

FLÁVIA MORAG ELLIFF

**Estratégias para melhorar a produção *in vitro* de embriões de
doadoras jovens das raças Holandês (*Bos taurus*) e Gir (*Bos
indicus*)**

São Paulo

2020

FLÁVIA MORAG ELLIFF

Estratégias para melhorar a produção in vitro de embriões de doadoras jovens das raças Holandês (*Bos taurus*) e Gir (*Bos indicus*)

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

De acordo: _____



Orientador

São Paulo
2020

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

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3896
FMVZ

Elliff, Flávia Morag
Estratégias para melhorar a produção *in vitro* de embriões de doadoras jovens das raças Holandês (*Bos taurus*) e Gir (*Bos indicus*) / Flávia Morag Elliff. – 2020.
109 f. : il.

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

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Bezerras. 2. FSH. 3. BST. 4. Oócito. 5. Embrião. I. Título.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estratégias para melhorar a produção in vitro de embriões de doadoras jovens das raças Holandês (*Bos taurus*) e Gir (*Bos indicus*)", protocolada sob o CEUA nº 8573050917 (ID 006859), sob a responsabilidade de **Pietro Sampaio Baruselli e equipe; FLÁVIA MORAG ELLIFF** - 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 14/08/2019.

We certify that the proposal "Strategies to improve the in vitro embryo production of young Holstein (*Bos taurus*) and Gyr (*Bos indicus*) donors", utilizing 165 Bovines (165 females), protocol number CEUA 8573050917 (ID 006859), under the responsibility of **Pietro Sampaio Baruselli and team; FLÁVIA MORAG ELLIFF** - 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 08/14/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [08/2019](#) a [11/2019](#)

Área: [Reprodução Animal](#)

Origem: [Animais de proprietários](#)

Espécie: [Bovinos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [3 a 144 meses](#)

N: [165](#)

Linhagem: [Holandês e Gir](#)

Peso: [100 a 600 kg](#)

Local do experimento: Os animais da raça Gir serão provenientes de estabelecimento comercial, sendo que todo o experimento será realizado no mesmo. Os animais serão mantidos a pasto e os procedimentos serão realizados em tronco de contenção. Os animais da raça Holandês serão provenientes do Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (Campus USP Pirassununga) e da Bovinocultura de Leite da Prefeitura do Campus da USP Pirassununga, sendo que todo o experimento será realizado no campus da USP. Os animais serão mantidos a pasto e os procedimentos serão realizados em tronco de contenção.

São Paulo, 18 de dezembro de 2019

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ELLIFF, Flávia Morag

Título: **Estratégias para melhorar a produção *in vitro* de embriões de doadoras jovens das raças Holandês (*Bos taurus*) e Gir (*Bos indicus*)**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico aos meus pais, Yara e David, por todo apoio e amor incondicional! Sem vocês, nada disso teria sido possível. Muito obrigada por acreditarem em mim!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Yara** e **David**, por terem me concedido a vida e por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos, me ensinando que nada é impossível, basta querer!

Às minhas irmãs, **Bianca** e **Carla**, que sempre me apoiaram e me deram forças para seguir em frente. Mesmo distantes fisicamente, se fazem presente a todo momento.

Às minhas avós, **Therezinha** e **Marjorie**, e aos meus avôs, que já partiram, **Raul** e **George**, muito obrigada por tornarem minha vida mais alegre e sempre fazerem de tudo para garantir minha felicidade!

Ao meu orientador e mentor de vida, **Prof. Pietro Sampaio Baruselli**. Levarei cada ensinamento comigo aonde quer que eu vá. Sua humildade, caráter, profissionalismo e seriedade servem de inspiração para todos nós. Não tenho palavras para descrever a gratidão que sinto por ter tido o privilégio de trabalhar sob sua orientação, muito obrigada!

Ao **Bernardo**, que além de amigo, se tornou um mentor durante minha trajetória. Obrigada por todos os ensinamentos, broncas, incentivos e parceria. Você foi uma peça essencial do meu trabalho, só tenho a agradecer por tê-lo em minha vida.

Ao **Romulo**, **Bruna** e **Lisbek**, obrigada por todos os momentos que vivemos juntos na casinha! Vocês definitivamente tornaram esses anos mais felizes e completos. Nunca vou me esquecer de tudo que passamos juntos, todas as dificuldades e alegrias, obrigada por tudo!

Ao **Badá** e **Marcos**, por todos os ensinamentos e ajuda com estatística! Vocês nunca mediram esforços para me ajudar, e por isso serei eternamente grata!

À **Laísa**, **Damiana** e **Laís**, minhas grandes amigas, que estiveram ao meu lado em todos os momentos, bons e ruins, obrigada por todo apoio e cumplicidade.

Ao **Gaúcho** e **Marina**, pelo companheirismo durante esses anos! Sei que vou levar a amizade de vocês para o resto da vida.

Ao **Tuba**, **Pallú**, **Juliana**, **Emiliana** e **Mari Ortolan**. Obrigada por toda ajuda, risadas, carinho e companheirismo.

Aos amigos de Pirassununga, **Gabi, Carlos, Júlio e Léo**, obrigada por me ajudarem sempre que preciso!

À **Júlia e Nélcio**, pelo companheirismo, conselhos, humildade e profissionalismo. Vocês são uma verdadeira inspiração em tudo que fazem!

Ao **Evandro Guimarães**, pela generosidade em dispor de sua fazenda e seus animais para a realização do experimento. Ao **Nando** e todos os funcionários das **Fazendas do Basa**, muito obrigada pela ajuda.

Ao **Prof. Francisco Rennó e Guilherme Gomes** por disponibilizarem os animais do **Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite** para este estudo. O apoio de vocês foi fundamental para a realização deste projeto, muito obrigada.

À **Yeda, Aline e Daniel** da **Vitrogen**, obrigada pelo profissionalismo, companheirismo e colaboração com esse trabalho.

À **Harumi**, por sempre me ajudar com as burocracias do VRA e pelos momentos de desabafo!

Aos queridos professores do VRA, **Mayra, Marcílio, Cláudia, Guilherme Pugliesi, Ed Hoffman, Camila, Carla e Ricardo**, por todos os ensinamentos, convívio do dia-a-dia e pelos churrascos.

À **Camila Motta**, por sempre salvar nossas vidas com a burocracia da CEUA, pelas broncas e por sempre estar presente.

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

À **FAPESP**: processo nº 2019/14679-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio à pesquisa.

Finalmente, gostaria de agradecer às **bezerrinhas, novilhas e vacas** usadas nesse projeto! Obrigada pela paciência e por contribuírem com a minha pesquisa. Vocês merecem todo respeito e admiração!

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less”
(Marie Curie)

RESUMO

ELLIFF, FM. **Estratégias para melhorar a produção *in vitro* de embriões de doadoras jovens das raças Holandês (*Bos taurus*) e Gir (*Bos indicus*).** 2020. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O uso de animais jovens como doadores de oócitos contribui para acelerar o ganho genético através da redução do intervalo de gerações. Entretanto, doadoras jovens possuem baixa eficiência na produção *in vitro* de embriões (PIVE). Com isso, o presente estudo objetivou avaliar estratégias para melhorar a PIVE dessa categoria de doadoras. No Experimento 1, 59 bezerras Holandesas foram divididas em: Controle (CTL; n=15), FSH (140mg de FSH, n=15), BST (500mg de rBST, n=14) e BST_FSH (associação de rBST+FSH, n=15) e 15 novilhas púberes (GNP) como controle positivo. No Experimento 2, 90 doadoras Gir foram utilizadas (30 bezerras, 30 novilhas púberes e 30 vacas). Cada categoria foi subdividida em: Controle (sem tratamento, n=15 por categoria) e FSH (tratadas com FSH, n=15 por categoria). Os embriões produzidos foram transferidos e foi avaliada a taxa de prenhez por transferência de embriões (P/TE). Ainda, foi realizada dosagem de IGF1 e de glicose de todos os animais. Os resultados foram analisados utilizando o software SAS. No Experimento 1, o tratamento com FSH elevou a quantidade de folículos médios (Com FSH: $7,2 \pm 1,4$; Sem FSH: $1,0 \pm 0,2$; $P < 0,0001$) e grandes (Com FSH: $2,4 \pm 0,6$; Sem FSH: $0,7 \pm 0,1$; $P = 0,0042$). O tratamento com FSH apresentou tendência ($P = 0,08$) em aumentar a taxa de oócitos viáveis (Com FSH: 62,1% vs. Sem FSH: 54,3%). Foi observada interação BST*FSH ($P = 0,0007$) para taxa de clivagem (GCTL: 40,5%^b; GFSH: 45,2%^{ab}; GBST: 48,4%^a; GBST_FSH: 40,9%^{ab}). Animais tratados com rBST apresentaram tendência ($P = 0,06$) em aumentar o número de blastocistos (Com rBST: $0,86 \pm 0,24$; Sem rBST: $0,39 \pm 0,14$) e taxa de blastocisto (Com rBST: 7,3%; Sem rBST: 3,7%; $P = 0,09$). O tratamento com rBST elevou a concentração plasmática de IGF1 (Com rBST: $311,1 \pm 24,9$; Sem rBST: $231,3 \pm 15,5$ ng/mL; $P_{bst} = 0,0031$). No Experimento 2 não foi verificada interação Trat*Cat para nenhuma variável. Entretanto, verificou-se efeito de categoria para: população folicular ($P < 0,0001$), oócitos totais ($P = 0,0002$) e oócitos clivados ($P = 0,0004$), sendo que as novilhas foram superiores. Verificou-se que as bezerras apresentaram maior

concentração de glicose ($P=0,0157$) que as novilhas e vacas. Ainda, as bezerras e as novilhas apresentaram maiores concentrações de IGF1 ($P=0,0001$) que vacas. O tratamento com FSH elevou a população folicular (Com FSH: $25,9\pm 0,76$; Sem FSH: $21,9\pm 0,70$, $P=0,0002$) e o número de folículos médios ($P>0,0001$) e grandes ($P>0,0001$). Animais tratados com FSH apresentaram menor taxa de recuperação oocitária (Com FSH: 51,8%; Sem FSH: 65,2%; $P=0,0136$). A taxa de clivagem foi influenciada pelo tratamento (Com FSH: 59,5%; Sem FSH: 50,7%; $P=0,0163$). Houve tendência de maior P/TE aos 30 (Bezerras: 40,0%^b; Novilhas: 44,5%^b; Vacas: 57,6%^a; $P=0,0623$) e aos 60 dias (Bezerras: 35,3%^b; Novilhas: 38,1%^b; Vacas: 50,4%^a; $P=0,0950$) para os embriões de vacas. O tratamento com FSH influenciou negativamente as concentrações de IGF1 (Com FSH: $238,7\pm 25,2$; Sem FSH: $296,8\pm 25,5$ ng/mL; $P=0,0312$), não influenciando os níveis de glicose ($P=0,8593$). Desta forma, conclui-se que o tratamento com rBST em bezerras holandesas e o tratamento com FSH em bezerras, novilhas e vacas Gir aumentaram a eficiência da PIVE.

Palavras-chave: Bezerras. FSH. BST. Oócito. Embrião.

ABSTRACT

ELLIFF, FM. **Strategies to improve the *in vitro* embryo production of young Holstein (*Bos taurus*) and Gyr (*Bos indicus*) donors.** 2020. 107 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Use of young animals as oocyte donors contributes to genetic gain enhancement through reduction of the generation interval. However, young donors have low efficiency on the *in vitro* embryo production (IVEP). Thus, the objective of the present study was to evaluate strategies to improve the IVEP of these animals. In Experiment 1, 59 prepubertal Holstein heifers were used, divided into 4 groups: Control (CTL; n=15), FSH (140 mg of FSH; n=15), BST (500 mg of rbST, n=14) and BST_FSH (association of both treatments; n=15) and 15 pubertal heifers (PH) as positive control. In Experiment 2, 90 Gyr donors were used (30 calves, 30 pubertal heifers and 30 cows). Each category was subdivided into 2 groups: Control (no treatment, n=15 per category) and FSH (treated with FSH, n=15 per category). The IVEP parameters were evaluated, the embryos produced were transferred and the pregnancy rate per embryo transfer (P/ET) was evaluated. Also, IGF1 and glucose were assayed for all animals. Data were analyzed using SAS software. In Experiment 1, treatment with FSH increased the number of medium follicles (With FSH: 7.23 ± 1.43 ; Without FSH: 1.03 ± 0.22 ; $P < 0.0001$) and large follicles (With FSH: 2.39 ± 0.56 ; Without FSH: 0.66 ± 0.12 ; $P = 0.0042$). Treatment with FSH showed a tendency ($P = 0.08$) to increase the rate of viable oocytes (With FSH: 62%; Without FSH: 54%). There was a BST*FSH interaction ($P = 0.0007$) for cleavage rate (CTL: 40.5%^b; FSH: 45.2%^{ab}; BST: 48.4%^a; BST_FSH: 40.9%^{ab}). Animals treated with rBST showed a tendency ($P = 0.06$) to have increased number of blastocysts (With rBST: 0.86 ± 0.24 ; Without rBST: 0.39 ± 0.14) and blastocyst rate (With rBST: 7.3%; Without rBST: 3.7%; $P = 0.09$). Treatment with rBST increased the levels of IGF1 (With rBST: 311.06 ± 24.9 ; Without rBST: 231.28 ± 15.54 ; $P_{bst} = 0.0031$). In Experiment 2, there was no Treat*Cat interaction for any of the variables. There was a category effect for the following variables: follicle population ($P > 0.0001$), total oocytes ($P = 0.0002$) and cleaved oocytes ($P = 0.0004$), such that pubertal heifers had higher values for all these variables. In addition, calves and heifers presented higher concentration of IGF1 ($P = 0.0001$) than cows. Treatment with FSH increased the follicle population

(With FSH: 25.9 ± 0.76 ; Without FSH: 21.9 ± 0.70 , $P=0.0002$) and the number of medium ($P>0.0001$) and large ($P>0.0001$) follicles. Animals treated with FSH had lower recovery rate (With FSH: 51.8%; Without FSH: 65.2%; $P=0.0136$). The cleavage rate was influenced ($P=0.0163$) by the treatment (With FSH: 59.5% vs. Without FSH: 50.7%). There was a tendency for increased pregnancy rate at 30 days (Calves: 40.0%^b; Heifers: 44.5%^b; Cows: 57.6%^a; $P=0.0623$) and 60 days (Calves: 35.3%^b; Heifers: 38.1%^b; Cows: 50.4%^a; $P=0.0950$) for embryos produced by cow donors. Treatment with FSH had a negative influence on the IGF1 concentration (With FSH: 238.7 ± 25.2 ; Without FSH: 296.8 ± 25.5 ; $P=0.0312$), with no effect on the glucose levels ($P=0.8593$). Thus, it is concluded that treatment with rBST for Holstein calves and treatment with FSH for Gyr calves, heifers and cows were effective for increasing the IVEP efficiency.

Keywords: Calves. FSH. BST. Oocyte. Embryo.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Modelo hipotético da proporção de folículos (FL) pequenos, médios e grandes, qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões das fêmeas pré-púberes tratadas ou não com FSH e/ou rBST..... 31
- Figura 2 - Desenho esquemático do delineamento experimental. Bezerras de 3 a 10 meses de idade distribuídas em 4 grupos experimentais (CTL – controle; FSH – tratadas somente com FSH; BST – tratadas somente com rBST; e BST_FSH – tratadas com rBST e FSH) e Novilhas Púberes (NP)..... 34
- Figura 3 - A: Guia de aspiração folicular guiada por ultrassonografia convencional, com 5,0 cm de diâmetro. B: Guia de aspiração folicular guiada por ultrassonografia de tamanho reduzido para novilhas, com 2,6 cm de diâmetro..... 35
- Figura 4 - Modelo hipotético da proporção de folículos (FL) pequenos, médios e grandes, qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões de bezerras, novilhas púberes e vacas tratadas ou não com FSH..... 60
- Figura 5 - Desenho esquemático do delineamento experimental. Bezerras, novilhas púberes e vacas tratadas ou não com FSH e submetidas à OPU..... 63
- Figura 6 - A. Gráfico de correlação linear entre a concentração plasmática de IGF1 e população folicular para as três categorias de doadoras da raça Gir. B. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e população folicular de bezerras. C. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e população folicular de novilhas. D. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e população folicular de vacas..... 77

Figura 7 -	A. Gráfico de correlação linear entre a concentração plasmática de IGF1 e número de oócitos viáveis para as três categorias de doadoras da raça Gir. B. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e número de oócitos viáveis de bezerras. C. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e número de oócitos viáveis de novilhas. D. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e número de oócitos viáveis de vacas.....	78
Figura 8 -	A. Gráfico de correlação linear entre a concentração plasmática de IGF1 e a taxa de oócitos viáveis para as três categorias de doadoras da raça Gir. B. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e a taxa de oócitos viáveis de bezerras. C. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e a taxa de oócitos viáveis de novilhas. D. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e a taxa de oócitos viáveis de vacas.....	79
Figura 9-	A. Gráfico de correlação linear entre a concentração plasmática de IGF1 e o número de blastocistos para as três categorias de doadoras da raça Gir. B. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e o número de blastocistos de bezerras. C. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e o número de blastocistos de novilhas. D. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e o número de blastocistos de vacas.....	80
Figura 10 -	A. Gráfico de correlação linear entre a concentração plasmática de IGF1 e taxa de blastocisto para as três categorias de doadoras da raça Gir ($P=0,218$; $r=-0,13581$). B. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e taxa de blastocisto de bezerras ($P=0,1059$; $r=0,0907$). C. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e taxa de blastocisto de novilhas ($0,2348$; $r=0,0538$). D. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e taxa de blastocisto de vacas.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Concentrações circulantes de IGF-1 (ng/mL) e Glicose (mg/dL) no dia da OPU de animais tratados co/sem FSH e rBST.....	42
Tabela 2 -	Proporção de folículos pequenos (<5 mm), médios (5-8 mm) e grandes (>8 mm) e população folicular total no D7 para animais tratados com/sem FSH e rBST.....	45
Tabela 3 -	Sumário dos parâmetros de avaliação de produção <i>in vitro</i> de embriões para cada grupo experimental.....	56
Tabela 4 -	Concentrações circulantes de IGF-1 (ng/mL) e Glicose (mg/dL) no dia da OPU para bezerras, novilhas púberes e vacas tratadas ou não com FSH.....	67
Tabela 5 -	Proporção de folículos pequenos (>5 mm), médios (5-8 mm) e grandes (<8 mm) e população folicular total no dia da OPU (D7) para bezerras, novilhas púberes e vacas tratadas ou não com FSH.....	70
Tabela 6 -	Produção <i>in vitro</i> de embriões de bezerras, novilhas púberes e vacas tratadas ou não com FSH antes da OPU. Dados apresentados em porcentagem, média e \pm erro padrão da média.....	76

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Proporção de folículos pequenos (>5 mm), folículos médios (5-8 mm) e folículos grandes (<8 mm) avaliados no dia da OPU (D7) para animais que receberam ou não tratamento com rBST.....	43
Gráfico 2 -	Medida repetida no tempo para os momentos D-2 (aplicação de rBST), D5 (início do tratamento com FSH) e D7 (dia da OPU) em relação às concentrações séricas de IGF-1 (ng/mL)	43
Gráfico 3 -	Proporção de folículos pequenos (>5 mm), folículos médios (5-8 mm) e folículos grandes (<8 mm) avaliados no dia da OPU (D7) para animais que receberam (n=30) ou não (n=30) tratamento com FSH.....	44
Gráfico 4 -	Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 (ng/mL) no momento da OPU e o número de oócitos viáveis recuperados.....	47
Gráfico 5 -	Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 (ng/mL) no momento da OPU e o número de oócitos clivados.....	49
Gráfico 6 -	Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 (ng/mL) no momento da OPU e a taxa de clivagem (nº de oócitos clivados/nº de oócitos totais)	50
Gráfico 7 -	Taxa de clivagem (nº de oócitos clivados/nº de oócitos totais) após PIVE em doadoras pré-púberes dos grupos Controle (GCTL; n=15), tratadas com rBST (GBST; n=14), tratadas com FSH (GFSH; n=15), tratadas com rBST e FSH (GBST_FSH; n=15)	51
Gráfico 8 -	Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 (ng/mL) no momento da OPU e o número de blastocistos.....	52
Gráfico 9 -	Número de blastocistos produzidos após PIVE em doadoras pré-púberes tratadas (n=30) ou não (n=30) com rBST.....	53

Gráfico 10 -	Taxa de blastocisto (nº de blastocistos/nº de oócitos totais) após PIVE em doadoras pré-púberes tratadas (n=30) ou não (n=30) com rBST.....	54
Gráfico 11 -	Correlação entre a concentração sérica de IGF-1 (ng/mL) no momento da OPU e a taxa de blastocisto (nº de blastocistos/nº de oócitos totais)	55
Gráfico 12 -	P/TE aos 29 dias dos embriões produzidos na PIVE de doadoras pré-púberes dos grupos BST (n=3), FSH (n=5), BST_FSH (n=10); e novilhas púberes (GNP; n=15)	57
Gráfico 13 -	Proporção de folículos pequenos (>5 mm), médios (5-8 mm) e grandes (<8 mm) no dia da OPU para bezerras, novilhas e vacas tratadas ou não com FSH.....	69
Gráfico 14 -	Taxa de recuperação oocitária (número de oócitos totais/número de folículos totais no D7) para animais que receberam (n=45) ou não (n=45) tratamento com FSH	72
Gráfico 15 -	Taxa de clivagem (número de oócitos clivados/número de oócitos totais) para animais que receberam (n=45) ou não (n=45) tratamento com FSH.....	74
Gráfico 16 -	Taxa de blastocisto (número de blastocistos/número de oócitos totais) para bezerras (n=30), novilhas (n=30) e vacas (n=30)	75
Gráfico 17 -	P/TE aos 30 e 60 dias de embriões provenientes de bezerras (n=43), novilhas (n=128) e vacas (n=114)	83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	DESAFIOS NA UTILIZAÇÃO DE FÊMEAS JOVENS COMO DOADORAS DE OÓCITOS.....	22
2.2	DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS GENÉTICOS <i>BOS TAURUS</i> E <i>BOS INDICUS</i>	24
2.3	ESTRATÉGIAS PARA MELHORAR A PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	25
2.3.1	Efeito do tratamento com FSH na produção <i>in vitro</i> de embriões	25
2.3.2	Efeito do tratamento com rBST na produção <i>in vitro</i> de embriões	27
2.4	RELAÇÃO ENTRE QUALIDADE OOCITÁRIA E NÍVEIS CIRCULANTES DE IGF1 E GLICOSE.....	29
3	EXPERIMENTO 1 – Efeito do tratamento com hormônio folículo estimulante e/ou somatotropina bovina recombinante na produção <i>in vitro</i> de embriões e concentração sérica de glicose e IGF1 de fêmeas pré-púberes da raça Holandês (<i>Bos taurus</i>)	30
3.1	OBJETIVOS	30
3.2	HIPÓTESES	30
3.3	MATERIAL E MÉTODOS	31
3.3.1	Local e período de execução	32
3.3.2	Animais e instalações	32
3.3.3	Delineamento experimental	33
3.3.4	Avaliações ultrassonográficas	34
3.3.5	Aspiração folicular guiada por ultrassonografia	35
3.3.6	Produção <i>in vitro</i> de embriões	37
3.3.6.1	Maturação <i>in vitro</i>	37
3.3.6.2	Fertilização <i>in vitro</i>	37

3.3.6.3	Cultivo <i>in vitro</i>	38
3.3.6.4	<i>Feeding</i> e avaliação da taxa de desenvolvimento embrionário....	38
3.3.7	Colheita de sangue	38
3.3.7.1	Análise de glicose.....	39
3.3.7.2	Análise de IGF1.....	39
3.3.8	Transferência de embriões e diagnóstico de gestação	39
3.3.9	Análise estatística	40
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4	EXPERIMENTO 2 – Efeito do tratamento com hormônio folículo estimulante na produção <i>in vitro</i> de embriões e concentração sérica de IGF1 e glicose de bezerras, novilhas púberes e vacas da raça Gir (<i>Bos indicus</i>)	58
4.1	OBJETIVOS	58
4.2	HIPÓTESE	59
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	61
4.3.1	Local e período de execução.....	61
4.3.2	Animais e instalações.....	61
4.3.3	Delineamento experimental.....	61
4.3.4	Avaliações ultrassonográficas.....	63
4.3.5	Aspiração folicular guiada por ultrassonografia.....	64
4.3.6	Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	64
4.3.7	Colheita de sangue.....	64
4.3.8	Transferência de embriões e diagnóstico de gestação.....	64
4.3.9	Análise estatística.....	65
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5	CONCLUSÕES	84
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS	85
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87

1 INTRODUÇÃO

A demanda mundial por produtos de origem animal aumentou consideravelmente nos últimos anos devido ao crescimento da população (FAO, 2017). Apesar de o Brasil ter o maior rebanho comercial do mundo (221,81 milhões de cabeças, IBGE, 2018), a produtividade ainda é baixa. A produção nacional de leite é de 33,5 bilhões de litros, produzidos por 17 milhões de vacas, o que corresponde a uma produção de 1.943 litros de leite por vaca por ano (IBGE, 2017).

A eficiência reprodutiva e a seleção genética têm grande influência sobre o sucesso e a produtividade da pecuária de leite (BARUSELLI et al., 2016). Dentre as biotecnologias reprodutivas disponíveis, a *ovum pick-up* (OPU), associada à produção *in vitro* de embriões (PIVE) e posterior transferência de embriões (TE) tem destaque por permitir a rápida disseminação de material genético de alto valor tanto de machos quanto de fêmeas, contrariamente à inseminação artificial (IA), que permite a rápida multiplicação apenas da linhagem de machos de alto valor (BARUSELLI et al., 2012; BATISTA et al., 2016; GUERREIRO et al., 2014). Atualmente, a PIVE representa 66% dos embriões produzidos no mundo e 92,1% dos embriões produzidos no Brasil (VIANA et al., 2018; IETS, 2018). Em 2017, o Brasil foi responsável pela produção *in vitro* de 345.528 embriões, sendo que 52,2% destes embriões foram oriundos de vacas leiteiras (IETS, 2018).

Com o advento da genômica é possível selecionar reprodutores de linhagens superiores baseado no valor genético, predito pelo mapeamento genômico, tendo, portanto, elevada acurácia (PONSART et al., 2014). Ainda, a ferramenta de seleção genômica permite que a predição do valor genético seja realizada logo após o nascimento. Baseado nesse conceito, a PIVE oriunda de animais jovens tem se tornado uma importante estratégia para diminuir o intervalo de gerações e acelerar ainda mais o ganho genético dos rebanhos (LOHUIS, 1995; DOORMAAL, 2012). Nos programas de melhoramento genético, o intervalo de gerações influencia significativamente o ganho genético dos rebanhos. Nesse sentido, quanto mais jovens as doadoras, maior é o impacto dos programas de melhoramento (BARUSELLI et al., 2016). Outra vantagem de se utilizar oócitos provenientes de animais jovens para a PIVE

está relacionada ao fato de que o número de folículos presentes nos ovários decresce com o avanço da idade da doadora (ERICKSON et al. 1966; REVEL et al., 1995).

Entretanto, existem alguns empecilhos a serem contornados ao utilizar animais jovens para a PIVE. A reduzida eficiência de doadoras jovens na produção de embriões quando comparada a de animais que já atingiram a puberdade torna este processo um desafio. Diversos estudos comprovam que animais jovens têm qualidade oocitária inferior e, conseqüentemente, piores resultados na produção de embriões. Verifica-se, também, que os animais jovens produzem embriões de pior qualidade, com reduzidas taxas de prenhez e maiores perdas gestacionais quando comparados com animais adultos (REVEL et al., 1995; PRESCICCE et al., 1997; LEVESQUE AND SIRARD, 1994; GUERREIRO, 2015).

