

**LUIS EDUARDO PEREIRA DE ANDRADE FERREIRA**

**A INFLUÊNCIA DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA  
NA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E QUALIDADE  
EMBRIONÁRIA EM GADO *BOS INDICUS***

**GARANHUNS**

**2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE  
RUMINANTES**

**LUIS EDUARDO PEREIRA DE ANDRADE FERREIRA**

**A INFLUÊNCIA DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA  
NA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E QUALIDADE  
EMBRIONÁRIA EM GADO *BOS INDICUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

**GARANHUNS**

**2014**

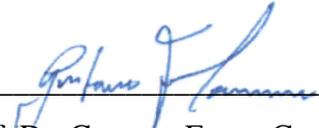
**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO**  
**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E REPRODUÇÃO DE**  
**RUMINANTES**

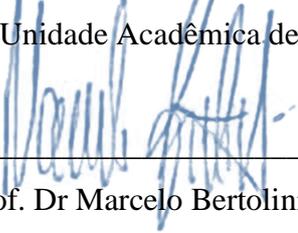
**A INFLUÊNCIA DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA**  
**NA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E QUALIDADE**  
**EMBRIONÁRIA EM GADO *BOS INDICUS***

Dissertação elaborada por  
**LUIS EDUARDO PEREIRA DE ANDRADE FERREIRA**

Aprovado em ...../...../.....

**BANCA EXAMINADORA**

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro  
Presidente da Banca - Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Marcelo Bertolini  
Universidade de Fortaleza - UNIFOR

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Claudio Coutinho Bartolomeu  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

\_\_\_\_\_  
Dr. André Mariano Batista  
Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação:

aos meus pais,

Antônio Francisco de A. Ferreira e Ângela Maria P. de A. Ferreira,  
que me deram a vida

e a minha noiva,

Aline Cristiane Araújo Chalegre,  
que escolhi para dividi-la.

**Esta é uma vitória nossa.**

## AGRADECIMENTOS

Finalizando mais uma etapa de minha vida e a conclusão de um objetivo que não poderia vir a acontecer sem a interferência de muitas pessoas, venho neste momento perpetuar um agradecimento sincero a todos que participaram e participam de minha formação. Desta forma eu agradeço:

Aos meus pais, Antônio Francisco de Andrade Ferreira e Ângela Maria P. de Andrade Ferreira, principais responsáveis de eu estar onde estou, e por serem grandes exemplos de luta e superação. Deixando-me sempre a lição de ser persistente na busca dos meus objetivos e por me ensinar a ficar de pé sempre que obstáculos tentam nos derrubar. Não bastante agradeço pela participação efetiva no desenvolvimento do nosso experimento.

Estendendo tal importância aos meus irmãos, Fátima Daniele, João Luis e Antônio Francisco Filho, pela convivência vivida por anos, que hoje sinto falta, os quais nos tornaram as pessoas que somos. Além de servirem de parâmetros de dedicação, responsabilidade e sucesso em minha carreira profissional. Agradeço ainda pelo exemplo de família que hoje constroem junto com seus parceiros, Tomaz, Joanda e Mayara, e a estes pela paciência que tem com eles.

Com igual importância agradeço a minha noiva Aline Cristiane Araújo Chalegre, por ter visto em mim algo que nem eu mesmo enxergo e demonstrando paciência, compreensão e amor em todos os momentos vividos, fáceis ou difíceis, acreditando em mim. Ainda por participar efetivamente de minha vida acadêmica, ajudando e dando suporte para que este trabalho tenha sido desenvolvido. Assim como também pela compreensão dos dias ausentes e momentos de lazer deixados de lado durante a elaboração de nosso trabalho. Além disso, agradeço por proporcionar a ampliação de minha família, me deixando participar da sua. Desta forma agradeço a Sr. Arnaldo, Dona Socorro, Ana Carolina, Alessandro, Carlos e Tamires, pelo exemplo de família que são.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro por vir cumprindo uma função difícil quer seja como orientador acadêmico ou de vida. Propiciando-me o encontro com seu vasto conhecimento e estilo de viver, estimulando-me a seguir desenvolvendo nossas atividades de maneira entusiasmante.

Não podendo esquecer aqueles que compõem a Clínica de Bovinos de Garanhuns (CBG) da qual fui residente, como: técnicos, residentes e funcionários, que não tive a

oportunidade de agradecer por escrito durante a residência e que continuaram a participar de minhas atividades durante o mestrado, no nome de José Rodolfo, Alexandre Tadeu e Alonso Filho. De forma especial agradeço a uns dos médicos veterinários da CBG, Dr José Augusto Bastos Afonso o qual, sem nenhuma obrigação que seja, continuou a me orientar em questões de vida e profissionais, me aconselhando em momentos decisivos para minha formação e participando efetivamente da elaboração de minha dissertação.

Ao programa de Pós-Graduação em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, no nome da vice-coordenadora Carla Lopes Mendonça, pela oportunidade apresentada, por todos os ensinamentos e preocupações com o andamento de nosso projeto. Assim como a CAPES pelas ajudas financeiras que propiciaram o desenvolver deste trabalho, e o laboratório Coopers, pela doação de parte do material utilizado.

Agradeço também a todos que fazem a Fazenda Murici em Canhotinho-PE, onde realizamos nosso experimento. Local que sempre fui bem recebido, carregando comigo ótimas amizades e lembranças, que nada pode abalar, e onde um dia pretendo retornar.

