o total de oócitos viáveis (PP = 28,2%^c; PU = 55,2%^b; PR = 67,8%^a; $P < 0,0001$) foram inferiores em novilhas PP em comparação às demais categorias. Da mesma forma Guerreiro, (2015) encontrou taxa de clivagem inferior para as categorias PP quando comparadas a PU (68,6% e 98,8%; $P < 0,0001$). Semelhantemente, Palma, Tortonese, & Sinowatz, (2001) observaram menor taxa de clivagem em bezerras da raça Simental de três meses de idade em relação a vacas adultas [61,5% (1319/2145) vs. 70,1% (2124/3030); $P < 0,01$]. Em estudo conduzido por Gimenes et al., (2015) foram encontradas taxas de clivagens variando entre 57,4% e 52,5% em novilhas holandesas PU. Estas diferentes taxas de clivagem podem estar relacionadas a fatores intrínsecos (ex. meios de maturação oocitária, cultivo embrionário do laboratório de PIV e equipe executora) além de fatores extrínsecos (ex. animais, fazendas e época do ano).

Quanto à produção *in vitro* de embriões, as taxas de blastocistos também foram inferiores em novilhas PP em relação às demais categorias. Esses resultados foram observados tanto quando calculados sobre o número total de oócitos recuperados (PP = 1,4%^c; PU = 8,1%^b; PR = 26,9%^a; $P < 0,0001$ – Figura 8) como quando calculados sobre o total de oócitos viáveis (PP = 2,3%^c; PU = 11,9%^b; PR = 20,3%^a; $P < 0,0001$ – Figura 8). Novilhas PP apresentaram menor número de embriões viáveis por sessão de OPU quando comparadas as novilhas PU e PR (PP = $0,13 \pm 0,05^c$; PU = $0,90 \pm 0,17^b$; PR = $1,76 \pm 0,32^a$; $P < 0,0001$ – Figura 7).

Figura 7 - Número de blastocistos produzidos por OPU conforme categoria.

Figura 8 - Taxa de blastocisto por oócitos recuperados e por oócitos viáveis conforme categoria.

Em revisão realizada por Armstrong, (2001) foi destacado que a idade da fêmea é fator crucial para a eficiência da produção de embriões. Assim como reportado por Ledda et al., (1997), a competência oocitária é menor após a MIV e FIV em cordeiras PP em comparação com ovelhas adultas. No presente estudo, as novilhas PP são mais jovens que as novilhas púberes e que as novilhas gestantes. O efeito de categoria na eficiência da PIVE observado nessa investigação pode também ser explicado pela idade dos animais, uma vez que as categorias que produziram mais embriões eram também as categorias com idade mais avançadas. Na Figura 9 está apresentada a correlação entre a idade dos animais e o número de blastocisto produzido por OPU. Verificou-se correlação positiva entre essas duas variáveis analisadas ($R^2 = 0,0747$; $P = 0,0002$ – Figura 9). A equação de predição: $y = \alpha + \beta x$. Em que: Y = total de blastocistos por doadora; α = intercepto; β = coeficiente linear; X = idade (meses); $Y = 0,49 + 0,094X$).

Figura 9 – Quantidade de blastocisto por doadora de acordo com a idade (em meses).

Equação de predição: $y = \alpha + \beta x$. Em que: Y = total de blastocistos por doadora; α = intercepto; β = é o coeficiente linear; X = é idade (meses); $Y = 0.49 + 0.094X$; $R^2 = 0,747$; $P = 0,0002$.

7 CONCLUSÃO

Foi confirmada a hipótese de que a produção *in vitro* de embriões de novilhas pré púberes é inferior à de novilhas púberes e prenhes. Verificou-se que novilhas pré púberes apresentam menor taxa de clivagem, taxa de blastocistos e número de blastocistos produzidos por OPU.

Novilhas prenhes apresentaram resultados superiores em relação ao número de embriões produzidos por OPU, justificando o uso desta categoria em programas comerciais.

