

**INSTITUTO DE ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL**  
**SUSTENTÁVEL**

**EFEITO DA IDADE DE FÊMEAS NELORE (*Bos indicus*) NA  
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E TAXA DE GESTAÇÃO**

**Marina de Oliveira Silva**

**Nova Odessa**  
**FEVEREIRO – 2021**



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL SUSTENTÁVEL

**EFEITO DA IDADE DE FÊMEAS NELORE (*Bos indicus*) NA  
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E TAXA DE GESTAÇÃO**

**Aluna:** Marina de Oliveira Silva

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante

**Coorientador:** Prof. Dr. Fabio Morato Monteiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Zootecnia, APTA/SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Produção Animal Sustentável.

Ficha Catalográfica elaborada pelo  
Núcleo de Informação e Documentação do Instituto de Zootecnia  
Bibliotecária: Flavia Helena Felizardo – CRB 8/8987

S586e

Silva, Marina de Oliveira.

Efeito da idade de fêmeas nelore (*Bos indicus*) na produção in vitro de embriões e taxa de gestação / Marina de Oliveira Silva.

Nova Odessa, SP: [s.n.], 2021.

46p.; Il.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Zootecnia. APTA/SAA, Nova Odessa.

Orientadora: Dra. Maria Eugênia Zerlotti Mercadante

Coorientador: Dr. Fabio Morato Monteiro

1. Categoria animal. 2. Doadoras Nelore. 3. Qualidade embrionária. 4. Qualidade oocitária. I. Mercadante, Maria Eugênia Zerlotti. II. Monteiro, Fabio Morato.

CDD- 636.2



GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
INSTITUTO DE ZOOTECNIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL SUSTENTÁVEL  
www.iz.sp.gov.br - iz.pg@sp.gov.br



## ATA DE DEFESA

RA-IZ: 265-679 - RG: 40.965.679-3/Página 1 de 1

Ata de defesa de Dissertação do (a) Senhor (a) Marina de Oliveira Silva no Programa de Pós-Graduação em Produção Animal Sustentável, Curso de Mestrado do Instituto de Zootecnia/APTA/SAA/SP.

Aos doze dias do mês de fevereiro de 2021, no PPG-IZ, realizou-se a Defesa da Dissertação do (a) Senhor (a) Marina de Oliveira Silva, apresentada para obtenção do título de Mestre intitulada:


**"EFEITO DA IDADE DE FÊMEAS NELORE (*Bos indicus*) NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E TAXA DE GESTAÇÃO"**

Após declarada aberta a sessão, o (a) Sr. (a) Presidente passa a palavra ao candidato para exposição e a seguir aos examinadores para as devidas arguições que se desenvolvem nos termos regimentais. Em seguida, a Comissão Julgadora proclama o resultado:


Nome dos participantes da banca	Função	Sigla da CPG	Resultado
Maria Eugênia Zerlotti Mercadante	Presidente	IZ/APTA/SAA	<u>APROVADA</u>
Maria Emília Franco Oliveira	Titular	UNESP/Jaboticabal	<u>APROVADA</u>
Júlia Gleyci Soares de Carvalho	Titular	UNIFESP/SP	<u>APROVADA</u>

Resultado Final: APROVADA

### Parecer da Comissão julgadora\*

Eu, Claudia Cristina Paro de Paz  lavrei a presente ata, que assino juntamente com os (as) Senhores (as). Nova Odeessa, aos doze dias de fevereiro de 2021.

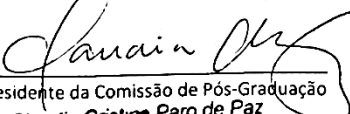
  
Maria Eugênia Zerlotti Mercadante

  
Maria Emília Franco Oliveira

  
Júlia Gleyci Soares de Carvalho

\*Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer será obrigatório.

A Defesa foi homologada pela Comissão de Pós-Graduação em 23/02/2021 e, portanto, o (a) aluno (a) Marina de Oliveira Silva faz jus ao Título de Mestre em Produção Animal Sustentável obtido no Programa Produção Animal Sustentável do Instituto de Zootecnia.

  
Presidente da Comissão de Pós-Graduação  
Claudia Cristina Paro de Paz  
Coordenadora do CPG-IZ  
R.G. 15.457.371-1

"Devido à pandemia do COVID-19, as diretrizes decreto N. 64.864/2020 do Governo do Estado de São Paulo e a Resolução SAA 18/2020-COVID19, todos os membros da banca participaram da defesa por webconferência e consideraram o aluno aprovado".

Nova Odessa, 12 de fevereiro de 2021.

*Maria Eugênia Zerlotti Mercadante*

Maria Eugênia Zerlotti Mercadante  
Presidente da Comissão Julgadora

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço à Deus, por ter me dado suporte para ter chegado até aqui.

Aos meus pais que estiveram ao meu lado durante todo o meu percurso, me incentivando e motivando a sempre seguir em frente.

À minha orientadora Dra. Maria Eugênia por todo ensinamento, paciência e puxões de orelha que me fizeram crescer e aprender muito.

Ao meu coorientador Dr. Fabio por ter acreditado em mim e ter me dado a oportunidade de realizar o mestrado, e que assim como a Dra. Maria Eugênia, me ajudou muito a evoluir academicamente e profissionalmente.

À banca de qualificação e defesa por todo o suporte, correções e sugestões que ajudaram a contribuir para o aperfeiçoamento do presente trabalho.

Aos funcionários do Instituto de Zootecnia, em especial à Estela, Aline, Dona Irma, Dona Arlete, Leu, Seu Bras e aos campeiros que sempre foram muito prestativos nos auxiliando em tudo que precisamos.

Aos meus familiares por sempre estar me apoiando ao longo da minha caminhada

À equipe da Vitrogen principalmente a Yeda e ao Daniel que contribuíram para o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao pecuarista Lucio Cornachini por ter acreditado e investido no nosso projeto.

Ao médico veterinário João Paulo e o técnico de laboratório Nei pelo trabalho prestado nas aspirações.

Aos meus amigos de laboratório Luana, Marcelo e Naiara por ter auxiliado em todos os manejos, sem vocês esse trabalho não teria chegado até aqui.

À casa dos mestrandos que durante dois anos foi o meu segundo lar. Agradeço à Catiucia por toda sua atenção, ensinamentos, risadas e músicas que sempre nos alegrava. À Valesquinha que sempre arrancava um sorriso com suas piadas aleatórias. À Lolo por sempre ser tão prestativa, sempre pronta para nos ajudar. Ao Ricardo por todos os conselhos e risadas com as suas “presepadadas”. Às minhas companheiras de quarto que foram mais do que companheiras foram minhas irmãs, Luana e Tatiane sempre carregarei em meu coração as noites falando besteira, os conselhos, e as risadas no quarto 32. Ao Marcelão que adora me tirar do sério, mas é meu irmão de coração, uma pessoa maravilhosa sempre pronta para ajudar. Ao Davizão por todos os seus conselhos e sua culinária maravilhosa. À Fer que chegou depois mas conquistou um espaço enorme em meu coração, muito obrigada por tudo. À Joycinha que sempre esteve presente pronta para ajudar no que precisamos. À Gabizinha e a Danny que tive

contato por pouco tempo na casa, mas que convivi o suficiente para carregar em meu coração.

Amo todos vocês e sempre carregarei as lembranças comigo. Obrigada por tudo!

Ao meu namorado Caio e sua família que me acolheram se tornando minha segunda família.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES, Código de Financiamento 001) pela bolsa concedida.

One day you'll leave this world behind

So, live a life you will remember... ♥

The Nights- Avicii

**RESUMO:** O objetivo do presente estudo foi avaliar a quantidade e qualidade oocitária e produção de embriões de doadoras da raça Nelore (*Bos indicus*) de três categorias de idade (novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas) e associá-las com taxa de gestação. Foram utilizadas 36 doadoras, sendo 11 novilhas pré-púberes ( $13 \pm 0,61$  meses,  $240 \pm 10,3$  kg), 17 novilhas púberes ( $25 \pm 0,78$  meses,  $352 \pm 8,30$  kg) e 8 vacas ( $83 \pm 28$  meses,  $560 \pm 12,1$  kg). As fêmeas foram submetidas a três aspirações folicular guiadas por ultrassom (OPU), sem sincronização, em dias aleatórios do ciclo estral, com intervalo de 21 dias. Foram realizadas medidas do trato genital externo (comprimento da rima e largura da vulva) e avaliações ultrassonográficas dos ovários para quantificação de folículos antrais e média dos diâmetros dos ovários (XOV). Os embriões produzidos de oócitos das novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas foram transferidos para receptoras múltíparas da raça Nelore. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a transferência de embriões por meio de ultrassonografia, e o diagnóstico confirmatório foi realizado 60 dias depois. As variáveis foram testadas quanto a distribuição por meio do procedimento Box-cox e transformadas quando necessário, e foram analisadas utilizando-se os procedimentos MIXED, GLIMMIX e CORR (SAS Inst., Inc., Cary, NC, US). O comprimento da rima diferiu entre vacas ( $9,56 \pm 0,30^a$  cm) e novilhas, sendo semelhante nas novilhas pré-púberes e púberes ( $7,85 \pm 0,25^b$  cm, e  $8,40 \pm 0,20^b$  cm, respectivamente), enquanto a largura da vulva diferiu entre as três categorias de idade ( $4,60 \pm 0,11^c$ ,  $5,58 \pm 0,09^b$ , e  $6,09 \pm 0,13^a$  cm para vacas, novilhas pré-púberes, e novilhas púberes). A XOV foi semelhante para a categoria das novilhas pré-púberes e púberes mas diferiu da categoria das vacas ( $20,0 \pm 0,57^b$  mm,  $20,8 \pm 0,46^b$  mm, e  $25,96 \pm 0,67^a$  mm para novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas). Vacas apresentaram maior número de folículos totais ( $32,87 \pm 5,32^b$ ;  $35,0 \pm 4,28^b$ ; e  $58,68 \pm 6,26^a$  para novilhas pré-púberes, púberes e vacas), assim como maior número de folículos <5mm ( $30,0 \pm 5,3^b$ ,  $31,7 \pm 4,2^b$ , e  $54,5 \pm 6,2^a$  para novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas), e de folículos de 5-8mm ( $1,7 \pm 0,36^b$ ,  $1,8 \pm 0,29^b$ , e  $4,0 \pm 0,43^a$ ). Entretanto, o número de folículos >8mm foi maior na categoria das novilhas pré-púberes ( $1,0 \pm 0,16^b$ ,  $1,3 \pm 0,12^{ab}$ , e  $1,0 \pm 0,19^a$ ). Em relação à produção oocitária, as vacas apresentaram maior número de oócitos viáveis ( $20,60 \pm 5,12^b$ ,  $19,05 \pm 4,12^b$ , e  $34,14 \pm 6,01^a$  para novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas), de oócitos inviáveis ( $6,96 \pm 1,06^b$ ,  $7,29 \pm 0,85^b$ , e  $10,03 \pm 1,25^a$ ), e de total clivados ( $13,09 \pm 3,72^b$ ,  $12,4 \pm 3,19^b$ , e  $21,1 \pm 4,22^a$ ), embora a taxa de clivagem tenha sido semelhante entre as categorias de idade (63,5%, 65,5%, e 62,2%). Entretanto, o número de blastocistos por OPU ( $5,57 \pm 1,99$ ,  $6,66 \pm 1,72$ , e  $9,74 \pm 2,26$  para novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas) e a taxa de blastocistos foram semelhantes entre as categorias de idade. Quando transferidos para as receptoras, os embriões das novilhas pré-púberes e das vacas apresentaram maior taxa de gestação aos 30 dias do que embriões das novilhas púberes (43,1%, 33,8%, e 40,4% para novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas), e o mesmo ocorreu com a taxa de gestação aos 60 dias (41,3%, 30,6%, e 39,0%). A variável XOV foi mediana e positivamente correlacionada com produção oocitária e embrionária na categoria das novilhas pré-púberes e púberes, o que não foi observado na categoria das vacas, enquanto o número de folículos totais foi alta e positivamente correlacionado com produção oocitária e embrionária nas três categorias. Os resultados permitem concluir que vacas apresentam maior produção oocitária e folicular do que fêmeas jovens. Entretanto, quando os oócitos são submetidos a FIV não há diferença na produção de blastocistos. As variáveis XOV e número de folículos totais podem ser indicativos da produção oocitária e embrionária, principalmente em fêmeas jovens.