Aos doutores que formam a banca examinadora, os quais não foram escolhidos ao acaso, e sim por mérito. Prof. Dr. Marcelo Bertolini pelos ensinamentos passados e por disponibilizar seu laboratório e equipe para desenvolver uma etapa de nosso trabalho. A Prof. Dra. Sildivane Valcácia Silva pela ajuda em etapas do nosso experimento. Ao Prof. Dr. Claudio Coutinho Bartolomeu pelos ensinamentos passados no desenvolver do projeto desse mestrado.

Agradeço ao medico veterinário Romero Cintra pela disponibilidade, mesmo em momentos difíceis, em nos presentiar com sua experiência em etapas decisivas do experimento. Não medindo esforços para cumprir com sua palavra.

Aos amigos e amigas, tanto antigos como novos, no nome de Jomel Francisco dos Santos e Pollyanne Raissa que de algum modo ajudaram na realização dessa dissertação. Principalmente aqueles que me acompanharam durante todo o processo, deixando com certeza momentos inesquecíveis, os quais contribuíram para a formação da pessoa e do profissional que hoje sou.

A todos que fazem parte de minha família agradeço pelos bons momentos propiciados e peço desculpas pela ausência em muitos momentos no decorrer dos últimos quatro anos, dois de residência e dois de mestrado, representados aqui pelas minhas tias, Maria de Lurdes, Verônica e Helena, meu tios Carlos e Mário, meus primos, Mário, Rafael e Carlos. Assim como aos meus avós sem os quais nenhum de nós estaria aqui, João Luis

Ferreira (in memoriam), Ana Gertrudes de Andrade Ferreira, Joel Pereira da Silva e Carmelita Pereira da Silva, exemplos de dignidade e fibra.

De forma alguma poderia esquecer de agradecer a todos os animais, mesmo sem que saibam, através dos meus amigos Tróia, Duque, Lua e Simba por sempre deixarem acesa a vontade de seguir sendo veterinário e me ensinando a respeitar sua condição e importância. Afirmando que o caráter de alguém pode ser medido por como ele se apresenta perante os mais fracos. Assim lembro em agradecer, aos animais que propiciaram o desenvolvimento do experimento e peço perdão por algum desconforto que os tenha causado.

Finalmente agradeço a Deus, maior responsável por tudo que acontece. Propiciando-me capacidade em desenvolver mais esta etapa, assim como tantas outras, além de colocar no meu caminho todas essas pessoas, e outras que talvez não tenha nomeado, sem as quais não seria possível vencer.

# A INFLUÊNCIA DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA NA RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA E QUALIDADE EMBRIONÁRIA EM GADO *BOS INDICUS*

## RESUMO

A eficiência das diferentes biotécnicas aplicadas à reprodução da fêmea bovina está intimamente relacionada à qualidade dos folículos ovulatórios. A somatotropina recombinante bovina (r-bST) tem sido descrita como estimuladora dos folículos e oócitos. Nesse trabalho avaliou-se sua influência na resposta superovulatória e na qualidade dos embriões de vacas *Bos indicus*, localizadas no agreste meridional de Pernambuco. Foram utilizadas 20 vacas, 10 no grupo controle e 10 no grupo tratamento (BST). Os animais do grupo BST foram medicados com 500 mg de r-bST e as controles com solução fisiológica estéril de sete em sete dias somando-se quatro aplicações até o início do protocolo de superovulação (SOV). Este se iniciou em dia aleatório do ciclo estral com a introdução do implante intravaginal de Progesterona (P4), associado a 2 mg de Benzoato de Estradiol, sendo considerado D0. No D4 se iniciou a estimulação folicular com 200 mg do Hormônio Folículo Estimulante, em oito doses decrescentes, com duas aplicações diárias. No D6 foi aplicado 0,5 mg de Cloprostenol, sendo a P4 retirado no D7 e 24 horas depois aplicado 1500 UI de Gonadotrofina Coriônica Humana, e inseminação feitas 12 e 24 horas depois. Nos D15 e 16 foram realizadas as coletas dos embriões, pelo método não cirúrgico, avaliados, classificados e armazenados para avaliação do total de células por fluorescência. Todos os animais passaram por acompanhamento da dinâmica folicular nos dias de tratamento, da coleta e durante o protocolo de SOV e coleta dos embriões, sendo avaliados de sete em sete dias o seu escore de condição corporal (ECC). Os resultados obtidos foram analisados por ANOVA com nível de significância de 5%. O grupo BST apresentou diâmetro folicular e número de folículos mais elevados em alguns momentos e redução do ECC ( $p < 0,05$ ), sendo observada elevação numérica ( $p > 0,05$ ) no número de corpos lúteos, embriões totais e viáveis, além de uma maior proporção de estádios embrionários mais maduros. Assim, conclui-se que o r-bST possivelmente potencializa os resultados da SOV, apesar de não atingir o objetivo final que seria um maior número de embriões, mesmo sendo visto nestas condições experimentais um aumento numérico dos mesmos. Mais estudos com relação a forma de aplicação e a dose utilizada são necessário, devido a alta variabilidade dos resultados.