A competência oocitária e, conseqüentemente, a eficiência na PIVE são influenciadas por diversos fatores, tendo alta correlação com características do metabolismo oocitário e, também, com características do fluído folicular no qual o oócito irá se desenvolver. Estudos indicam que a concentração circulante de IGF1 e glicose está relacionada à qualidade do oócito, eficiência na PIVE e viabilidade embrionária (VELAZQUEZ et al., 2005; WALTERS et al., 2006; VELAZQUEZ et al., 2009; VELAZQUEZ et al., 2012). Ainda, o diâmetro do folículo aspirado pode influenciar a competência oocitária. No entanto, a literatura ainda é escassa com relação aos níveis adequados destes metabólitos e o diâmetro adequado para aspiração folicular com o intuito de otimizar a PIVE de doadoras jovens. Zaraza et al. (2010) referem que a concentração circulante de IGF1 ideal para elevar a eficiência de animais jovens em programas de OPU-PIVE ainda requer muitos estudos.

A manipulação dos níveis de IGF1 e glicose e do diâmetro folicular pode ser realizada por diversos tratamentos com finalidade de aumentar o número de blastocistos produzidos na PIVE. Dessa forma, torna-se imprescindível a realização de estudos que busquem a adequação de técnicas e melhorem a rentabilidade da PIVE em doadoras jovens.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DESAFIOS NA UTILIZAÇÃO DE FÊMEAS JOVENS COMO DOADORAS DE OÓCITOS

Diversos trabalhos comprovam que é possível produzir embriões viáveis a partir de oócitos de animais jovens (ARMSTRONG et al., 1994; KHATIR et al., 1996; PRESICCE et al., 1997; MAJERUS et al., 1999; LANDRY et al., 2016). No entanto, a PIVE em doadoras jovens ainda enfrenta alguns desafios. Um dos fatores que pode comprometer a eficiência da PIVE em doadoras jovens é a qualidade oocitária. A competência oocitária pode ser entendida como a habilidade do oócito em completar a maturação, ser fertilizado, atingir o estágio de blastocisto e se desenvolver em um embrião viável, produzindo uma progênie saudável após a TE (SIRARD et al., 2006; WATSON, 2007). A competência oocitária é obtida através da biossíntese ou armazenamento de várias moléculas que são resultantes de processos que ocorrem durante o crescimento e maturação do oócito (BLONDIN et al., 2012). O oócito passa por constantes mudanças durante o crescimento do folículo até a ovulação, sendo que as mudanças finais ocorrem quando o oócito diminui as atividades transcricionais (FAIR et al., 1995), ou seja, a competência de desenvolvimento adequada é adquirida quando o oócito dispuser de todo o RNA necessário.

Estudos comprovam que oócitos provenientes de animais jovens possuem reduzida competência de desenvolvimento a embriões quando comparados a animais adultos (REVEL et al., 1995; RIZOS et al., 2005). Corroborando com este fato, Presicce et al. (1997) demonstraram reduzido potencial de desenvolvimento a blastocisto em bezerras. Em estudo realizado por Guerreiro (2015), foi observado que doadoras pré-púberes tiveram taxa de clivagem e taxa de blastocisto mais baixa quando comparadas às outras categorias. Além disso, embriões produzidos de oócitos de doadoras jovens obtiveram menor taxa de prenhez (REVEL et al.; 1995; GUERREIRO, 2015) e maior taxa de perda gestacional quando comparados a embriões produzidos de vacas (REVEL et al., 1995).

A presença de células do cumulus no oócito pode ter influência sobre a produção de embriões. Oócitos de doadoras jovens possuem anormalidades

na síntese de proteínas (TANEJA et al., 2000; MORIN-DORÉ et al., 2017), semelhante ao que é encontrado em oócitos desnudos de animais adultos (LEVESQUE E SIRARD, 1994).

Damiani et al. (1996) afirmaram que a baixa competência oocitária dessa categoria animal está parcialmente relacionada à uma maturação ooplásmica atrasada ou incompleta. Oócitos advindos de animais adultos possuem mitocôndrias de maior tamanho e número, quando comparados a oócitos de bezerras (DE PAZ et al., 2001). Ainda, Warzych et al. (2017) referem que a qualidade oocitária está relacionada ao tamanho do oócito. Oócitos de tamanho reduzido possuem menor número de gotas lipídicas e frequentemente carregam alguma anormalidade cromossômica (LECHNIAK et al., 2002). Ainda, Warzych et al. (2017) relataram que oócitos provenientes de bezerras possuem menor distribuição dos grânulos corticais, reduzido número de mitocôndrias, atividade enzimática e metabolismo de glutamina, piruvato e glicose reduzidos.

O tamanho do oócito também têm influência sobre sua capacidade de desenvolvimento, de acordo com Fair et al. (1995) e Arlotto et al. (1996), apenas oócitos com 135 μm ou mais têm capacidade de se desenvolver a blastocisto. Em estudo realizado por Erickson (1966) foi constatado que oócitos de animais jovens possuem apenas 118 μm de diâmetro.

Além de fatores no próprio oócito, esta baixa habilidade de desenvolvimento pode estar relacionada a um ambiente folicular inadequado para o desenvolvimento dos oócitos previamente à puberdade. O tamanho do folículo é um parâmetro importante que pode influenciar a competência de desenvolvimento do oócito, devido à influência sobre a competência citoplasmática e meiótica (LONERGAN et al., 1994). Oócitos obtidos de folículos pequenos possuem baixa capacidade de desenvolvimento a blastocisto (LONERGAN et al., 1994; BLONDIN E SIRARD, 1995; MARCHAL et al., 2002). Contrariamente, Seneda et al. (2001) referem que não há diferenças nas taxas de clivagem e blastocistos de folículos maiores ou menores do que 4 mm. Kauffold et al. (2005) afirmam que folículos maiores do que 8 mm têm maior capacidade de desenvolvimento embrionário em animais pré-púberes.

Foi constatado que o fluido folicular de novilhas pré-púberes tem menor quantidade de gotas lipídicas e reduzidos níveis de glicose e de ácidos graxos

(WARZYCH et al., 2017). Além disso, o ambiente folicular de novilhas difere de vacas por conta da distribuição de proteínas e concentração de LH e estradiol (KHATIR et al., 1997), podendo explicar a diferença expressa na qualidade do ócito destas categorias animais.

2.2 DIFERENÇAS ENTRE OS GRUPOS GENÉTICOS *Bos taurus* E *Bos indicus*

A raça Holandês (*Bos taurus*) tem grande eficiência na produção de leite, sendo a principal raça utilizada para esta finalidade no mundo. No entanto, animais *Bos taurus* possuem baixa habilidade de adaptação a climas tropicais. No Brasil as principais raças utilizadas para produção de leite são Holandês (*Bos taurus*) e Gir (*Bos indicus*), muitas vezes formando o cruzamento Girolando (*Bos indicus* x *Bos taurus*). Raças *Bos indicus* possuem alta tolerância a climas tropicais, produzindo animais rústicos com menor comprometimento na eficiência produtiva e reprodutiva. O estresse térmico pode causar importante redução na eficiência reprodutiva, através da redução da expressão de estro, reduzidas taxas de fertilização (SARTORI et al., 2011), redução na qualidade oocitária e eficiência na PIVE (FERREIRA et al., 2011), além de aumentar perdas embrionárias, sendo portanto um aspecto de grande importância em animais *Bos taurus*.

Outra importante diferença entre os grupos genéticos se refere à dinâmica folicular ovariana. Animais *Bos taurus* possuem menor quantidade de ondas foliculares (SÁ FILHO et al., 2009, NEGLIA et al., 2003), menor número de folículos recrutados por onda (NEGLIA et al., 2011), menor população de folículos antrais e folículo dominante de maior diâmetro (CARVALHO et al., 2002, SARTORI et al., 2016) quando comparados a fêmeas *Bos indicus* (FIGUEIREDO et al., 1997, SARTORI & BARROS, 2011, CARVALHO et al., 2008, GIMENES et al., 2008, BALDRIGHI et al., 2013, GIMENES et al., 2015). A diferença quanto ao número de folículos antrais entre animais *Bos indicus* e *Bos taurus* pode ter associação com os níveis circulantes de IGF1 e insulina. Sartori et al. (2016) referem que animais *Bos indicus* possuem maior quantidade de IGF1 e insulina.

A menor população folicular e a maior sensibilidade ao estresse térmico têm grande influência sobre a eficiência da PIVE. Gimenes et al. (2015) comparou a PIVE de novilhas da raça Holandês (*Bos taurus*) e Nelore (*Bos indicus*), verificando que novilhas holandesas possuíam menor porcentagem de oócitos viáveis, número e taxa de blastocisto. Em estudo de Sales et al. (2015), vacas da raça Holandês (*Bos taurus*) tiveram menor número de oócitos recuperados, menor quantidade de oócitos viáveis e menor número e taxa de blastocisto quando comparadas a vacas da raça Gir (*Bos indicus*). Sales et al. (2015) também demonstraram que embriões provenientes de doadoras *Bos indicus* possuem menor taxa de fragmentação de DNA do que animais *Bos taurus*. As diferenças na eficiência da PIVE entre ambos os grupos genéticos podem ser atribuídas à maior qualidade oocitária de animais *Bos indicus*, evidenciando a importância da qualidade do oócito na PIVE.

2.3 ESTRATÉGIAS PARA MELHORAR A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

2.3.1 Efeito do tratamento com FSH na produção *in vitro* de embriões

O uso de superestimulação com hormônio folículo estimulante (FSH) previamente à OPU é um manejo de doadoras que pode ter grandes vantagens em programas de PIVE em vacas, gerando aumento no número de embriões por OPU (GOODHAND et al., 1999; SENDAG et al., 2008) e também aumentando a taxa de blastocisto (BLONDIN et al., 2012). Algumas pesquisas relatam que a superestimulação com FSH aumenta o número de folículos disponíveis para aspiração (GOODHAND et al., 1998; MAJERUS et al., 1999; TANEJA et al., 2000, VIEIRA et al. 2014). No entanto, Currin et al. (2017) afirmaram que o uso de FSH não eleva de fato o número de folículos, mas sim seu tamanho. Esta afirmação está em acordo com o fato que apenas folículos que já atingiram o estágio antral de desenvolvimento são responsivos às gonadotrofinas. Complexos cumulus-oócitos (COCs) recuperados de folículos maiores têm maior competência de desenvolvimento do que COCs

provenientes de folículos menores (KAUFFOLD et al., 2005; BLONDIN et al., 2012).

O efeito positivo da superestimulação com FSH na PIVE é ainda mais claro quando aplicado em doadoras jovens. Diversos estudos apontam a necessidade de estimulação gonadotrópica prévia à aspiração folicular em animais jovens (BATISTA et al., 2016; PRESICCE et al., 1997; TANEJA et al., 2000), sendo que a principal escolha é o tratamento com FSH.

A partir dos 11 meses de idade, novilhas apresentam competência de desenvolvimento *in vitro* para produção de embriões similar a de animais adultos, portanto, animais com menos de 11 meses necessitam de estimulação gonadotrópica para atingir algum grau de viabilidade na PIVE (TANEJA et al., 2000). Revel et al. (1995) e Pérez O'Brien et al. (2014) comprovaram que oócitos de novilhas pré púberes tratadas com FSH têm maior capacidade de desenvolvimento até blastocisto. Batista et al. (2016) provaram que bezerras tratadas com FSH tiveram aumento no número de folículos visualizados e no número e taxa de oócitos cultivados em comparação com bezerras não tratadas.

A administração de gonadotrofinas promove o crescimento de folículos não atrésicos, podendo aumentar a taxa de recrutamento (BLONDIN et al., 1996). Entretanto, a qualidade de oócitos recuperados após superestimulação pode variar consideravelmente (DE LOOS et al., 1991; DIELEMAN et al., 1994). Alguns fatores que podem influenciar na variação do sucesso da superestimulação para produção de embriões incluem o estágio do ciclo estral, a presença de um folículo dominante, o tipo de gonadotrofina utilizada e fatores individuais (BLONDIN et al., 1997).

Outro fator importante que pode influenciar o resultado da superestimulação para a PIVE é o período de *coasting*, que se trata do período entre a última aplicação de FSH e a OPU (SIRARD et al., 1999; NIVET et al., 2012), ou seja, a interrupção de suporte gonadotrófico exógeno na presença de LH endógeno (GINTHER et al., 1998). Durante este período ocorre a diferenciação folicular final e a aquisição de competência oocitária em bovinos. A ausência de FSH promove uma pressão de seleção que elimina folículos menores e aumenta a proporção de folículos médios e grandes (BLONDIN et al., 2002). O período de *coasting* leva a uma hipóxia folicular associada com

um aumento de apoptose folicular e inflamação (NIVET et al., 2013), semelhantemente ao que ocorre em folículos dominantes, elevando a competência oocitária (SIRARD, 2011).

Um período de *coasting* menor que o necessário pode influenciar negativamente na competência oocitária devido ao fato de que a diferenciação folicular ainda não foi iniciada. No entanto, um período de *coasting* maior que o necessário também pode acarretar em reduzida competência oocitária devido à uma atresia mais avançada do folículo (BLONDIN et al., 2012). Estudos comprovam que para animais adultos, o período de *coasting* que promove melhores resultados na PIVE é em torno de 48 horas (BLONDIN et al., 1997; BLONDIN et al., 2002). No entanto, Bernal et al. (2011) referem que períodos de *coasting* superiores a 24 horas em bezerras têm efeito negativo na qualidade oocitária. Ainda, Zacarias et al., (2018) obtiveram resultados satisfatórios ao utilizar um período de *coasting* de 20-24 horas em novilhas da raça Nelore. Estes achados podem indicar que animais mais jovens necessitam de um período de *coasting* menor. Ao modificar e adequar os protocolos de superestimulação de acordo com a idade da doadora, é possível atingir a janela ideal de desenvolvimento oocitário, que pode variar conforme a idade do animal.

2.3.2 Efeito do tratamento com rBST na produção *in vitro* de embriões

A superestimulação gonadotrófica pode ser realizada também associada à somatotropina bovina recombinante (rBST). A somatotropina é um hormônio de crescimento que influencia a regulação do crescimento e diferenciação de diversas células, além de controlar a atividade metabólica de diversos órgãos e tecidos (KUZMINA et al., 2006).

O uso de rBST eleva significativamente as concentrações séricas de fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF1) (BAUMAN et al., 1999) e insulina, tendo efeito importante na proliferação e esteroidogênese de células da granulosa de bovinos (GONG et al., 1997). O aporte de energia necessário para maturação e competência oocitária depende de IGF1. Receptores IGF1 são expressos na granulosa e no oócito, tendo efeitos importantes sobre o oócito e o rBST estimula a expressão de IGF-I nas células da granulosa

(MONGET E MONNIAUX, 1995; BLEY et al., 1997). O aumento de IGF1 está associado à maior atividade de GLUT1 nas células da granulosa e oócito, sendo este um fator essencial para a maturação oocitária (ZHOU et al. 2000). Segundo Lucy (2000), a rBST tem efeito indireto na reprodução, agindo através da modulação de IGF1. Ainda, Monteiro et al. (2002) verificaram que vacas tratadas com rBST apresentaram maiores taxas de prenhez após TE.

Diversos estudos comprovam que o tratamento com rBST aumenta a população folicular (GONG et al., 1991, 1993, 1996, 1997; WEBB et al., 1994; KIRBY et al., 1997; LUCY et al., 2000; BURATINI et al., 2000; TRIPP et al., 2000), potencialmente tendo efeito no recrutamento folicular, aumentando o número de folículos disponíveis para a OPU. Bols et al., (1998) trataram novilhas com rBST semanalmente e observaram uma tendência para que o número de folículos aumentasse durante o período de aspirações para o grupo tratado. No entanto, não houve diferença quanto ao número de oócitos recuperados entre os grupos tratado e não tratado. Buratini et al. (1999) referem maiores concentrações de IGF1 e aumento no número de folículos pequenos em animais tratados com rBST.

Alguns estudos referem que o tratamento com rBST tende a melhorar a qualidade oocitária (BEVERS et al., 1997; PIVATO et al., 1999). Pavlok et al. (1996) aplicaram rBST em vacas uma vez e obtiveram como resultado oócitos de melhor qualidade, no entanto, não observaram diferenças quanto ao número de folículos entre animais tratados e não tratados. Além disso, estudos apontam que o uso de rBST melhora o desenvolvimento embrionário em *Bos taurus* (IZADYAR et al. 1996; MOREIRA et al., 2001, HASLER et al., 2003). Em estudo realizado por Ramos et al. (2007) foi constatada maior taxa de clivagem e maior número de blastocisto após tratamento com rBST. A melhora na qualidade oocitária e no desenvolvimento embrionário provavelmente está ligada à maior concentração de IGF1 no fluido folicular (HERRLER et al., 1994).

Ainda, a suplementação do meio de maturação *in vitro* com IGF1 (MARKKULA & MAKAREVICH, 2001) ou de rbST (IZADYAR et al., 1996) auxilia a maturação nuclear e a capacidade de desenvolvimento dos oócitos, elevando o número blastocistos produzidos.

2.4 RELAÇÃO ENTRE QUALIDADE OOCITÁRIA E NÍVEIS CIRCULANTES DE IGF1 E GLICOSE

O fator de crescimento semelhante a insulina (IGF1) é um peptídeo que consiste em 70 aminoácidos (LARON, 2001), produzido principalmente pelo fígado (SJOGREN et al., 1999), e também pelo oviduto e útero em bovinos (ROBINSON et al., 2000; PUSHPAKUMARA et al., 2002). Estudos comprovam que os receptores de IGF1 podem ser localizados tanto em células da granulosa quanto em células da teca em oócitos bovinos (YOSHIDA et al. 1998, ARMSTRONG et al. 2001, SCHAMS et al. 2002, NUTTINCK et al. 2004). Em diversas espécies, inclusive ruminantes, o IGF1 tem importante papel na fisiologia ovariana, crescimento folicular e desenvolvimento embrionário (DIAZ-CUETO & GERTON 2001, DISKIN et al. 2003, RIVERA & FORTUNE 2003). Em bovinos e suínos, o IGF1 estimula a proliferação e esteroidogênese de células da granulosa.

Estudos associam a qualidade oocitária e viabilidade embrionária às concentrações de IGF1 (O'CALLAGHAN et al. 2000, VELAZQUEZ et al. 2005), sendo que tratamentos que elevam as concentrações intrafoliculares de IGF1 são capazes de elevar o número de embriões produzidos *in vivo* (HERRLER et al. 1994, CUSHMAN et al. 2001). Tosta et al. (2020) não observou efeito do tratamento nutricional com propilenoglicol nos níveis circulantes de IGF1 ou na PIVE de doadoras jovens. O IGF1 tem efeito sinérgico quando associado ao FSH através da regulação da atividade aromatase de células da granulosa (SPICER et al., 2002).

A demanda energética do oócito durante o seu desenvolvimento e maturação é alta. O principal substrato energético para suprir essa demanda é a glicose (ZHOU et al., 1993). Ainda, a glicose e a insulina têm capacidade de exercer efeito sobre a secreção hipotalâmica de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) em vacas leiteiras (LEROY et al., 2008). A glicose circulante e IGF1 estão funcionalmente ligados em todo o organismo animal (LUCY, 2011; KAWASHIMA et al., 2012).

3 EXPERIMENTO 1 – Efeito do tratamento com hormônio folículo estimulante e/ou somatotropina bovina recombinante na produção *in vitro* de embriões e concentração sérica de glicose e IGF1 de fêmeas pré-púberes da raça Holandês (*Bos taurus*)

3.1 OBJETIVOS

- ✓ Avaliar o efeito da superestimulação ovariana com FSH associada ou não a rBST em doadoras pré-púberes da raça Holandês (*Bos taurus*) nos seguintes parâmetros de eficiência de produção *in vitro* de embriões:
 - Proporção de folículos pequenos, médios e grandes no dia da OPU
 - Número de oócitos totais
 - Taxa de recuperação
 - Número de oócitos viáveis
 - Taxa de oócitos viáveis
 - Número de oócitos clivados
 - Taxa de clivagem
 - Número de blastocistos
 - Taxa de blastocisto

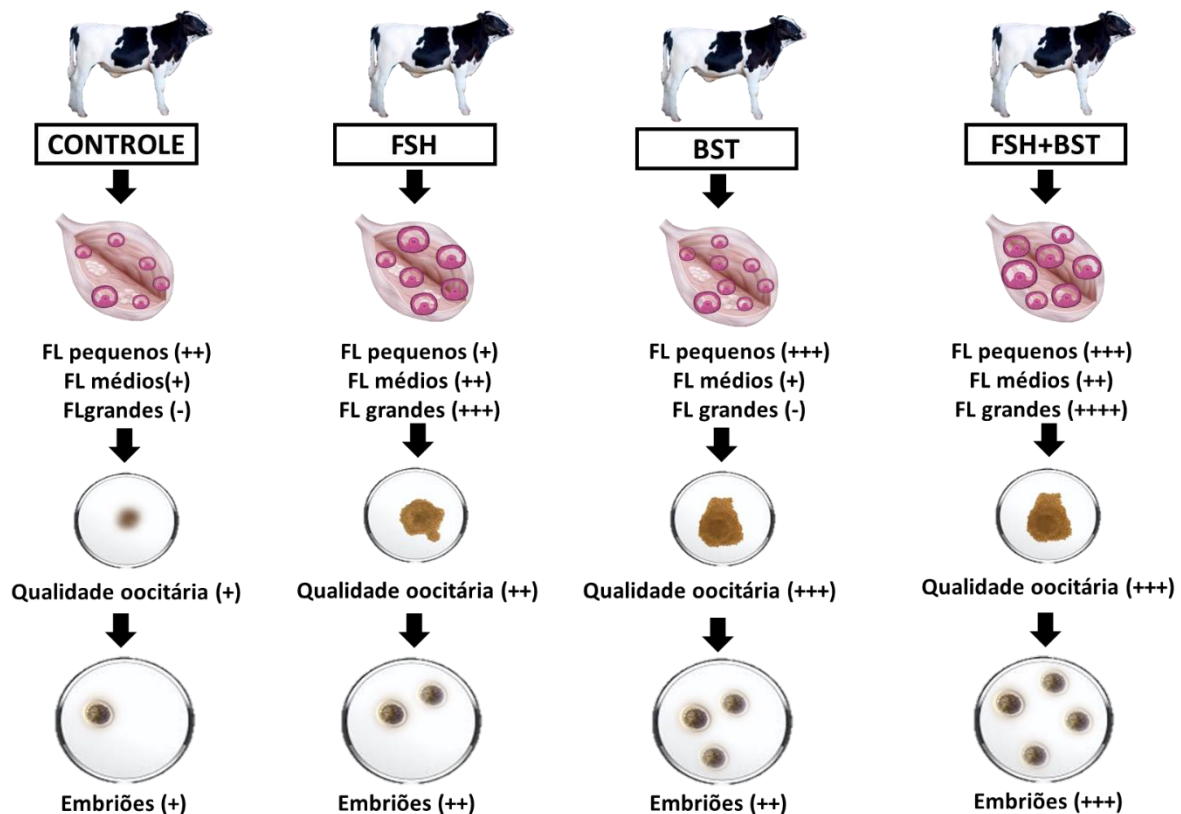
- ✓ Avaliar o efeito da superestimulação ovariana com FSH associada ou não a rBST na concentração sérica de glicose e IGF1 de doadoras jovens da raça Holandês.

3.2 HIPÓTESES

Fêmeas pré-púberes tratadas com FSH ou rBST terão maior eficiência na PIVE, sendo semelhantes entre si (com FSH ou com rBST). Animais que receberem a associação de FSH e rBST terão maior eficiência na PIVE que os demais grupos (Figura 1). Além disso, animais tratados com rBST (com ou sem

FSH) apresentarão maior concentração sérica de glicose e IGF1 do que animais pré-púberes que não receberem tratamento com rBST.

Figura 1. Modelo hipotético da proporção de folículos (FL) pequenos, médios e grandes, qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões das fêmeas pré-púberes tratadas ou não com FSH e/ou rBST.



3.3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo atendeu as normas e princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – SP (FMVZ) (protocolo número 8573050917).

3.3.1 Local e período de execução

O projeto foi executado em 4 sessões de OPU durante o período de Fevereiro de 2017 a Maio de 2019. Foram utilizadas 74 fêmeas da raça Holandês (*Bos taurus*), pertencentes a duas propriedades do campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo, sendo que 11 animais pertenciam à Prefeitura do campus Fernando Costa da USP (PUSP) em Pirassununga e 64 animais pertenciam ao Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do campus Fernando Costa da USP.

Para todas as sessões de PIVE foi utilizado o laboratório comercial da Vitrogen (WTA-FIV), situada em Cravinhos, SP. Para cada sessão de PIVE foi utilizada a mesma partida de sêmen de um touro, totalizando 4 touros para a PIVE (distribuídos homoganeamente entre os grupos experimentais).

3.3.2 Animais e instalações

Durante todo o experimento os animais foram mantidos nos piquetes de cada propriedade, com acesso a água *ad libitum* e manejo nutricional estabelecido na propriedade. Logo após o nascimento, os animais são recebidos colostro *ad libitum* (que pode ser o da própria mãe, dependendo da qualidade ou banco de colostro). São mantidas em sistemas tipo “casinha”, pressas por coleiras com correntes de aproximadamente 3 metros de comprimento, recebendo dois litros de leite por dia (as 7:30 e as 16:00 horas). Recebem água e dieta sólida a partir do terceiro dia de vida). Permanecem neste sistema até atingirem 115-120 kg de peso corporal (120-140 dias de vida), com consumo médio de 3kg de concentrado dia. Após o desmame, as bezerras são alojadas em um sistema de baia individual com cama de areia (17m²) para adaptação ao consumo de silagem de milho. Após este período de adaptação, seguem para o confinamento experimento, onde são alojadas em lotes de acordo com o peso corporal (pesagem mensais), com intuito de minimizar disputa por alimentação. Tem acesso a água e alimento *ad libitum* (silagem de milho 2 kg de concentrado por dia).

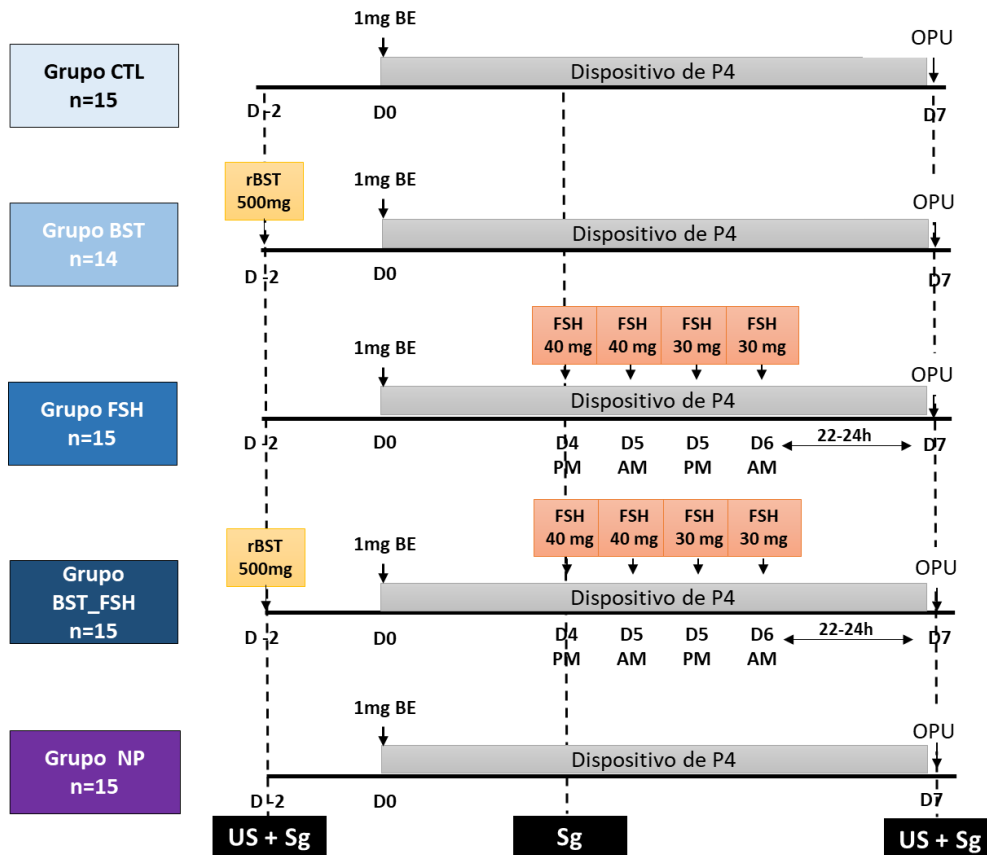
3.3.3 Delineamento experimental

Foram utilizadas 74 fêmeas da raça Holandês (*Bos taurus*), sendo 15 púberes (12 a 18 meses de idade) e 59 pré-púberes (3 a 10 meses de idade). As fêmeas pré-púberes foram distribuídas em arranjo fatorial 2x2 em 4 grupos experimentais (com ou sem rBST e com ou sem FSH) de acordo com a população folicular em dia aleatório do ciclo estral. Ainda, um grupo de animais púberes foi introduzido como controle positivo do laboratório para a produção de embriões. Os animais de todos os grupos receberam 1mg de benzoato de estradiol (BE; Ric-BE®, Agener União Química, São Paulo, SP) e um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; Primer PR®, Agener União Química, SP) no dia 0 (D0) durante 7 dias para sincronização da onda de crescimento folicular previamente à OPU.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: GCTL – animais não receberam tratamento adicional prévio à OPU (n=15); GFSH – animais receberam superestimulação com 140mg FSH (Folltropin®, Vetoquinol, Mariporã, SP) administrado em 4 injeções duas vezes por dia em doses decrescentes (40 mg [dia 4, PM], 40 mg [dia 5, AM], 30 mg [dia 5, PM], e 30 mg [dia 6, AM]; n=15); GBST – animais receberam tratamento com 500mg de rBST (Boostin®, MSD Saúde Animal, São Paulo, SP) no dia -2 (D-2; KUEHNER ET AL., 1993) do protocolo (n=14) e; GBST_FSH – animais receberam tratamento com rBST e FSH (conforme descrito para os grupos anteriores; n=15). Ainda, as novilhas púberes (controle positivo, GNP) não receberam tratamento adicional previamente à OPU (n=15).