**Palavras chave:** categoria de idade, doadoras Nelore, qualidade embrionária, qualidade oocitária.

**ABSTRACT:** The aim of the present study was to evaluate the quantity and quality of oocytes and embryo production of Nelore donors (*Bos indicus*) from three age categories (prepubertal heifers, pubescent heifers and cows) and to associate them with gestation rate. Thirty-six donors were evaluated: 11 prepubertal heifers ( $13 \pm 0.61$  months,  $240 \pm 10.3$  kg), 17 pubescent heifers ( $25 \pm 0.78$  months,  $352 \pm 8.30$  kg) and 8 cows ( $83 \pm 28$  months,  $560 \pm 12.1$  kg). The females were submitted to three follicular aspirations guided by ultrasound (OPU), without synchronization, on random days of the estrous cycle, with an interval of 21 days. Measurements of the external genital tract (length of the rhyne and width of the vulva) and ultrasound evaluations of the ovaries were performed to quantify antral follicles and mean ovary diameters (XOV). The embryos produced from oocytes of prepubescent heifers, pubescent heifers and cows were transferred to multiparous Nelore recipients. The pregnancy diagnosis was made 30 days after the embryo transfer by ultrasound, and the confirmatory diagnosis was made 60 days later. The variables were tested for distribution using the box-cox procedure and it was transformed when necessary. Variables were analyzed using the MIXED, GLIMMIX and CORR procedures (SAS Inst., Inc., Cary, NC, US). The length of the rhyne differed between cows ( $9.56 \pm 0.30^a$  cm) and heifers, being similar in prepubescent and pubescent heifers ( $7.85 \pm 0.25^b$  cm, and  $8.40 \pm 0.20^b$  cm, respectively), while the width of the vulva differed between the three age categories ( $4.60 \pm 0.11^c$ ,  $5.58 \pm 0.09^b$ , and  $6.09 \pm 0.13^a$  cm for cows, prepubescent heifers, and heifers pubescent). The XOV was similar for the category of prepubertal and pubescent heifers but it differed for the category of cows ( $20.0 \pm 0.57^b$  mm,  $20.8 \pm 0.46^b$  mm, and  $25.96 \pm 0.67^a$  mm for heifers prepubertal, pubescent heifers and cows). Cows showed a higher number of total follicles ( $32.87 \pm 5.32^b$ ;  $35.0 \pm 4.28^b$ ; and  $58.68 \pm 6.26^a$  for prepubescent, pubescent and cows heifers), as well as a greater number of follicles  $< 5$ mm ( $30.0 \pm 5.3^b$ ,  $31.7 \pm 4.2^b$ , and  $54.5 \pm 6.2^a$  for prepubertal heifers, pubescent heifers and cows), and follicles of 5-8mm ( $1.7 \pm 0$ ,  $36^b$ ,  $1.8 \pm 0.29^b$ , and  $4.0 \pm 0.43^a$ ). However, the number of follicles  $>8$ mm was higher in the category of prepubertal heifers ( $1.0 \pm 0.16^b$ ,  $1.3 \pm 0.12^{ab}$ , and  $1.0 \pm 0.19^a$ ). Regarding oocyte production, cows showed a higher number of viable oocytes ( $20.60 \pm 5.12^b$ ,  $19.05 \pm 4.12^b$ , and  $34.14 \pm 6.01^a$  for prepubescent heifers, pubescent heifers and cows), non-viable oocytes ( $6.96 \pm 1.06^b$ ,  $7.29 \pm 0.85^b$ , and  $10.03 \pm 1.25^a$ ), and total cleavages ( $13.09 \pm 3.72^b$ ,  $12.4 \pm 3$ ,  $19^b$ , and  $21.1 \pm 4.22^a$ ), although the cleavage rate was similar between age categories (63.5%, 65.5%, and 62.2%). However, the number of blastocysts per OPU ( $5.57 \pm 1.99$ ,  $6.66 \pm 1.72$ , and  $9.74 \pm 2.26$  for prepubertal heifers, pubescent heifers and cows) and the rate of blastocysts were similar across age categories. When transferred to the recipients, embryos of prepubertal heifers and cows showed a higher gestation rate at 30 days than embryos of pubescent heifers (43.1%, 33.8%, and 40.4% for pre-pubescent, pubescent heifers and cows), and the same tendency occurred with the pregnancy rate at 60 days (41.3%, 30.6%, and 39.0%). The XOV variable was median and positively correlated with oocyte and embryonic production in the category of prepubescent and pubescent heifers, which was not observed in the category of cows, while the number of total follicles was high and positively correlated with oocyte and embryonic production in the three categories. The results allow us to conclude that cows have higher oocyte and follicular production than young females. However, when the oocytes are submitted to IVF there is no difference in the production of blastocysts. Furthermore, XOV and number of total follicles can be indicative of oocyte and embryonic production, especially in young females.

**Keywords:** age category, embryonic quality, Nelore donors, oocyte quality.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b> .....	17
<b>2.1 Revisão Bibliográfica</b> .....	17
2.1.1 Aspectos fisiológicos e dinâmica folicular.....	17
2.1.2 Competência oocitária.....	18
2.1.3 Qualidade oocitária e embrionária .....	19
2.1.4 Aspiração folicular e Produção <i>in vitro</i> de embriões em doadoras de diferentes idades .....	21
2.1.5 Contagem de folículos antrais e relação com diâmetro ovariano.....	21
2.1.6 Mensurações da morfometria vulvar.....	22
<b>2.2 Objetivos</b> .....	23
<b>2.3 Material e métodos</b> .....	23
2.3.1 Local do experimento e animais.....	24
2.3.2 Delineamento .....	24
2.3.3 Biometria vulvar.....	24
2.3.4 Exame ultrassonográfico dos ovários.....	25
2.3.5 Aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) .....	25
2.3.6 Lavagem, seleção e transporte de oócitos .....	25
2.3.7 Maturação <i>in vitro</i> .....	26
2.3.8 Fecundação <i>in vitro</i> .....	26
2.3.9 Cultivo <i>in vitro</i> .....	27
2.3.10 Manejo das receptoras .....	27
2.3.11 Análises estatísticas.....	28
<b>2.4 Resultados</b> .....	29
<b>2.5 Discussão</b> .....	33
<b>3 CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	38

# 1 INTRODUÇÃO

Segundo relatório das Nações Unidas (ONU, 2019), é estimado que em 2050 a população humana alcance 9,7 bilhões de pessoas, caracterizando aumento na demanda por proteína animal. Na tentativa de suprir tal demanda, a produção de carne bovina deverá ter um crescimento de mais de 200 milhões de toneladas (FAO, 2017). Nesse cenário, o Brasil possui grande relevância, pois detém o maior rebanho comercial, a maior produção de carne bovina, além de ser um dos maiores exportadores de carne do mundo (ABIIEC, 2019). No intuito de fomentar o aumento da produção de carne bovina tem-se empregado biotecnologias da reprodução, tais como a inseminação artificial (IA) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) (Figueiredo et al., 2007), além da utilização de preditores de fertilidade como morfometria vulvar (Mesquita et al., 2016; Vasconcelos et al., 2020), diâmetro ovariano (Murasawa et al., 2005; Ireland et al., 2008) e contagem de folículos antrais (CFA) (Silva-Santos et al., 2014; Santos et al., 2016).

Estudos associaram a morfometria vulvar (Mesquita et al., 2016; Maculan et al., 2017; Vasconcelos et al., 2020) e o diâmetro ovariano (Murasawa et al., 2005; Ireland et al., 2008) com a quantidade de folículos presente no ovário, tornando possível a seleção de animais com maiores quantidades de folículos com base em tais características. Outro preditor de fertilidade é a contagem de folículos antrais (CFA) realizada por meio de ultrassonografia, técnica que permite indicar diretamente animais com maior população folicular (Silva-Santos et al., 2014; Santos et al., 2016). Através dos preditores de fertilidade é possível selecionar animais mais eficientes para a PIVE.

A PIVE é uma técnica usada para aumentar a eficiência reprodutiva das matrizes, promovendo maior ganho genético no rebanho bovino pelo aumento da taxa reprodutiva das fêmeas, e ainda pela possibilidade de utilizar doadoras jovens que não possuem capacidade de se tornar gestantes (Baruselli et al., 2019). O uso de doadoras jovens auxilia na diminuição do intervalo de gerações, uma vez que é possível obter maior número de progênies de alto valor genético em curto período de tempo (Snel-Oliveira et al., 2003; Camargo et al., 2005; Baruselli et al., 2019). Oócitos de doadoras jovens podem ser obtidos através de laparoscopia (Armstrong et al., 1992) ou aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) (Adams et al., 1994), sendo que para a realização da OPU as fêmeas podem ou não serem submetidas a protocolos pré-aspiração, podendo ser aspiradas em dias aleatórios do ciclo estral sem prejuízos para o resultado final da PIVE (Majerus et al. 1999; Seneda et al., 2006).