**Palavras-chave:** Hormônio do crescimento, dinâmica folicular, transferência de embrião, superovulação, Nelore.

# **THE INFLUENCE OF RECOMBINANT BOVINE SOMATOTROPIN (R-BST) ON SUPEROVULATORY RESPONSE AND EMBRYO QUALITY OF BOS INDICUS CATTLE**

## **ABSTRACT**

The efficiency of different biotechnologies applied to reproduction of the bovine female is closely related to the quality of ovulatory follicles. The recombinant bovine somatotropin (bST-r) has been described as stimulating follicle and oocyte. In this work we evaluated its influence on superovulatory response and embryo quality in *Bos indicus* cows, located at State of Pernambuco, Brazil. Twenty cows, 10 in control group and 10 in treatment group (BST) were used. The animals in the BST group were treated with 500 mg of r-bST and controls with sterile saline solution every seven days totaling four applications until beginning of superovulation protocol (SOV). This began on a random day of estrous cycle considered D0, with the introduction of intravaginal Progesterone device (P4) combined with 2 mg of estradiol benzoate. At D4 it started follicular stimulation with 200mg of Follicle Stimulating Hormone in eight decreasing doses, with two daily applications. At D6 0.5 mg of cloprostenol was administered, with the P4 being removed in D7 and 24 hours after 1500 IU of Human Chorionic Gonadotropin was administered, and artificial insemination was performed 12 and 24 hours later. In D15 and 16 collections of embryos were carried out by non-surgical method, evaluated, classified and stored for later evaluation by fluorescence microscopy. All animals underwent monitoring of follicular dynamics in the days of treatment, collection and during the SOV protocol and collection of embryos; body condition score (BCS) was evaluated every seven days. The results were analyzed by ANOVA with a significance level of 5% . The BST group showed follicular diameter and number of follicles significant higher at some moments and it was seen a significant reduction of ECC ( $p < 0.05$ ). In other hand, only a numeric increase ( $p < 0.05$ ) was observed in the number of corpus luteum, total and viable embryos. It was observed a higher proportion of embryonic development stages more mature in BST group. So it was concluded that r-bST favors a strengthening of the SOV, however not targeting the ultimate goal, or a greater number of embryos, although numerically this occurred. Further study are necessary on application form and dosage used, based upon high variability of the results showed in other studies.

**Keywords:** Growth hormone, follicular dynamics, embryo transfer, superovulation, Nelore.

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b> - Esquema demonstrando interações hormonais no controle da função reprodutiva da fêmea.....	18
<b>Figura 2</b> - Desenho esquemático do protocolo de sincronização de estro e superovulação com necessidade de observação de estro.....	20
<b>Figura 3</b> - Desenho esquemático do protocolo de sincronização de estro e superovulação com manutenção da P4 por 36 horas após $PGF_2\alpha$ .....	21
<b>Figura 4</b> - Desenho esquemático do protocolo de sincronização de estro e superovulação com P4 sendo retida 24 horas após a $PGF_2\alpha$ .....	22
<b>Figura 5</b> - Recuperação via transcervical de embriões do útero de uma fêmea doadora nos dias 6-8 após o estro.....	24
<b>Figura 6</b> - Desenho esquemático de introdução e controle do posicionamento do cateter de colheita.....	25
<b>Figura 7</b> - Desenho esquemático dos diferentes estádios embrionários segundo classificação da IETS (1998).....	26
<b>Figura 8</b> - Fotos de dois embriões em diferentes estágios e quantidade, marcados com Hoechst e avaliados em microscópio de fluorescência...	28

### ARTIGO CIENTÍFICO

<b>Figura 1</b> - Desenho esquemático do protocolo de sincronização de estro e superovulação com manutenção da P4 por 36 horas após $PGF_2\alpha$ .....	47
---	----

## LISTA DE GRÁFICOS

### ARTIGO CIENTÍFICO

	<b>Página</b>
<b>Gráfico 1 -</b> Distribuição das medias dos diâmetros foliculares (BST e Controle) de vacas Bos Indicos, da raça Nelore submetidas a superovulação.....	57

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1</b> - Critérios para avaliação de embriões bovinos segundo os parâmetros de qualidade de propositos pela IETS (1998).....	27
<b>Tabela 2</b> - Expressão de RNAm para o IGF-I, IGF-II e receptores de IGF em folículos do ovário de mamíferos.....	29

### ARTIGO CIENTÍFICO

<b>Tabela 1</b> - Medias dos diâmetros foliculares (BST e Controle) de vacas <i>Bos Indicus</i> , da raça Nelore submetidas a superovulação.....	57
<b>Tabela 2</b> - Total, medias ( $\bar{x}$ ) e percentes de Corpos Lúteos, folículos anavulatórios, estruturar recuperas, numero de blastómeros (BST e Controle) de vacas <i>Bos Indicus</i> , da raça Nelore submetidas a superovulação.....	58
<b>Tabela 3</b> - Percentagem dos estagios embrionarios dos grupos BST e Controle de vacas <i>Bos Indicus</i> , da raça Nelore submetidas a superovulação.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

ECC – Escore de Condição Corporal  
eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina  
FIV – Fecundação *in vitro*  
FSH – Hormônio Folicular Estimulante  
GH – Hormônio do Crescimento  
GHRH – Hormônio de Liberação do Hormônio do Crescimento  
GnRH – Hormônio Regulador da Gonadotrofina  
IA – Inseminação Artificial  
IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo  
IGF-I – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-I  
IGF-II - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-II  
kg - Quilograma  
LH – Hormônio Luteinizante  
mg - Miligrama  
ml – Mililitro  
mm - Milímetro  
PBF – Solução Salina Tampão-Fosfato  
PGF2  $\alpha$  – Prostaglandina F2  $\alpha$   
P4 - Progesterona  
r-bST – Somatotropina Recombinante Bovina  
RNAm – Ácidos Ribonucleicos Mensageiros  
TE – Transferência de Embrião  
SOV – Superovulação  
SRIF – Somatostatina