No dia 7 (D7) os dispositivos de P4 foram removidos e os animais de todos os grupos foram submetidos a anestesia epidural (Lidocaína 2%), seguido da OPU (período de *coasting*: 24h) e os oócitos recuperados seguiram para a PIVE em laboratório comercial (Vitrogen, WTA, Cravinhos, SP). O delineamento experimental segue esquematizado na Figura 2.

Figura 2. Desenho esquemático do delineamento experimental. Bezerras de 3 a 10 meses de idade distribuídas em 4 grupos experimentais (CTL – controle; FSH – tratadas somente com FSH; BST – tratadas somente com rBST; e BST_FSH – tratadas com rBST e FSH) e Novilhas Púberes (NP).



3.3.4 Avaliações ultrassonográficas

Todas as fêmeas foram submetidas a avaliação ultrassonográfica transretal com probe linear de frequência 8,0 MHz (S8, Sonoscape, China) no D-2 para confirmar a categoria reprodutiva dos animais (pré-púbere ou púbere) através da presença ou não de um corpo lúteo (CL) e para contagem da população folicular ovariana. A contagem da população folicular foi utilizada para distribuição dos grupos experimentais. Ainda, em D7 durante o procedimento de OPU, a população folicular foi registrada para avaliação da proporção do tamanho dos folículos para cada grupo experimental.

3.3.5 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia

As OPUs foram realizadas nas propriedades em que os animais se encontravam (PUSP e LPBL) pelo Médico Veterinário Bernardo Marcozzi Bayeux, da empresa Bovigênese - Reprodução Animal.

As fêmeas foram contidas em um brete e submetidas à anestesia epidural (espaço sacrococcígeo) utilizando 2,0 a 3,0 mL de lidocaína a 2%. Todos os folículos visíveis (≥ 2 mm) foram aspirados com um sistema de agulha descartável com rosca (20 G; 0.9 x 50 mm; WTA, Cravinhos, SP, Brasil), acoplado à linha de aspiração de Teflon de 1,7 mm de diâmetro e 110 cm de comprimento (WTA, Cravinhos-SP) com auxílio da probe microconvexa (S8, Sonoscape, China) e uma guia de aspiração folicular desenvolvida para novilhas (WTA, Cravinhos, SP; Figura 3), tendo portanto tamanho reduzido quando comparado à guia convencional de OPU. Todo o sistema de aspiração foi submetido à pressão negativa entre 12 a 15 mL de água/minuto (90 a 110 mmHg) produzida por uma bomba de vácuo com aquecedor de tubo de 50 mL (TED, Cravinhos, SP, Brasil).

Figura 3. A: Guia de aspiração folicular guiada por ultrassonografia convencional, com 5,0 cm de diâmetro. B: Guia de aspiração folicular guiada por ultrassonografia de tamanho reduzido para novilhas, com 2,6 cm de diâmetro. Fonte: Silva, L.G., 2017.



O conteúdo folicular foi aspirado e 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 µm (WTA, Cravinhos, SP) 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 de 60 mm, contendo DPBS acrescido de heparina a 37°C para a realização da busca dos oócitos, lavagem, classificação e seleção dos CCOs (complexos *cumulus-oócito*) com auxílio de lupa estereó microscópica (OPTIKA) 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* em 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.

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

3.3.6 Produção *in vitro* de embriões

3.3.6.1 Maturação *in vitro*

Os COCs foram lavados em TCM-199 HEPES (Gibco, Invitrogen Co., Grand Island, NY, EUA) com 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco, Invitrogen Co.) e 22 mg/mL de piruvato de sódio. Os oócitos de cada doadora foram maturados em 100 mL de TCM 199 (Gibco, Invitrogen Co.) suplementados com 10% de SFB, 25 mg / mL de bicarbonato de sódio, 22 mg / mL de piruvato de sódio, 50 mg / mL de amicacina, 0,5 mg / mL de FSH (Pluset, Hertape Calier, Juatuaba, Minas Gerais, Brasil) e 100 UI / mL de hCG (Vetecor, Hertape Calier), em óleo mineral e incubados a 5% de CO₂ no ar, a 38,8 C e alta umidade por 22 e 24 h.

3.3.6.2 Fertilização *in vitro*

Os COCs foram lavados e submetidos à fertilização *in vitro* em gotas de 90 mL de meio de fertilização *in vitro* sob óleo mineral. Ocorreu fertilização na solução de Tyrode, suplementado com 10 mg / mL de heparina, 22 mg / mL de piruvato de sódio, 50 mg / mL de amicacina, 6 mg / mL de BSA livre de ácidos graxos e penicilamina, hipotaurina, solução de epinefrina (Penicilina 2 mM, hipotaurina 1 mM e epinefrina 0,25 mM).

Para a fertilização *in vitro*, foram utilizadas palhetas de sêmen de quatro touros diferentes, um para cada sessão de OPU-PIVE. As partidas de sêmen foram descongeladas por 30 segundos em banho-maria a 36° C e o sêmen foi colocado em um gradiente de 400 µl de Percoll 90% e 400 µl de Percoll 45%. Os espermatozóides foram centrifugados por 6 min a 800g, o sobrenadante foi removido e o sedimento foi suspenso com 1 mL de meio de fertilização. Os espermatozóides foram centrifugados por 3 min a 200g e o sobrenadante foi removido. A motilidade e a concentração espermática foram avaliadas e 1x10⁶ espermatozóides móveis / mL foram adicionados a cada gota de fertilização. A fertilização ocorreu durante as 18 e 22 h de incubação e, após a fertilização, zigotos presuntivos foram desnudados mecanicamente.

3.3.6.3 Cultivo *in vitro*

O cultivo ocorreu no fluido de oviduto sintético modificado suplementado com 50 mg / mL de amicacina, aminoácidos 0,1 mM, citrato 340,02 mM, citrato 340,02 mM, mioinositol 2775 mM, FBS a 2,5% (vol / vol) e 6 mg / mL de BSA (livre de ácidos graxos, SigmaA-8806) a 38,8°C em ar umidificado com 6% de CO₂, 5% de O₂ e 89% de N₂.

3.3.6.4 *Feeding* e avaliação da taxa de desenvolvimento embrionário

A taxa de clivagem foi registrada 72 horas após a inseminação. A primeira alimentação foi realizada neste momento, quando foram trocados 50% do meio de cultivo usado por um meio novo (fresco). A segunda alimentação foi realizada no quinto dia da cultura embrionária, seguindo o mesmo padrão da primeira alimentação. E a taxa de blastocistos (número total de blastocistos divididos pelo número total de oócitos recuperados/viáveis) foi registrada no sétimo dia da cultura embrionária.

3.3.7 Colheita de sangue

Nos dias -2, 5 e 7 foi realizada colheita de sangue, para análise da concentração sérica de glicose e IGF1. Com os animais contidos no brete, foi realizada a punção da veia sacrococcígea em tubos de colheita de sangue à vácuo, sendo um tubo com fluoreto de sódio (4 mL; Vacutainer, Becton-Dickinson e Company, EUA) e um tubo sem anticoagulante (8 mL, Vacutainer).

O plasma e soro foram separados por centrifugação durante 15 minutos. (3500 rpm por 15 minutos, Centrífuga Excelsa Baby, Fanem, Brasil). O soro e plasma separados foram acondicionados em tubos esterilizados (Tubos Eppendorf 3810X standard, Eppendorf, Alemanha) com identificação e em seguida, armazenados em freezer a -21°C até posterior análise das variáveis metabólicas.

3.3.7.1 Análise de glicose

As amostras foram enviadas ao Laboratório de Pesquisa em Bovinos de Leite (LPBL) do campus Fernando Costa da Universidade de São Paulo (USP) para dosagem de glicose. A análise das concentrações do parâmetro glicose foi realizada por meio de kit comercial (Bioclin® e CELM®) que utiliza método enzimático colorimétrico de ponto final e cinético, sendo a leitura realizada em analisador automático de bioquímica (Sistema de Bioquímica Automático SBA-200 - CELM®).

3.3.7.2 Análise de IGF1

As análises de para mensuração de IGF1 plasmática foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia Animal Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária, Campus Araçatuba.

A quantificação das concentrações plasmáticas do fator de crescimento semelhante a insulina 1 foi realizada através do ensaio imunoenzimático competitivo (cELISA) *in house*, utilizando o sistema de amplificação biotina-estreptavidina peroxidase, conforme descrito por Maioli e Nogueira (2017).

3.3.8 Transferência de embriões e diagnóstico de gestação

Os embriões produzidos foram transferidos em receptoras da raça Nelore (n=33; *Bos indicus*) pertencentes ao campus Fernando Costa em Pirassununga - SP. As receptoras foram submetidas ao seguinte protocolo de sincronização de onda folicular: D0 – introdução de dispositivo intravaginal de P4 (Prociclar®, Ceva Saúde Animal, Paulínia – SP) e aplicação de 2mg de BE (Ric-BE®, Agener União Química, São Paulo – SP); D7 – dispositivo de P4 foi removido e foi aplicado 300 UI de eCG, (Folligon®, MSD Saúde Animal, São Paulo, SP), 43,2 mg de cloprostenol sódico (Estron®, Agener União Química) e 2 mg de cipionato de estradiol (E.C.P., Zoetis, São Paulo – SP). No dia 17 do protocolo as receptoras foram submetidas a avaliação ultrassonográfica (M5 Vet, Mindray) para verificação da presença e quantidade de CL. Apenas

receptoras que possuíam ao menos um CL receberam um embrião, através do método de transferência não cirúrgico para o corno ipsilateral ao CL.

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 29 dias após a TE por avaliação ultrassonográfica (M5 Vet, Mindray). A taxa de concepção foi calculada baseada no número de fêmeas prenhes em relação ao número de fêmeas que receberam um embrião no dia da TE.

3.3.9 Análise estatística

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

Utilizou-se um delineamento experimental inteiramente casualizados, em esquema fatorial 2x2, sendo dois níveis de rBST (Sem-rBST – Sem aplicação de rBST; ou rBST = 500 mg rBST) e dois níveis de FSH (Sem-FSH – Sem aplicação de FSH; ou FSH = 140 mg FSH), totalizando quatro tratamentos com quatro repetições. A bezerra pré-púbere foi considerada a unidade experimental.

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

Os dados foram analisados utilizando o procedimento Glimmix. No modelo estatístico, foi considerado o esquema fatorial com efeitos de fixos de rBST (Sem-rBST ou rBST), FSH (Sem-FSH ou FSH) e as interações. Idade da bezerra (meses) foi utilizada como covariável no modelo. Réplica e Touro foram incluídos no modelo como fator aleatório. Nos casos em que as interações foram significativas, comparações foram feitas considerando os dois fatores (interação rBST* FSH). Quando não houve interações os fatores foram avaliados separadamente efeito principal de rBST e efeito principal de FSH). A

comparação das médias foi realizada através do comando LSMEANS, utilizando-se o teste de Tukey – Kramer.

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

O nível de significância utilizado para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5% ($P \leq 0,05$) e tendência quando $P < 0,10$.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada diferença estatística quanto à população folicular estabelecida no D-2 (GCTL: $16,2 \pm 2,4$; GFSH: $17,4 \pm 1,7$; GBST: $17,2 \pm 2,1$; GBST_FSH: $17,5 \pm 1,5$) independente do tratamento com rBST ($P=0,7$), com FSH ($P=0,7$) ou interação BST*FSH ($P=0,5$), demonstrando que os animais foram equilibrados dentro dos tratamentos quanto a essa variável.

Não foi observada interação BST*FSH quanto à quantidade de folículos pequenos ($P=0,90$), médios ($P=0,77$) e grandes ($P=0,25$) avaliados no dia da OPU (D7). No entanto, animais tratados com rBST apresentaram tendência a possuir maior quantidade de folículos pequenos ($15,4 \pm 2,1$ vs. $11,0 \pm 1,2$; $P=0,07$). Os dados com o efeito principal do tratamento com rBST estão apresentados no gráfico 1. Os níveis circulantes de glicose (mg/dL) não diferiram entre os grupos (GCTL: $95,0 \pm 1,8$; GFSH: $96,2 \pm 2,3$; GBST: $96,6 \pm 1,4$; GBST_FSH: $97,7 \pm 1,4$), independente do tratamento com rBST ($P=0,4086$), FSH ($P=0,5159$) ou interação BST*FSH ($P=0,9491$). Ainda, foi verificado que animais tratados com rBST apresentaram níveis circulantes mais altos de IGF1 (ng/mL) do que animais que não receberam rBST (Com rBST: $311,1 \pm 24,9$ vs. Sem rBST: $231,3 \pm 15,5$; $P_{bst}=0,0031$; $P_{fsh}=0,2318$; $P_{bst*fsh}=0,9845$). Os resultados de glicose e IGF1 por grupo experimental estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Concentrações circulantes de IGF1 (ng/mL) e Glicose (mg/dL) no dia da OPU de animais pré-púberes dos grupos controle (n=15), BST (n=14), FSH (n=15) e BST+FSH (n=15).

	GCTL	GBST	GFSH	GBST_FSH	Pbst	Pfsh	Pbst*fsH
IGF1 (ng/mL)	249,1±21,8	322,5±30,3	214,6±21,9	299,6±40,5	0,0031	0,2318	0,9845
Glicose (mg/dL)	95,0±1,7	96,6±1,4	96,2±2,3	97,6±1,4	0,4086	0,5159	0,9491

Corroborando com os achados do presente estudo, Buratini et al. (2000) referem que o tratamento com rBST eleva a concentração circulante de IGF1. O IGF1 tem relação importante com o desenvolvimento e crescimento folicular, devido a sua ação estimulatória na proliferação de células somáticas e biossíntese de estrógeno e progesterona (ARMSTRONG & WEBB, 1997, WEBB et al. 1999). Ainda, diversos autores verificaram que o uso de rBST eleva o número de folículos pequenos (GONG et al., 1991; 1993; SPICER et al., 1995; BOLS et al., 1998; BURATINI et al., 1999; PIVATO et al., 1999; BURATINI et al., 2000; ROTH et al., 2002), demonstrando que o tratamento com rBST pode elevar o recrutamento folicular, assim como verificado no presente estudo. Ainda, foi realizada análise de medida repetida no tempo para IGF1 Verificou-se interação (P=0,0588) tratamento com rBST e tempo para as concentrações circulantes de IGF1. Constatou-se que o tratamento com rBST foi eficiente em manter os níveis de IGF1 constantes no momento do recrutamento folicular (Gráfico 2). Contrariamente, os animais que não receberam rBST apresentaram reduzidos níveis circulantes de IGF1 durante o período do recrutamento folicular e do tratamento com FSH. Em estudo realizado por Slaba et al. (1994), foi analisada a curva de IGF1 após tratamento com rBST. Foi verificado que animais tratados apresentaram níveis altos de IGF1 após 7 dias do tratamento (equivalente ao D5 do presente estudo), corroborando com os dados do presente estudo. Este dado e os resultados do presente estudo são indicativos de que o tratamento com rBST mantém constante o perfil de IGF1, podendo refletir no desenvolvimento folicular e oocitário.

Entretanto, apesar das diferenças verificadas nas concentrações circulantes de IGF1, o aumento foi abaixo do esperado. Animais jovens podem apresentar reduzida resposta hepática ao tratamento com rBST (BREESE et al., 1991), justificando em parte, o baixo aumento verificado no presente

estudo. Ainda, estudos apontam que animais com manejo nutricional adequado, quando tratados com rBST, apresentam maior afinidade hepática dos receptores de BST, induzindo maior liberação de IGF1 (HOLZER et al., 2000).

Gráfico 1. Proporção de folículos pequenos (<5 mm), folículos médios (5-8 mm) e folículos grandes (>8 mm) avaliados no dia da OPU (D7) para animais que receberam ou não tratamento com rBST (500 mg).

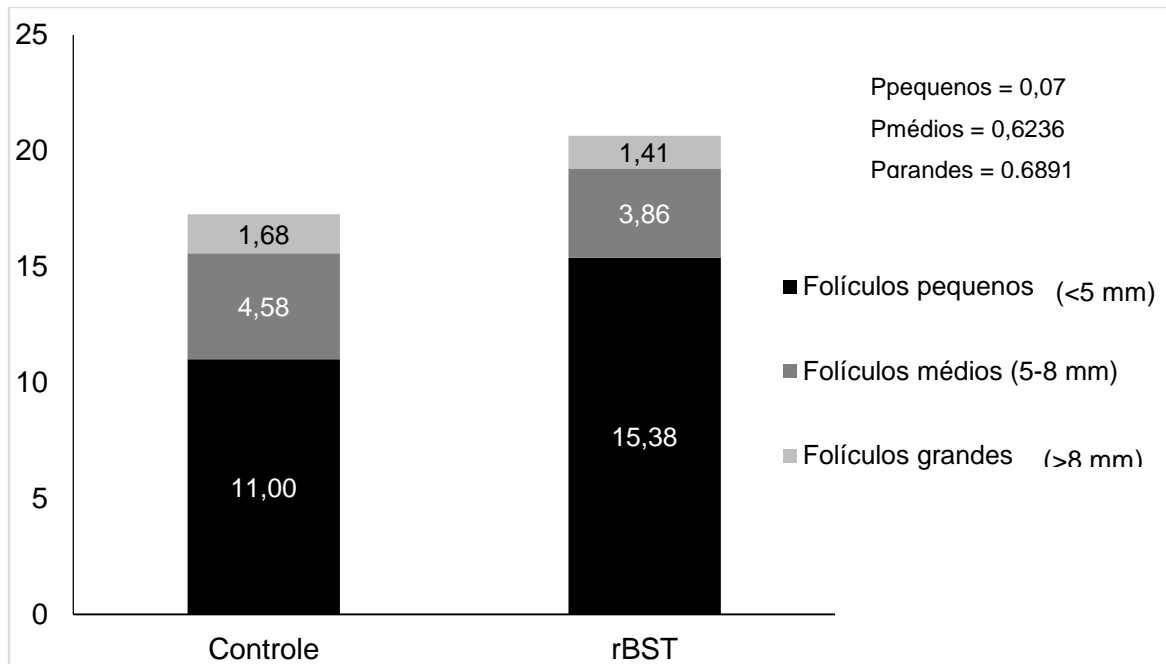
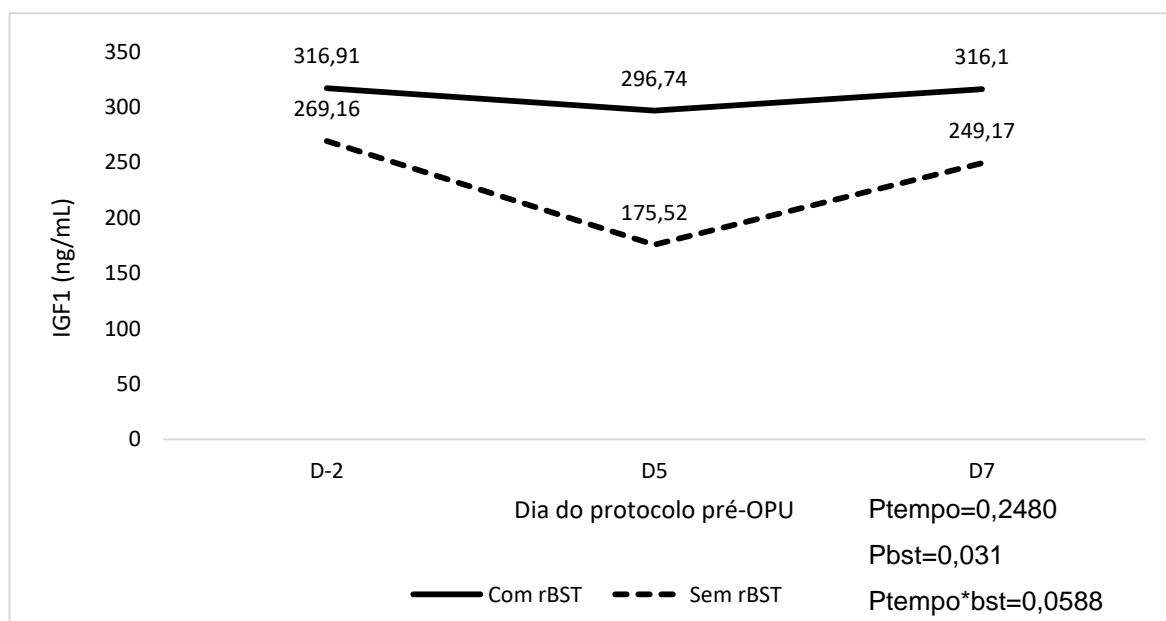
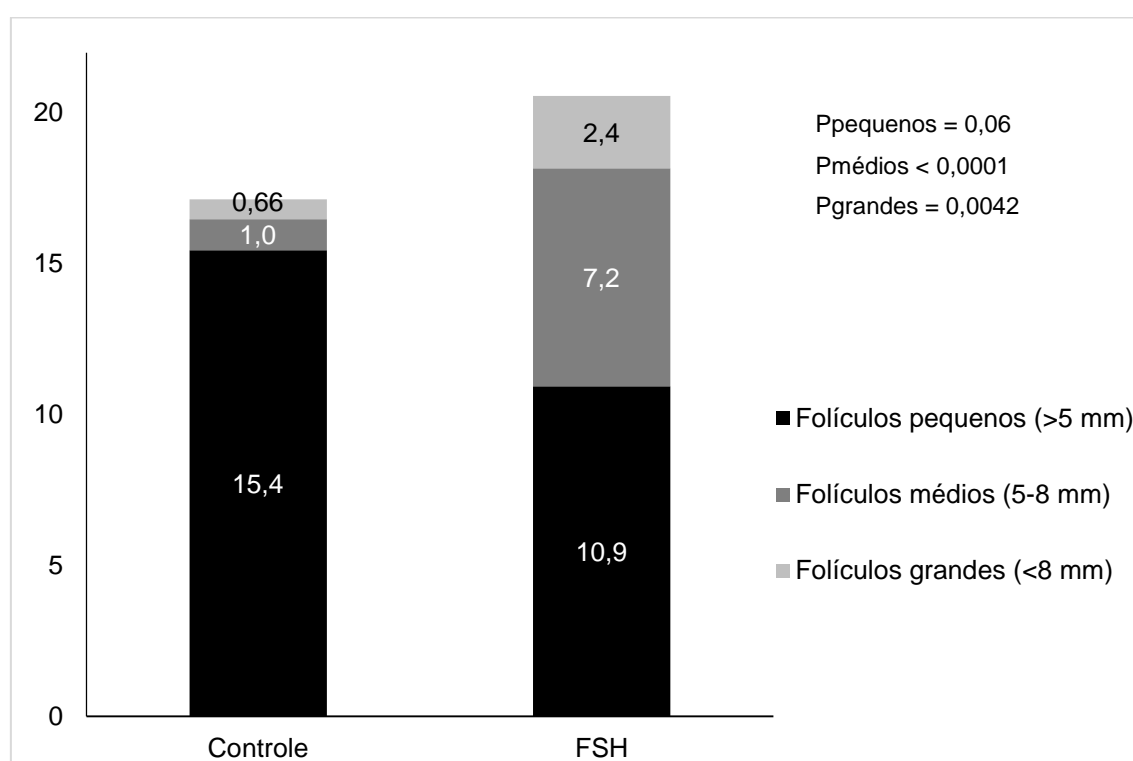


Gráfico 2. Medida repetida no tempo para os momentos D-2 (aplicação de rBST), D5 (início do tratamento com FSH) e D7 (dia da OPU) em relação às concentrações séricas de IGF1 (ng/mL).



Ainda, no presente estudo, os animais tratados com FSH apresentaram tendência a possuir menor quantidade de folículos pequenos ($10,9 \pm 1,9$ vs. $15,4 \pm 1,8$; $P=0,06$) e estatisticamente maior quantidade de folículos médios ($7,2 \pm 1,4$ vs. $1,0 \pm 0,22$; $P < 0,0001$) e de folículos grandes ($2,4 \pm 0,56$ vs. $0,66 \pm 0,12$; $P=0,0042$) quando comparados com os animais que não receberam FSH. Os dados com o efeito principal do tratamento com FSH estão apresentados no gráfico 3.

Gráfico 3. Proporção de folículos pequenos (<5 mm), folículos médios (5-8 mm) e folículos grandes (>8 mm) avaliados no dia da OPU (D7) para animais que receberam (n=30) ou não (n=30) tratamento com FSH.



Assim como nesse estudo, Vieira et al. (2014) em vacas holandesas e de Ramos et al. (2007) em vacas Gir, demonstraram que o tratamento com FSH aumenta a proporção de folículos médios e grandes. Conseqüentemente, a quantidade de folículos pequenos é menor quando as doadoras são tratadas com FSH para superestimulação. Os resultados do número de folículos no dia da OPU (D7) por categoria (pequenos, médios e grandes) estão sumarizados na Tabela 2

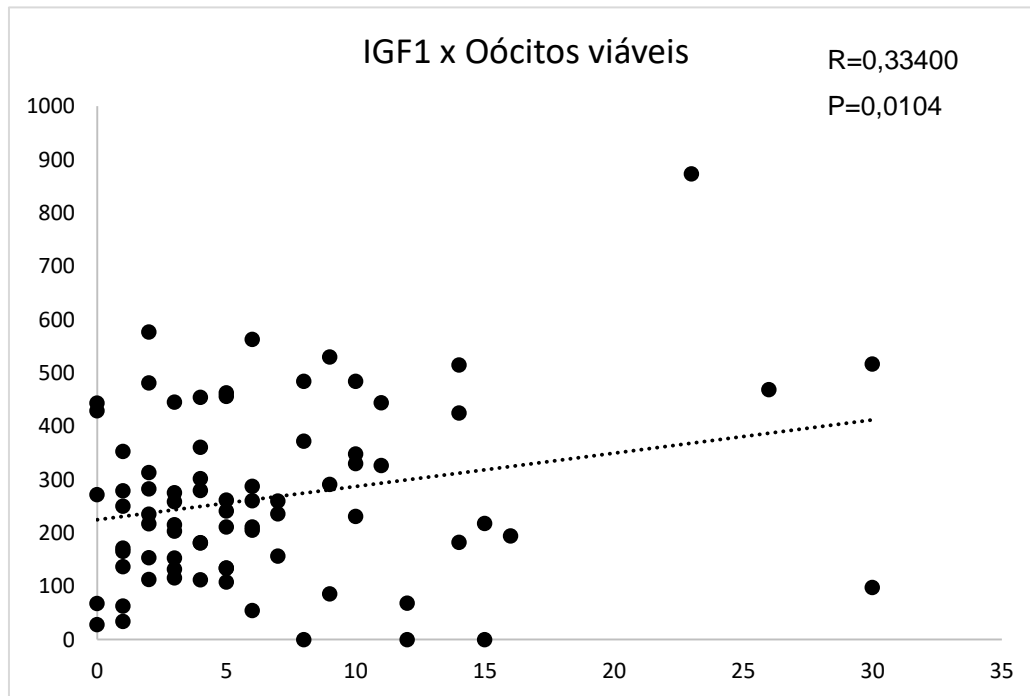
Tabela 2. Proporção de folículos pequenos (<5 mm), médios (5-8 mm) e grandes (>8 mm) e população folicular total no D7 para animais pré-púberes dos grupos controle (n=15), BST (n=14), FSH (n=15) e BST+FSH (n=15).