Fêmeas pré-púberes apresentam maior quantidade de folículos aspirados quando comparadas a fêmeas mais velhas (Mello et al., 2016; Malhi et al., 2006). De acordo com Erickson (1966), a quantidade de folículos antrais pode ter correlação positiva com o desempenho reprodutivo das fêmeas, e pode variar de animal para animal, porém é altamente repetível em um mesmo indivíduo (Burns, et al. 2005). Além disso, animais com maior número de folículos antrais podem ser mais eficientes quando submetidos a PIVE (Silva-Santos et al., 2014). Entretanto, os oócitos recuperados dos folículos antrais de fêmeas pré-púberes apresentam baixa qualidade quando comparados aos de vacas (Camargo et al., 2005; Mello et al., 2016). Essa baixa qualidade pode estar associada a imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise que leva a diminuição do diâmetro folicular acarretando em baixa qualidade oocitária (Adams et al., 1994).

Devido a imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise, fêmeas pré-púberes apresentam folículos com tamanho distintos (Adams et al., 1994), podendo acarretar alterações no desenvolvimento oocitário, uma vez que o tamanho do folículo aspirado tem clara relação com a qualidade oocitária (Lonergan et al., 1994; Landry et al., 2016). Além disso, devido à baixa qualidade oocitária fêmeas pré-púberes parecem apresentar baixo desenvolvimento de blastocistos (Presicce et al., 1997; Camargo et al., 2005). Entretanto, é importante compreender os mecanismos fisiológicos da utilização de fêmeas jovens para PIVE visando intensificar o uso da categoria para maximizar essa biotecnologia, principalmente sem a utilização de protocolos pré-aspiração pensando na praticidade nas rotinas em grandes propriedades.

Desta forma, torna-se necessário estudar a utilização de doadoras de diferentes categorias de idade (novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas) da raça Nelore para PIVE, sem utilização de protocolos pré-aspiração em dias aleatórios do ciclo estral. Ainda, é importante verificar a qualidade oocitária, produção embrionária e taxa de gestação das três categorias de idade, além da relação de medidas do trato genital externo e interno, e CFA com a produção oocitária e embrionária.

## **2 DESENVOLVIMENTO**

### **2.1 Revisão Bibliográfica**

#### 2.1.1 Aspectos fisiológicos e dinâmica folicular

Em fêmeas bovinas, assim como na maioria dos mamíferos, o desenvolvimento folicular tem início na vida fetal (Taneja, 2000). Ao nascimento, o desenvolvimento folicular é acelerado, e se torna gradativo em torno de 120 dias de vida (Erickson, 1966). Entretanto, a partir do quarto ano de vida, o desenvolvimento folicular volta a apresentar alterações, nas quais há um declínio no número de folículos antrais, devido a diminuição de folículos primordiais (Erickson, 1966). Esse processo de formação, crescimento, e desenvolvimento folicular é denominado foliculogênese (Martins et al., 2008).

A foliculogênese ocorre por meio da migração das células germinativas primordiais para as cristas gonodais, onde sofre diferenciação em oogônia e proliferação nos ninhos ou cistos ovarianos (Hafez e Hafez, 2004). Nos cistos ovarianos, as oôgonias se desenvolvem em oócitos primários, que entram na prófase meiótica e permanecem inertes em estágio de diplóteno (Monniaux et al., 2014). Durante o desenvolvimento dos oócitos primários, estes são circundados por células somáticas e dão origem aos folículos primordiais (Hafez e Hafez, 2004). Conforme a evolução dos folículos primordiais, estes são envolvidos por uma camada de células da granulosa, e originam os folículos primários (Monniaux et al., 2014). Novas camadas da célula da granulosa são desenvolvidas, e dão origem aos folículos de múltiplas camadas, os folículos secundários quando apresentam duas camadas, e folículos terciários ou pré-antrais, quando apresentam três camadas (Van den Hurk e Zhao, 2005). Com o crescimento desses folículos, um antro cheio de líquido é desenvolvido e envolve as células da granulosa ao redor do oócito, e gera os folículos antrais (Britt, 2008).

Os folículos antrais apresentam um processo constante de crescimento e regressão, o que induz ao desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório, processo conhecido como dinâmica folicular (Lucy et al., 1992). A dinâmica folicular antral é dividida em três fases: 1) fase de recrutamento, caracterizada pela formação de uma onda folicular, quando estes folículos irão passar por um processo de amadurecimento devido a estímulos gonadotróficos hipofisários, o que os prepara para a ovulação; 2) fase de seleção, quando apenas um folículo é selecionado para atingir competência de ovulação e, 3) fase de dominância, quando o

folículo selecionado atinge capacidade ovulatória, e se torna um folículo dominante (Hodgen, 1982; Lucy et al., 1992). Essa dinâmica folicular ocorre tanto em fêmeas bovinas pré-púberes quanto pós-púberes (Adams et al., 1994).

A dinâmica folicular em fêmeas bovinas da raça Nelore é apresentada em três ou quatro ondas de crescimento folicular (Figueiredo et al., 1997; Adams et al., 2008), e a idade do animal pode interferir na onda de crescimento folicular. Estudo realizado por Adams et al. (1994) relatou que as ondas foliculares de fêmeas pré-púberes Hereford possuem qualidade semelhante, mas quantidade distinta. Foi observado que todas as ondas foliculares eram anovulatórias em fêmeas pré-púberes, com encurtamento da fase de crescimento dos folículos dominantes e subordinados, e com diminuição na fase de intervalo entre as ondas (Adams et al., 1994). Essa dinâmica folicular é semelhante em fêmeas bovinas da raça Nelore, embora o tamanho do folículo dominante e corpo lúteo sejam menores quando comparado a raças europeias (Figueiredo et al., 1997).

A idade da fêmea também pode interferir no diâmetro do folículo dominante. É sabido que fêmeas pré-púberes apresentam imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise, o que leva a diminuição da produção de hormônios reprodutivos responsáveis pelo crescimento e manutenção do folículo dominante (Adams et al., 1994).

### 2.1.2 Competência oocitária

A competência oocitária relaciona-se com a habilidade que um oócito tem em se submeter a uma fecundação e desenvolver um embrião (Dode, 2006) A competência total é atingida a partir do momento em que o embrião se torna apto para manter uma gestação saudável até o nascimento (Armstrong, 2001). Essa competência oocitária é adquirida de maneira gradual, e aumenta concomitantemente ao desenvolvimento folicular, quando os oócitos passam por diversas modificações morfológicas e bioquímicas que o capacitam para concluir a meiose (Brevini-Gandolfi e Gandolfi, 2001; Dode, 2006; Chaves et al., 2010).

A idade da fêmea pode levar a algumas alterações na conclusão meiótica como: a) inabilidade em retomar ou completar a meiose, o que resulta em oócitos incapazes de realizar fertilização; e b) erros na maturação meiótica que podem ser compatíveis com a fertilização, mas podem levar a uma série de anormalidades genéticas, e podem gerar perda gestacional e anormalidades fetais (Armstrong, 2001). A capacidade meiótica está ligada com o tamanho do oócito, que por sua vez está ligado com o tamanho do folículo (Dode, 2006). Em animais

mais jovens, os folículos antrais possuem menor tamanho (Erickson et al., 1996; Armstrong, 2001).

Os oócitos presentes nos folículos antrais em crescimento ou pré-ovulatórios se encontram no estágio diplóteno da prófase meiótica. *In vivo*, a retomada da meiose ocorre devido ao aumento pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), e ocorre somente em folículos dominantes meioticamente competentes, e com o crescimento completo (Van den Hurk e Zhao, 2005; Chaves et al., 2010). *In vitro*, a retomada da meiose ocorre devido a remoção do oócito do ambiente folicular, o que induz a sua maturação, uma vez que o período de maturação é a preparação final para fecundação (Dode, 2006).

A proporção do desenvolvimento após fecundação dos oócitos para blastocitos *in vitro* é menor do que *in vivo* (Lonergan et al., 2003). Este fato pode ser explicado devido ao tamanho dos folículos, uma vez que na aspiração guiada por ultrassom (OPU) são coletados folículos de diferentes tamanhos (Rizos et al., 2002). De acordo com Landry et al. (2016), fêmeas pré-púberes podem fornecer maior quantidade de folículos aspirados por OPU do que fêmeas púberes. No entanto, o rendimento para blastocisto é menor, e isso pode ser explicado devido ao tamanho dos folículos aspirados, uma vez que fêmeas pré-púberes fornecem folículos de tamanho inferior ao de fêmeas púberes (Landry et al., 2016). Entretanto, Silva (2020) mostrou que fêmeas pré-púberes e fêmeas púberes não apresentaram diferença na quantidade de folículos aspirados no momento da OPU, porém fêmeas púberes apresentaram maiores quantidades de folículos grandes (>8mm) quando comparadas às fêmeas pré-púberes. O mesmo foi observado por Guerreiro (2015) que não encontrou diferença na quantidade de folículos aspirados de fêmeas pré-púberes, púberes, lactantes e não lactantes, porém observou que fêmeas pré-púberes tiveram menores taxas de folículos médios quando comparadas com as demais categorias. A obtenção de oócitos com diâmetro grande (>8mm) auxilia na obtenção de maiores taxas de clivagem e blastócitos, independentemente da idade do animal (Kaulffold et al., 2005).

### 2.1.3 Qualidade oocitária e embrionária

Embora o meio de maturação *in vitro* tenha papel importante no desenvolvimento embrionário, a qualidade oocitária é o fator principal que determina o desenvolvimento dos oócitos para o estágio de blastocisto (Lonergan et al., 2003). Segundo revisado por Baruselli et al. (2019), diversos fatores podem causar alterações na qualidade oocitária acarretando

prejuízo na produção *in vitro* de embriões, entre eles o estresse térmico, a população folicular, o status fisiológico e a idade da doadora.