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	OBJETIVOS .....	16
2.1	GERAL .....	16
2.2	ESPECÍFICOS.....	16
3.	REVISÃO DE LITERATURA .....	17
3.1.1	OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE.....	17
3.2	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO POR SUPEROVULAÇÃO .....	19
3.2.1	PROTOCOLO DE SINCRONIZAÇÃO .....	20
3.2.2	SUPEROVULAÇÃO .....	22
3.2.3	INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL .....	23
3.2.4	COLHEITA DOS EMBRIÕES .....	23
3.2.5	AVALIAÇÃO EMBRIONÁRIA .....	25
3.3	HORMÔNIO DO CRESCIMENTO .....	28
3.3.1	OOGÊNESE, FOLICULOGÊNESE E O HORMÔNIO DO CRESCIMENTO .....	30
3.3.2	SUPEROVULAÇÃO E O HORMONIO DO CRESCIMENTO .....	31
4.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
5.	ARTIGO CIENTIFICO.....	40
6.	ANEXO .....	60

## 1. INTRODUÇÃO

A busca contínua por maior produtividade e consequente lucratividade em todos os setores socioeconômicos no mundo, incluindo a produção animal, leva ao estudo de medidas que aumentem a eficiência produtiva. Na pecuária uma das principais alternativas é a otimização reprodutiva do rebanho (VIANA, 2006).

Neste contexto as biotécnicas aplicadas à reprodução animal têm sido de enorme importância e produzido efeito positivo nos programas de melhoramento animal (FREITAS, 2007), além de propiciarem um rápido avanço na qualidade genética do rebanho mundial. No último censo realizado pelo IBGE (2012) o Brasil detinha 211,2 milhões de bovinos, ocupando o segundo lugar no “ranking” mundial e sendo o maior rebanho comercial do mundo. Mesmo assim o principal sistema de serviço é o regime de monta natural, que tem um crescimento genético e produtivo lento. Por isso, na pecuária brasileira técnicas visando aperfeiçoar programas de melhoramento genético e ampliações de rebanhos puros têm sido rapidamente adotadas, visto que existe uma grande demanda por animais geneticamente superiores (AGUIAR, 2008).

Dentre as biotécnicas, a inseminação artificial (IA) merece destaque, pois foi a primeira a ser desenvolvida e serve como ferramenta para muitas outras, contribuindo para a rápida disseminação genética dos machos (RENESTO, 2004). Porém com o advento da transferência de embrião (TE) por superovulação (SOV) e da fecundação *in vitro* (FIV), a genética das fêmeas passou a ser mais amplamente disseminada, possibilitando o nascimento de mais de uma cria por ano, nos bovinos, e sendo uma importante ferramenta para o melhoramento zootécnico (REICHENBACH *et al.*, 2002). A TE é uma técnica já bem difundida mundialmente, com considerável produção brasileira de embriões *in vivo* (38975), responsável por 14,8% da produção mundial (STROUD; CALLESEN, 2010). Porém existem inúmeros fatores que interferem nos resultados de cada tratamento, sendo a variabilidade na resposta das doadoras ao tratamento superovulatório um dos maiores problemas (BARROS; NOGUEIRA, 2004; BARUSELLI *et al.*, 2006).

Desta forma, práticas que possibilitem melhoria na qualidade e quantidade de folículos e oócitos, nos protocolos utilizados para a realização dessas biotécnicas possibilitariam uma melhoria nos resultados obtidos. Alguns autores estão estudando o análogo sintético recombinante da Somatotrofina bovina (r-bST), hormônio do crescimento (GH) amplamente utilizado para aumentar a produção leiteira, como um potencializador da

dinâmica folicular (GONG *et al.*, 1993; GONG *et al.*, 1996; LIU *et al.*, 1998; BURATINI *et al.*, 2000; LUCY, 2000; CUSHMAN, 2001; BACHELOT *et al.*, 2002; ; BARUSELLI *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2008; MORAIS, 2008; SILVA *et al.*, 2009; VASCONCELOS, 2009). O fato de folículos dominantes diferirem dos outros folículos antrais recrutados a um tempo similar, mesmo estando expostos ao mesmo ambiente gonadotrófico, sugere que as gonadotrofinas não são exclusivamente responsáveis pelo controle da foliculogênese, e que outros mecanismos podem estar envolvidos e desempenhar importante papel neste âmbito (GONG, *et al.*, 1993).

Buratini *et al.* (2005) e Webb *et al.* (2007) provaram que os fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF), mediadores da ação do GH, são de grande importância para os estágios iniciais da foliculogênese, de modo que eles regulam a foliculogênese pré-antral, podendo ser definidos como facilitadores do desenvolvimento folicular através de seu sinergismo com o hormônio folículo estimulante (FSH). Foi observado que folículos pré-ovulatórios maiores geram corpos lúteos maiores, que secretam maiores quantidades de progesterona (P4), melhorando assim o desenvolvimento embrionário inicial e consequentemente aumentando a taxa de prenhez em fêmeas bovinas (VASCONCELOS, 2009), além de estarem intimamente relacionados com uma melhor qualidade oocitária, o que garante uma maior quantidade de ácidos ribonucleicos mensageiros (RNAm) para proteínas responsáveis pela manutenção da viabilidade da gestação (MOTA, 2008).