	GCTL	GFSH	GBST	GBST_FSH	Pbst	Pfsh	Pbst*fsH
Folículos pequenos	13,5±1,3	8,7±1,9	17,6±3,4	13,3±2,6	0,07	0,06	0,90
Folículos médios	1,1±0,4	7,8±2,0	0,9±0,20	6,6±2,0	0,63	<0,0001	0,77
Folículos grandes	0,47±0,17	2,8±0,92	0,86±0,18	1,9±0,61	0,68	0,0042	0,25
Folículos totais	15,1±1,4	19,31±4,3	19,4±3,4	21,9±3,4	0,31	0,28	0,84

A população folicular no dia da OPU foi semelhante entre os grupos experimentais, conseqüentemente, a quantidade de oócitos totais recuperados não diferiu entre os grupos experimentais (GCTL: 9,5±1,0; GFSH: 11,6±3,3; GBST: 14,9±4,6; GBST_FSH: 11,9±2,3). Não foi verificado efeito do tratamento com rBST (P=0,37), com FSH (P=0,98), além de ausência de interação BST*FSH (P=0,47) sobre o número de oócitos recuperados. Currin et al. (2017) verificaram que o tratamento com FSH não aumenta de fato a população folicular, e, conseqüentemente, não eleva o número de oócitos totais recuperados, corroborando com os achados do presente estudo. A literatura é conflitante sobre o efeito do tratamento com rBST prévio à OPU na quantidade de oócitos recuperados. Alguns estudos referem que o tratamento com rBST eleva a quantidade de folículos ovarianos e o número de oócitos recuperados (GONG et al., 1991; 1993; DE LA SOTA et al., 1993; LUCY et al., 1993; WEBB et al., 1994; KIRBY et al., 1997). Entretanto, Pavlok et al. (1996), Ramos et al. (2007) e Martins et al. (2012) constataram que o tratamento com rBST não elevou a população folicular nem a quantidade de oócitos recuperados, semelhantemente aos achados do presente estudo. Ainda, não foi verificada correlação entre IGF1 (P=0,1498; r=0,18985) ou glicose (P=0,9522; r=-0,00844) e a população folicular estabelecida no dia da OPU. Estudos apontam que animais que apresentam altos níveis de IGF1 não possuem maior quantidade de folículos, apenas maior número de folículos pequenos (SPICER et al., 1995; BURATINI et al., 1999; PIVATO et al., 1999; BURATINI et al., 2000)

A competência de desenvolvimento oocitário está associada ao diâmetro folicular (ARLOTTO et al., 1996, LONERGAN et al., 1994, CAIXETA et al., 2009), indicando que o tratamento com FSH, que é capaz de elevar o tamanho dos folículos, pode ser eficiente para melhorar a qualidade oocitária. Ainda, estudos referem que o tratamento com rBST previamente à OPU também é eficaz para elevar a qualidade do oócito e o desenvolvimento embrionário (PAVLOK et al., 1996; BEVERS et al., 1997; PIVATO et al., 1999). O rBST atua elevando as concentrações de IGF1 no fluído folicular (HERRLER et al., 1994), criando um ambiente mais propício para o desenvolvimento do oócito, podendo elevar sua qualidade, refletindo em maior eficiência na formação de blastocistos. No presente estudo, foi verificada correlação entre IGF1 e total de oócitos viáveis ($P=0,0104$; $r=0,33400$; Gráfico 4), porém, a glicose não apresentou interação com o número de oócitos viáveis ($P=0,9641$; $r=0,00633$). Apesar de ter sido verificada correlação entre IGF1 e oócitos viáveis, os grupos experimentais apresentaram quantidade semelhante de oócitos viáveis (GCTL: $5,6\pm 1,0$; GFSH: $7,7\pm 2,3$; GBST: $9,2\pm 3,9$; GBST_FSH: $7,8\pm 1,6$) quanto ao tratamento com BST ($P=0,46$), FSH ($P=0,73$) ou interação BST*FSH ($P=0,50$). Bols et al. (1998), Tripp et al. (2000) e Ramos et al. (2007) também não observaram efeito do tratamento com rBST quanto ao número de oócitos viáveis. Contudo, em estudo de Martins et al. (2012) foi verificado que o uso de rBST aumentou o número de oócitos viáveis em vacas da raça Holandês, não observando efeito do tratamento em animais das raças Nelore e Brangus, indicando que o efeito do rBST pode estar relacionado ao grupo genético ou raça da doadora.

Gráfico 4. Correlação entre a concentração sérica de IGF1 (ng/mL) no momento da OPU e o número de oócitos viáveis recuperados.



Ainda, Greve et al. (1995) verificaram que o tratamento superestimulatório com FSH teve efeito negativo na qualidade morfológica dos oócitos recuperados. Não foi observada interação BST*FSH ($P=0,76$) quanto a taxa de oócitos viáveis (oócitos viáveis/oócitos totais) e não foi observada diferença ($P=0,81$) quanto ao tratamento com rBST (Com rBST: 57% vs. Sem rBST: 55%). O tratamento com FSH apresentou tendência ($P=0,08$) em aumentar a taxa de oócitos viáveis (Com FSH: 62,1% vs. Sem FSH: 54,3%), podendo estar relacionada a maior proporção de folículos médios e grandes. Ramos et al. (2007) observaram que o tratamento com FSH aumentou a qualidade morfológica dos oócitos, associando esta melhora ao aumento no tamanho dos folículos após tratamento com FSH. Ainda, no presente estudo, não foi verificada correlação entre IGF1 e taxa de oócitos viáveis ($P=0,6560$; $r=0,05920$) e glicose e taxa de oócitos viáveis ($P=0,9107$; $r=0,01579$). A ausência de correlação entre estes parâmetros pode estar associada ao fato de que a taxa de oócitos viáveis apresentou tendência em aumentar quando as doadoras receberam tratamento com FSH, que eleva o tamanho dos folículos.

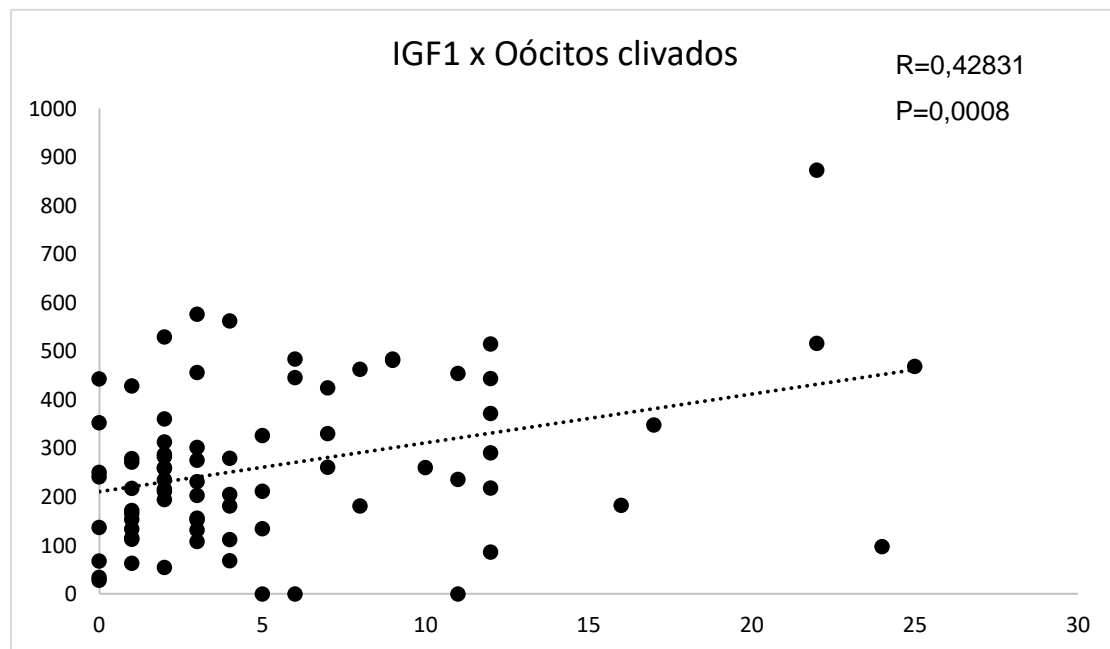
O tratamento com rBST, que elevou os níveis de IGF1, aumentou apenas a quantidade de folículos pequenos. Ainda, houve correlação entre IGF1 e total de oócitos viáveis no presente estudo. Estes resultados podem indicar que a taxa de viáveis está relacionada ao aumento do tamanho dos folículos. Oócitos provenientes de folículos grandes, em fase final de maturação, estão sujeitos a mudanças dramáticas em seu núcleo (LONERGAN et al., 1994) e ao acúmulo de RNA (SIRARD et al., 1992), podendo refletir na qualidade do mesmo. Ainda, estes achados não têm relação com os níveis circulantes de IGF1 e glicose. O maior número de oócitos viáveis do presente estudo, entretanto, está relacionado ao aumento no número de folículos pequenos e do recrutamento folicular, refletido em níveis mais altos de IGF1.

No presente estudo foi observado que a taxa de recuperação (oócitos totais/população folicular no D7) não diferiu (GCTL: 67,2%; GFSH: 45,5%; GBST: 66,3%; GBST_FSH: 53,6%) quanto ao tratamento com rBST ($P=0,9$) e FSH ($P=0,14$) ou interação BST*FSH ($P=0,4$). Diferentemente desses achados, Goodhand et al., (1999) e Vieira et al. (2014) verificaram que o tratamento com FSH reduz a taxa de recuperação oocitária. Estudos verificaram que o tamanho do folículo tem correlação negativa com a taxa de recuperação oocitária em vacas (SENEDA et al., 2001) e novilhas (GOODHAND et al., 1999). Folículos pequenos tem fluído folicular de reduzido volume e viscosidade e menor pressão intrafolicular, podendo influenciar positivamente a recuperação de oócitos provenientes de folículos menores (SENEDA et al., 2001). A taxa de recuperação oocitária pode ser influenciada por alguns fatores, como a pressão da bomba de vácuo utilizada no procedimento de OPU, por exemplo. No presente estudo, a pressão utilizada foi de 100-110 mmHg, enquanto Goodhand et al. (1999) utilizaram pressão de 70-80 mmHg, podendo resultar numa pressão insuficiente para a recuperação de oócitos provenientes de folículos maiores e explicar, em parte, a diferença encontrada nos resultados entre o presente e os demais estudos.

Oócitos de novilhas pré-púberes têm reduzida competência de clivagem, sendo que esta capacidade se inicia após os 9 meses de idade da doadora e atinge competência plena após a puberdade (PRESICCE et al. 1997). Diversos estudos referem baixas taxas de clivagem em doadoras pré-púberes (MAJERUS et al., 1999, DORJI et al., 2012, GUERREIRO, 2015). No presente

estudo, o número de oócitos clivados foi semelhante ($P_{bst}=0,72$; $P_{fsh}=0,51$; $P_{bst*fsh}=0,18$) entre os grupos (GCTL: $4,0\pm 0,89$; GFSH: $7,6\pm 2,6$; GBST: $7,1\pm 2,4$; GBST_FSH: $5,6\pm 1,6$). Entretanto, foi observada correlação entre IGF1 e o número de oócitos clivados ($P=0,0008$; $r=0,42831$; Gráfico 5), porém, não foi verificada correlação entre glicose e o número de oócitos clivados ($P=0,6762$; $r=-0,05872$). Velazquez et al. (2012) afirmaram que oócitos expostos a altos níveis de IGF1 aumentam a expressão de mRNA de transportadores de glicose, podendo elevar o transporte de glicose para dentro do oócito, sendo crítico para o desenvolvimento a blastocisto.

Gráfico 5. Correlação entre a concentração sérica de IGF1 (ng/mL) no momento da OPU e o número de oócitos clivados.



Foi observada interação $BST*FSH$ ($P=0,0007$) para a taxa de clivagem (oócitos clivados/oócitos totais), sendo que apenas o tratamento com rBST elevou a taxa de clivagem quando comparado ao grupo controle (GCTL: $40,5\%^b$; GFSH: $45,2\%^{ab}$; GBST: $48,4\%^a$; GBST_FSH: $40,9\%^{ab}$). Não foi verificada correlação entre glicose ($P=0,3951$; $r=-0,11923$) e taxa de clivagem, porém, houve correlação positiva da concentração plasmática de IGF1 e a taxa de clivagem ($P=0,0018$; $r=0,40077$; Gráfico 6). Esta correlação pode estar associada ao fato de que oócitos provenientes de animais com altos níveis de IGF1 têm maior competência de desenvolvimento, provavelmente ocasionada

pelo tratamento com rBST. Os dados de taxa de clivagem estão apresentados no gráfico 7. Yu et al. (2003) referem que o tratamento superestimulatório com FSH é capaz de elevar as concentrações intrafoliculares de IGF1, no entanto, não havendo efeito sobre os níveis circulantes do mesmo. Apesar de não ter sido observada diferença quanto aos níveis circulantes de IGF1 ou glicose para o grupo BST_FSH, a associação destes tratamentos antes da OPU pode ter elevado acima dos níveis fisiológicos a concentração intrafolicular de IGF1, causando um efeito deletério na qualidade do oócito (THATCHER ET AL., 2006). Níveis muito altos de IGF1 podem explicar a interação encontrada no presente estudo quanto à taxa de clivagem.

Gráfico 6. Correlação entre a concentração sérica de IGF1 (ng/mL) no momento da OPU e a taxa de clivagem (nº de oócitos clivados/nº de oócitos totais).

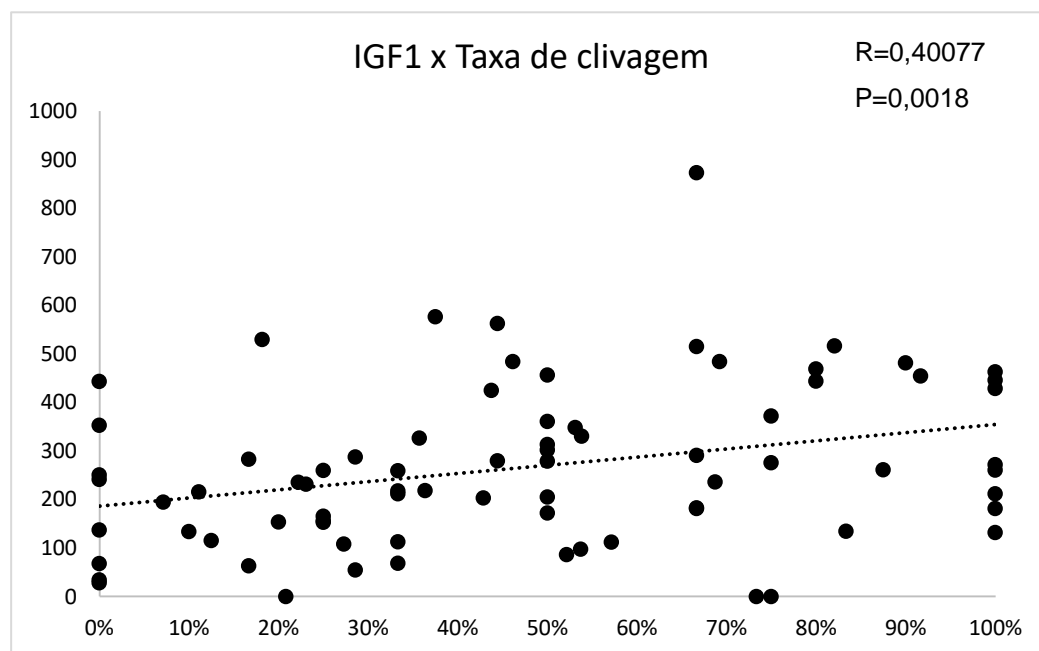
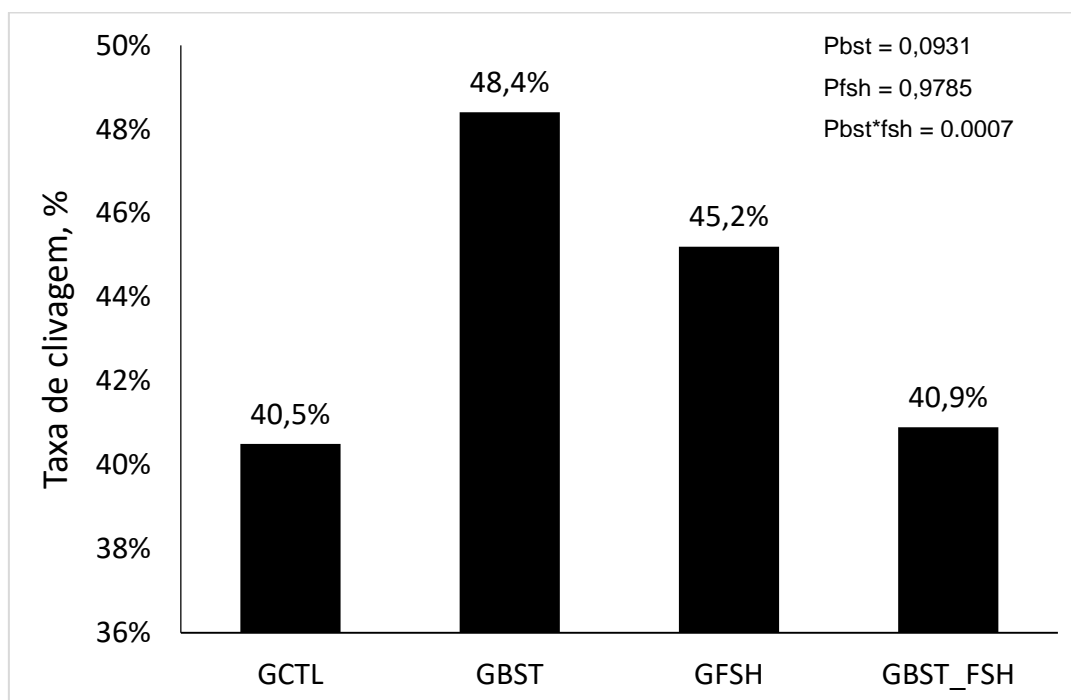


Gráfico 7. Taxa de clivagem (n° de oócitos clivados/ n° de oócitos totais) após PIVE em doadoras pré-púberes dos grupos Controle (GCTL; $n=15$), tratadas com rBST (GBST; $n=14$), tratadas com FSH (GFSH; $n=15$), tratadas com rBST e FSH (GBST_FSH; $n=15$). Dados apresentados como porcentagem.



Oócitos provenientes de animais jovens possuem reduzida habilidade de desenvolvimento a blastocisto quando comparados a oócitos de animais púberes (PRESICCE et al., 1997; GUERREIRO, 2015). Não foi observada interação BST*FSH ($P=0,66$) sobre o número de blastocistos produzidos no presente estudo porém, foi observado que animais tratados com rBST apresentaram tendência ($P=0,06$) em aumentar o número de blastocistos formados (Com rBST: $0,86 \pm 0,24$ vs. Sem rBST: $0,39 \pm 0,14$). Além disso, foi verificada correlação positiva entre IGF1 e o número de blastocistos ($P=0,0124$; $r=0,32634$; Gráfico 8). Oropeza et al. (2004) realizaram tratamento com injeção intraovariana com IGF1, elevando o número de blastocistos formados, assemelhando-se ao número de blastocistos produzidos por doadoras adultas. Entretanto, não foi observada diferença ($P=0,47$) quanto ao tratamento com FSH sobre o número de blastocistos (Com FSH: $0,74 \pm 0,23$ vs. Sem FSH: $0,48 \pm 0,15$), semelhantemente aos achados de Batista et al. (2016), onde

bezerras holandesas foram tratadas ou não com FSH e submetidas a OPU, não havendo diferença na produção e taxa de blastocistos. Os dados com o efeito principal do tratamento com rBST no número de blastocistos estão apresentados no Gráfico 9.

Gráfico 8. Correlação entre a concentração sérica de IGF1 (ng/mL) no momento da OPU e o número de blastocistos.

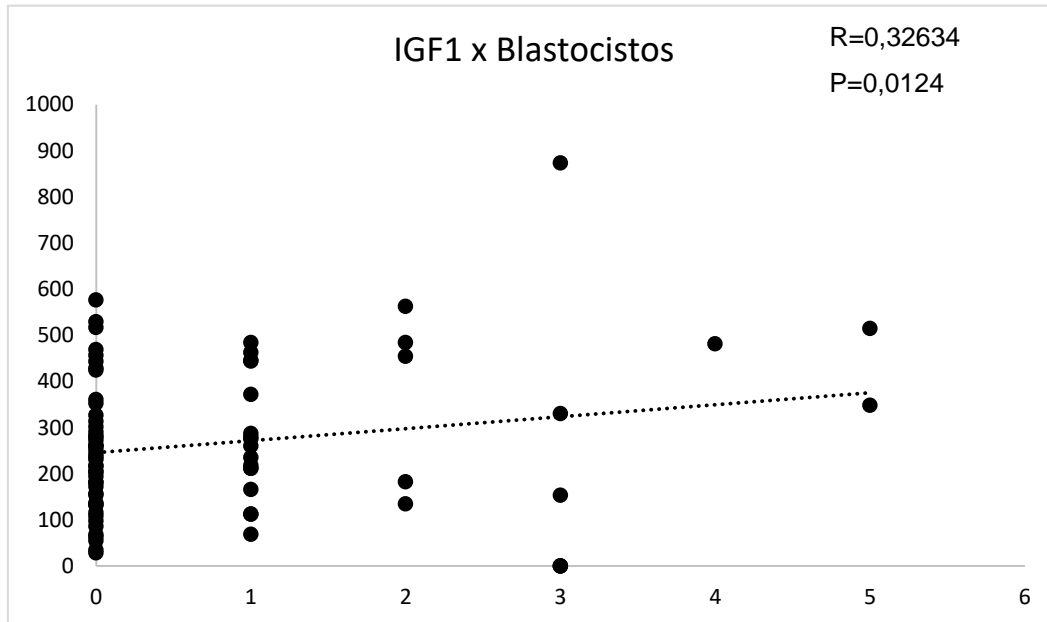
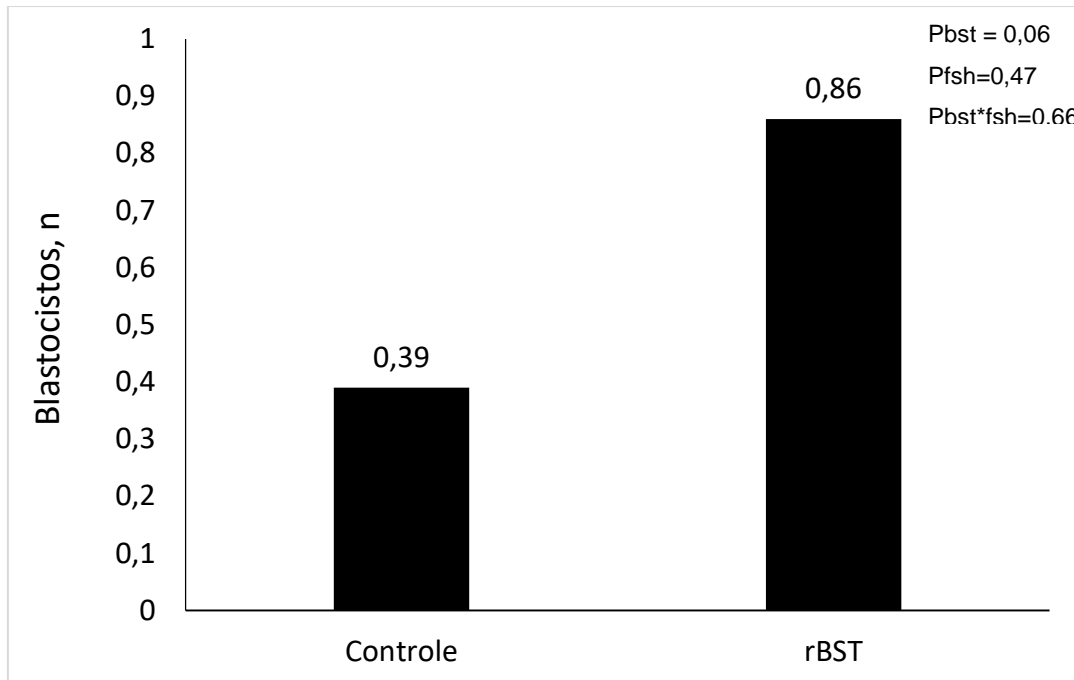
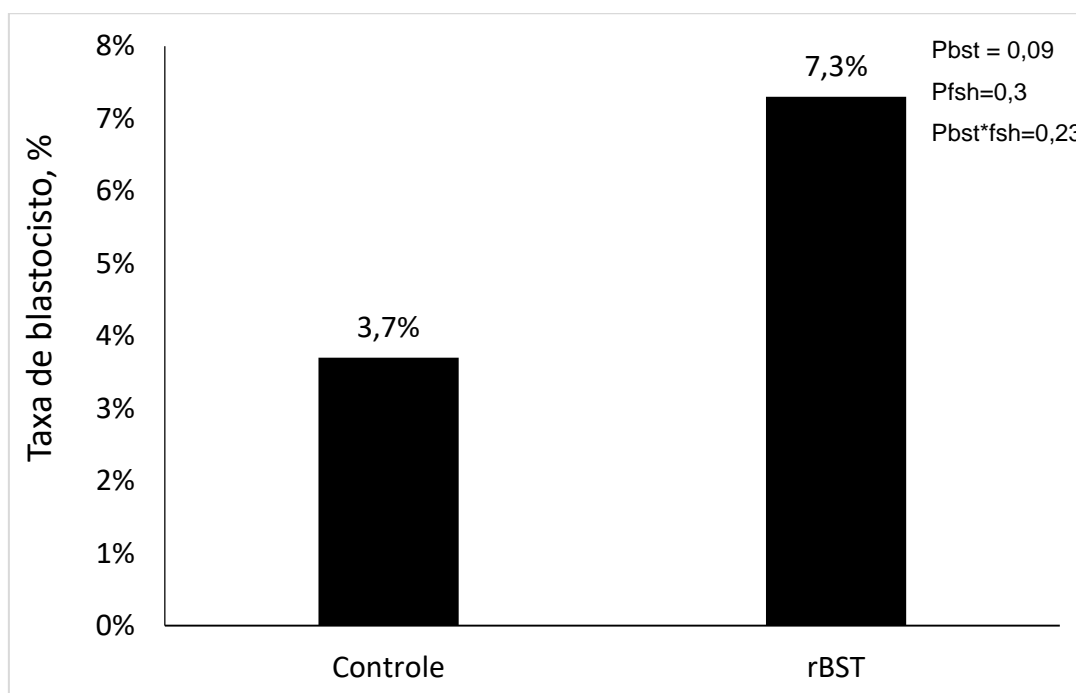


Gráfico 9. Número de blastocistos produzidos após PIVE em doadoras pré-púberes tratadas (n=30) ou não (n=30) com rBST.