A idade da doadora é um fator que pode influenciar na qualidade oocitária, o que causa alterações nas taxas de desenvolvimento embrionário (Mello et al., 2016). Oócitos de fêmeas pré-púberes possuem menor capacidade de desenvolvimento, e isso pode ser atribuído a maturação ooplasmática incompleta ou atrasada (Salamone et al., 2001). Um estudo realizado por Camargo et al. (2005), com oócitos de fêmeas bovinas mestiças, relataram que oócitos de fêmeas pré-púberes possuem competência embrionária inferior ao oócitos de vacas. Entretanto, conforme as fêmeas atingem idade entre 9 a 14 meses, os oócitos vão adquirindo competência semelhante ao das vacas, o que indica que a idade é um fator determinante na competência oocitária. Em outro estudo, Presicce et al. (1997) relataram que fêmeas pré-púberes (5-7 meses de idade) apresentaram menores taxas de clivagem e de blastocistos do que fêmeas adultas, porém ao atingir a puberdade, a taxa de clivagem aumentou significativamente. Entretanto, as taxas de desenvolvimento e de blastocistos permaneceram inferiores nessa categoria, em comparação à categoria das vacas (Presicce et al., 1997).

Outro fator que pode levar a alterações no desenvolvimento embrionário é o tamanho do oócito. Este fator apresenta clara relação com a qualidade e desenvolvimento em termos de morfologia e produção de embriões (Lonergan et al., 1994). Oócitos obtidos de folículos com diâmetro >6mm são superiores aos de folículos menores (Lonergan et al., 1994).

Gandolfi et al. (1998) relataram que o diâmetro dos oócitos recuperados de folículos de fêmeas pré-púberes é inferior ao dos oócitos recuperados de vacas, e isso impacta negativamente a competência oocitária, uma vez que a capacidade do oócito bovino em atingir a metáfase II durante a maturação *in vitro* está relacionada com o seu diâmetro. Além disso, o diâmetro oocitário também tem relação com o desenvolvimento embrionário, pois quanto maior o diâmetro, melhores são as taxas de clivagem e desenvolvimento em blastocistos e blastocistos expandidos (Otoi et al., 1997).

O desenvolvimento embrionário e a sobrevivência também podem ser afetados pela idade da doadora (Torres et al., 2014). Majerus et al. (2000) relataram que oócitos derivados de fêmeas pré-púberes têm seu desenvolvimento embrionário interrompido antes do estágio de 9 células, em comparação com o desenvolvimento embrionário das vacas. Corroborando com essas informações, Revel et al. (1995) relataram que oócitos de fêmeas pré-púberes entre 3-4 meses não apresentaram diferença nas taxas de fertilização e clivagem em relação as doadoras mais velhas. Entretanto, após 7 dias de cultura a formação de blastocistos foi menor

para fêmeas pré-púberes, além de maior perda embrionária após transferência (Revel et al., 1995).

#### 2.1.4 Aspiração folicular e Produção *in vitro* de embriões em doadoras de diferentes idades

A PIVE é uma técnica utilizada para aumentar a taxa reprodutiva das fêmeas e acelerar a produção de animais geneticamente superiores (Baruselli et al., 2019). A técnica também visa impedir, através da aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU), o descarte de fêmeas com problemas de infertilidade que impossibilitam sua reprodução por meios naturais, ou até mesmo por meio da transferência de embriões (Gonçalves et al., 2007). A PIVE pode ser realizada com ou sem tratamento hormonal das doadoras (Barbosa et al., 2013), embora a utilização de estimulação hormonal aumente a proporção de folículos médios e grandes (Vieira et al., 2014; Carvalho et al., 2019). A técnica também permite a utilização de animais mais jovens na tentativa de diminuir o intervalo de gerações, e conseqüentemente aumentar o ganho genético (Snel-Oliveira et al., 2003).

No entanto, para que ocorra sucesso na OPU-PIVE é necessário que se tenha boa qualidade e quantidade de oócitos obtidos durante a aspiração (Dode et al., 2006). Na OPU-PIVE, a idade da doadora é um fator significativo que pode interferir na competência oocitária (Armstrong, 2001). Fêmeas pré-púberes tendem a ter menor capacidade de desenvolvimento oocitário, redução na taxa de blastocitos e menor competência embrionária (Salamone et al., 2001; Camargo et al., 2005, Landry et al., 2016).

Embora os oócitos de fêmeas pré-púberes apresentem menor competência ao se desenvolverem em embriões quando comparados a oócitos obtidos de vacas (Gandolfi et al., 1998; Khatir et al., 1998; Majerus et al., 2000), estudos indicam que é possível obter embriões viáveis capazes de desenvolver uma gestação a partir de oócitos de fêmeas pré-púberes de diferentes espécies, como bovina (Silva, 2020), ovina (O'Brien et al., 1997) e suína (Marchal et al., 2001).

#### 2.1.5 Contagem de folículos antrais e relação com diâmetro ovariano

O tamanho do ovário pode variar de animal para animal, e essa variação pode ter grande potencial de afetar a produção de folículos (Murasawa et al., 2005). Além disso, o tamanho do ovário pode estar correlacionado com a fertilidade, pois está relacionado com a

contagem de folículos antrais (CFA) (Crane e Muirhead et al., 2020). Murasawa et al. (2005), em estudo com ovários de novilhas da raça Holandesa (*Bos taurus*), observaram associação positiva entre número de folículos e peso do ovário, e sugerem que o peso do ovário pode ser um indicador de estimativa de CFA. Ireland et al. (2008), em estudo com novilhas mestiças, encontraram que fêmeas com comprimento, altura e peso ovariano menores, possuem CFA baixa. A CFA é um parâmetro utilizado para prever o tamanho da população folicular ovariana (Cushman et al., 2009). Estudos indicam que a CFA pode variar entre indivíduos, porém é altamente repetível em um mesmo animal durante as ondas foliculares, o que torna possível avaliar a CFA somente uma vez durante a vida do animal (Burns et al., 2005).

A realização da CFA é importante para aferir a quantificação de folículos antrais logo no início da vida do animal, em que é possível identificar animais de maior fertilidade mais precocemente (Ireland et al., 2008), e animais que possam ter produção *in vitro* de embriões mais eficiente (Baruselli et al. 2016). Santos et al. (2016) verificaram que vacas Nelore que apresentam CFA alta produzem mais oócitos por sessão de aspiração folicular, além de maiores proporções de oócitos viáveis e taxas de blastocitos em comparação a fêmeas de médio e baixo CFA. Os autores concluíram que a realização da ultrassonografia para quantificação de folículos antrais é um bom método para melhorar a PIVE. Silva-Santos et al. (2014), em estudo com novilhas mestiças da desmama aos 24 meses de idade, relataram que fêmeas com CFA alto apresentaram maior taxa média de recuperação de células cumulus oócitos, maior quantidade de oócitos viáveis e maior produção de embriões em comparação com fêmeas com médio e baixo CFA, e concluíram que a CFA pode ser realizada em fêmeas de 12 meses para prever o sucesso da PIVE.

#### 2.1.6 Mensurações da morfometria vulvar

Indicadores de fertilidade são úteis para facilitar o reconhecimento de fêmeas férteis em diferentes estágios reprodutivos. Um indicador de fertilidade de fácil mensuração e baixo custo é a morfometria vulvar (Maculan et al., 2017). A morfometria da vulva é caracterizada por dois lábios que se encontram em uma comissura dorsal e outra ventral, as quais envolvem a abertura vulvar vertical. A comissura dorsal apresenta forma arredondada e a comissura ventral é caracterizada por forma aguda (König e Liebich, 2016).

A mensuração da morfometria vulvar é realizada com auxílio de um paquímetro, e são feitas duas medidas, comprimento da rima da vulva e a largura vulvar (Maculan et al., 2017).

O comprimento da rima é realizado através da mensuração da distância entre a comissura ventral e dorsal da vulva, e a largura vulvar é obtida através da distância entre as bordas laterais da vulva (Mesquita et al., 2016).

Em estudos recentes utilizando mensurações de morfometria vulvar como preditores de fertilidade, Mesquita et al. (2016) avaliaram a relação entre morfometria vulvar, largura de vulva e tamanho corporal com CFA, e concluíram que tais parâmetros são bons indicadores de reserva ovariana. Do mesmo modo, Maculan et al. (2017) relataram que a morfometria vulvar tem associação com a fertilidade em fêmeas bovinas da raça Tabapuã (*Bos indicus*), e salientam que a técnica apresenta fácil mensuração e baixo custo. Vasconcelos et al. (2020) relataram que vacas Brahman com morfometria vulvar intermediária apresentaram maior eficiência de produção embrionária, enquanto vacas Simental com morfometria vulvar alta tiveram maior eficiência de produção embrionária do que vacas com morfometria intermediária.

## **2.2 Objetivos**

- Avaliar e comparar a quantidade e qualidade dos oócitos recuperados por OPU de novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas da raça Nelore.
- Avaliar e comparar a quantidade e qualidade dos embriões de novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas da raça Nelore.
- Avaliar a taxa de gestação de embriões provenientes de novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas da raça Nelore e transferidos a fêmeas receptoras.
- Avaliar a correlação de medidas do trato genital externo e interno, e CFA com quantidade e qualidade oocitária e embrionária.

## **2.3 Material e métodos**

Os experimentos obedeceram às diretrizes de bem-estar animal, de acordo com a Lei Estadual nº 11.977 do Estado de São Paulo, Brasil.

### 2.3.1 Local do experimento e animais

O estudo foi conduzido no Centro Avançado de Pesquisa de Bovinos de Corte, unidade de pesquisa do Instituto de Zootecnia, localizada em Sertãozinho, SP. Todos os animais foram mantidos juntos durante todo o experimento em um piquete e alimentados com silagem, além de disponibilidade de forragem composta por capins do gênero *Brachiaria brizantha*, sendo disponibilizado sal mineral e água *ad libitum*. O experimento foi conduzido nos meses de outubro, novembro e dezembro de 2019, com intervalo de 21 dias entre as seções de OPU.

### 2.3.2 Delineamento

Foram utilizadas 36 doadoras bovinas da raça Nelore (*Bos indicus*) agrupadas em três categorias de acordo com a idade, sendo categoria 1 formado por novilhas pré-púberes (n=11, 13±0,61 meses de idade, 239,94±10,32 kg de peso corporal, e 4,3±1,04 de escore de condição corporal), categoria 2 formado por novilhas púberes (n=17, 25±0,78 meses, 352,29±8,30 kg, 5,0±0,85 escore) e categoria 3 por vacas (n=8, 83±28 meses, 560,20±12,11 kg, 8,9±1,25 escore). O escore de condição corporal foi pontuado numa escala de 1 a 9, respectivamente para animais extremamente magros e gordos (Wagner et al., 1988).