Porém, em revisão de literatura realizada por Vasconcelos (2009) sobre o efeito do r-bST na reprodução bovina, demonstra-se que existem muitas divergências entre autores, incluindo o protocolo para a utilização da droga. Sá Filho *et al.* (2009), por exemplo, levantaram a hipótese de um possível efeito deletério no uso de altas doses de bST, devido a uma elevada concentração plasmática de IGF-I.

Diante deste preâmbulo e levando-se em consideração a importância da pecuária para a região em estudo, objetivou-se estudar a variação da resposta superovulatória e da qualidade embrionária em vacas *Bos indicus* (Nelore), submetidas a consecutivas aplicações do r-bST, na região do agreste meridional de Pernambuco.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Geral**

- Avaliar a qualidade dos embriões e a resposta superovulatória, em vacas *Bos indicus* (Nelore), no agreste Meridional Pernambucano, tratadas cumulativamente com r-bST.

### **2.2 Específicos**

- Avaliar a dinâmica folicular, no protocolo de superovulação, das vacas tratadas cumulativamente com aplicação do r-bST;
- Mensurar a resposta superovulatória das vacas tratadas com doses consecutivas de somatotropina bovina; e
- Avaliar a influência das aplicações consecutivas de r-bST na qualidade dos embriões coletados.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

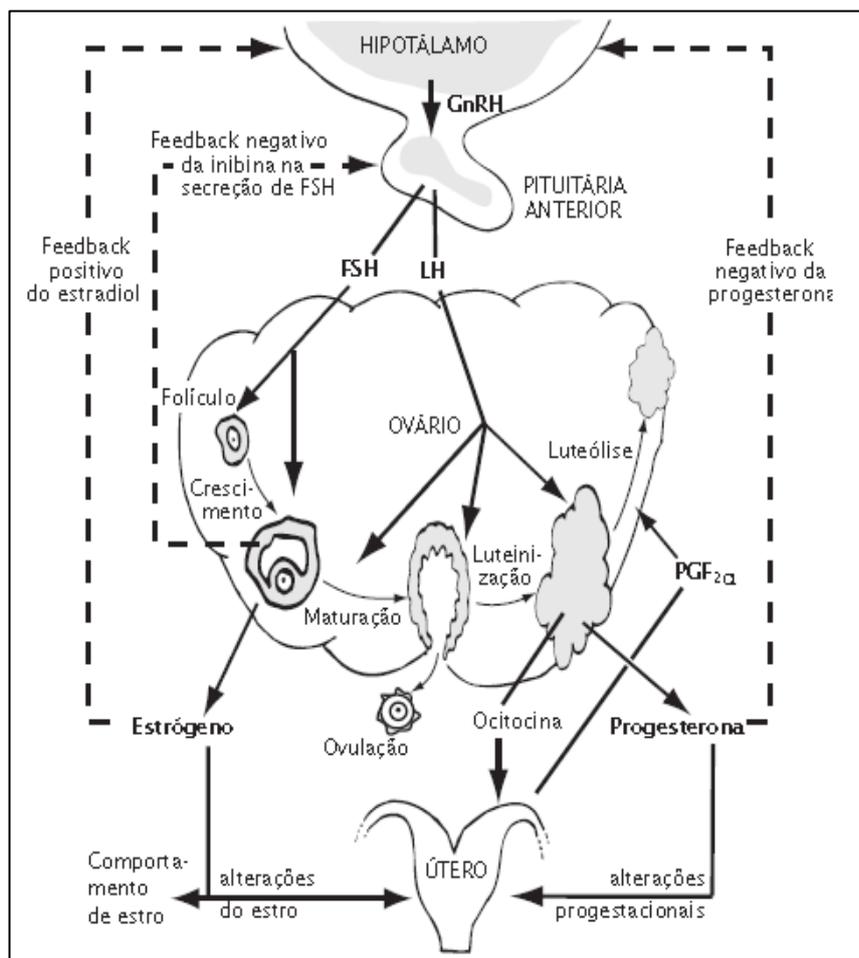
#### 3.1.1 Oogênese e foliculogênese

Durante o crescimento pré-natal, os precursores dos oócitos, oogônias, entram em mitose, atingindo ao nascimento um número aproximado de 120.000, na vaca. No período do nascimento, as oogônias entram na prófase da primeira divisão meiótica, sendo então denominadas oócitos, e permanecem em tal fase de repouso até pelo menos a puberdade, após a qual a meiose é retomada de maneira sequencial em poucas células em cada ciclo estral. Junto com o seu desenvolvimento o crescimento folicular ocorre sequencialmente durante toda a fase reprodutiva e envolve primeiramente o aumento do volume citoplasmático e da atividade dentro do oócito, posteriormente evolui de folículo primordial para primário, secundário, terciário e ovulatório ou de Graff, respectivamente, parte através do estímulo das gonadotrofinas (FSH e Hormônio luteinizante - LH) e parte independente das influências desses hormônios (crescimento inicial, folículo primordial para primário) (SWENSON, 1996).