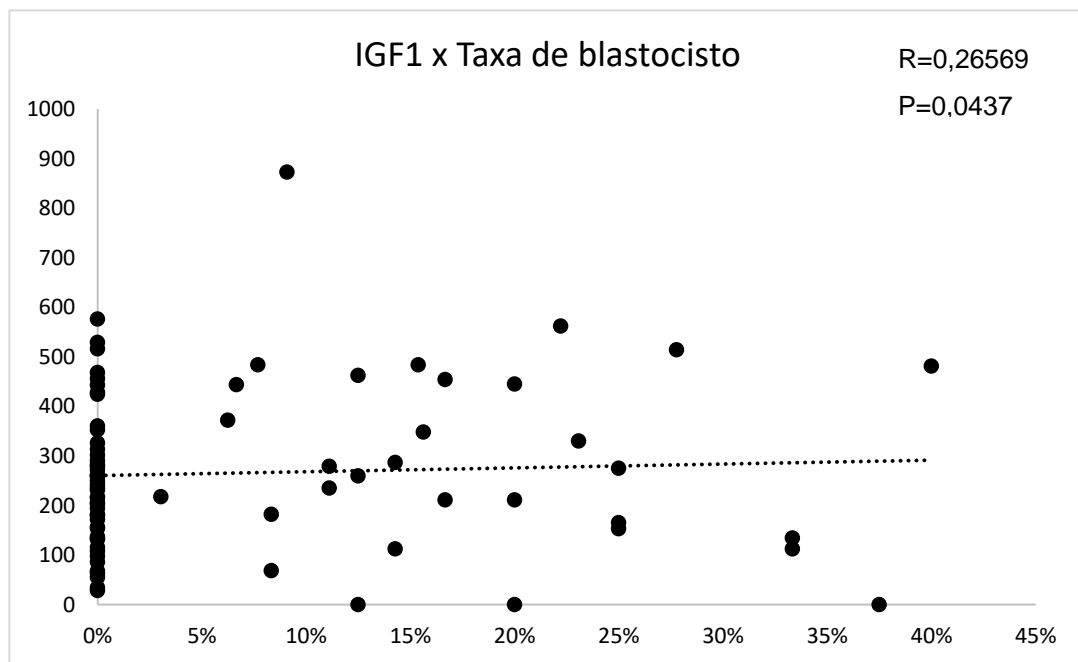
Semelhantemente, a taxa de blastocisto (blastocistos/oócitos totais) não apresentou interação BST*FSH ($P=0,23$), no entanto, houve tendência em aumentar quando a doadora foi tratada com rBST (Com rBST: 7,3% VS. Sem rBST: 3,7%; $P=0,09$), ainda, o tratamento com FSH não influenciou esta taxa (Com FSH: 6,4% vs. Sem FSH: 4,5%; $P=0,30$). Os dados com o efeito principal do tratamento com rBST na taxa de blastocisto estão apresentados no gráfico 10.

Gráfico 10. Taxa de blastocisto (nº de blastocistos/nº de oócitos totais) após PIVE em doadoras pré-púberes tratadas (n=30) ou não (n=30) com rBST. Dados apresentados como porcentagem.



Não foi verificada correlação entre glicose e taxa de blastocisto ($P=0,5763$; $r=-0,07851$), porém, no presente estudo, IGF1 apresentou correlação com o mesmo parâmetro ($P=0,0437$; $r=0,26589$; Gráfico 11). Esta correlação pode ser explicada pela sequência de correlações positivas entre IGF1 e os demais parâmetros de PIVE. No presente estudo, animais com alto IGF1 tiveram maior competência de desenvolvimento oocitário e, portanto, maior formação de blastocistos. Diversos estudos apontam que o IGF1 está relacionado à qualidade do oócito e sua capacidade em se desenvolver a blastocisto (VELAZQUEZ et al., 2005; WALTER et al., 2006; VELAZQUEZ et al., 2009; VELAZQUEZ et al., 2012), corroborando com os achados do presente estudo.

Gráfico 11. Correlação entre a concentração sérica de IGF1 (ng/mL) no momento da OPU e a taxa de blastocisto (nº de blastocistos/nº de oócitos totais).



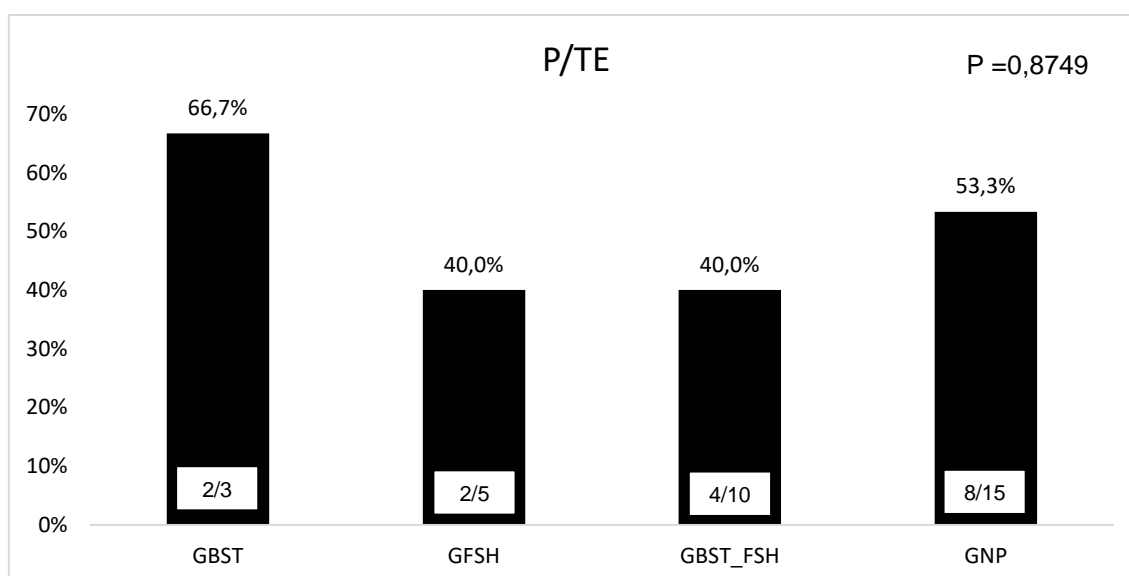
Estudos referem que o tratamento com rBST elevou a taxa de clivagem (RAMOS et al., 2007) e o número de blastocistos produzidos (RAMOS et al., 2007, MARTINS et al., 2012). Roth et al. (2002) referem que o tratamento com rBST é capaz de elevar as concentrações intrafoliculares de IGF1, podendo influenciar positivamente a competência de desenvolvimento embrionário. A somatotropina atua sobre a função ovariana através do aumento do aporte e utilização de nutrientes pelo ovário (ANDRADE et al., 1996). Os resultados da PIVE estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3. Sumário dos parâmetros de avaliação de produção *in vitro* de embriões de doadoras pré-púberes dos grupos controle (n=15), BST (n=14), FSH (n=15) e BST+FSH (n=15). Dados apresentados em porcentagem, média e \pm erro padrão da média.

	GCTL	GFSH	GBST	GBST+FSH	Pfsh	Pbst	Pfsh*bst
Oócitos totais, n	9,47 \pm 1,04	11,56 \pm 3,32	14,86 \pm 4,58	11,93 \pm 2,3	0,98	0,37	0,47
Oócitos viáveis, n	5,60 \pm 1,01	7,75 \pm 2,27	9,21 \pm 3,92	7,80 \pm 1,58	0,73	0,46	0,5
Taxa de oócitos viáveis, %	56%	63%	52%	61%	0,08	0,81	0,09
Taxa de recuperação, %	67%	45%	66%	53%	0,14	0,91	0,42
Oócitos clivados, n	4,00 \pm 0,89	7,56 \pm 2,66	7,14 \pm 2,42	5,60 \pm 1,6	0,51	0,72	0,18
Blastocistos, n	0,20 \pm 0,11	0,56 \pm 0,24	0,79 \pm 0,26	0,93 \pm 0,40	0,47	0,06	0,66
Taxa de clivagem, %	40,50%	45,20%	48,40%	40,90%	0,97	0,09	0,00007
Taxa de blastocisto, %	1,8%	5,5%	7,4%	7,3%	0,3	0,09	0,23

Os embriões produzidos no presente estudo foram transferidos no mesmo dia em receptoras da raça Nelore. Foram transferidos 33 embriões vitrificados (GBST: 3 embriões; GFSH: 5 embriões; GBST_FSH: 10 embriões; controle positivo, GNP: 15 embriões). Não foram transferidos embriões do grupo de bezerras controle (CTL). Não houve diferença estatística para a P/TE aos 29 dias de embriões provenientes das doadoras dos diferentes grupos experimentais (GBST: 66,7%; GFSH: 40,0%; GBST_FSH: 40,0%; GNP: 53,3%; $P=0,8749$). Estudos referem que embriões provenientes de doadoras jovens têm menor viabilidade e menores taxas de gestação (REVEL et al., 1995; PRESCICCE et al., 1997; LEVESQUE AND SIRARD, 1994; GUERREIRO, 2015). No entanto, apesar do número reduzido de embriões transferidos, o mesmo não foi verificado no presente estudo. Block et al. (2003) referem que a adição de IGF1 no meio de cultivo da PIVE foi relacionada com maior taxa de gestação dos embriões produzidos após transferência. Apesar de animais tratados com rBST apresentarem maiores níveis de IGF1, o tratamento pré-OPU das doadoras não influenciou a P/TE (Gráfico 12). Apesar do reduzido número de embriões transferidos, a taxa de gestação obtida com os embriões de bezerras demonstra que é possível utilizar essa tecnologia como ferramenta de melhoramento genético, reduzindo intervalo de gerações.

Gráfico 12. P/TE aos 29 dias dos embriões produzidos por PIVE de bezerras dos grupos BST (n=3), FSH (n=5), BST_FSH (n=10) e das novilhas púberes (controle positivo; GNP; n=15). Dados apresentados como porcentagem.



4 EXPERIMENTO 2 – Efeito do tratamento com hormônio folículoestimulante na produção *in vitro* de embriões e concentração sérica de IGF1 e glicose de bezerras, novilhas púberes e vacas da raça Gir (*Bos indicus*)

4.1 OBJETIVOS

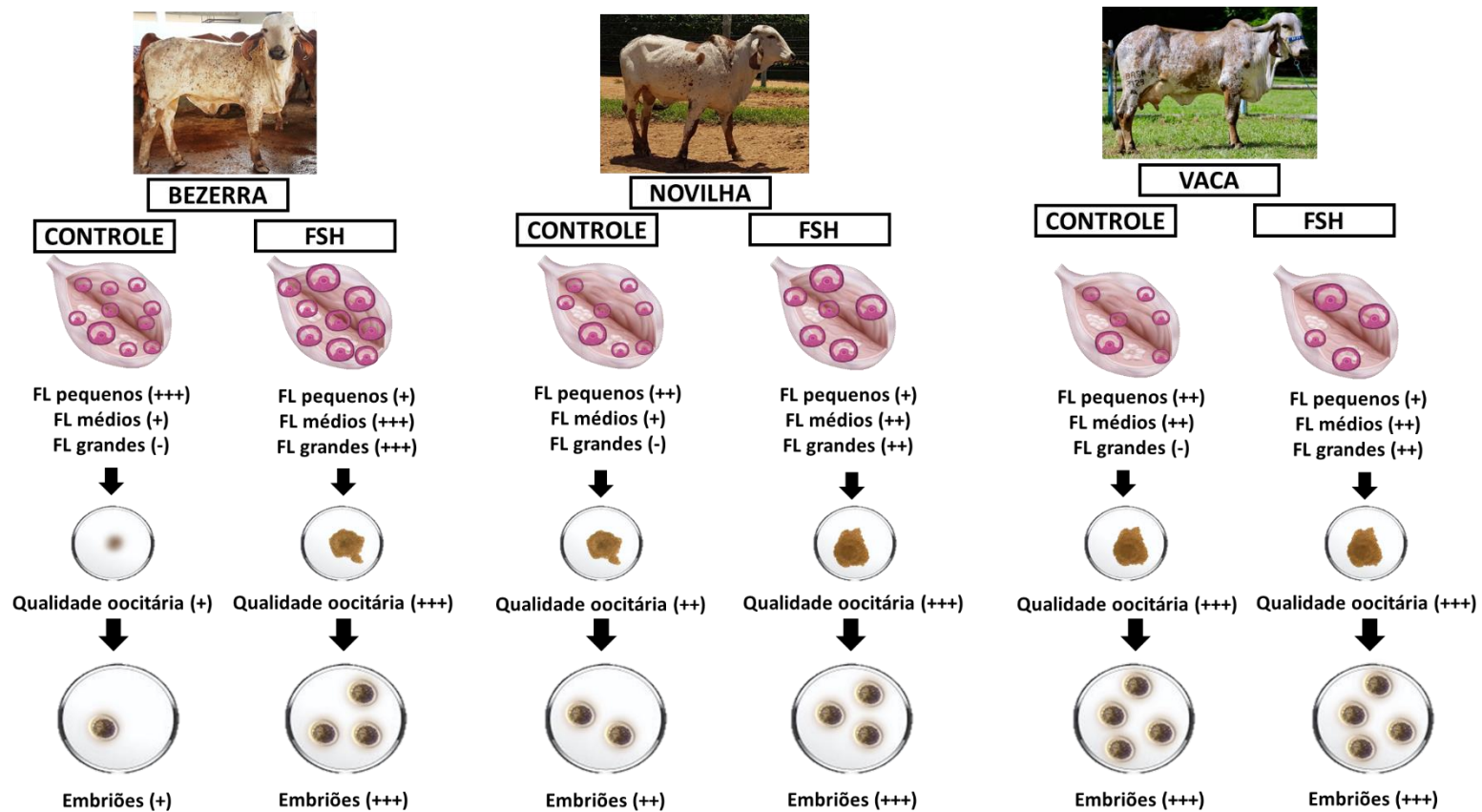
- ✓ Avaliar o efeito da superestimulação ovariana com FSH em bezerras (3 a 10 meses), novilhas púberes (16 a 22 meses) e vacas (72 a 144 meses) da raça Gir (*Bos indicus*) nos seguintes parâmetros de eficiência de produção *in vitro* de embriões:
 - Proporção de folículos pequenos, médios e grandes no dia da OPU
 - Número de oócitos totais
 - Taxa de recuperação
 - Número de oócitos viáveis
 - Taxa de oócitos viáveis
 - Número de oócitos clivados
 - Taxa de clivagem
 - Número de blastocistos
 - Taxa de blastocisto

- ✓ Avaliar o efeito da superestimulação ovariana com FSH na concentração sérica de glicose e IGF1 de bezerras, novilhas púberes e vacas da raça Gir.

4.2 HIPÓTESE

O tratamento com FSH será eficiente em aumentar o diâmetro dos folículos, a competência oocitária, melhorar os parâmetros da PIVE e a P/TE dos embriões produzidos. Esses efeitos serão mais evidentes em animais jovens (Figura 4). Ainda, não se espera efeito do tratamento com FSH nas concentrações séricas de glicose e de IGF1. Além disso, bezerras apresentarão maior população folicular, menor competência oocitária e reduzida eficiência na PIVE e na P/TE. Entretanto, espera-se que as concentrações circulantes de IGF1 sejam mais baixas nas bezerras e não se espera efeito de categoria para as concentrações séricas de glicose.

Figura 4. Modelo hipotético da proporção de folículos (FL) pequenos, médios e grandes, qualidade oocitária e produção *in vitro* de embriões de bezerras, novilhas púberes e vacas tratadas ou não com FSH.



4.3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo atendeu as normas e princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo – SP (FMVZ) (protocolo número 8573050917).

4.3.1 Local e período de execução

O projeto foi executado em 3 sessões de OPU durante o período de Maio de 2018 a Dezembro de 2018. Foram utilizadas 90 fêmeas da raça Gir (*Bos indicus*), sendo 30 animais de cada categoria pertencentes às Fazendas do Basa, localizadas no município de Leopoldina, MG.

Para todas as sessões de PIVE foi utilizado o laboratório comercial da In Vitro Brasil (IVB), situada em Mogi Mirim, SP. Respeitando o programa de acasalamento da fazenda, foram utilizados 8 touros para a PIVE, sendo que os grupos experimentais foram distribuídos homogeneamente entre os touros.

4.3.2 Animais e instalações

Durante todo o experimento os animais foram mantidos nos piquetes da propriedade, sendo um piquete para cada categoria animal. A alimentação das bezerras era composta de: 1 kg de concentrado, 8 kg de silagem de milho e 2 kg de feno. A nutrição das novilhas púberes era composta de: 2 kg de concentrado e 15 kg de silagem de milho. As vacas recebiam: 1,5 kg de concentrado e 10 kg de silagem de milho. Ainda, todos os animais tinham livre acesso à pastagem *Brachiaria brizantha* e água *ad libitum*.

4.3.3 Delineamento experimental

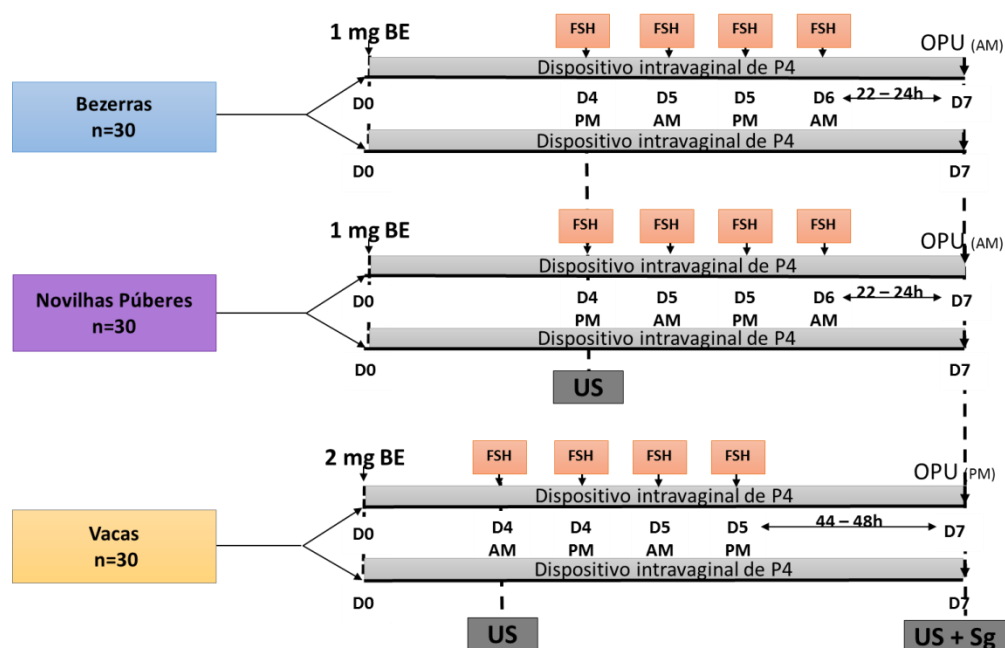
Foram utilizadas 90 fêmeas da raça Gir (*Bos indicus*), sendo 30 bezerras (3 a 10 meses de idade), 30 novilhas púberes (16 a 22 meses de idade) e 30 vacas (72 a 144 meses de idade). O experimento foi delineado em arranjo fatorial 3x2, sendo que cada categoria foi dividida entre animais

tratados com FSH e animais controle, homoganeamente distribuídos de acordo com o acasalamento e a população folicular. Os animais de todos os grupos receberam benzoato de estradiol (BE; Ric-BE®, Agener União Química, São Paulo, SP; bezerras e novilhas receberam 1mg e vacas receberam 2mg) e um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; bezerras receberam o Primer PR®, Agener União Química, SP, contendo 0,360 mg de P4 e novilhas e vacas receberam o Prociclar®, Ceva Saúde Animal, Paulínia, SP, contendo 0,75 mg de P4) no dia 0 (D0) durante 7 dias para sincronização da onda de crescimento folicular previamente à OPU.

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos: GBCTL – bezerras não receberam tratamento adicional prévio à OPU; GBFSH – bezerras receberam superestimulação com 80mg FSH (Folltropin®, Vetoquinol, Mariporã, SP) administrado em 4 injeções duas vezes por dia em doses decrescentes (25 mg [dia 4, PM], 25 mg [dia 5, AM], 15 mg [dia 5, PM], e 15 mg [dia 6, AM]); GNCTL – novilhas não receberam tratamento adicional prévio à OPU; GNFSH – novilhas receberam superestimulação com 100mg FSH (Folltropin®, Vetoquinol, Mariporã, SP) administrado em 4 injeções duas vezes por dia em doses decrescentes (30 mg [dia 4, PM], 30 mg [dia 5, AM], 20 mg [dia 5, PM], e 20 mg [dia 6, AM]); GVCTL – vacas não receberam tratamento adicional prévio à OPU; GVFSH – vacas receberam superestimulação com 140mg FSH (Folltropin®, Vetoquinol, Mariporã, SP) administrado em 4 injeções duas vezes por dia em doses decrescentes (40 mg [dia 4, AM], 40 mg [dia 4, PM], 30 mg [dia 5, AM], e 30 mg [dia 5, PM]).

No dia 7 (D7) os dispositivos de P4 foram removidos e os animais de todos os grupos foram submetidos a anestesia epidural (Lidocaína 2%), seguido da OPU (período de *coasting*: bezerras e novilhas: 24h; vacas:48h) e os oócitos recuperados seguiram para a PIVE em laboratório comercial (In Vitro Brasil, IVB, Mogi Mirim, SP). O delineamento experimental segue esquematizado em Figura 5.

Figura 5. Desenho esquemático do delineamento experimental. Bezerras, novilhas púberes e vacas tratadas ou não com FSH e submetidas à OPU.



4.3.4 Avaliações ultrassonográficas

As novilhas púberes foram submetidas a avaliação ultrassonográfica transretal com probe linear de frequência 6,5 MHz (2200, Mindray VET) 7 dias antes do início da sincronização da onda folicular (D-7) para confirmar a ciclicidade (avaliada pela presença ou não de um CL). Antes do início do tratamento com FSH (D4PM para novilhas e bezerras e D5AM para vacas) foi realizada nova avaliação ultrassonográfica transretal com probe linear de frequência 8,0 Hz (S8, Sonoscape, China) em todos os animais para contagem da população folicular ovariana, para auxiliar a distribuição dos grupos experimentais. Ainda, durante o procedimento de OPU no D7, a população folicular foi registrada novamente para avaliação da proporção do tamanho dos folículos para cada grupo experimental.

4.3.5 Aspiração folicular guiada por ultrassonografia

As OPUs foram realizadas na propriedade em que os animais se encontravam (Fazendas do Basa) pelo Médico Veterinário Bernardo Marcozzi Bayeux, da empresa Bovigênese - Reprodução Animal.

As fêmeas foram contidas em um brete e submetidas à anestesia epidural no espaço sacrococcígeo com lidocaína a 2% (2mL para bezerras, 3 mL para novilhas púberes e 4 mL para vacas). O procedimento de OPU foi o mesmo descrito anteriormente no Experimento 1.

4.3.6 Produção *in vitro* de embriões

Os procedimentos de PIVE (MIV, FIV e CIV) foram os mesmos descritos anteriormente no Experimento 1.

4.3.7 Colheita de sangue

As colheitas de sangue foram realizadas em D7 (após o procedimento de OPU) para as 3 categorias para análise da concentração sérica de glicose e IGF1. O procedimento de colheita de sangue e as análises realizadas (IGF1 e glicose) foram realizados conforme descrito em Experimento 1.

4.3.8 Transferência de embriões e diagnóstico de gestação

Os embriões produzidos foram transferidos em receptoras novilhas cruzadas (n=280; *Bos indicus* x *Bos taurus*) na central de receptoras da Minerembryo – Alfenas, MG. As receptoras foram submetidas a protocolo de observação de estro (sem sincronização farmacológica do ciclo estral) e os embriões transferidos em D6, D7 ou D8 após observação do estro. Antes da realização da TE, as receptoras foram submetidas a palpação retal para avaliação da presença, tamanho (1, 2 ou 3) e quantidade de CL. Apenas receptoras que possuíam ao menos um CL receberam um embrião, através do método de transferência não cirúrgico para o corno ipsilateral ao CL. Os

embriões da primeira e da terceira sessão de OPU-PIVE foram transferidos a fresco e da segunda sessão foram vitrificados.

O diagnóstico de gestação foi realizado aos 30 dias após a TE e a confirmação da gestação foi realizada aos 60 dias após a TE, ambos por palpação retal. A taxa de concepção foi calculada baseada no número de fêmeas prenhes em relação ao número de fêmeas que receberam um embrião no dia da TE.

4.3.9 Análise estatística

Informações de cada doadora foram compiladas em uma planilha para análise estatística. Os dados foram analisados com o auxílio dos procedimentos do SAS (Statistical Analysis System Inst. Inc., Cary, NC). As variáveis contínuas foram testadas de acordo com a normalidade dos resíduos utilizando-se o PROC UNIVARIATE e as variáveis que não obtiveram a normalidade foram transformadas e “outliers” foram removidos quando necessário. No modelo estatístico foram inclusas variáveis aleatórias de data de OPU e touro. Assim como inclusas co-variáveis como: peso, ECC e idade. As variáveis resposta analisadas foram número de folículos pequenos, médios e grandes antes do tratamento superestimulatório (D5) e no dia da OPU, número de oócitos totais, taxa de recuperação, número de oócitos viáveis, taxa de oócitos viáveis, número de oócitos clivados, taxa de clivagem, número de blastocistos, taxa de blastocisto e taxa de prenhez após TE (30 e 60 dias e perda gestacional). A comparação das médias foi realizada através do procedimento GLIMMIX e as diferenças estatísticas foram estabelecidas utilizando o procedimento Tukey-Kramer. Para as variáveis contínuas os resultados foram mostrados como média \pm erro padrão e para as taxas foram mostradas como porcentagem (%). As correlações foram analisadas utilizando o procedimento CORR do SAS e o coeficiente de correlação de Spearman para dados não-paramétricos. Foi considerado como diferença significativa se o valor de $P < 0,05$ e tendência quando $P < 0,10$.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foi observada interação tratamento*categoria ($P=0,1083$) ou efeito de categoria ($P=0,29$) quanto à população folicular estabelecida no D4, demonstrando que de cada categoria foi equilibrada entre os grupos experimentais (com ou sem FSH; Tabela 5). Entretanto, foi verificado que novilhas púberes possuíam maior população folicular no D5 do que bezerras e vacas (Bezerras: $20,4\pm 0,82$; Novilhas: $27,6\pm 0,95$; Vacas: $18,9\pm 0,79$; $P<0,0001$).

Não foi verificada interação tratamento*categoria para os níveis séricos de IGF1 (ng/mL), entretanto, os animais que receberam FSH apresentaram valores mais baixos de IGF1 (Com FSH: $238,7\pm 25,2$ vs. Sem FSH: $296,8\pm 25,5$; $P=0,0312$). Spicer et al. (2002) referem que altas doses de FSH podem reduzir a atividade de IGF1, através da diminuição da produção de estradiol e progesterona intrafolicular. Apesar da produção de IGF1 no fígado ser considerada a mais importante, no presente estudo as reduzidas concentrações de IGF1 nos animais tratados com FSH podem estar relacionadas a uma dose elevada de FSH, causando um *down-regulation* de IGF1 intrafolicular e redução dos níveis circulantes. Baruselli et al. (2003) referem que animais *Bos indicus* possuem maior sensibilidade ao FSH. Entretanto, outros estudos devem ser realizados para confirmar esses achados.