Foram realizados três procedimentos de aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) de todos os animais sem protocolo de sincronização, nos Dias 0 (1ª OPU), 21 (2ª OPU) e 42 (3ª OPU), portanto, as OPU foram realizadas em dias aleatórios do ciclo estral. Todas as seções de OPU foram realizadas pelo mesmo técnico.

### 2.3.3 Biometria vulvar

Antes do início das seções de OPU foram determinados comprimento da rima vulvar e largura da vulva das fêmeas com auxílio de um paquímetro. O comprimento da rima vulvar foi obtido a partir da distância entre as comissuras dorsal e ventral e a largura vulvar foi obtida de uma borda lateral a outra dos lábios vulvares, considerando o ponto médio da rima vulvar (paquímetro posicionado em um ângulo de 90° em relação a rima), conforme descrito por Maculan et al. (2017). As medidas de biometria vulvar foram realizadas pelo mesmo técnico, nas três OPU (Dias 0, 21, 42).

#### 2.3.4 Exame ultrassonográfico dos ovários

Foram realizadas imagens ultrassonográficas dos ovários nos Dias 0, 21 e 42, para a obtenção do diâmetro dos ovários (média do diâmetro vertical e horizontal em corte do ovário em suas maiores dimensões), contagem dos folículos antrais, e classificação da população folicular de acordo com categorias de tamanho: pequenos (< 5,0 mm), médios (5,0 a 8,0 mm) e grandes (> 8,0 mm). As avaliações foram realizadas através da introdução de uma probe micro até o fundo do saco vaginal. A classificação e contagem dos folículos antrais foram realizadas visualmente no momento da aspiração. Todas as avaliações foram realizadas pelo mesmo técnico.

#### 2.3.5 Aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU)

Antes da realização da OPU as doadoras passaram por anestesia epidural com lidocaína realizada no espaço sacrococcígeo onde cada doadora recebeu uma dose específica (novilhas pré-púbere 2 mL; novilhas púberes 4 mL e vacas 5 mL). Foi realizada limpeza da região vulvar e perineal para retirada do conteúdo fecal, e foi introduzida uma guia de aspiração folicular (guia de aspiração folicular, WTA Cravinhos, SP, Brasil) com probe micro convexa (6,5mmH, Mindray DP2200) até o fundo do saco vaginal.

Posteriormente foi realizado o procedimento de aspiração folicular utilizando sistema de agulha descartável (calibre 20G) acoplado a linha de aspiração de Teflon. O sistema foi conectado a uma bomba a vácuo (Cook ® 90-100 mmHG), para gerar pressão negativa, com aquecedor de tubo de 50 ml (WTA®, Cravinhos, SP, Brasil).

Os folículos visíveis foram aspirados e o fluido folicular contendo os oócitos foram depositados em um tubo de 50 ml contendo 5 ml de PBS acrescido de 1% de SFB e Lique mine, mantido a 37°C.

#### 2.3.6 Lavagem, seleção e transporte de oócitos

As etapas de lavagem, seleção e início da maturação foram realizadas no Laboratório de Reprodução e Saúde Animal, Instituto de Zootecnia, Sertãozinho, SP. As demais etapas da

produção dos embriões *in vitro* foram realizadas no Laboratório Vitrogen YVF Biotech, Cravinhos, SP.

O tubo contendo o material aspirado foi despejado em filtro de colheita de embriões (WTA®) e lavado com a mesma solução utilizada na aspiração folicular (PBS acrescido de 1% de SFB e Liquemine). O sedimento restante no filtro foi então observado em placas de *petri* e, neste momento, foi efetuada a contagem e a avaliação dos complexos cumulus oócitos (COCs) de acordo com a qualidade, os quais foram classificados de acordo com a morfologia (número de camadas de células do *cumullus* e aspecto do citoplasma) em grau I, II e III (GI, GII e GIII), oócitos sem *cumullus* (s/c), expandidos (exp), degenerados (deg) e atrésicos (atr), segundo Lonergan et al. (1994).

Após a classificação, os COCs 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% SFB, 5 µg/ml FSH, 50 µg/ml LH e 01 µg/ml de estradiol). Em seguida os COCs foram transportados para um microtubo (WTA) com meio de maturação (MIV) sob óleo mineral (500µl MIV + 300µl óleo). Os microtubos foram levados em transportadora de oócitos - Labmix (WTA®) com temperatura de 38,5°C e atmosfera gasosa controlada (6%CO<sub>2</sub> + 5%O<sub>2</sub> + 89%N<sub>2</sub>), sendo realizada a maturação durante o transporte com uma pressão hidrostática controlada de 15mmHg (Labmix)

### 2.3.7 Maturação *in vitro*

No laboratório da Vitrogen os microtubos contendo os COCs selecionados foram transferidos para incubadora de bancada (Eve – WTA®) na qual os mesmos continuaram o processo de maturação por 22 horas nas mesmas condições de temperatura (38,5°C) e baixa tensão de oxigênio (6%CO<sub>2</sub> + 5%O<sub>2</sub> + 89%N<sub>2</sub>).

### 2.3.8 Fecundação *in vitro*

Para a fecundação *in vitro* foram utilizadas amostras de sêmen criopreservado da mesma partida de três touros da raça Nelore, previamente testados pelo método de FIV com oócitos obtidos de abatedouro. O sêmen criopreservado foi preparado mediante a técnica de gradiente de Percoll para obtenção de espermatozoides móveis, remoção do diluidor e plasma seminal. A concentração foi ajustada para 1x10<sup>6</sup> spz/ml. O meio utilizado na fecundação *in*

vitro foi o meio Tyrode modificado (TALP) acrescido de soluções de Penicilamida, Hipotaurina e Epinefrina (PHE) e 10µg/ml de heparina. Os gametas permaneceram incubados em placas com microgotas de 70µl cobertas com óleo mineral, por 20-22 horas a 38,5°C com baixa tensão de oxigênio. Para a retirada do efeito touro, os oócitos das doadoras das três categorias de idade foram submetidos a fecundação com o sêmen criopreservado dos três touros.

### 2.3.9 Cultivo *in vitro*

Após o tempo de incubação dos gametas, os prováveis zigotos foram lavados para retirar o excesso de células do cumulus e transferidos para uma placa contendo microgotas de 70µL de meio de cultivo (CR2 modificado acrescido de SFB e BSA), cobertos por óleo mineral de acordo com os protocolos de Watanabe (1999). Estes permaneceram na incubadora de bancada (Eve – WTA®) por 7 dias, sendo mantidos a temperatura de 38,5°C com baixa tensão de oxigênio (6:5:89) e pressão hidrostática de 5mmHg.

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

### 2.3.10 Manejo das receptoras

Os embriões produzidos a partir de oócitos das novilhas pré-púberes (n=116), novilhas púberes (n=183) e vacas (n=146) foram aleatoriamente transferidos em receptoras de uma fazenda comercial (BR Pecuária- Terenos-MS). Foram utilizadas vacas multíparas da raça Nelore que receberam protocolo de sincronização da ovulação para transferência de embriões em tempo fixo. No Dia 0, todas as receptoras receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) (1,9 g de P4, CIDR®, Zoetis, São Paulo) e 2 mg por via intramuscular de benzoato de estradiol (Gonadiol®, Zoetis, São Paulo). No Dia 8, o dispositivo de P4 foi removido e administrou-se por via intramuscular 25 mg de dinoprost trometamina (Lutalyse®, Zoetis, São Paulo), 300 UI de gonadotrofina coriônica equina (ECG, Folligon®,

MSD, São Paulo) e 1 mg de cipionato de estradiol (CE; Ferticare Ovulação®, MSD, São Paulo). No Dia 17, foi realizada ultrassonografia ovariana para verificação de ciclicidade, e as vacas com presença de corpo lúteo foram submetidas a transferência de um embrião. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a transferência por meio de ultrassonografia, e o diagnóstico comprobatório foi realizado aos 60 dias.

### 2.3.11 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando procedimentos do Statistical Analysis System (SAS Inst., Inc., Cary, NC, US). As variáveis foram testadas quanto à normalidade. Para as análises de variância e de correlação, as variáveis que não apresentaram distribuição normal foram transformadas. O valor de lambda apropriado foi obtido por meio da análise de transformação Box-Cox, utilizando o procedimento TRANSREG, e as variáveis rima, média do diâmetro dos ovários esquerdo e direito (XOV), folículos totais, total de oócitos, oócitos viáveis, oócitos inviáveis, total clivados, e blastocistos por OPU foram transformadas dependendo do valor de lambda.

O efeito da categoria de idade ( $i=1, 2, 3$ ) foi estimado usando o procedimento MIXED, considerando medidas repetidas ( $j=1, 2, 3$  OPU) e ajustando um modelo que incluiu os efeitos fixos de categoria de idade, OPU e a interação. Nas análises das variáveis da produção embrionária, o efeito de touro ( $k=1, 2, 3$ ) foi considerado como aleatório. A variância residual foi modelada considerando a estrutura de (co) variância CS (*compound symmetry*). As médias de quadrados mínimos (LSMEANS) foram comparadas entre as categorias de idade por meio da probabilidade de diferença (PDIFF) usando o teste t. Diferença estatística foi declarada quando  $P \leq 0,05$ . O efeito da categoria de idade nas variáveis taxa de clivagem, taxa de blastocistos, e taxa de gestação aos 30 e 60 dias foi estimado usando o procedimento GLIMMIX com função logit que leva em conta a resposta binomial envolvida na razão número de sucessos/número de eventos, ajustando os mesmos modelos descritos acima. Correlações de Pearson foram estimadas entre as variáveis estudadas, por categoria de idade, considerando as 3 OPU como observações independentes.

## 2.4 Resultados

Na Tabela 1 são mostradas as médias de quadrados mínimos das medidas do trato genital externo (comprimento da rima e largura da vulva), média do diâmetro dos ovários direito e esquerdo (XOV), número de folículos aspirados, oócitos recuperados e embriões produzidos por OPU em novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas. Como esperado, para as medidas do trato genital externo foi observado que o comprimento da rima ( $7,85 \pm 0,25$  cm,  $8,40 \pm 0,20$  cm, e  $9,56 \pm 0,30$  cm para novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas) e largura da vulva ( $4,60 \pm 0,11$  cm,  $5,58 \pm 0,09$  cm, e  $6,09 \pm 0,13$  cm) foi maior em vacas em comparação às novilhas pré-púberes e novilhas púberes. O comprimento da rima foi similar entre novilhas pré-púberes e novilhas púberes ( $P=0,10$ ), enquanto a largura da vulva foi menor nas novilhas pré-púberes que nas novilhas púberes ( $P<0,01$ ).