Estudos com relação ao início do desenvolvimento folicular, demonstram a existência de fatores secretados pelo próprio oócito como desencadeadores do desenvolvimento folicular inicial. Inúmeros fatores de crescimento sintetizados pelas células foliculares atuam modulando o efeito dos hormônios e regulando o desenvolvimento dos folículos ovarianos, tais como: Fator de Crescimento de Diferenciação-9, Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1), Kit Ligand, Fator de Crescimento Epidermal, Proteína Morfogenética do Osso-15, Fator de Crescimento Fibroblástico, Fator de Crescimento Keratinócito, Neurotrofinas, Peptídeo Intestinal Vasoativo e Ativina (MARTINS *et al.*, 2008).

Sobre influência das gonadotrofinas, durante o ciclo estral, ocorrem ondas foliculares, que são compostas por uma fase de recrutamento ou emergência (grupo de folículos primordiais e primários iniciam seu crescimento), selecionado apenas um que potencialmente poderá chegar a ovular (fase de seleção ou divergência), passando esse a exercer dominância (fase de dominância), suprimindo o crescimento dos demais folículos, que sofrem atresia, inibindo então o recrutamento de um novo grupo (MORAES JR, 2008). O FSH, quando atuante nas células da granulosa dos folículos em crescimento, favorece a aromatização dos andrógenos produzidos pelas células da teca interna, convertendo-os em estrógeno, pela ação da enzima aromatase. O estrógeno, por sua vez, estimula a expressão

de receptores de LH nas células da teca interna e a liberação do hormônio regulador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo e consequentemente a liberação do LH. Assim, o folículo dominante fica sob o controle do LH até seu crescimento final (CUNNINGHAM, 1993).



**Figura 1** - Esquema demonstrando interações hormonais no controle da função reprodutiva da fêmea (PTASZYNSKA, 2007).

Como relação aos diâmetros máximos dos folículos dominantes, na sua fase de crescimento final, são observadas variações quando comparada fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus*. Nas *Bos taurus* em ciclos com duas ondas de crescimento folicular são descritos diâmetros de 17,1 e 16,5 mm para a primeira e segunda onda. Já em *Bos indicus* os diâmetros relatados são de 11,3 a 12,1 mm, respectivamente (GINTHER *et al.*, 1989; FIGUEIREDO *et al.*, 1997).

### 3.2 Transferência de embrião por superovulação

Dentre as várias tecnologias utilizadas, a TE se destaca por ser um campo em constante mudança e expansão, sendo uma das biotécnicas mais importantes para alavancar o melhoramento genético (BARROS; NOGUEIRA, 2004). A primeira realizada com sucesso em mamíferos foi com coelhos em 1890 (HEAPE, 1891), sendo 70 anos mais tarde, obtido o primeiro sucesso em bovino (WILLETT *et al.*, 1951). Em pesquisa realizada por Stroud e Collesen (2012) foram documentados 263.036 TEs bovinos em todo o mundo.

Sua expansão veio pela necessidade de maximizar a utilização de fêmeas com conhecido mérito genético (doadoras), aproveitando uma maior quantidade de folículos, que normalmente se tornariam atresícos, levando vários pesquisadores a desenvolver protocolos superovulatórios, sendo possível superovular uma fêmea, inseminá-la e posteriormente transferir seus embriões para receptoras, animais de menor valor genético e comercial (GONÇALVES *et al.*, 2008). Possibilitando às doadoras produzir mais bezerros do que poderiam via acasalamento natural, do mesmo modo que a IA permite que touros geneticamente superiores procriem mais bezerros que conseguiriam naturalmente. Além desse, existem outros motivos para se implementar um programa de TE, como:

- realizar teste de progênie em fêmeas;
- resgatar a genética de um rebanho, após grandes perdas, mais rapidamente;
- servir como ferramenta para a formação de um banco de germoplasma, criando um banco de embriões criopreservados;
- permitir a utilização de fêmeas com problemas em manter a gestação, caso não seja um problema genético;

No entanto, na maioria das vezes é utilizada para introduzir nova genética em um rebanho, pois fornece menor risco de biossegurança em relação a introdução de animais vivos, ou para geração de renda através da venda de embriões provenientes de acasalamentos valiosos (WRATHALL *et al.*, 2005).

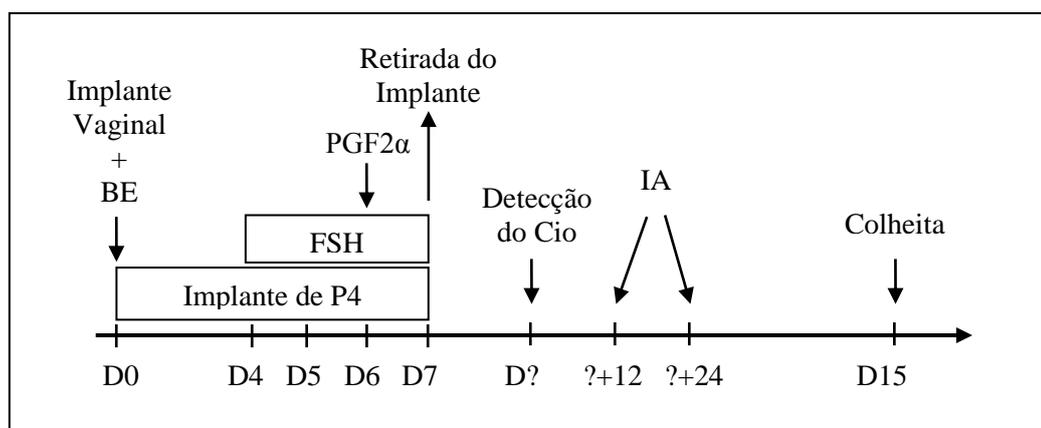
A TE, na realidade, é um passo no processo de remoção de um ou mais embriões de uma doadora até transferí-los para uma ou mais receptoras. Podendo ser considerada, no sentido mais amplo, um processo composto por várias etapas, tais como: superovulação e inseminação das doadoras, coleta dos embriões, isolamento, avaliação e armazenamento a curto prazo dos embriões, micromanipulação e análise genética dos embriões, congelamento e transferência dos embriões propriamente dito (TROXEL, 2007).