A literatura é conflitante quanto ao perfil de IGF1 em relação à idade do animal. Cooke et al. (2013) referem que os níveis plasmáticos de IGF1 aumentam conforme a idade do animal. No entanto, em estudo de Govoni et al. (2003) foi verificado que os níveis de IGF1 se mantêm constante independentemente da idade do animal. No presente estudo foi verificado efeito de categoria ($P<0,0001$), sendo que vacas apresentaram menor concentração de IGF1 do que as demais categorias (Bezerras: $295,5\pm 30,9^a$; Novilhas: $311,82\pm 31,6^a$; Vacas: $188,4\pm 26,6^b$). Semelhantemente, Breese et al. (1991) relataram que as concentrações de IGF1 decrescem com a idade dos animais, podendo explicar as maiores concentrações de IGF1 em doadoras mais jovens. Ainda, metade das vacas utilizadas no presente estudo ($n=15$) estavam em lactação durante a realização do experimento. Sanchez et al. (2014) apontam que vacas em lactação possuem níveis plasmáticos e

intrafoliculares mais baixos de IGF1 quando comparadas a novilhas. Já para glicose (mg/dL), não foi observada interação tratamento*categoria ($P=0,1354$) ou efeito de tratamento ($P=0,8593$). Foi observado efeito de categoria ($P=0,0157$), em que bezerras apresentaram níveis plasmáticos mais altos de glicose do que as demais categorias (Bezerras: $104,5\pm 18,2^a$; Novilhas: $94,7\pm 4,3^b$; Vacas: $90,1\pm 3,6^b$), corroborando com achados de Kennedy et al. (1939), em que foi verificado que os níveis de glicose decrescem com a idade do animal. Entretanto, Sanchez et al. (2015) relataram que os níveis de glicose se mantiveram constantes dos 3 aos 15 meses de idade. Os resultados de concentrações circulantes de IGF1 e de glicose estão sumarizados na Tabela 4.

Tabela 4. Concentrações circulantes de IGF1 (ng/mL) e Glicose (mg/dL) no dia da OPU para bezerras (controle, n=15 e FSH, n=15), novilhas púberes (controle, n=15 e FSH, n=15) e vacas (controle, n=15 e FSH, n=15) tratadas ou não com FSH.

	Bezerras		Novilhas		Vacas		Valor de P		
	Controle	FSH	Controle	FSH	Controle	FSH	Tratamento	Categoria	Trat*Cat
IGF1 (ng/mL)	355,7±43,2	235,2±39,6	332,9±45,2	290,7±45,3	190,0±30,1	186,7±45,2	0,0312	0,0001	0,4695
Glicose (mg/dL)	107,5±4,9	101,3±4,6	89,5±5,7	100,7±6,5	94,4±6,3	85,7±3,5	0,8593	0,0157	0,1354

Não foi observada interação tratamento*categoria ($P=0,5998$, Tabela 5) para a população total de folículos no dia da OPU (D7). Entretanto, foi observado efeito de tratamento ($P=0,0002$), sendo que animais tratados com FSH apresentaram maior população folicular do que animais não tratados (Com FSH: $25,9\pm 0,76$ vs. Sem FSH: $21,9\pm 0,70$). Os dados da literatura sobre o efeito da superestimulação com FSH são conflitantes. Corroborando com os dados do presente estudo, outros autores também verificaram que o tratamento com FSH eleva a quantidade de folículos disponíveis para OPU (GOODHAND et al., 1998; MAJERUS et al., 1999; TANEJA et al., 2000, VIEIRA et al. 2016). Entretanto, outros autores referem que o tratamento com FSH não elevou a população folicular (VIEIRA et al. 2014, CURRIN et al. 2017). Ainda, como esperado, devido aos resultados de população folicular avaliada no D5, foi observado efeito de categoria ($P<0,0001$), em que novilhas tiveram maior

população folicular do que bezerras e vacas no dia da OPU (D7). A população folicular em bovinos é estimada em 235.000 folículos, sendo que este número decresce com a idade (ERICKSON, 1966; BETTERIDGE et al., 1989). Este dado indica que animais jovens possuem mais folículos antrais do que animais mais velhos. A hipótese do presente estudo de que bezerras apresentariam maior população folicular do que novilhas púberes e vacas não foi confirmada. A alta população folicular verificada em novilhas púberes pode estar relacionada a diversos fatores, como nutrição, manejo e seleção genética. Ainda, não foi verificada correlação entre os níveis plasmáticos de IGF1 ($P=0,9693$; $r=0,00427$) ou de glicose ($P=0,2009$; $r=-0,13847$) e a população folicular no dia da OPU (D7).

Não foi observada interação tratamento*categoria ($P=0,8109$) quanto à quantidade de folículos pequenos no D7, no entanto, animais que receberam tratamento com FSH tiveram menor quantidade de folículos pequenos quando comparados a animais dos grupos controle (FSH: $12,4\pm0,53$ vs. CTL: $20,3\pm0,68$; $P>0,0001$). O uso de FSH pode estar associado a diminuição no número de folículos pequenos, uma vez que o FSH age sobre folículos FSH-dependentes, estimulando seu crescimento (PALERMO et al., 2007). Ainda, a quantidade de folículos pequenos diferiu conforme categoria animal ($P>0,0001$), sendo maior para novilhas púberes ($23,4\pm0,89^a$), seguido de bezerras ($14,7\pm0,70^b$) e então animais adultos ($11,7\pm0,63^c$). Contrariamente aos achados do presente estudo, Guerreiro (2015) verificou que fêmeas pré-púberes possuíam maior quantidade de folículos pequenos do que fêmeas púberes. Em estudo realizado por Lussier et al. (1987), foi constatado que o crescimento de folículos pequenos é mais lento do que o crescimento de folículos maiores. As novilhas púberes apresentaram maior quantidade de folículos pequenos do que as demais categorias, tanto na avaliação realizada no D4 (antes do tratamento com FSH) quanto no dia da OPU (D7). A diferença na velocidade de crescimento dos folículos pequenos e grandes pode explicar a maior quantidade de folículos pequenos, observada em novilhas púberes.

Não foi observada interação tratamento*categoria ($P=0,1294$) ou efeito de categoria ($P=0,1892$) quanto à quantidade de folículos médios. Entretanto, foi verificado efeito de tratamento com FSH ($P>0,0001$) sobre este parâmetro. A quantidade de folículos grandes também foi maior para animais tratados com

FSH ($P > 0,0001$). Diversos estudos apontam que o tratamento com FSH é eficaz para promover o crescimento de folículos ovarianos, sendo que animais que recebem tratamento apresentam maior quantidade de folículos médios e grandes (LOONERGAN et al., 1994; GOODHAND et al., 1999; CURRIN et al., 2017, CARVALHO et al., 2019). Ainda, houve efeito de categoria ($P = 0,0112$), em que vacas apresentaram maior quantidade de folículos grandes do que bezerras, não diferindo de novilhas (Bezerras: $1,1 \pm 0,3^b$; Novilhas: $2,2 \pm 0,6^{ab}$; Vacas: $3,6 \pm 0,9^a$). Na avaliação ultrassonográfica realizada no D5 (antes do início do tratamento com FSH), as vacas já possuíam maior quantidade de folículos médios e grandes do que as demais categorias, podendo explicar a diferença na quantidade de folículos grandes, observada no dia da OPU (D7). Sartori & Barros (2011) referem que o diâmetro do folículo dominante de vacas da raça Nelore (*Bos indicus*) variam de 10 a 12 mm. Gimenes et al. (2008) verificaram que o diâmetro do folículo dominante em novilhas Nelore variou de 7,0 a 8,4 mm. Esta diferença no tamanho do maior folículo entre novilhas e vacas pode explicar a diferença encontrada na quantidade de folículos grandes de vacas que receberam tratamento com FSH. Os resultados de população folicular no dia da OPU (D7) estão sumarizados na Tabela 5 e apresentados no gráfico 13.

Gráfico 13. Proporção de folículos pequenos (<5 mm), médios (5-8 mm) e grandes (>8 mm) no dia da OPU para bezerras, novilhas e vacas tratadas ou não com FSH.

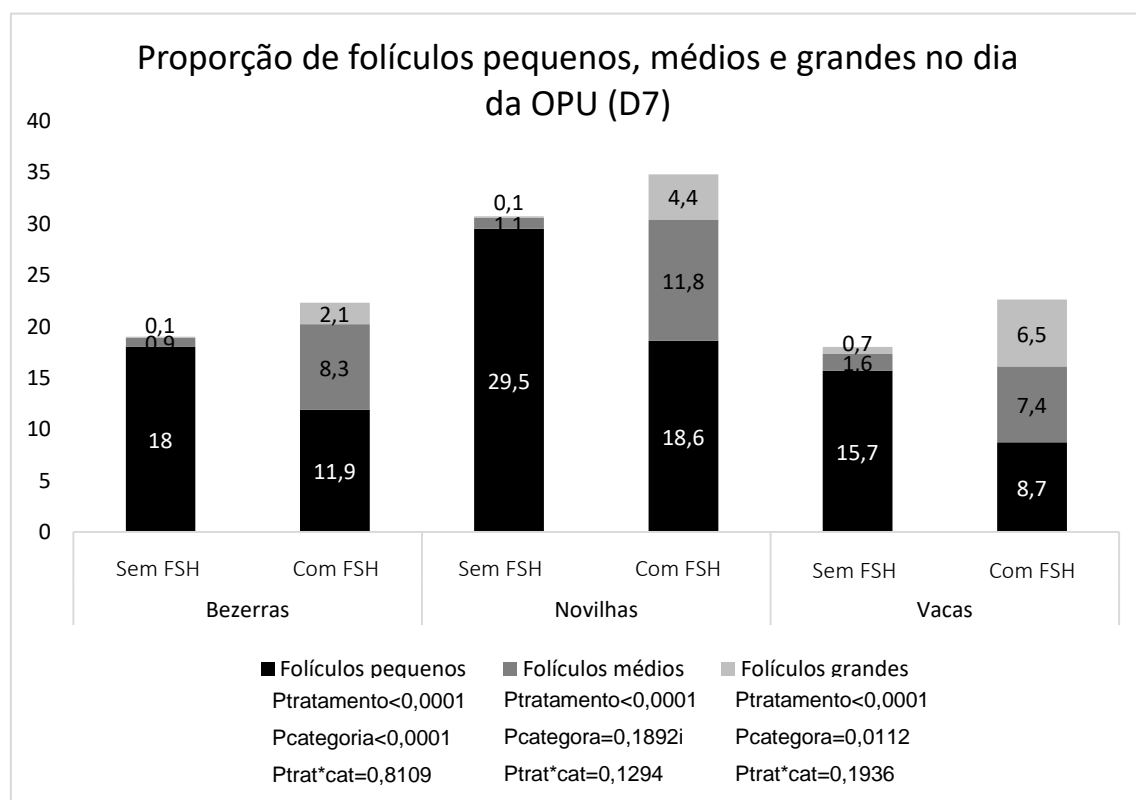


Tabela 5. Proporção de folículos pequenos (<5 mm), médios (5-8 mm) e grandes (>8 mm) e população folicular total no dia da OPU (D7) para bezerras (controle, n=xx e FSH, n=xx), novilhas púberes (controle, n=xx e FSH, n=xx) e vacas (controle, n=xx e FSH, n=xx) tratadas ou não com FSH.

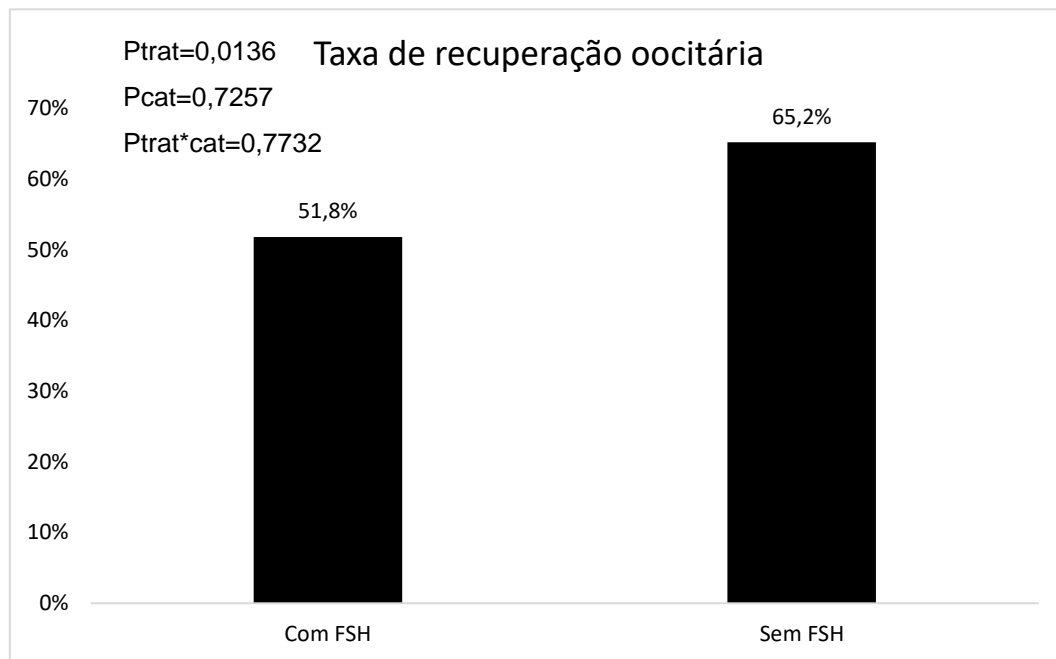
	Bezerras		Novilhas		Vacas		Valor de P		
	Controle	FSH	Controle	FSH	Controle	FSH	Tratamento	Categoria	Trat*Cat
D5 do protocolo									
Folículos pequenos	20,5±2,0	17,2±2,1	26,9±2,2	25,2±2,1	17,2±2,1	17,9±1,9	0,1482	<0,0001	0,2133
Folículos médios	1,6±0,5	1,3±0,5	0,9±0,3	1,9±0,5	0,8±0,3	1,3±0,4	0,1036	0,3278	0,0911
Folículos grandes	0,2±0,1	0,1±0,1	0,0±0,0	0,1±0,1	0,3±0,1	0,3±0,2	0,9756	0,4412	0,9351
Folículos totais	22,3±2,1	18,6±1,9	27,9±2,2	27,3±2,1	18,3±2,1	19,5±1,9	0,29	<0,0001	0,1083
D7 do protocolo									
Folículos pequenos	18,0±2,3	11,9±2,2	29,5±2,4	18,6±2,7	15,7±1,5	8,7±1,4	<0,0001	<0,0001	0,8109
Folículos médios	0,9±0,2	8,3±0,7	1,1±0,3	11,8±0,9	1,6±0,3	7,4±0,7	<0,0001	0,1892	0,1294
Folículos grandes	0,1±0,1	2,1±0,5	0,1±0,1	4,4±1,0	0,7±0,2	6,5±1,6	<0,0001	0,0112	0,1936
Folículos totais	19,0±2,2	22,3±2,8	30,7±2,4	34,8±3,6	19,9±1,5	22,6±2,5	0,0002	<0,0001	0,5998

Não foi observada interação tratamento*categoria ($P=0,8245$) ou efeito de tratamento superestimulatório ($P=0,685$) quanto ao número de oócitos totais. Entretanto, foi observado efeito de categoria ($P=0,0002$), em que novilhas apresentaram maior quantidade de oócitos recuperados do que as demais categorias (Bezerras: $12,3\pm 1,40^b$; Novilhas: $20,0\pm 2,15^a$; Vacas: $11,3\pm 1,10^b$). Esse efeito, provavelmente, está relacionado ao fato de que novilhas do presente estudo apresentaram maior população folicular no dia da OPU (D7).

Não foi observado efeito tratamento*categoria ($P=0,7732$) ou efeito de categoria ($P=0,7257$) para taxa de recuperação oocitária (n° de oócitos totais / população folicular no D7). Entretanto, verificou-se que animais tratados com FSH ($P=0,0136$) apresentaram redução na taxa de recuperação oocitária em todas as categorias animais (Com FSH: 51,8% vs. Sem FSH: 65,2%). Diversos estudos apontam que a taxa de recuperação oocitária é menor quando animais recebem tratamento com FSH (LONERGAN et al., 1994; GOODHAND et al., 1999; SENEDA et al., 2001). O uso do tratamento superestimulatório eleva o tamanho dos folículos, que por sua vez contém mais células da granulosa e maior viscosidade do que folículos menores (GOODHAND et al., 1999), podendo interferir na captação do oócito quando o folículo é aspirado. Os dados com efeito principal de taxa de recuperação oocitária estão apresentados no gráfico 14.

Semelhantemente ao número total de oócitos recuperados, não foi constatada interação tratamento*categoria ($P= 0,3985$) ou efeito de tratamento ($P=0,7613$) quanto ao número de oócitos viáveis. No entanto, foi verificado efeito de categoria ($P=0,0066$) para esta variável. Novilhas apresentaram maior quantidade de oócitos viáveis recuperados. Este efeito está, provavelmente, relacionado ao fato de que novilhas apresentaram maior quantidade de oócitos totais recuperados no dia da OPU (D7). Ainda, não houve correlação entre as concentrações plasmáticas de IGF1 ($P= 0,7727$; $r= 0,03199$) ou glicose ($P= 0,7868$; $r= 0,02941$) com o número de oócitos viáveis.

Gráfico 14. Taxa de recuperação oocitária (número de oócitos totais/número de folículos totais no D7) para animais que receberam (n=45) ou não (n=45) tratamento com FSH. Dados apresentados em porcentagem.

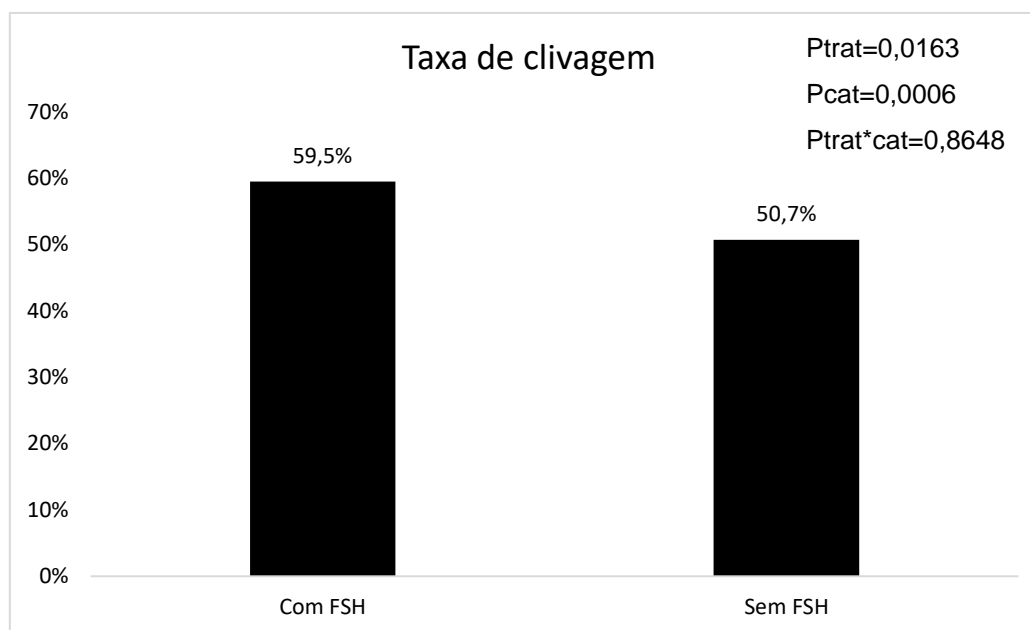


A taxa de oócitos viáveis não diferiu entre categoria ($P=0,6987$) e tratamento ($P=0,1133$) e não houve interação tratamento*categoria ($P=0,5747$). Este resultado rejeita a hipótese de que animais tratados com FSH apresentariam oócitos de maior qualidade e viabilidade. Estudos apontam que oócitos provenientes de folículos maiores possuem maior capacidade de desenvolvimento a blastocisto do que oócitos obtidos de folículos pequenos (LONERGAN et al., 1994; BLONDIN E SIRARD, 1995; MARCHAL et al., 2002). Apesar do tratamento com FSH ter sido eficiente em elevar o tamanho dos folículos em todas as categorias animais no presente estudo, o efeito do tamanho do folículo sobre a qualidade morfológica dos oócitos não foi observada. Alguns estudos referem que a utilização da qualidade morfológica para prever a competência do oócito na PIVE tem baixa acurácia (BLONDIN et al., 1995; HAZELEGER et al., 1995; JEWGENOW et al., 1999; EBNER et al., 2003; FENG et al., 2007). Este fato está, provavelmente, relacionado à alta subjetividade da avaliação morfológica dos oócitos, podendo explicar a ausência de diferença estatística nos resultados de viabilidade oocitária do presente estudo. Foi verificada tendência de correlação negativa entre IGF1 e taxa de oócitos viáveis ($P=0,075$; $r=-0,19533$), entretanto, o baixo valor de "r"

indica que esta correlação é baixa. Ainda, não foi observada correlação entre glicose e taxa de viáveis ($P=0,774$; $r=0,03124$).

Não foi observada interação Grupo*Categoria ($P=0,5536$) ou efeito de tratamento ($P=0,5715$) sobre o número de oócitos clivados. Entretanto, foi verificado que novilhas apresentaram maior quantidade de oócitos clivados do que as demais categorias (Novilhas: $11,3\pm 1,30^a$; Vacas: $7,2\pm 0,80^b$; Bezerras: $5,8\pm 0,70^b$; $P=0,0004$). Esta diferença de categoria no número de oócitos clivados está, provavelmente, relacionado ao número maior de oócitos recuperados e de oócitos viáveis para novilhas púberes. Não foi observada interação Grupo*Categoria ($P=0,8648$) sobre a taxa de clivagem, porém, foi constatado que o tratamento com FSH ($P=0,0163$) foi eficaz em elevar a taxa de clivagem dos animais tratados (Com FSH: 59,5% vs. Sem FSH: 50,7%, Gráfico 15) e que bezerras tiveram menor taxa de clivagem quando comparadas à novilhas e vacas (Novilhas: 34,8%^a; Vacas: 35,4%^a; Bezerras: 28,3%^b; $P=0,0006$). Semelhantemente, Guerreiro (2015) também verificou que animais pré-púberes apresentam menor taxa de clivagem. A reduzida qualidade oocitária de animais jovens pode explicar a menor taxa de clivagem encontrada para esta categoria animal. Ainda, no presente estudo, foi verificado que o tratamento com FSH melhorou a taxa de clivagem nas três categorias experimentais. Apesar de não ter sido evidenciada diferença morfológica na qualidade oocitária, os oócitos apresentaram maior competência de desenvolvimento, expressa na maior taxa de clivagem. Batista et al. (2016) também verificaram que bezerras tratadas com FSH apresentaram aumento na taxa de clivagem.

Gráfico 15. Taxa de clivagem (número de óocitos clivados/número de óocitos totais) para animais que receberam (n=45) ou não (n=45) tratamento com FSH. Dados apresentados em porcentagem.



O número de blastocistos produzidos foi influenciado apenas pela categoria animal ($P= 0,0016$), não havendo diferença quanto ao tratamento com FSH ($P=0,2726$), ou interação tratamento*categoria ($P=0,4234$). No presente estudo foi verificado que bezerras produziram significativamente menos blastocistos do que novilhas e vacas (Bezerras: $1,5\pm 0,28^b$; Novilhas: $4,5\pm 0,72^{a_i}$; Vacas: $4,0\pm 0,66^a$). Não foi constatada correlação entre IGF1 e número de blastocistos ($P=0,2894$; $r=-0,11696$). Entretanto, foi verificada tendência de correlação negativa entre glicose e número de blastocistos ($P=0,0702$; $r=-0,19504$), no entanto, o baixo valor de "r" indica que esta correlação é pouco explicativa. A taxa de blastocisto se comportou semelhantemente, sendo que não foi verificada interação tratamento*categoria ($P=0,8663$) ou efeito de tratamento ($P=0,316$). Entretanto, vacas apresentaram maior taxa de blastocisto do que bezerras e novilhas (Bezerras: $15,2\%^b$; Novilhas: $21,5\%^b$; Vacas: $32,7\%^a$; $P=0,0016$). Este achado corrobora com achados de outros autores, que referem que óocitos obtidos de animais mais jovens possuem menor eficiência de desenvolvimento na PIVE do que de animais adultos (REVEL et al., 1995; RIZOS et al., 2005). Os dados com efeito principal de taxa de blastocisto estão apresentados no gráfico 16. Os

resultados de PIVE estão sumarizados na Tabela 6. Não foi verificada correlação entre IGF1 e taxa de blastocisto ($P=0,218$; $r=-0,13581$), entretanto, houve tendência de correlação negativa entre glicose e taxa de blastocisto ($P=0,0702$; $r=-0,19147$). Entretanto, o baixo valor de “r” é indicativo de que esta correlação é fraca e pouco significativa. Os gráficos de correlação entre IGF1 e os parâmetros de PIVE estão apresentados nas figuras de número 6 a 10.

Gráfico 16. Taxa de blastocisto (número de blastocistos/número de oócitos totais) para bezerras ($n=30$), novilhas ($n=30$) e vacas ($n=30$). Dados apresentados em porcentagem.

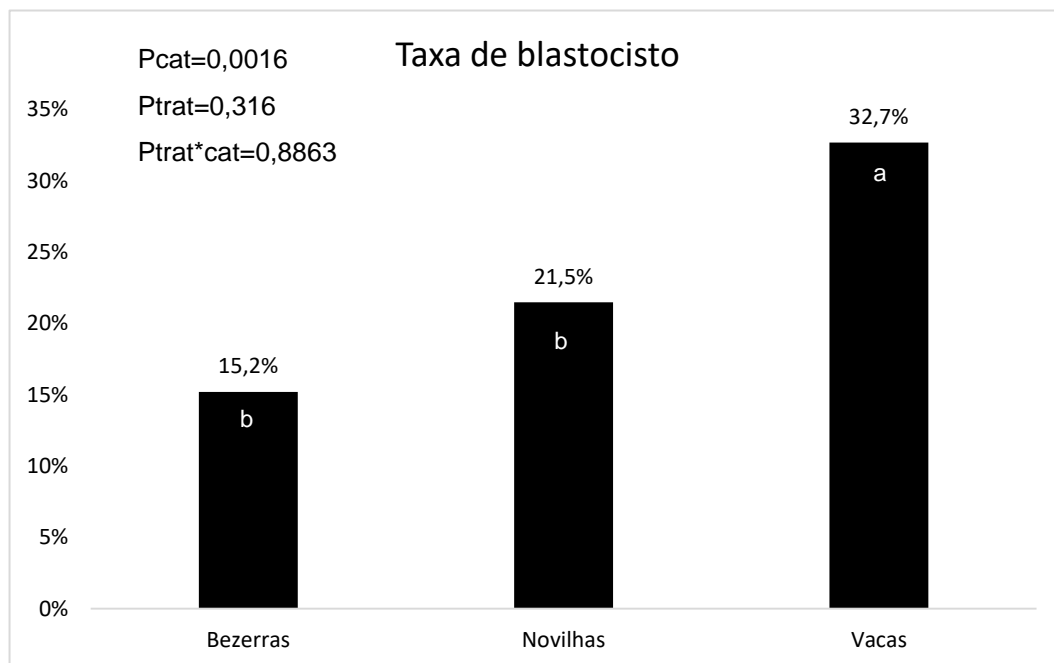


Tabela 6. Produção *in vitro* de embriões de bezerras (controle, n=xx e FSH, n=xx), novilhas púberes (controle, n=xx e FSH, n=xx) e vacas (controle, n=xx e FSH, n=xx) tratadas ou não com FSH antes da OPU. Dados apresentados em porcentagem, média e \pm erro padrão da média.