Nas avaliações realizadas por ultrassonografia, a média dos diâmetros dos ovários (XOV) ( $20,0 \pm 0,57$  mm,  $20,8 \pm 0,46$  mm, e  $25,96 \pm 0,67$  mm para novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas) e o número total de folículos foi maior em vacas do que em novilhas pré-púberes e novilhas púberes. Entretanto, não foi observada diferença entre novilhas pré-púberes e novilhas púberes, tanto para XOV ( $P=0,23$ ) quanto para número total de folículos ( $P=0,59$ ). Quando analisado o diâmetro folicular, vacas apresentaram maior número de folículos  $<5$ mm, que novilhas pré-púberes e púberes ( $30,0 \pm 5,3$ ,  $31,7 \pm 4,2$ , e  $54,5 \pm 6,2$  folículos para novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas), o mesmo ocorreu para número de folículos entre 5-8 mm. Entretanto, novilhas púberes e vacas apresentaram número semelhante de folículos  $>8$ mm, sendo maior que as novilhas pré-púberes. Vacas também apresentaram maior número de oócitos totais, de oócitos viáveis e de oócitos inviáveis quando comparado às fêmeas mais jovens (novilhas pré-púberes e novilhas púberes) (Tabela 1).

A produção *in vitro* de embriões foi avaliada pelo número de oócitos clivados, taxa de oócitos clivados (%), número de blastocistos produzidos por OPU e taxa de blastocisto (%). O número de oócitos clivados foi maior na categoria das vacas ( $21,14 \pm 4,22$ ) quando comparada às categorias de novilhas pré-púberes ( $13,09 \pm 3,72$ ) e novilhas púberes ( $12,40 \pm 3,19$ ), que foram similares entre si. Entretanto, quando a taxa de oócitos clivados foi analisada (relação entre oócitos viáveis e oócitos clivados), não foi observada diferença entre as categorias de idade. Do mesmo modo, o número de blastocistos produzidos por OPU foi similar entre as categorias de fêmeas avaliadas (novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas).

**Tabela 1-** Médias de quadrados mínimos das medidas do trato genital externo, média do diâmetro dos ovários direito e esquerdo (XOV), número total de folículos aspirados, total de oócitos recuperados e embriões produzidos em três OPU (0, 21 e 42) em dias aleatório do ciclo estral

Variável	Categoria de idade			<i>P</i> valor categoria	<i>P</i> valor comparação		
	Novilhas pré-púberes	Novilhas púberes	Vacas		Novilhas PP vs. Novilhas P	Novilhas PP vs. Vacas	Novilhas P vs. Vacas
Rima (cm)	7,85 ± 0,25	8,40 ± 0,20	9,56 ± 0,30	0,0007	0,10	0,0002	0,004
Vulva (cm)	4,60 ± 0,11	5,58 ± 0,09	6,09 ± 0,13	0,0001	0,0001	0,0001	0,003
XOV (mm)	20,0 ± 0,57	20,8 ± 0,46	25,96 ± 0,67	0,0001	0,23	0,0001	0,0001
Folículos <5mm (n)	30,0±5,3	31,7±4,2	54,5±6,2	0,01	0,70	0,005	0,007
Folículos 5-8 mm (n)	1,7±0,36	1,8±0,29	2,4±0,43	0,009	0,71	0,004	0,006
Folículos >8mm (n)	1,0±0,16	1,3±0,12	1,0±0,19	0,05	0,07	0,59	0,03
Folículos totais (n)	32,87 ± 5,32	35,0 ± 4,28	58,68 ± 6,26	0,007	0,59	0,003	0,006
Total oócitos (n)	28,93 ± 6,14	27,21 ± 4,94	45,97 ± 7,22	0,04	0,73	0,02	0,02
Oócitos viáveis (n)	20,60 ± 5,12	19,05 ± 4,12	34,14 ± 6,01	0,06	0,96	0,04	0,02
Oócitos inviáveis (n)	6,96 ± 1,06	7,29 ± 0,85	10,03 ± 1,25	0,10	0,77	0,05	0,06
Total clivados (n)	13,09 ± 3,72	12,40 ± 3,19	21,14 ± 4,22	0,08	0,87	0,04	0,04
Taxa clivagem (%)	63,5 (432/680)	65,5 (637/972)	62,2 (498/800)	0,82	0,94	0,58	0,60
Blastocisto por OPU (n)	5,57 ± 1,99	6,66 ± 1,72	9,74 ± 2,26	0,20	0,42	0,07	0,22
Taxa de blastocistos (%)	27,1 (184/680)	35,4 (344/972)	28,3 (227/800)	0,14	0,07	0,68	0,14

Novilhas PP: novilhas pré-púberes; Novilhas P: novilhas púberes.

Na Tabela 2 são apresentadas as médias das taxas de gestação aos 30 e 60 dias de novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas, como porcentagem da razão entre o número de gestações confirmadas e o número de embriões transferidos. Os embriões produzidos através de oócitos de fêmeas pré-púberes e vacas apresentaram maior capacidade em desenvolver gestação aos 30 e 60 dias quando comparados às fêmeas púberes.

**Tabela 2-** Taxa de gestação aos 30 e 60 dias após transferência de embriões produzidos *in vitro* em novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas da raça Nelore

Variável	Categoria de idade			P valor
	Novilhas pré-púberes	Novilhas púberes	Vacas	
Taxa de gestação 30d, %	43,1 <sup>a</sup> (50/116)	33,8 <sup>b</sup> (62/183)	40,4 <sup>a</sup> (59/146)	0,03
Taxa de gestação 60d, %	41,3 <sup>a</sup> (48/116)	30,6 <sup>b</sup> (56/183)	39,0 <sup>a</sup> (57/146)	0,006

Letras minúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente ( $P \leq 0,05$ ).

Foram estimadas correlações de Pearson entre as medidas do trato reprodutivo externo (comprimento da rima e largura da vulva), média do diâmetro dos ovários direito e esquerdo (XOV) e número de folículos totais aspirados com total oócitos recuperados, oócitos viáveis, oócitos inviáveis e embriões produzidos por OPU, separadamente para as categorias novilhas pré-púberes, púberes e vacas (Tabela 3). De modo geral, XOV foi mediana e positivamente correlacionado (de 0,30 a 0,46) com quantidade e qualidade oocitária e embrionária nas novilhas pré-púberes e púberes, mas não nas vacas.

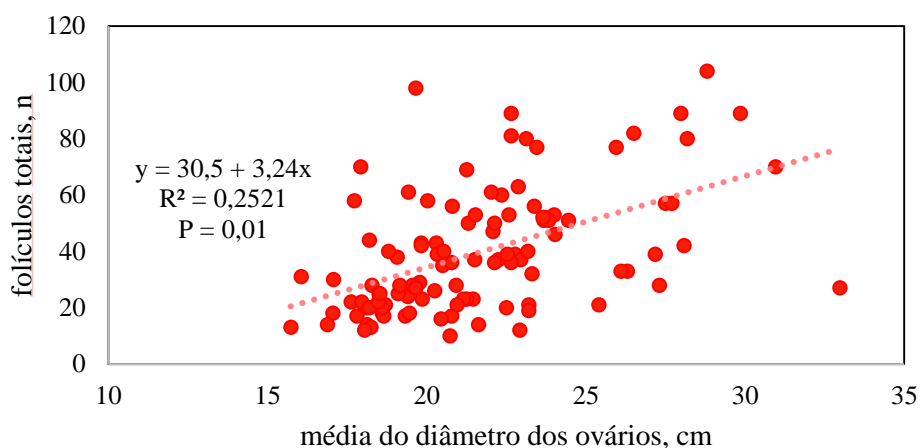
Por outro lado, o número total de folículos foi, em geral, altamente correlacionado com total de oócitos recuperados (de 0,68 a 0,91), oócitos viáveis (0,64 a 0,91), e oócitos inviáveis (0,36 a 0,72). As correlações do número total de folículos com as demais variáveis foram baixas e não significativas até próximas da unidade, dependendo da categoria de idade da fêmea. As correlações mais altas foram observadas nas novilhas pré-púberes e novilhas púberes. Entretanto, correlações não significativas foram obtidas entre número total de folículos com taxa de clivagem e taxa de blastocisto nas três categorias de idade.

**Tabela 3-** Coeficientes de correlação de Pearson significativos ( $P \leq 0,05$ ) entre comprimento de rima, largura de vulva, média do diâmetro dos ovários (XOV), e folículos totais com total oócitos, oócitos inviáveis, total clivados, taxa clivagem, blastocisto por OPU e taxa de blastocistos por categoria de idade de fêmeas Nelore

Novilhas pré-púberes				
	Rima	Vulva	XOV	Folículos Totais
Total oócitos	NS	NS	0,32	0,91
Oócitos viáveis	NS	-0,45	0,30	0,91
Oócitos inviáveis	-0,44	NS	NS	0,72
Total clivados	NS	NS	NS	NS
Taxa de clivagem	NS	NS	NS	NS
Blastocisto por OPU	NS	NS	0,32	0,79
Taxa de blastocistos	NS	NS	NS	NS
Novilhas púberes				
Total Oócitos	NS	NS	0,32	0,82
Oócitos viáveis	NS	NS	NS	0,78
Oócitos inviáveis	NS	NS	0,31	0,36
Total clivados	NS	NS	0,46	0,71
Taxa de clivagem	NS	NS	0,44	NS
Blastocisto por OPU	NS	NS	0,42	0,59
Taxa de blastocistos	NS	NS	0,40	NS
Vacas				
Total Oócitos	NS	NS	NS	0,68
Oócitos viáveis	NS	NS	NS	0,64
Oócitos inviáveis	NS	NS	NS	0,47
Total clivados	NS	NS	NS	0,57
Taxa de clivagem	NS	NS	NS	NS
Blastocisto por OPU	NS	NS	NS	NS
Taxa de blastocistos	NS	NS	NS	NS

NS: coeficiente de correlação não significativo ( $P \geq 0,05$ ).

A Figura 1 mostra a relação entre XOV e o número total de folículos por meio de análise de regressão. A relação entre as duas variáveis é fraca a média e positiva, portanto, XOV explica somente 25% da variação do número total de folículos, considerando conjuntamente os dados das três categorias de idade das doadoras.



**Figura 1** - Regressão linear entre média do diâmetro dos ovários e folículos totais considerando as três categorias de idade de fêmeas (novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas) da raça Nelore.