Dentre os fatores que interferem nos resultados em um programa de TE alguns podem ser controlados, reduzindo sua interferência, como: a sanidade e o estado nutricional do rebanho; a técnica utilizada na colheita e transferência; e o manejo dos animais. Porém a variabilidade de resposta das doadoras de embriões aos tratamentos SOV é o maior problema encontrado nos programas comerciais de TE (ARMSTRONG, 1993; BARROS; NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI et al., 2006).

### 3.2.1 Protocolo de Sincronização

Com o passar dos anos e graças ao uso de dispositivos de P4 aplicados por via vaginal e subcutânea em associação com fontes de estrógeno, que juntos promovem atresia folicular e originam nova onda em aproximadamente quatro dias após o início do tratamento (BÓ *et al.*, 2003), não é mais necessário a detecção de cio para a realização dos protocolos, e os mesmo podem ser iniciados em qualquer momento do ciclo estral (VASCONCELOS, 2009).

Inúmeros são os trabalhos realizados na tentativa de se estabelecer um protocolo de sincronização e superovulação ideal. Um realizado com a necessidade de observação de cio seria a aplicações de FSH quatro dias após o implante de P4 e aplicação de estrógeno, com intervalos de 12 horas entre doses reduzidas. Posteriormente administrado prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) dois dias após a primeira dose de FSH e 12 horas depois sendo retirado o implante de P4, sendo as doadoras submetidas a IA 12 e 24 horas após a detecção do cio (BARROS; NOGUEIRA, 2004) (figura 2).

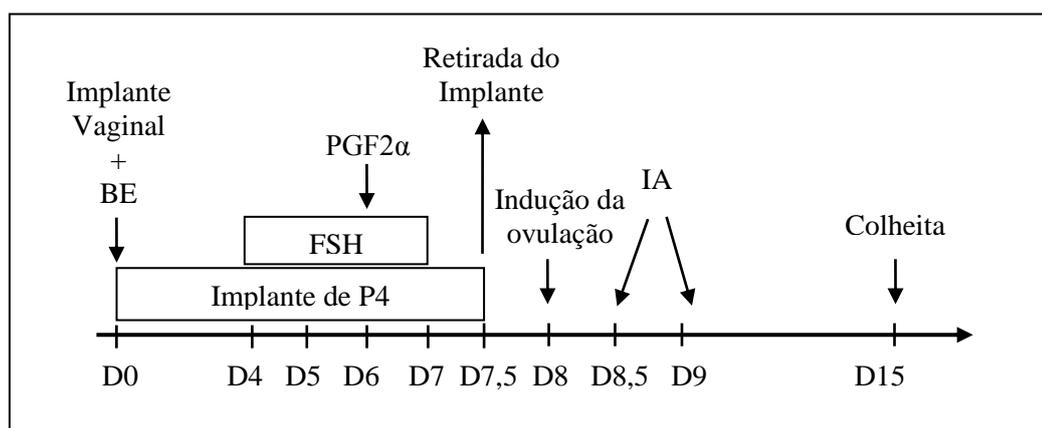


**Figura 2**-Desenho esquemático do protocolo de sincronização de estro e superovulação com necessidade de observação de cio.

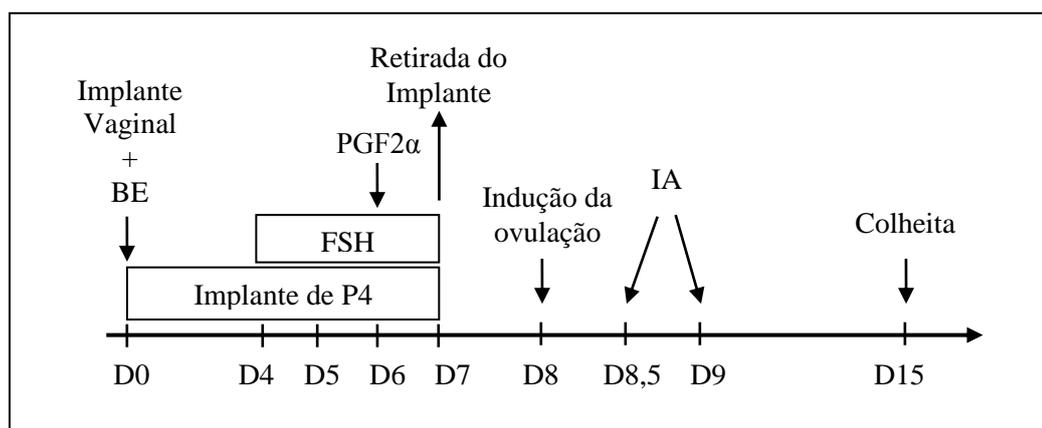
Na tentativa de atrasar o pico pré-ovulatório de LH, para que os folículos se desenvolvam mais e criem quantidade suficiente de receptores para este hormônio, pois já

foi demonstrado que sua formação é tempo-dependente, estando relacionada com a maturidade folicular (LIU *et al.*, 1998), aumentando assim o número de folículos ovulados e conseqüentemente de embriões (VAN DE LEEMPUT *et al.*, 1997), foram criadas estratégias, que ainda viabilizaram a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) após a SOV (BARROS; NOGUEIRA, 2004; BARUSELLI *et al.*, 2006)