	Bezerras		Novilhas		Vacas		Valor de P		
	Controle	FSH	Controle	FSH	Controle	FSH	Tratamento	Categoria	Trat*Cat
Oócitos totais, n	13,0 \pm 2,2	11,7 \pm 1,8	22,1 \pm 2,9	18,0 \pm 2,4	10,3 \pm 1,1	12,3 \pm 1,9	0,685	0,0002	0,8245
Oócitos viáveis, n	8,1 \pm 1,8	8,7 \pm 1,8	15,2 \pm 2,6	12,9 \pm 2,7	6,5 \pm 1,1	9,7 \pm 2,0	0,7613	0,0066	0,3986
Taxa de oócitos viáveis, %	62,3%	74,3%	68,8%	71,6%	63,1%	78,8%	0,1133	0,6987	0,5747
Taxa de recuperação, %	67,5%	52,2%	69,2%	51,8%	59,0%	51,7%	0,0136	0,7257	0,7732
Oócitos clivados, n	5,7 \pm 1,1	5,9 \pm 0,9	11,7 \pm 2,0	11,1 \pm 1,8	6,1 \pm 0,8	8,4 \pm 1,4	0,5715	0,0004	0,5536
Blastocistos, n	1,1 \pm 0,3	2,0 \pm 0,4	4,7 \pm 1,0	4,3 \pm 1,1	3,1 \pm 0,6	4,9 \pm 1,2	0,2726	0,0016	0,4234
Taxa de clivagem, %	43,8%	50,4%	52,9%	61,6%	59,2%	68,3%	0,0163	0,0006	0,8648
Taxa de blastocisto, %	8,5%	17,1%	21,3%	23,8%	30,1%	39,8%	0,316	0,0016	0,8663

Figura 6. A. Gráfico de correlação linear entre a concentração plasmática de IGF1 e população folicular para as três categorias de doadoras da raça Gir ($P=0,9693$; $r=0,00427$). B. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e população folicular de bezerras ($P=0,2427$; $r=0,0484$). C. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e população folicular de novilhas púberes ($P=0,0974$; $r=-0,3523$). D. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e população folicular de vacas ($P=0,1139$; $r=0,1008$).

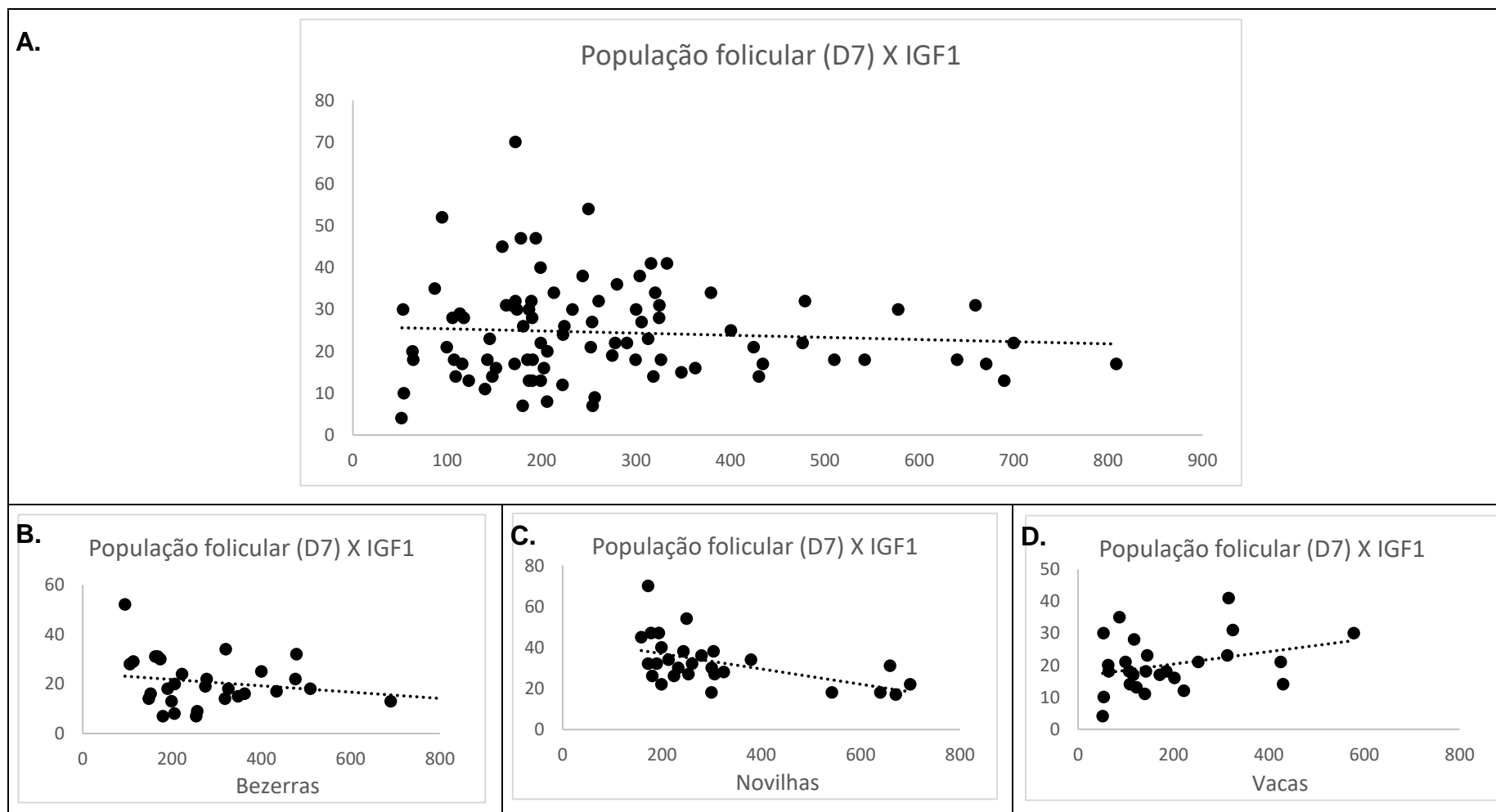


Figura 7. A. Gráfico de correlação linear entre a concentração plasmática de IGF1 e número de oócitos viáveis para as três categorias de doadoras da raça Gir (P= 0,7727; r= 0,03199). B. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e número de oócitos viáveis de bezerras (P=0,9428; r=0,0027). C. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e número de oócitos viáveis de novilhas (P=0,3837; r=0,0293). D. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e número de oócitos viáveis de vacas (P=0,1561; r=0,0820).

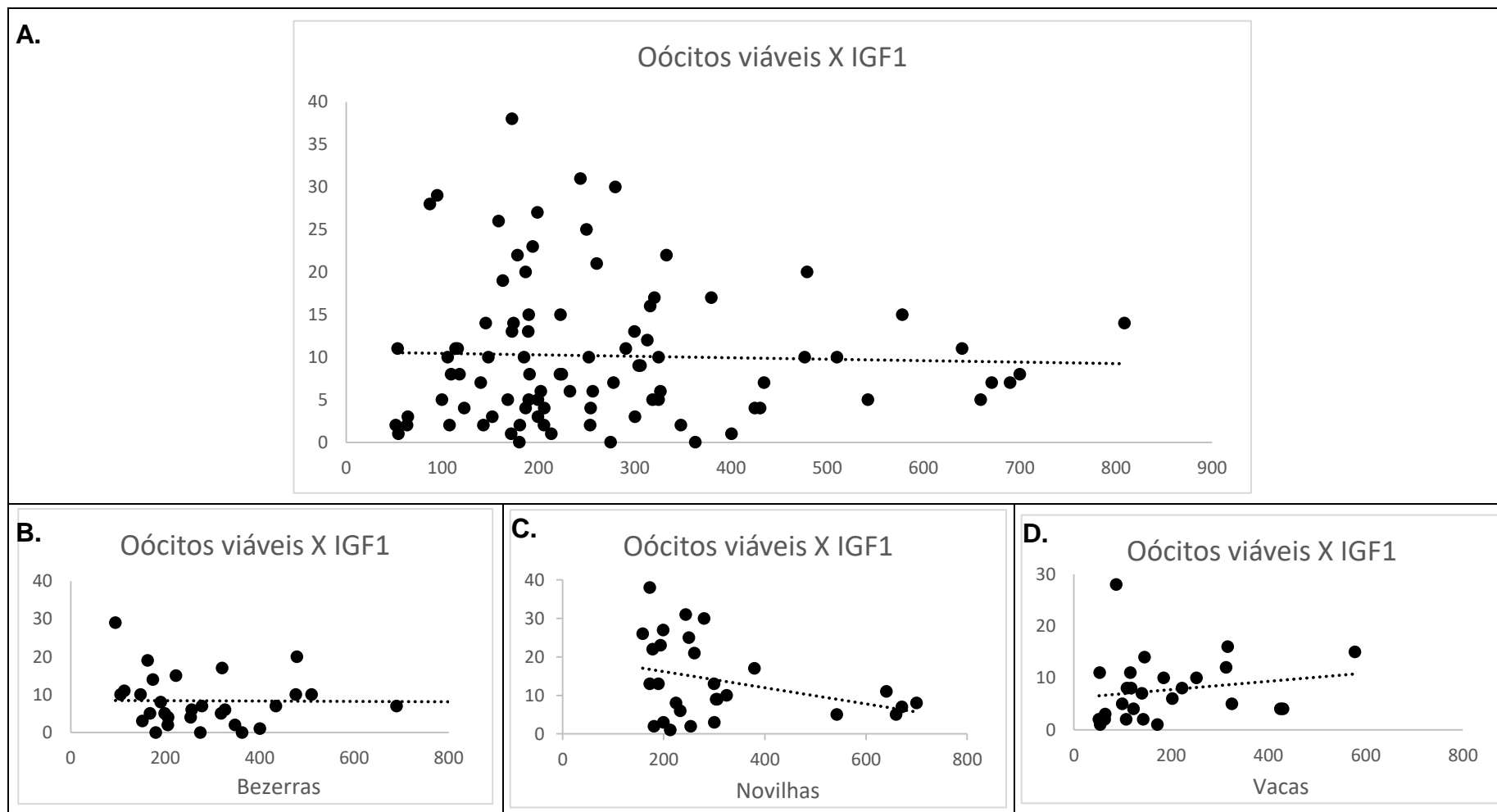


Figura 8. A. Gráfico de correlação linear entre a concentração plasmática de IGF1 e a taxa de oócitos viáveis para as três categorias de doadoras da raça Gir ($P=0,075$; $r=-0,19533$). B. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e a taxa de oócitos viáveis de bezerras ($P=0,1597$; $r=0,2649$). C. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e a taxa de oócitos viáveis de novilhas ($P=0,5062$; $r=0,0172$). D. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e a taxa de oócitos viáveis de vacas ($P=0,6015$; $r=0,0115$).

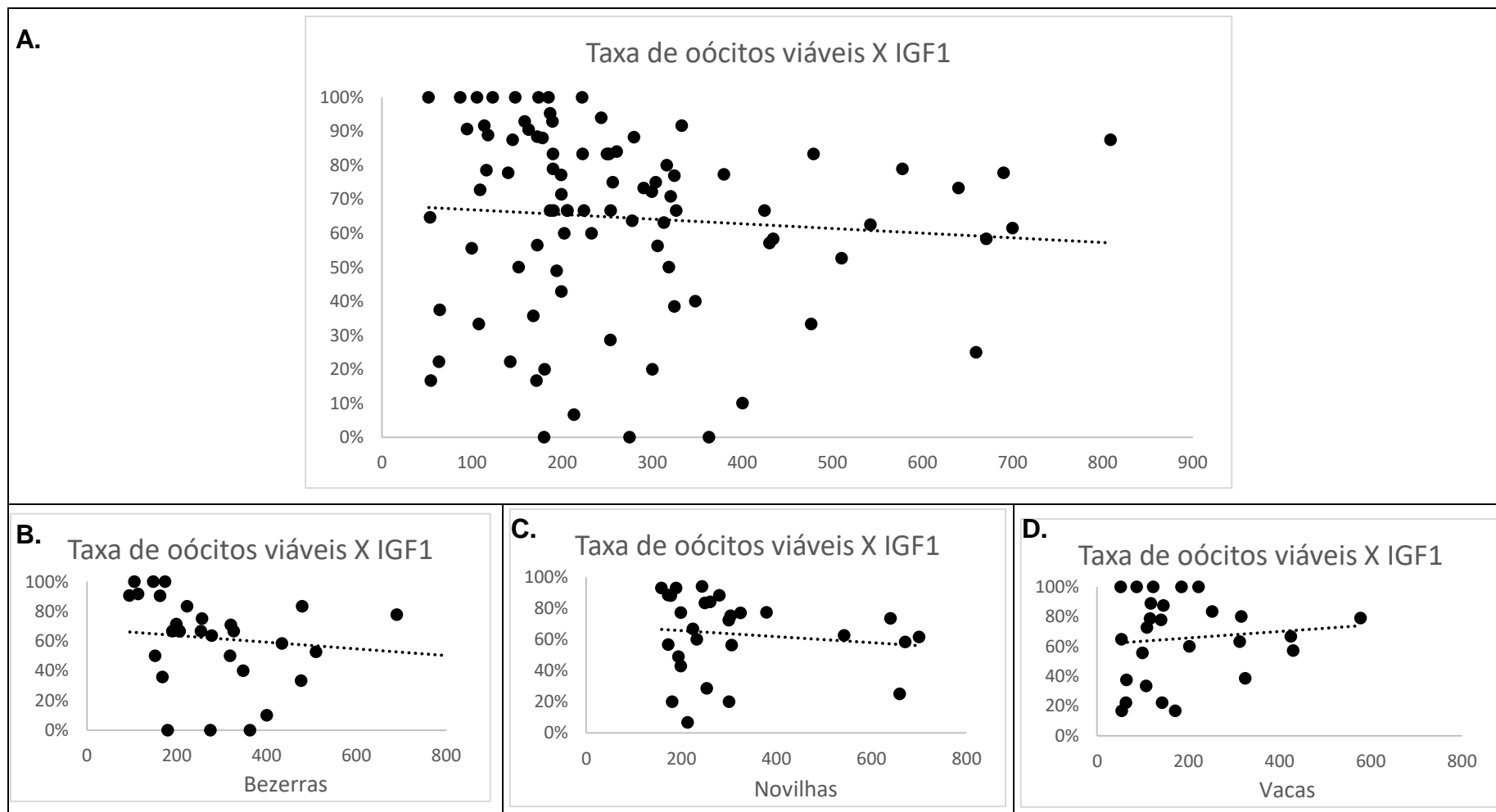


Figura 9. A. Gráfico de correlação linear entre a concentração plasmática de IGF1 e o número de blastocistos para as três categorias de doadoras da raça Gir ($P=0,2894$; $r=-0,11696$). B. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e o número de blastocistos de bezerras ($P=0,1160$; $r=0,0859$). C. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e o número de blastocistos de novilhas ($P=0,0868$; $r=-0,1086$). D. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e o número de blastocistos de vacas ($P=0,1111$; $r=0,0538$).

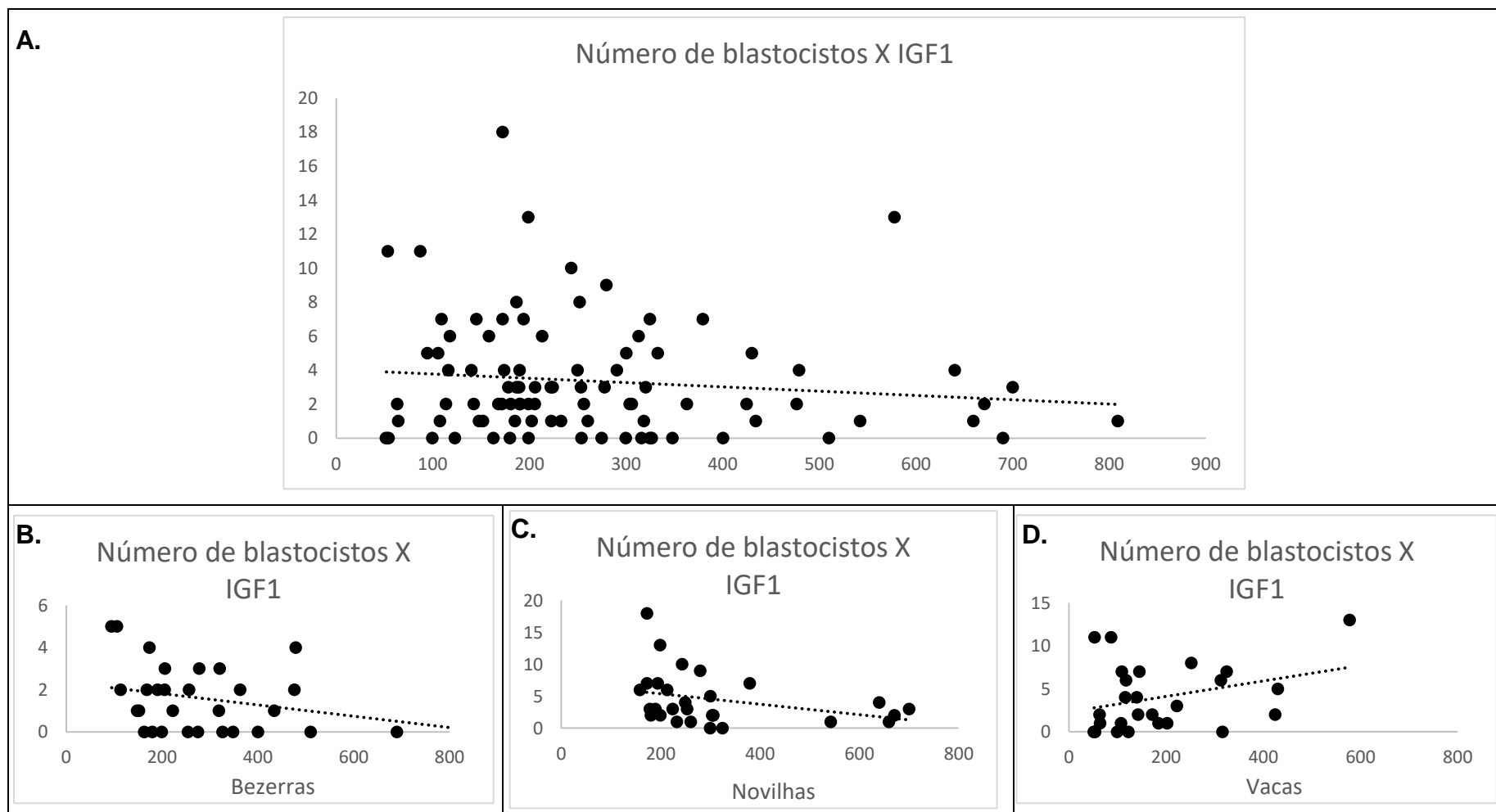
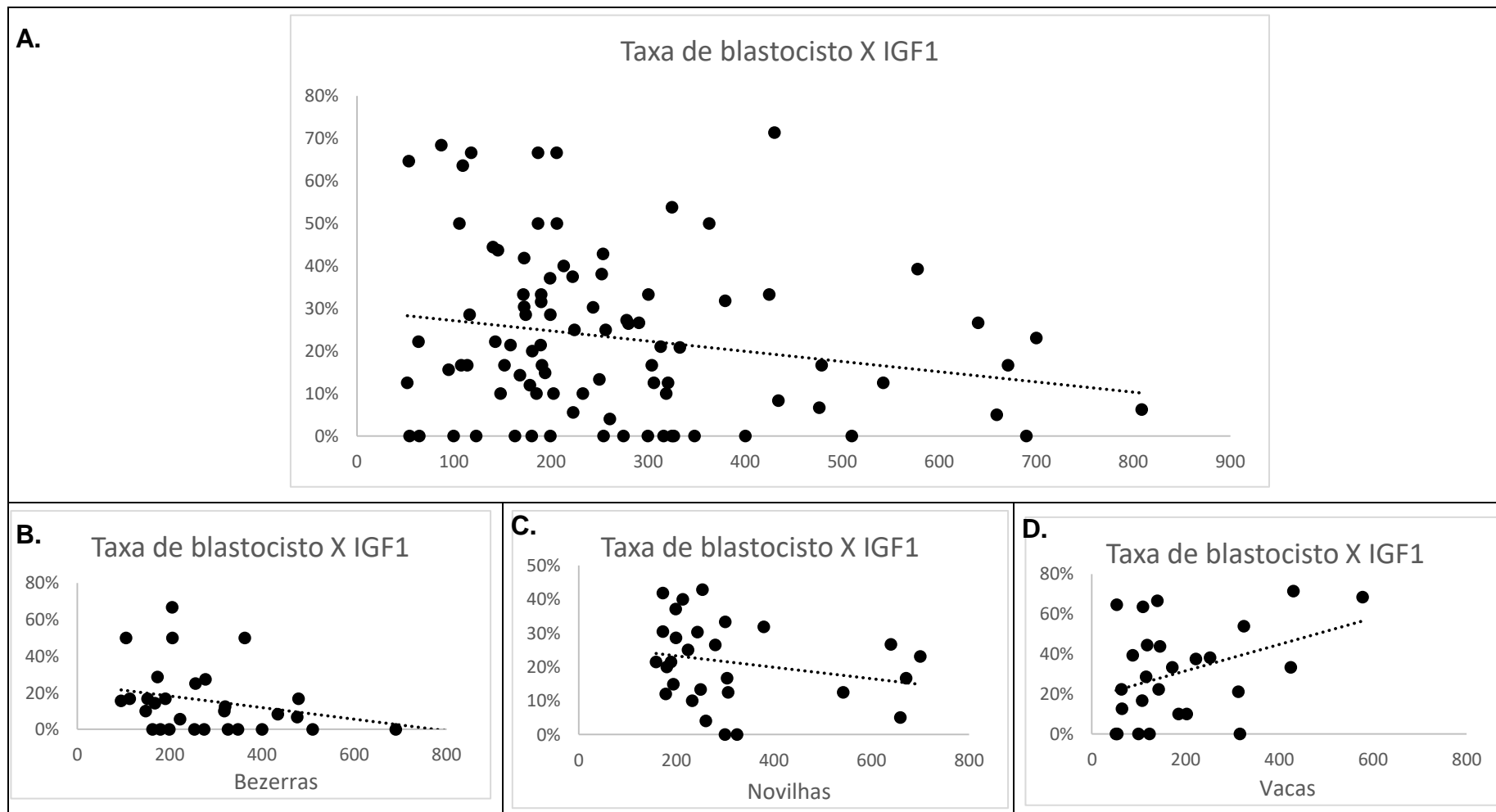
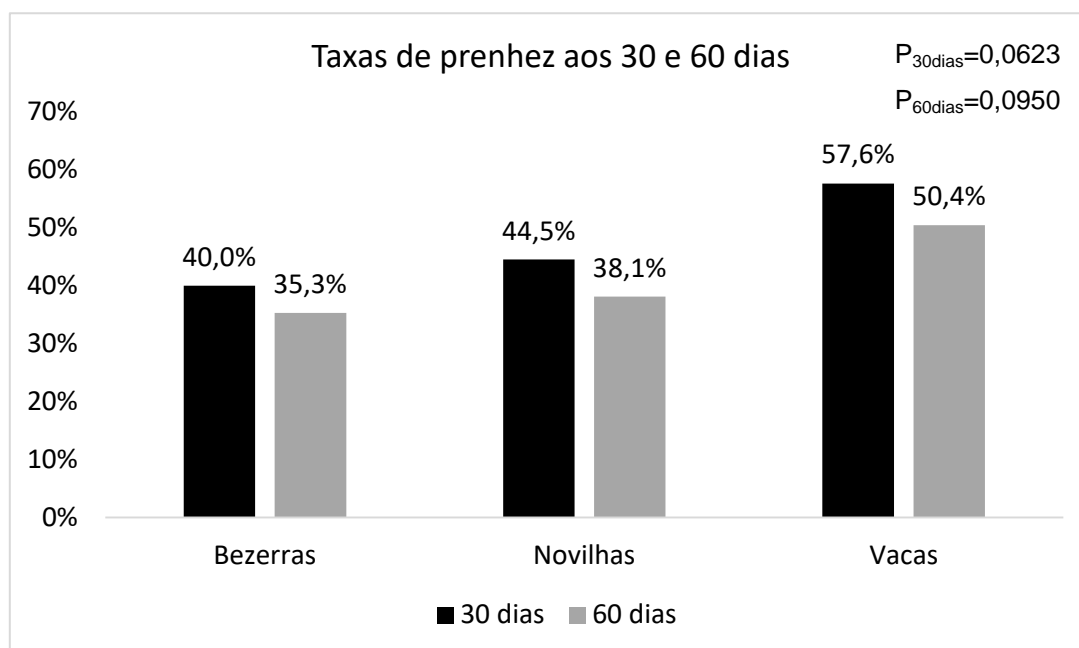


Figura 10. A. Gráfico de correlação linear entre a concentração plasmática de IGF1 e taxa de blastocisto para as três categorias de doadoras da raça Gir ($P=0,218$; $r=-0,13581$). B. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e taxa de blastocisto de bezerras ($P=0,1059$; $r=0,0907$). C. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e taxa de blastocisto de novilhas ($P=0,2348$; $r=0,0538$). D. Gráfico de correlação linear entre IGF1 e taxa de blastocisto de vacas ($P=0,0455$; $r=0,1565$).



Os embriões produzidos foram transferidos em receptoras cruzadas (*Bos indicus* x *Bos taurus*), totalizando 280 embriões transferidos, sendo 43 embriões de doadoras bezerras (Com FSH: 26 embriões; Sem FSH: 17 embriões), 128 embriões de doadoras novilhas (Com FSH: 58 embriões; Sem FSH: 65 embriões) e 114 embriões de doadoras adultas (Com FSH: 69 embriões; Sem FSH: 45 embriões). Não foi observada interação tratamento*categoria ($P=0,38$) ou efeito de tratamento ($P=0,3853$) para a P/TE aos 30 dias. Entretanto, foi verificada tendência ($P=0,0623$) para que embriões provenientes de vacas produzam taxa de P/TE maior do que embriões obtidos das demais (Bezerras: 40,0%^b; Novilhas: 44,5%^b; Vacas: 57,6%^a). A taxa de P/TE aos 60 dias se comportou de forma semelhante, sendo que não foi verificada interação tratamento*categoria ($P=0,88$) ou efeito de tratamento ($P=0,5003$), porém, foi verificada tendência para a categoria da doadora (Bezerras: 35,3%^b; Novilhas: 38,1%^b; Vacas: 50,4%^a; $P=0,0950$). O efeito principal das taxas de prenhez aos 30 e 60 dias estão representadas no gráfico 17. Ainda, não houve interação tratamento*categoria ($P=0,69$), efeito de tratamento ($P=0,8554$) ou de categoria ($P=0,9319$) sobre a taxa de perda gestacional (BC: 22,2%; BF: 0,0%; NC: 16,1%; NF: 12,5%; VC: 8,0%; VF: 10,0%). Estes resultados indicam que o tratamento com FSH não influenciou a taxa de P/TE dos embriões produzidos de doadoras jovens. Embriões produzidos de doadoras bezerras produzem taxas de prenhez mais baixas e maiores perdas gestacionais (REVEL et al., 1995; PRESCICCE et al., 1997; LEVESQUE AND SIRARD, 1994; GUERREIRO, 2015). Os resultados do presente estudo corroboram com estes achados referentes à taxa de P/TE, entretanto, as perdas gestacionais foram semelhantes entre os grupos.

Gráfico 17. P/TE aos 30 e 60 dias de embriões provenientes de bezerras (n=43), novilhas (n=128) e vacas (n=114). Dados apresentados em porcentagem.



5 CONCLUSÕES

A hipótese do Experimento 1 foi parcialmente confirmada. Não foi observado aumento na eficiência da PIVE com a associação de FSH e rBST. Entretanto, as bezerras tratadas com rBST apresentaram maior produção de embriões por OPU. Além disso, a hipótese de que o tratamento com rBST elevaria as concentrações circulantes de IGF1 foi confirmada. No entanto, foi rejeitada a hipótese de que o tratamento com rBST elevaria as concentrações circulantes de glicose.

A hipótese do experimento 2 foi parcialmente confirmada. Não foi observado efeito do tratamento com FSH no número de embriões por OPU e na P/TE dos embriões produzidos. Entretanto, animais tratados com FSH apresentaram maior taxa de clivagem. Ainda, o tratamento superestimulatório foi eficiente em elevar a população folicular e o diâmetro dos folículos. Entretanto, não foi observada interação Trat*Cat, rejeitando a hipótese de que bezerras apresentariam maior resposta ao tratamento. A hipótese de que o tratamento com FSH não influenciaria as concentrações plasmáticas de IGF1 e glicose foi confirmada.