Dessa forma, conclui-se que a produção *in vitro* de embriões em animais pré púberes da raça Holandesa se mostrou ineficiente no presente trabalho. Sugere-se, portanto, a necessidade de mais estudos prospectivos, relacionados a fatores ligados a puberdade e gestação a fim de compreender os aspectos fisiológicos que influenciam na competência oocitária e na PIVE de animais jovens, em busca de estabelecer procedimentos que tornem viáveis a utilização desta categoria em programas de PIVE. Além disso, a técnica pode ser beneficiada através de estudos relacionados à meios de maturação de oócitos específicos para animais jovens, bem como protocolos hormonais prévios à OPU para criar um ambiente ovariano mais favorável, permitindo a obtenção de oócitos de maior qualidade e viabilidade para a PIVE.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS

Devido ao potencial da utilização de animais jovens para acelerar o ganho genético através da redução do intervalo de gerações, estudos prospectivos adicionais são necessários para o desenvolvimento de métodos que auxiliem a melhora dos resultados de produção *in vitro* de embriões em novilhas pré púberes da raça Holandesa.

Alguns autores sugerem protocolos de superestimulação previamente as OPUs, para promover aumento do diâmetro dos folículos e melhora da competência oocitária. Diferentes estudos comparando a competência oocitária em animais jovens não estimulados em relação aos animais com estímulo hormonal, sugerem que a estimulação aumenta a proporção de oócitos viáveis, a taxa de clivagem e a porcentagem de embriões que alcançam a fase de mórula e blastocisto (REVEL et al., 1995; PRESICCE et al., 1997; ARMSTRONG, 2001).

Outras estratégias devem ser levadas em consideração para obtenção de resultados satisfatórios. Novilhas selecionadas para se tornarem doadoras de embrião devem receber destacada atenção referente aos manejos sanitário, nutricional e ambiental afim de maximizar sua performance nos programas de produção de embriões. Empregar boas práticas de manejo nutricional e sanitário é de extrema importância em todas as fêmeas selecionadas para doadoras de oócitos, independentemente da categoria. Animais saudáveis atingem a maturidade mais cedo e tendem a ter melhores resultados na PIVE. Animais manejados em ambientes que proporcionam bem-estar e conforto térmico podem expressar o máximo potencial produtivo dentro dos programas de produção de embriões.

9 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, 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.
- ARMSTRONG, D. T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1303–1322, 2001.
- ARMSTRONG, D. T.; IRVINE, B. J.; EARL, C. R.; MCLEAN, D.; SEAMARK, R. F. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and *in vitro* embryo production from calf oocytes. **Theriogenology**, v. 42, n. 7, p. 1227–1236, 1994.
- ARMSTRONG, D. T.; KOTARAS, P. J.; EARL, C. R. Advances in production of embryos *in vitro* from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. **Reproduction, fertility and development** 9.3, 333-340, 1997.
- ATKINS, J. A.; POHLER, K. G.; SMITH, M. F. Physiology and endocrinology of puberty in heifers. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 29, n. 3, p. 479–492, 2013.
- BAGG, M. A.; NOTTLE, M. B.; ARMSTRONG, D. T.; GRUPEN, C. G. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 7, p. 797–803, 2007.
- BALDRIGHI, J. M.; SÁ FILHO, M. F.; BATISTA, E.; LOPES, R. N. V. R.; VISINTIN, J. A.; BARUSELLI, P. S.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A. Anti-Müllerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 1020, p. 1015–1020, 2014.
- BARUSELLI, P. S.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; FERREIRA, R. M.; GUERREIRO, B. G.; BAYEUX, B. M.; SALES, J. N. S.; SOUZA, A. H.; GIMENES, L. U. Factors that interfere with oocyte quality for *in vitro* production of cattle embryos: effects of different developmental & reproductive stages. **Anim. Reprod**, v. 13, n. 3, p. 264–272, 2016.
- BATISTA, E. O. S.; GUERREIRO, B. M.; FREITAS, B. G.; SILVA, J. C. B.; VIEIRA, L. M.; FERREIRA, R. M.; RESENDE, R. G.; BASSO, a. C.; LOPES, R. N. V. R.; RENNÓ, F. P.; SOUZA, a. H.; BARUSELLI, P. S. Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves for

in vitro embryo production. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 54, p. 1–9, 2015.