## 2.5 Discussão

As medidas do trato genital externo diferiram entre as três categorias de idade, o que pode ser explicado devido ao desenvolvimento do trato genital externo ser proporcional ao desenvolvimento corporal do animal (Mesquita et al., 2016). No presente estudo as vacas apresentaram maior proporção corporal quando comparado com as novilhas pré-púberes e púberes, assim como as novilhas púberes apresentaram maior proporção corporal que as novilhas pré-púberes. Em relação ao tamanho dos ovários (XOV), as três categorias de idade diferiram entre si, o que sugere que o tamanho dos ovários pode ter associação com presença de grandes quantidades de folículos antrais (Murasawa et al., 2005), uma vez que as vacas apresentaram maiores quantidades foliculares, seguidas pelas novilhas púberes e por último as novilhas pré-púberes.

A hipótese de que fêmeas pré-púberes apresentam maiores quantidades de folículos pequenos do que doadoras púberes e vacas não foi confirmada no presente estudo, contradizendo com os relatados na literatura. Landry et al. (2016) relataram que fêmeas pré-púberes apresentaram maior população de pequenos folículos quando comparado com fêmeas púberes. Assim como Erickson et al. (1966) relataram que fêmeas pré-púberes apresentam maiores quantidade de folículos pequenos quando comparado com fêmeas mais velhas. A baixa quantidade de folículos pequenos observados na categoria das novilhas pré-púberes pode estar relacionado a nutrição, uma vez que no momento da aspiração as fêmeas apresentavam baixo peso e condição corporal. A nutrição pode alterar as concentrações de

hormônios e metabólitos circulantes principalmente insulina e o fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), que estão diretamente envolvidos no eixo-hipotálamo hipófise gonadal, o que pode levar a alterações no desenvolvimento folicular (Sartori et al., 2016).

Com relação aos folículos médios (5-8mm) e grandes (>8mm), foi observado maior quantidade nas vacas quando comparado com as novilhas pré-púberes. Esse resultado pode ser explicado devido as novilhas pré-púberes apresentarem imaturidade do eixo hipotálamo-hipófise, que causa diminuição na concentração de hormônios responsáveis pelo crescimento folicular (Adams et al., 1994), acarretando em baixo desenvolvimento, e por isso as novilhas pré-púberes tendem a apresentar folículos com menor diâmetro quando comparado com doadoras mais velhas.

Não houve diferença no número de folículos aspirados nas novilhas pré-púberes e nas novilhas púberes, mas a categoria das vacas apresentou maiores quantidade de folículos aspirados. Esses resultados foram semelhantes com os descritos por Guerreiro (2015), que relatou que novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas não lactantes apresentaram quantidade de folículos semelhantes quando aspirados, assim como Silva (2020) que também não relatou diferença no número de folículos aspirados em novilhas pré-púberes e novilhas púberes, indicando que a utilização de fêmeas pré-púberes é eficaz na PIVE uma vez que a quantidade de folículos observados é um fator considerável na maior obtenção de embriões.

A taxa de recuperação oocitária foi semelhante na categoria das novilhas pré-púberes e púberes, porém assim como a quantidade de oócitos viáveis e inviáveis, a recuperação oocitária foi superior na categoria das vacas. Isso pode ser explicado devido a categoria das vacas ter apresentado maior proporção de folículos aspirados. Guerreiro (2015) não relatou diferença na taxa de oócitos recuperados, assim como não relatou diferença na taxa de oócitos viáveis e inviáveis para novilhas pré-púberes, novilhas púberes e vacas não lactantes. Entretanto, Silva (2020) observou que novilhas púberes apresentaram maiores taxas de recuperação oocitária e de oócitos viáveis quando comparadas a novilhas pré-púberes. A taxa de recuperação oocitária tem relação com a qualidade dos oócitos obtidos de folículos antrais por meio de aspiração folicular. Fêmeas pré-púberes tendem a ter folículos menores o que leva a oócitos com diâmetro inferior (Landry et al., 2016), e o diâmetro tem relação com a competência oocitária (Gandolfi et al., 1998). Assim, pelo fato de as vacas apresentarem maiores quantidades foliculares, as chances de apresentarem altas taxas de oócitos viáveis e não viáveis é maior.

A capacidade de clivagem tem relação com a qualidade oocitária e fêmeas pré-púberes apresentam qualidade oocitária inferior quando comparado com vacas (Rizos et al., 2005). No presente estudo foi observado que o número de oócitos clivados foi maior na categoria das vacas quando comparado com as novilhas pré-púberes e púberes demonstrando que oócitos de fêmeas mais velhas apresentam maior capacidade de clivagem quando comparado com oócitos de fêmeas jovens. Entretanto, quando se fala de PIVE, o número de oócitos clivados torna-se secundário, uma vez que o objetivo principal é obter maiores números de produção de blastocistos e não de clivagem (Mello et al., 2016).

Em relação a produção embrionária, ou seja, blastocistos por OPU e taxa de blastocistos, não foram detectadas diferenças entre as três categorias de idade. Esses resultados diferem dos resultados de Presicce et al. (1997), os quais relataram que fêmeas pré-púberes e púberes apresentam piores taxas de blastocistos quando comparadas com vacas, e diferem também do estudo de Camargo et al. (2005), que relataram que novilhas pré-púberes apresentaram menor taxa de blastocisto, quando comparadas a vacas. Apesar do resultado observado no presente estudo diferir dos encontrados em literatura, pode-se interpretá-lo de maneira positiva, uma vez que a ausência de diferença estatística nas três categorias de idade quanto ao número de blastocistos produzidos e taxa de blastocistos, indica que a utilização de fêmeas pré-púberes ou púberes não afetará a PIVE.

Quanto às taxas de gestação de embriões transferidos aos 30 e 60 dias, os resultados do presente estudo diferem em relação a outros estudos. Khatir et al. (1998) relataram que oócitos obtidos de fêmeas pré-púberes apresentaram menor capacidade de estabelecer gestação, além de maior perda gestacional quando comparado com oócitos obtidos de vacas. Este fato indica que baixa viabilidade pode ocorrer devido a deficiência na expressão de proteínas e metabólicos, e diferença no número de células (Khatir et al., 1998). Silva (2020) também não relatou diferença na taxa de gestação aos 30 e 60 dias de fêmeas pré-púberes e fêmeas púberes. Guerreiro (2015) observou que a taxa de gestação de fêmeas pré-púberes foi inferior às obtidas de vacas lactantes e não lactantes, entretanto foi semelhante quando comparado com fêmeas púberes. Uma hipótese da diferença dos resultados do presente estudo com os citados acima pode ser devido a fatores ligados a receptora, cujos dados não estavam disponíveis, uma vez que os embriões foram transferidos em um rebanho comercial, porém acredita-se que a distribuição dos embriões nas receptoras tenha sido aleatória, o que permitiu a aleatorização dos efeitos de idade, condição corporal e de saúde das receptoras nas categorias de idade de doadoras avaliadas.

As correlações das medidas do trato genital externo (vulva e rima) com a produção oocitária e embrionária foram diferentes dos valores reportados na literatura. Vasconcelos et al. (2020), em estudo com fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus*, relataram que fêmeas *Bos taurus* com largura vulvar pequena apresentaram menor quantidade de oócitos viáveis, enquanto não houve diferença entre largura vulvar e quantidade oocitária em fêmeas *Bos indicus*. Já Mesquita et al. (2016) relataram que o tamanho do trato genital externo quando correlacionado com o tamanho corporal de fêmeas da raça Tabapuã tem associação com a qualidade oocitária.

A correlação entre XOV e produção oocitária e embrionária foi positiva e mediana somente na categoria das novilhas pré-púberes e púberes, mas não na categoria das vacas. O resultado obtido na categoria das novilhas pré-púberes e púberes indica que o tamanho ovariano pode influenciar na quantidade folicular, conforme demonstrado por outros estudos (Murasawa et al., 2005; Ireland et al., 2008; Crane e Muirhead et al., 2020). Este resultado sugere que XOV pode ser utilizado para prever a reserva ovariana tanto em fêmeas pré-púberes quanto fêmeas púberes.

O número de folículos totais foi positivamente e altamente correlacionado à produção oocitária em todas as categorias de idade, o que mostra que a quantidade folicular é um bom indicativo da produção oocitária final (Silva-Santos et al., 2014). Esses resultados indicam que a quantidade folicular influencia na PIVE, pois quanto maior o número de folículos, melhores são os resultados na PIVE (Santos et al., 2016). Além disso, a utilização de fêmeas pré-púberes em programas de PIVE é eficaz, uma vez que a quantidade folicular de novilhas púberes e pré-púbere é semelhante, sendo assim quando se utiliza fêmeas pré-púberes para PIVE é possível obter produção embrionária semelhante à de doadoras púberes.

Ao analisar a relação da XOV com folículos totais das três categorias de idade, foi possível observar uma relação positiva, porém de fraca a média magnitude. Conjuntamente, os resultados indicam que XOV pode ser uma medida útil para ser usada como indicativo de quantidade folicular, resultado semelhante aos relatados em outros estudos (Murasawa et al., 2005, Ireland et al., 2008; Crane e Muirhead et al., 2020).

### 3 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que as vacas apresentam maior produção folicular e oocitária quando comparado com as fêmeas mais jovens (novilhas pré-púberes e novilhas púberes). Entretanto, foi demonstrado que quando as três categorias foram submetidas a fertilização *in vitro* não houve diferença na produção de blastocistos.

As medidas do trato genital externo não apresentaram correlação com as variáveis relacionadas a produção *in vitro* de embriões, excluindo a hipótese que tais parâmetro são bons indicadores para prever seu sucesso. Entretanto, a média do diâmetro dos ovários e o número de folículos totais apresentou correlação média a alta com as variáveis relacionadas a produção *in vitro* de embriões, o que confirma a hipótese que essas variáveis tem relação com o sucesso da produção *in vitro* de embriões.

Entretanto, são necessários mais estudos em doadoras jovens da raça Nelore para melhorar a eficiência dessa categoria na produção *in vitro* de embriões, possibilitando maximizar o uso de animais com alto valor genético em características importantes para a produção de carne em um curto espaço de tempo.

## REFERÊNCIAS

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

ADAMS, G.P.; JAISWAL, SINGH, R.; J.; MALHI P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, p.72-80, 2008.

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

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

Associação Brasileira das indústrias Exportadoras de Carnes Bovinas (ABIEC). Beef Report Perfil da Pecuária no Brasil, 2019. 31-32 p. Disponível em: <http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2019/>. Acesso em: 10 de julho de 2020.