Foi rejeitada a hipótese de que bezerras apresentariam maior população folicular. Entretanto, as bezerras apresentaram menores taxa de clivagem, taxa de blastocisto e número de blastocistos, conformando a hipótese inicial. Verificou-se que os embriões produzidos de bezerras apresentaram menor P/TE quando comparados com embriões de vacas, confirmando a hipótese do Experimento 2. Ainda, foi rejeitada a hipótese de que as concentrações circulantes de IGF1 seriam mais baixas nas bezerras e as concentrações séricas de glicose constantes entre as categorias.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS E IMPLICAÇÕES PRÁTICAS

A maximização da produtividade da pecuária tem se tornado uma necessidade eminente, no entanto, a pecuária leiteira do Brasil ainda tem baixa eficiência. A eficiência produtiva dos rebanhos está diretamente relacionada ao manejo e a eficiência reprodutiva (BARUSELLI et al. 2019). Com isso, o desenvolvimento e aprimoramento das biotecnologias da reprodução tornam-se importantes ferramentas para aumentar a produtividade do setor. Além disso, a utilização de fêmeas cada vez mais jovens colabora para a diminuição do intervalo de gerações e, conseqüentemente, acelerar o ganho genético (LOHUIS, 1995; DOORMAAL, 2012).

Diversos estudos apontam que fêmeas jovens possuem baixa eficiência na PIVE, relacionada à baixa qualidade oocitária encontrada nesta categoria animal (PRESCICCE et al., 1997, LEVESQUE & SIRARD, 1994, WARZYCH et al., 2017). O uso de protocolos prévios à OPU podem influenciar positivamente a competência do oócitos pela manipulação do ambiente folicular no qual este irá se desenvolver. O presente estudo demonstrou que o uso de rBST em doadoras jovens da raça Holandês melhorou a eficiência destes animais na PIVE, potencialmente associado ao aumento nas concentrações plasmáticas de IGF1. No experimento 1 do presente estudo foi verificada correlação positiva as concentrações plasmáticas de IGF1 com número de oócitos viáveis, número de oócitos clivados, taxa de clivagem, número de blastocistos e taxa de blastocisto. Esses achados suportam a adoção de tecnologias com objetivo de aumentar as concentrações de IGF1 para melhorar a eficiência da PIVE em bezerras holandesas doadoras de oócitos.

Entretanto, animais *Bos indicus* possuem níveis de IGF1 mais elevados que animais *Bos taurus* (SARTORI et al., 2016), portanto, o tratamento com rBST pode não ter influência positiva para doadoras da raça Gir (Martins et al., 2012). No entanto, o presente estudo foi indicativo de que o tratamento com FSH melhorou a eficiência da PIVE de doadoras jovens da raça Gir. O tratamento com FSH aumentou o diâmetro dos folículos aspirados no momento da OPU, potencialmente associado à melhora da competência oocitária. Estes

tratamentos podem ser utilizados como ferramentas para otimizar e viabilizar a PIVE em doadoras jovens, contribuindo para o aumento do ganho genético dos rebanhos e, conseqüentemente, aumentando sua produtividade e rentabilidade.

Outros fatores podem também influenciar a eficiência de oócitos oriundos de doadoras jovens. Estudos comprovam que os elementos dos meios de maturação e cultivo dos oócitos têm grande importância na PIVE (BAVISTER et al., 1992, DUBY et al., 1996, VAN LANGENDONCKT et al., 1997, LONERGAN et al., 2003). Desta forma, o tratamento prévio a OPU de doadoras jovens deve estar associado ao desenvolvimento de meios de cultivo adequados às categorias de doadoras jovens.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. P.; RHIND, S. M.; WRIGHT, I. MCMILLEN, S. R.; GODDARD, P. J.; BRAMLEY, T. A. Effects of bovine somatotropin (bST) on ovarian function in postpartum beef cows. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 8, n. 6, p.951-960, 1996.

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, abr 1996.

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

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

ARMSTRONG, D. T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1303–1322, abr 2001.

BALDRIGHI, J. M.; SIQUEIRA, A. F.; ASSIS, P. M.; Sá Filho, M. F.; Visintin, J. A.; NOGUEIRA, G. P.; BARUSELLI, P. S.; Assumpção, M. E. O. A. Hormonal evaluation during the ovulatory cycle of Holstein, gíg and Buffalo heifers at the same environment and nutritional management. XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 2013, Praia do Forte. Proceedings of the 27th Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE), 2013. v. 10, p. 415.

BARUSELLI, P. S., MARQUES, M. O., REIS, E. L., NASSER, L. F. T., SILVA, R. C. P., MENEGATTI, J. A., SANTOS, I. C. C. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Sci Vet.**, v. 31, p. 244-245. 2003.

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. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 47, suppl. 4, p. 134–141, ago 2012.

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

BARUSELLI, P. S., CATUSSI, B. L. C., DE ABREU, L. Â., ELLIFF, F. M., DA SILVA, L. G., BATISTA, E. S., CREPALDI, G. A. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 43, n.2, p. 308-314. 2019.

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

BAUMAN, D. E. Bovine somatotropin and lactation from basic science to commercial application. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 17, n. 2-3, p. 101-106, out 1999.

BAVISTER, B. D.; ROSE-HELLEKANT, T. A.; PINYOPUMMINTR, T. Development of in vitro matured/in vitro fertilized bovine embryos into morulae and blastocysts in defined culture media. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 127-146, jan 1992.

BERNAL, S. M. ; GONELLA, A. M. ; VALBUENA, D. ; MENDOZA, R. ; MOLINA, J. J. ; CHACON, L. . Effect of age and coasting period on oocytes quality and their in vitro development from prepubertal cattle. **MVZ Cordoba**, v. 16, n. 2, p. 2499-2506, mai-ago 2011.

BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B.; XU, K. P.; KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v. 38, p. 87–98, 1989.

BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; VAN DEN HURK, R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p.13-22, jan 1997.

BLEY, M.A.; SARAGUETA, P.E.; BARANAO, J.L. Concerted stimulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis by sex steroids and follicle-stimulating hormone. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, v.62, n. 1, p.11-19, mai 1997.

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

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

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

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

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

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

BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; LEIN, A.; CORYN, M.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocysts yield in an OPU-IVP program. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p.983-995, abr 1998.

BREESE, C. R.; INGRAM, R. L.; SONNTAG, W. E. Influence of age and long-term dietary restriction on plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-1 gene expression, and IGF-1 binding proteins. **J. Gerontol.**, v. 46, n. 5, p. B180-B187, set 1991.

BURATINI JR, J.; PRICE, C.A.; BÓ, G.A.; VISINTIN, J.A. Os efeitos do bst e da ablação do folículo dominante sobre o desenvolvimento folicular. **Arq. Fac. Vet. UFRGS.**, v.27, n.1, p.147-162, 1999.

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

CAIXETA, E. S.; RIPAMONTE, P.; FRANCO, M. M.; JUNIOR, J. B.; DODE, M. A. N. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Rep. Fertil. Dev.**, v. 21, n. 5, p. 655-664, 2009.

CARVALHO, N. A.; BARUSELLI, P. S.; ZICARELLI, L.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A.; D'OCCHIO, M. J. Control 446 of ovulation with a GnRH agonist after superstimulation of follicular growth in buffalo: fertilization and embryo recovery. **Theriogenology**, v. 58, n. 9, p. 1641-1650, dez 2002.

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of 538 early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* × *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 167-175, jan 2008.

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

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

CURRIN, L.; MICHALOVIC, L.; BELLEFLEUR, A.; GUTIERREZ, K.; GLANZNER, W.; SCHUERMANN, Y.; BOHRER, R.C.; DICKS, N.; DA ROSA,

P.; DE CESARO, M.P.; LOPEZ, R.; GRAND, F.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; GOURDON, J.; BALDASSARRE, H.; BORDIGNON, V. The effect of age and length of gonadotropin stimulation on the in vitro embryo development of Holstein calf oocytes. **Theriogenology**, v.104, p. 87–93, dez 2017.

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. **J. Anim. Sci.**, v. 78, n. 6, p. 1564–1567, jun 2000.

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. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 45, n. , p. 521–534, dez 1996.

DE LA SOTA, R. L.; LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effect of recombinant bovine somatotropin (sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating cows. **J. Dairy Sci.**, v.76, n. 4, p.1002-1013, abr 1993.

DE LOOS, F. A. M.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J., KRUIP, T. A. Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. **Theriogenology**, v. 35, n. 3, p. 537-546, mar 1991.

DE PAZ, P.; SANCHEZ, A. J.; DE LA FUENTE, J.; CHAMORRO, C. A.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; ANEL, L. Ultrastructural and cytochemical comparison between calf and cow oocytes. **Theriogenology**, v. 1, n. 1, p. 1107–1116, mar 2001.

DÍAZ-CUETO, L.; GERTON, G. L. The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos. **Arch. Med. Res.**, v. 32, n. 6, p. 619-626, nov-dez 2001.

DIELEMAN, S. J.; BEVERS, M. M. Folliculogenesis and oocyte maturation in superovulated cattle. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 36, n. 2, p. 271-273, out 1993.

DISKIN, M. G.; MACKEY, D. R.; ROCHE, J. F.; SREENAN, J. M. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 78, n. 3-4, p. 345-370, out 2003.

DOORMAAL BV. Increased Rates of Genetic Gain with Genomics. **Canadian Dairy Network**. 2012

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. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 24, n. 2, p. 370-381, 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, 1995.

EBNER, T.; MOSER, M.; SOMMERGRUBER, M.; TEWS, G. Selection based on morphological assessment of oocytes and embryos at different stages of preimplantation development: a review. **Hum. Reprod. Update**, v. 9, n. 3, p. 251-262, mai-jun 2003.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **J. Anim. Sci.**, v. 25, n. 3, p. 800-805, ago 1966.

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

FENG, W. G.; SUI, H. S.; HAN, Z. B.; CHANG, Z. L.; ZHOU, P.; LIU, D. J.; BAO, S.; TAN, J. H. Effects of follicular atresia and size on the developmental competence of bovine oocytes: a study using the well-in-drop culture system. *Theriogenology*, v. 67, n. 8, p. 1339-1350, mai 2007.

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. *J. Dairy Sci.*, v. 94, n. 5, p. 2383-2392, mai 2011.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in 531 Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v. 47, n.8, p. 1489-1505, jun 1997.

Food and Agriculture Organization (FAO). 2017. Cenário da demanda por alimentos no Brasil. Rome: FAO, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/901168/>.

GIMENES, L. U.; SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; TORRES-JÚNIOR J. R. S.; SOUZA, A. H.; MADUREIRA, E. H.; TRINCA, L. A.; SARTORELLI, E. S.; BARROS, C. M.; CARVALHO, J. B.; MAPLETOFT, R. J.; BARUSELLI, P. S. Follicle deviation and ovulatory capacity in *Bos indicus* heifers. *Theriogenology*, v. 69, n. 7, p. 852-858, abr 2008.

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

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

GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. **Biol. Reprod.**, v. 45, n. 6, p.941-949, dez 1991.

GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; WILMUT, I.; WEBB, R. Effect of recombinant bovine somatotropin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. **Biol. Reprod.**, v. 48, n. 5, p.1141-1149, mai 1993.

GONG, J. G.; WILMUT, I.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to the fsh in heifers. **Theriogenology**, v.45, n. 3, p.611-622, fev 1996.

GONG, J. G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. **J. Reprod. Fertil.**, v. 110, n. 1, p. 91–97, mai 1997.

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

GOVONI, K. E., HOAGLAND, T. A., ZINN, S. A. The ontogeny of the somatotrophic axis in male and female Hereford calves from birth to one year of age. **Journal of animal science**, v.81, n.11, p. 2811-2817. 2003.

GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P.; HØIER, R.; ASSEY, R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 41-50, jan 1995.

GUERREIRO, B. M.; BATISTA, E. O. S.; VIEIRA, L. M.; FILHO, M.F.S., 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, out 2014.

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

HASLER, J. F.; BILBY, C. R.; COLLIER, R. J.; DENHAM, S. C.; LUCY, M. C. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy rates in a commercial embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 59, n. 9, p. 1919-1928, maio 2003.

HAZELEGER, N. L.; HILL, D. J.; STUBBING, R. B.; WALTON, J. S. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 43, n. 2, p. 509-522, jan 1995.

HERRLER, A.; EINSPANNER, R.; SCHAMS, D.; NIEMANN, H. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular IGF-1 contents and the ovarian response following superovulation treatment in dairy cows. **Theriogenology**, v. 41, n. 3, p. 601-611, fev 1994.

HOLZER, Z., AHARONI, Y., BROSH, A., ORLOV, A., BUONOMO, F. The influence of recombinant bovine somatotropin on dietary energy level-related growth of Holstein-Friesian bull calves. **Journal of animal science**, v. 78, n.3, p. 621-628. 2000.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2017. Sistema de

Recuperação Automática (SIDRA). Efetivo do rebanho brasileiro. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/pesquisa/ppm/quadros/brasil/2017>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2018. Sistema de Recuperação Automática (SIDRA). Efetivo do rebanho brasileiro. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>.

International Embryo Technology Society (IETS). 2018. Embryo Technology Newsletter, 36(4):46p. Disponível em: https://www.iets.org/pdf/Newsletter/Dec18_IETS_Newsletter.pdf.

IZADYAR, F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. In vitro maturation of bovine oocytes in the presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 45, n. 3, p. 372–377, nov 1996.

JEWGENOW, K.; HEERDEGEN, B.; MÜLLER, K. In vitro development of individually matured bovine oocytes in relation to follicular wall atresia. **Theriogenology**, v. 51, n. 4, p. 745-756, mar 1999.

KAUFFOLD, J.; AMER, A. H.; BERGFELD, U.; WEBER, W.; SOBIRAJ, A. The in vitro developmental competence of oocytes from juvenile calves is related to follicular diameter. **J. Reprod. Dev.**, v. 51, n. 3, 325-332, jun 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. **J. Reprod. Dev.**, v. 58, n. 1, p. 10-16, 2012.

KENNEDY, W. L.; ANDERSON, A. K.; BECHDEL, S. I.; SHIGLEY, J. F. (1939). Studies on the composition of bovine blood as influenced by gestation, lactation, and age. **J. Dairy Sci.**, v. 22, n. 4, p. 251-260, abr 1939.

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. **J Reprod. Fertil.**, vol. 111, n. 2, p. 267–275, nov 1997.

KIRBY, C. J.; SMITH, M. F.; KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. **J Dairy Sci.**, v. 80, n. 2, p.273-285, fev 1997.

KUEHNER, L. F., RIEGER, D., WALTON, J. S., ZHAO, X., JOHNSON, W. H. The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v.40, n.5, p. 1003-1013. 1993

KUZMINA, T. I.; ALM, H.; DENISENKO, V.; TUCHSCHERER, A.; KANITZ, W.; TORNER, H. Effect of recombinant bovine somatotropin (rbST) on cytoplasmic maturation of bovine oocytes and their developmental competence in vitro. **J. Reprod. Dev.**, v. 53, n. 2, p. 309–316, abr 2007.

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

LARON, Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. **Mol. Pathol.**, v. 54, n. 5, p. 311, out 2001.

LEROY, J.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; GOOVAERTS, I. G. F.; BOLS, P. E. J. Reduced fertility in high-yielding dairy cows: are the oocyte and embryo in danger? **Reprod. Domest. Anim.**, v. 43, n. 5, p. 612-622, out 2008.

LÉVESQUE, J. T.; SIRARD, M. A. Proteins in oocytes from calves and adult cows before maturation: relationship with their development capacity. **Reprod Nutr Dev.**, v. 34, n. 2, p. 133-139, 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. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 37, n. 1, p. 48-53, jan 1994.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reprod. Dom. Anim.**, v. 38, n. 4, p. 259-267, ago 2003.

LUCY, M. C.; CURRAN, T. L.; COLLIER, R. J.; COLE, W. J. Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. *Theriogenology*, v. 41, n. 2, p. 561-572, fev 1993.

LUCY, M. C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 83, n. 7, p. 1635-1647, jul 2000.

LUCY, M. C. Growth hormone regulation of follicular growth. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 24, n. 1, p. 19-28, 2011.

LUSSIER, J. G; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. *J. Reprod. Fertil.*, v. 81, n. 2, p. 301-307, nov 1987.

MAILLO, V.; RIZOS, D.; BESENFELDER, U.; HAVLICEK, V.; KELLY, A. K.; GARRET, M.; LONERGAN, P. Influence of lactation on metabolic characteristics and embryo development in postpartum Holstein dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 95, n. 7, p. 3865–3876, 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. 1169-1179, nov 1999.

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. 1523-1532, mar 2002.

MARKKULA, M.; MAKAREVICH, A. Insulin-like growth factor I increases the ratio of proliferating cell nuclear antigen positive cells of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, p.432, 2001.

MARTINS, CM, REIS, PO, SALES, JNS, SALA, RV, VIEIRA, LM, BARUSELLI, PS. Efeito da sincronização da onda de crescimento folicular e do tratamento com bST ou eCG na OPU-PIV de doadoras Nelore, Brangus e Holandesas. Resumos, p.403. XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu, 2012

MONGET,P.; MONNIAUX, D. Growth factors and the control of folliculogenesis. **J. Reprod Fertil. Suppl.**, v. 49, p. 321-333, 1995.

MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C. A.; MATTOS, R.; LOPES, F.; THATCHER, W. W. Effects of presynchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a timed artificial insemination protocol in lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.**, v. 84, n. 7, p. 1646–1659, jul 2001.

MOREIRA, F., BADINGA, L., BURNLEY, C., & THATCHER, W. W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v. 57, n.4, p. 1371-1387. 2010.

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

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; CARACCILO DI BRIENZA, V.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; ANTONIO PRESICCE, G.; ZICARELLI, L. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived 441 from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v. 59, n. 5-6, p. 1123-1130, mar 2003.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; VECCHIO, D.; BOCCIA, L.; VARRICCHIO, E.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G. Long term effect of ovum pick-up in buffalo species. **Anim Reprod Sci.**, v. 123, n. 3-4, p. 180-186, fev 2011.

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

NIVET, A. L.; VIGNEAULT, C.; BLONDIN, P.; SIRARD, M.A. Changes in granulosa cells' gene expression associated with increased oocyte competence in bovine. **Reproduction**, v. 145, n. 6, p. 555–565, mai 2013.

NUTTINCK, F.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P.; LOOSFELT, H.; MEDURI, G.; FRERET, S.; GRIMARD, B.; HEYMAN, Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine cumulus–oocyte complexes during oocyte maturation. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 27, n. 2, p. 179-195, ago 2004.

O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; SPICER, L. J.; BOLAND, M. P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid

composition and systemic hormone concentrations in ewes. **J. Reprod. Fertil.**, v. 118, n. 2, p. 303-314, mar 2000.

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

PALERMO, R. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis. **Reprod Biomed Online**, v. 15, n. 3, p. 326-337, set 2007.

PAVLOK, A.; KOUTECKÁ, L.; KREJCI, P.; SLAVIK, T.; CERMAN, J.; SLABA, J.; DORN, D. . Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes n cattle. **Anim. Reprod. Sci.** v. 41, n. 3-4, p. 183-192, mar 1996.

PÉREZ O'BRIEN, A. M.; MÉSZÁROS, G.; UTSUNOMIYA, Y. T.; SONSTEGARD, T. S.; GARCIA, J. F.; VAN TASSELL, C. P.; CARVALHEIRO, R.; MARCOS, V. B.; SO, J. 2014. Linkage disequilibrium levels in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle using medium and high density SNP chip data and different minor allele frequency distributions. **Livest. Sci.**, v. 166, p. 121–132, ago 2014..

PIVATO, I.; PEREIRA, D. C.; PEIXER, M. A. S.; LUCIA JR, T.; DESCHAMPS, J. C.; RUMPF, R. O efeito do BST sobre a taxa de recuperação e qualidade dos ovócitos em bovinos. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 27, n. 1, p.171-186, 1999.

PONSART, C. A. H. D.; LE BOURHIS, D.; KNIJN, H.; FRITZ, S.; GUYADER-JOLY, C.; OTTER, T.; LACAZE, S.; CHARREAUX, F.; SCHIBLER, L.; DUPASSIEUX, D.; MULLAART, E. Reproductive technologies and genomic selection in dairy cattle. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 26, n. 1, p. 12-21, 2014.

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

PUSHPAKUMARA, P. G. A.; ROBINSON, R. S.; DEMMERS, K. J.; MANN, G. E.; SINCLAIR, K. D.; WEBB, R.; WATHES, D. C. Expression of the insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine oviduct at oestrus and during early pregnancy. **Reproduction**, v. 123, n. 6, p. 859-868, jun 2002.

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

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. **J. Reprod. Fertil.**, v. 103, n. 1, p. 115–120, jan 1995.

RIVERA, G. M.; FORTUNE, J. E. Selection of the dominant follicle and insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins: evidence that pregnancy-associated plasma protein A contributes to proteolysis of IGF-binding protein 5 in bovine follicular fluid. **Endocrinology**, v. 144, n. 2, p. 437-446, fev 2003.

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

ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; GADD, T. S.; LAMMING, G. E.; WATHES, D. C. The expression of the IGF system in the bovine uterus throughout the

oestrous cycle and early pregnancy. **J. Endocrinol.**, v. 165, n. 2, p. 231-244, mai 2000.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocyte aspirated in the autumn from previously heat-stressed cows. **J. Dairy Sci.**, v. 85, n. 6, p. 1398-1405, jun 2002.

SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; GIMENES, L. U.; TORRES-JÚNIOR, J. R.; NASSER, L. F. T.; TONHATI, H.; GARCIA, J. M.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI, L.; BARUSELLI, P. S. Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on in vitro 438 buffalo embryo production. **Anim Reprod Sci.**, v. 113, n. 1-4, p. 51-59, jul 2009.

SALES, J. N. D. S.; IGUMA, L. T.; BATISTA, R. I. T. P.; QUINTÃO, C. C. R.; GAMA, M. A. S.; FREITAS, C.; PEREIRA, M. M.; CAMARGO, L. S.; VIANA, J. H.; SOUZA, J. C.; BARUSELLI, P. S. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **J. Dairy Sci.**, v. 98, n. 5, p. 3086-3099, mai 2015.

SANCHEZ, R.; SCHUERMANN, Y.; GAGNON-DUVAL, L.; BALDASSARRE, H.; MURPHY, B. D.; GEVRY, N.; AGELLON, L. B.; BORDIGNON, V.; DUGGAVATHI, R. Differential abundance of IGF1, bile acids, and the genes involved in their signaling in the dominant follicle microenvironment of lactating cows and nulliparous heifers. **Theriogenology**, v. 81, n. 6, p. 771-779, abr 2014.

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, J. A., SANZ, A., TAMANINI, C., CASASÚS, I. Metabolic, endocrine, and reproductive responses of beef heifers submitted to different growth strategies during the lactation and rearing periods. **Journal of Animal Science**, v. 93, n,8, p.3871-3885. 2015

SARTORI R, BASTOS MR, WILTBANK MC. Factors affecting fertilisation and early embryo quality in single- and superovulated dairy cattle. *Reprod Fertil Dev.*, 22, p. 151-158. 2011.

SARTORI, R.; BARROS, C. M. Reproductive cycles in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 124, n. 3-4, p. 244-250, abr 2011.

SARTORI, R.; GIMENES, L. U.; MONTEIRO JR, P. L.; MELO, L. F.; BARUSELLI, P. S.; BASTOS, M. R. Metabolic and endocrine differences between *Bos taurus* and *Bos indicus* females that impact the interaction of nutrition with reproduction. ***Theriogenology***, v. 86, n. 1, p. 32-40, jul 2016.

SCHAMS, D.; BERISHA, B.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W. M. (2002). Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. ***Domest. Anim. Endocrinol.***, v. 22, n. 1, p. 51-72, mar 2002.

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

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

SIRARD, M. A.; PICARD, L.; DERY, M.; COENEN, K.; BLONDIN, P. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the development of cattle oocytes. ***Theriogenology***, v. 51, n. 4, p. 699-708, mar 1999.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. ***Theriogenology***, v. 65, n. 1, p. 126-136, jan 2006.

SIRARD, M. A. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v. 28, n. 6, p. 483–488, 2011.

SJÖGREN, K.; LIU, J. L.; BLAD, K.; SKRTIC, S.; VIDAL, O.; WALLENIUS, V.; LEROITH, D.; TÖRNELL, J.; ISAKSSON, O. G.; JANSSON, J. O.; OHLSSON, C. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, vol 96, n, 12, p. 7088-7092, jun 1999.

SLABA, J.; KREJCI, P.; SKARDA, J.; HUYBRECHTS, L. M.; DECUYPERE, E.; HERRMANN, H. Plasma profiles of somatotropin and IGF-I in dairy cows following application of two preparations of recombinant bovine somatotropin in a sustained release vehicle. **Physiol. Res.**, v. 43, n.1, p. 37-37, 1994.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 12, n. 3, p. 223-245, jul 1995.

SPICER, L. J.; CHAMBERLAIN, C. S.; MACIEL, S. M. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 22, n. 4, p. 237-254, jun 2002.

TANEJA, M.; BOLS, P. E. J.; VAN DE VELDE, A.; JU, J.; SCHREIBER, D.; TRIPP, M. W.; LEVINE, H.; ECHELARD, Y.; RIESEN, J.; YANG, X. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo : influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation 1. **Biol. Reprod.**, v. 62, n. 1, p. 206–213, jan 2000.

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

TRIPP, M. W.; JU. J. C.; HOAGLAND, T. A.; RIESEN, J. W.; YANG, X.; ZINN, S. A. Influence of somatotropin and nutrition on bovine oocyte retrieval and in vitro development. *Theriogenology*, v. 53, n. 8, p. 1581-1590, mai 2000.

TOSTA, R., SALA, R., PEREIRA, D., KENDALL, D., ELLIFF, F.M., ZIEMER, J., ADELSBERGER, E., MORENO, J., CATUSSI, B., BARUSELLI, P. Effect of ruminal infusion with propylene glycol on the in vitro embryo production of Holstein (*Bos taurus*) prepubertal heifers and pregnancy rate of the embryo transfer. **46th Annual Conference of the International Embryo Technology Society**, 20 to 23 January, 2019, New York, NY, 2020 (abstract)

VAN LANGENDONCKT, A.; DONNAY, I.; SCHUURBIERS, N.; AUQUIER, P.; CAROLAN, C.; MASSIP, A.; DESSY, F. Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. **J. Reprod. Fertil.**, v. 109, n. 1, p.87-93, jan 1997.

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

VELAZQUEZ, M. A.; ZARAZA, J.; OROPEZA, A.; WEBB, R.; NIEMANN, H. The role of IGF1 in the in vivo production of bovine embryos from superovulated donors. **Reproduction**, v. 137, n. 2, p. 161-180, fev 2009.

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

VIANA, J. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm

animals: is it a turning point? **Embryo Technology Newsletter**, v. 36, n. 4, p. 8-19, dez 2018.

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

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

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

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

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **J. Anim. Sci.**, v. 85, suppl 13, p. E1-E3, mar 2007.

WEBB, R.; GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. **Theriogenology**, v. 41, n. 1, p.24-30, jan 1994.

WEBB, R.; CAMPBELL, B.; GARVERICK, H.; GONG, J.; GUTIERREZ, C.; ARMSTRONG, D. Molecular mechanisms regulating follicular. **J Reprod Fertil. Suppl.**, v. 54, p. 33-48, 1999.

YOSHIDA, Y.; MIYAMURA, M.; HAMANO, S.; YOSHIDA, M. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during in vitro maturation and after fertilization in vitro. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 60, n. 5, p. 549-554, mai 1998.

YU, Y.; LI, W.; HAN, Z.; LUO, M.; CHANG, Z.; TAN, J. The effect of follicle stimulating hormone on follicular development, granulosa cells apoptosis and steroidogenesis and its mediation by insulin-like growth factor-I in the goat ovary. **Theriogenology**, v. 60, n. 9, p. 1691–1704, dez 2003.

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

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.; BONDY, C. A. Placental glucose transporter gene expression and metabolism in the rat. **J. Clin. Invest.**, v. 91, n. 3, p.845-852, mar 1993. .

ZHOU, J.; BIEVRE, M.; BONDY, C. A. Reduced GLUT1 expression in Igf1-/- null oocytes and follicles. **Growth Horm. IGF Res.**, v. 10, n. 3, p. 111–117, jun. 2000.