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

BENDER, K.; WALSH, S.; EVANS, A. C. O.; FAIR, T.; BRENNAN, L. Metabolite concentrations in follicular fluid may explain differences in fertility between heifers and lactating cows. **Reproduction**, v. 139, n. 6, p. 1047–1055, 2010.

BUTLER, S. A. A.; ATKINSON, P. C.; BOE-HANSEN, G. B.; BURNS, B. M.; DAWSON, K.; BO, G. A.; MCGOWAN, M. R. Pregnancy rates after fixed-time artificial insemination of Brahman heifers treated to synchronize ovulation with low-dose intravaginal progesterone releasing devices, with or without eCG. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1416–1423, 2011.

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. 53–59, 2005.

COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F. AND JORGE, E. C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, v. 24, p. 123–147, 2010.

CUSHMAN, R. A.; HEDGPETH, V. S.; ECHTERNKAMP, S. E.; BRITT, J. H. Evaluation of numbers of microscopic and macroscopic follicles in cattle selected for twinning. **Journal of Animal Science**, v. 78, n. 6, p. 1564–1567, 2000.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; GARCIA-WINDER, M.; ZALESKY, D. D.; SCHANBACHER, B. D.; KITOK, R. J.; KINDER, J. E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers: estradiol negative feedback regulation of luteinizing hormone secretion. **Biology of reproduction**, v. 31, n. 2, p. 332–341, 1984.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; PENNEL, P. L.; ZALESKY, D. D.; CLUTTER, A. C.; KITOK, R. J.; KINDER, J. E. Influence of season and estradiol on secretion of luteinizing hormone in ovariectomized cows. **Biology of reproduction**, v. 35, n. 3, p. 549–53, out. 1986.

DAY, M. L.; IMAKAWA, K.; WOLFE, P. L.; KITOK, R. J.; KINDER, J. E. Endocrine mechanisms of puberty in heifers. Role of hypothalamo-pituitary estradiol receptors in the negative feedback of estradiol on luteinizing hormone secretion. **Biology of reproduction**, v. 37, n. 5, p. 1054–65, 1987.

DE LOS REYES, M.; VILLAGRÁN, M. L.; CEPEDA, R.; DUCHENS, M.; PARRAGUEZ, V.; URQUIETA, B. Histological characteristics and steroid concentration of ovarian follicles at different stages of development in pregnant and non-pregnant dairy cows. **Veterinary Research Communications**, v. 30, n. 2, p. 161–173, 2006.

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. 1, p. 1107–1116, 2001.

DELOUKAS, P.; MATHEWS L. H.; ASHURST J.; et al. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20. **Nature**, v. 414, n. 6866, p. 865–871, 2001.

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.

DOWNS, S. M.; MASTROPOLO A. M. The participation of energy substrates in the control of meiotic maturation in murine oocytes. **Developmental biology**, v. 162, n. 1, p. 154–168, 1994.

ERICKSON, B. H. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. **Jornal of Animal Science**, p. 800–805, 1966.

EVANS, a C.; ADAMS, G. P.; RAWLINGS, N. C. Follicular and hormonal development in prepubertal heifers from 2 to 36 weeks of age. **Journal of reproduction and fertility**, v. 102, n. 2, p. 463–470, 1994.

FREITAS, B. G. Influência do desenvolvimento corporal na resposta aos programas de sincronização para inseminação artificial em tempo fixo em novilhas Nelore de 14 meses de idade. 2015. 85f. **Dissertação (Mestrado em Ciências)** - Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

GARDNER, D. K.; LANE, M. Culture of viable human blastocysts in defined sequential serum-free media. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 13 Suppl 3, p. 148–59; discussion 160, jun. 1998.

GARDNER, D. K.; LEESE, H. J. Assessment of embryo viability prior to transfer by the noninvasive measurement of glucose uptake. **The Journal of experimental zoology**, v. 242, n. 1, p. 103–5, abr. 1987.

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 invitro embryo production in *Bos indicus*, *Bos taurus*, and *Bubalus bubalis*. **Theriogenology**, v. 83, n. 3, p. 385–393, 2015a.