BARBOSA TONIOLLO, G.H.; GUIMARÃES, E.C. Produção *in vitro* de embriões de bovinos da raça nelore oriundos de ovócitos de ovários com e sem corpo lúteo. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, p. 81-90, 2013., C.P.;

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

BARUSELLI, P.S.; CATUSSI, B.L.C.; ABREU, L.A.; ELLIFF, F.M.; SILVA, L.G.; BATISTA, E.S.; CREPALDI, G.A. Evolução e perspectivas da inseminação artificial em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.43, p.308-314, 2019.

BREVINI-GANDOLFI, T.A.L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, p.1255-1276, 2001.

BRITT, J.H. Oocyte development in cattle: physiological and genetic aspects. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.110-115, 2008.

BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J.J. Numbers of Antral Follicles During Follicular Waves in Cattle: Evidence for High Variation Among Animals, Very High Repeatability in Individuals, and an Inverse Association with Serum Follicle-Stimulating Hormone Concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, p. 54–62, 2005.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VALE FILHO, V.R. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 85, p. 53–59, 2005.

CARVALHO, J.G.S.; 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*) donos. **Theriogenology**, v.138, p.164-168, 2019.

CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.37-49, 2010.

CRANE, M.B.; MUIRHEAD, T.L. Evaluation of ovarian volume by transrectal ultrasonography in cattle; effect of the day of the estrous cycle and validation of a method of subtracting of corpora lutea and follicle volume. **Animal Reproduction Science**, v. 214, 2020.

CUSHMAN, R. A.; ALLAN, M. F.; KUEHN, L. A.; SNELLING, W. M.; CUPP, A. S.; FREETLY, H. C. Evaluation of antral follicle count and ovarian morphology in crossbred beef cows: Investigation of influence of stage of the estrous cycle, age, and birth weight<sup>1,2</sup>. **Journal of Animal Science**, v.87, p. 1971–1980, 2009.

DODE, M.A.N. Advances on bovine oocyte maturation. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34 p.115-129, 2006.

ERICKSON, B. H. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. **Journal of Animal Science**, v. 25, p. 800–805, 1966.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Representante da FAO Brasil apresenta cenário da demanda por alimentos. <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/901168/>. 2017. Acesso em: 10 de julho de 2020.

FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.143-152,2007.

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

GANDOLFI, F.; MILANESI, E.; POCAR, P.; LUCIANO, A.M.; BREVINI, T.A.L.; ACOCELLA, F.; LAURIA, A.; ARMSTRONG, D.T. Comparative Analysis of Calf and Cow Oocytes During *In Vitro* Maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 49, p.168–175, 1998.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, p.212-217, 2007.

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

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Fertilização e Clivagem. **Reprodução Animal**, v.7, p.127-142, 2004.

HODGEN, G.D. The dominant ovarian follicle. **Fertility and Sterility**, v. 37, p. 281-300, 1982.

IRELAND, J.L.H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMEN, A.P.N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G.I.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Antral Follicle Count Reliably Predicts Number of Morphologically Healthy Oocytes and Follicles in Ovaries of Young Adult Cattle. **Biology of Reproduction**, v.79, p.1219–1225, 2008.

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

KHATIR, H.; LONERGAN, P.; TOUZ, J-L.; MERMILLOD, P. The characterization of bovine embryos obtained from prepubertal calf oocytes and their viability after non surgical embryo transfer. **Theriogenology**, v. 50, p.1201-1210, 1998.

KÖNIG, H.E.; LIEBICH, H.G. Órgãos Genitais. Anatomia dos Animais Domésticos. 6ª edição, p.429-450, 2016.

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

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M.P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.48-53, 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. **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.259–267, 2003.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHERS, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, v.70, p. 3615–3626, 1992.

MACULAN, R.; PINTO, T.L.C.; MOREIRA, G.M.; VASCONCELOS, G.L.; SANCHES, J.A.; ROSA, R.G.; BONFIM, R.R.; GONÇALVES, T.M.; DE SOUZA, J.C. Anti-Müllerian Hormone (AMH), antral follicle count (AFC), external morphometrics and fertility in Tabapuã cows. **Animal Reproduction Science**, v.189, p. 84-92, 2017.

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

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

MALHI, P. S.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; SINGH, J. Bovine model of reproductive aging: Response to ovarian synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, v.66, p.1257–1266, 2006.

MARCHAL, R.; FEUGANG, J.M.; PERREAU, C.; VENTURI, E.; TERQUI, M.; MERMILLOD, P. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. **Theriogenology**, v.56, p.17-29, 2001.

MARTINS, F.S.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.36-49, 2008.

MELLO, R. R. C.; MELLO, M. R. B.; DE SOUSA, S. L. G.; FERREIRA, J. E. Parâmetros da produção *in vitro* de embriões da raça Sindi. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.51, p.1773–1779, 2016.

MESQUITA, N.F.; MACULAN, R.; MACIEL, L. F. S.; ALVES, N.; DE CARVALHO, R.R.; MOREIRA, G.M.; DE SOUZA, J.C. Vulvar width and rima length as predictors of the ovarian follicular reserve in bovine females. **Journal of Reproduction and Development**, v. 62, p..587-590, 2016.

MONNIAUX, D.; CLÉMENT, F.; DALBIÈS-TRAN, R.; ESTIENNE, A.; FABRE, S.; MANSANET, C.; MONGET, P. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: What Is the Link?. **Biology of Reproduction**, v.90, p.1-11, 2014.

MURASAWA, M.; TAKAHASHI, T.; NISHIMOTO, H.; YAMAMOTO, S.; HAMANO, S.; TETSUKA, M. Relationship between ovarian weight and follicular population in heifers. **Journal of Reproduction and Development**, v.51, p. 689-693,2005.

Organização das Nações Unidas (ONU). População mundial deve chegar a 9,7 bilhões de pessoas em 2050, diz relatório da ONU. Brasil: Nações Unidas Brasil, 2019. Disponível em: <https://nacoesunidas.org/populacao-mundial-deve-chegar-a-97-bilhoes-de-pessoas-em-2050-diz-relatorio-da-onu/>. Acesso em:10 de julho de 2020

O'BRIEN, J. K.; CATT, S. L.; IRELAND, K. A.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. *In vitro* and *in vivo* developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep. **Theriogenology**, v.47, p.1433-1443, 1997.

OTOI, T.; YAMAMOTO, K.; KOYAMAL, N.; TACHIKAWAL, S.; SUZUKI, T. Bovine oocyte diameter in relation to developmental competence. **Theriogenology**, v.48, p.769-774, 1997.

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

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

RIZOS, D.; BURKE, L.; DUFFY, P.; WADE, M.; MEE, J. F.; O'FARRELLB 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, p. 939-949, 2005.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; DUFFY, M.P, LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234-248, 2002.

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

SANTOS, G. M. G.; SILVA-SANTOS, K. C.; BARREIROS, T. R. B.; MOROTTI, F.; SANCHES, B. V.; MORAES, F. L. Z.; BLASCHI, W.; SENEDA, M. M. High numbers of antral follicles are positively associated with *in vitro* embryo production but not the conception rate for FTAI in Nelore cattle. **Animal Reproduction Science**, v.165, p.17-21, 2016.

SARTORI, R.; SPIES, C.; WILTBANK M. C. Effects of dry matter and energy intake on quality of oocytes and embryos in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, p. 58-65, 2017.

SENEDA, M.M.; SANTOS, G.M.G.; SILVA, K.C.F.; SPEGIORIN, M.R.; BLASCHI, W.; PONTES, J.H.F. Situação atual da aspiração folicular e da fecundação *in vitro*. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2, Londrina. **Anais...** Londrina, p.172-180, 2006.

SILVA, L.G. **Produção *in vitro* de embriões de novilhas Nelore (*Bos indicus*) de 12 e 24 meses de idade tratadas ou não com FSH**. 2020.68p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; KOETZ JUNIOR, C.; MOROTTI, F.; SILOTO, L.S.; MARCANTONIO, T.N.; URBANO, M.R.; OLIVEIRA, R.L.; LIMA, D.C.M.;

SENEDA, M.M. Antral follicle populations and embryo production – *in vitro* and *in vivo* – of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, p.228–232,2014.

SNEL-OLIVEIRA, M.V.; PEREIRA, D.C.; MALAGOLI JUNIOR.; RUMPF, R. Estimulação hormonal, punção folicular transvaginal e avaliação ovocitária em bezerras pré-púberes da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.106-114, 2003.

TANEJA, M.; BOLS, P. E.J.; VAN DE VELDE, A.V.; JU, J. C.; 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. **Biology of Reproduction**, v.62, p.206–213, 2000.

TORRES, A.; BATISTA, M.; DINIZ, P.; SILVA, E.; MATEUS, L.; LOPES-DA-COSTA, L. Effects of oocyte donor age and embryonic stage of development on transcription of genes coding for enzymes of the prostaglandins and progesterone synthesis pathways in bovine *in vitro* produced embryos. **Zigot**, v.23, p.802-812, 2014.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.

VASCONCELOS, G. L., CUNHA, E. V., MACULAN, R., VIAFARA, J.A.S., SILVA, A.W.B., BATISTA, A. L. S., SILVA, J.R.V., SOUZA, J.C. Effects of vulvar width and antral follicle count on oocyte quality, *in vitro* embryo production and pregnancy rate in *Bos taurus taurus* and *Bos taurus indicus* cows. **Animal Reproduction Science**, v. 217, 2020.

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, p.318-324, 2014.

WAGNER, J.J.; LUSBY, K.S.; OLTJEN, J.W.; RAKESTRAW, J.; WETTEMANN, R.P.; WALTERS, L.E. Carcass composition in mature Hereford cows: estimation and effect on daily metabolizable energy requirement during winter. **Journal of Animal Science**, v. 66, p. 603-612, 1988.

WATANABE, O.Y.; SCHMITT, E.; MEIRELLES, F.V.; OLIVEIRA, A.; BOS-MIKICH, A.; WATANABE, Y.F. Vitrification system (open and closed) in new incubator with reduced oxygen. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, p.158, 2014.

WATANABE, Y.F.; WATANABE, M.R.; VILA, R.A.; GALERANI, M.A.V.; LÔBO, R.B. The influence of b2 and a modified cr-2 medium on the in vitro production of bovine embryos with cumulus and oviduct co-culture. **Theriogenology**, v. 51, p.259, 1999.