GUERREIRO, B. M. **Produção *in vitro* de embriões de doadoras pré púberes da raça Holandesa**. 2015. Universidade de São Paulo, 2015.

GUERREIRO, B. M.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; SÁ FILHO, M. F.; RODRIGUES, C. a.; NETTO, a. C.; 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. **Domest Anim Endocrinol**, v. 49, p. 96–104, jul. 2014.

HONARAMOOZ, A.; ARAVINDAKSHAN, J.; CHANDOLIA, R. K.; BEARD, A. P.; BARTLEWSKI, P. M.; PIERSON, R. a; RAWLINGS, N. C. Ultrasonographic evaluation

of the pre-pubertal development of the reproductive tract in beef heifers. **Animal reproduction science**, v. 80, n. 1–2, p. 15–29, jan. 2004.

JAINUDEEN, M.R., HAFEZ, E. S. E. (Eds.). **Reproduction in farm animals**. John Wiley & Sons. 2013.

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. **The Journal of reproduction and development**, v. 51, n. 3, p. 325–32, 2005.

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.

KRISHER, R. L.; BAVISTER, B. D. Responses of oocytes and embryos to the culture environment. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 103–14, jan. 1998.

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

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.

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, 1994.

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.

MARCHAL, R.; VIGNERON, C.; PERREAU, C.; BALI-PAPP, A.; MERMILLOD, P. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1523–32, 15 mar. 2002.

MEINTJES, M.; BELLOW, M. S.; BROUSSARD, J. R.; PAUL, J. B.; GODKE, R. A. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef cattle for *in vitro* fertilization. **Journal of animal science**, v. 73, n. 4, p. 967–974, 1995.

MOOR, R. M.; POWELL D.J. Translational capacity of sheep oocytes microinjected with messenger RNA. **Journal of reproduction and fertility**, v. 86, n. 1, p. 289-295, 1989.

NRC. NUTRIENT REQUIREMENTS OF DAIRY CATTLE. 7th ed. Washington, DC.; Natl. Acad. Sci., 2001.

- 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, 2001.
- PÉREZ O'BRIEN, A. M.; MÉSZÁROS, G.; UTSUNOMIYA, Y. T.; SONSTEGARD, T. S.; FERNANDO GARCIA, J.; VAN TASSELL, C. P.; CARVALHEIRO, R.; DA SILVA, M. V. B.; SÖLKNER, J. Linkage disequilibrium levels in *Bos indicus* and *Bos Taurus* cattle using medium and High density SNP chip data and different minor allele frequency distributions. **Livestock Science**. 2014.
- PERRY, G. A. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 373–378, 2016.
- 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.
- REVEL, F.; MERMILLOD, P.; PEYNOT, N.; RENARD, J. P.; HEYMAN, Y. Low developmental capacity of *in vitro* matured and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **Journal of reproduction and fertility**, v. 103, n. 1, p. 115–120, 1995.
- RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J. F.; O'FARRELL, K. J.; MACSIURTAİN, M.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production *in vitro*. **Theriogenology**, v. 63, n. 3, p. 939–949, 2005.
- RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 234–248, 2002.
- SENGER, P. L. **Pathways to pregnancy and parturition**. Current Conceptions, Inc., 1615 NE Eastgate Blvd., 1997.
- STEEVES, T. E.; GARDNER, D. K. Metabolism of glucose, pyruvate, and glutamine during the maturation of oocytes derived from pre-pubertal and adult cows. **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, n. 1, p. 92–101, 1999.
- SUNDERLAND, S. J.; CROWE, M. a; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. **Journal of reproduction and fertility**, v. 101, n. i, p. 547–555, 1994.
- WARZYCH, E.; PAWLAK, P.; PSZCZOLA, M.; CIESLAK, A.; LECHNIAK, D. Prepubertal heifers versus cows: The differences in the follicular environment. **Theriogenology**, v. 87, p. 36–47, 2017.

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

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, 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.

ZIELKE, H. R.; ZIELKE, C. L.; OZAND, P. T. Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells. **Federation proceedings**, v. 43, n. 1, p. 121–5, jan. 1984.