Protocolos com o momento da ovulação retardada por seis a 12 horas e estimulada com indutores de ovulação como LH ou GnRH, foram testados. Porém não foi visto um aumento significativo no número de embriões viáveis em relação a protocolos com detecção do estro. Mas, foi possível sincronizar o momento da ovulação, permitindo a utilização da IATF. Sendo criado um novo tratamento hormonal, o qual mantém por 36 horas após a aplicação de  $PGF2\alpha$  a P4 exógena, sendo induzida a ovulação 12 horas após a remoção da P4 (figura 3). Uma vez que a ovulação ocorre entre 24 e 36 horas após a administração de LH a IATF é realizada 12 e 24 h após a injeção de LH, evitando a inconveniência da detecção do estro (BARROS; NOGUEIRA, 2004). Com resultados semelhantes ao protocolo citado anteriormente, uma outra alternativa seria uma modificação no tempo de permanência da progesterona exógena, sendo esta retirada 24 horas, em vez de 36, após a  $PGF2\alpha$ , com a manutenção da aplicação do indutor de ovulação no dia 9 (48 horas após a  $PGF2\alpha$ ), obtendo bons resultados em fêmeas Nelore (ZANENGA *et al.*, 2003; BARUSELLI *et al.*, 2006) (Figura 4).



**Figura 3**-Desenho esquemático do protocolo de sincronização de estro e superovulação com manutenção da P4 por 36 horas após  $PGF2\alpha$ .



**Figura 4**-Desenho esquemático do protocolo de sincronização de estro e superovulação com P4 sendo retirada 24 após a PGF2 $\alpha$ .

### 3.2.2 Superovulação

O tratamento superovulatório objetiva suprir a deficiência de FSH antes que o folículo dominante promova a redução da concentração endógena dessa gonadotrofina, através da produção de inibina pela granulosa. Assim, os efeitos da dominância folicular são neutralizados, a divergência impedida e o desenvolvimento simultâneo de vários folículos com características semelhantes daqueles selecionados para ovularem, torna-se possível. É importante frisar que o tratamento deve ser iniciado no momento da emergência da onda folicular, seja espontânea ou induzida (GONÇALVES et al, 2008).

Apesar de existirem vários estudos em relação aos protocolos de superovulação, ainda não se consegue atingir índices satisfatórios (VASCONCELOS., 2009). A baixa resposta superovulatória e a baixa recuperação de embriões viáveis por colheita ainda podem estar relacionados a fatores individuais, tais como: raça, causas genéticas ou fisiológicas (GINTHER *et al.*, 1989; ARMSTRONG, 1993), estado nutricional (SARTORI;MOLLO, 2007), reação imunogênica por repetições sucessivas de tratamento superovulatório (VASCONCELOS., 2009) e a fatores relacionados ao tratamento: momento de se iniciar com relação à fase do ciclo estral; tipo de gonadotrofina utilizada; relação FSH e LH nos preparados; duração do tratamento; dose de gonadotrofina e a via de administração (GINTHER et al., 1989; ARMSTRONG, 1993).

Uma das possibilidades propostas para se diminuir os transtornos citados acima foi à ablação folicular, ou seja, a aspiração do folículo dominante ou todos os folículos acima de 5mm de diâmetro. Após este procedimento haveria a emergência de uma nova onda folicular e conseqüentemente o início do protocolo de superovulação. Porém, esse processo

se mostrou de baixa praticidade e antieconômico, pois requer mão-de-obra qualificada e equipamento específico e de alto custo (GONÇALVES et al, 2008).

Os agentes superovulatórios mais usados em vacas são o FSH, já consagrado, e mais recentemente a gonadotrofina coriônica equina (eCG) voltou a ser utilizada. A desvantagem do uso do FSH é o alto número de manejos necessários (duas vezes ao dia durante quatro dias). Outras pesquisas mostraram ser viável a redução para três aplicações de FSH (mantendo a concentração aplicada) em vacas Nelore, com vantagem de reduzir o número de manejos. Os mesmos autores já haviam demonstrado anos antes, que uma única aplicação de eCG produziu número semelhante de embriões transferíveis comparado ao grupo tratado com FSH, por até 3 superovulações consecutivas (MARTINS *et al.*, 2008).

### **3.2.3 Inseminação Artificial**

A maioria dos programas de TE utilizam duas inseminações com intervalo de 12 horas entre elas, 12 e 24 horas depois da administração do indutor da ovulação (BARROS; NOGUEIRA 2005; BARUSELLI et al., 2006), porém alguns trabalhos buscando potencializar o protocolo se testou uma maior quantidade de inseminações, mantendo o intervalo de 12 horas. Comparando os resultados entre duas ou três inseminações Nogueira *et al.*, (2007), não encontraram diferenças entre os tratamentos.

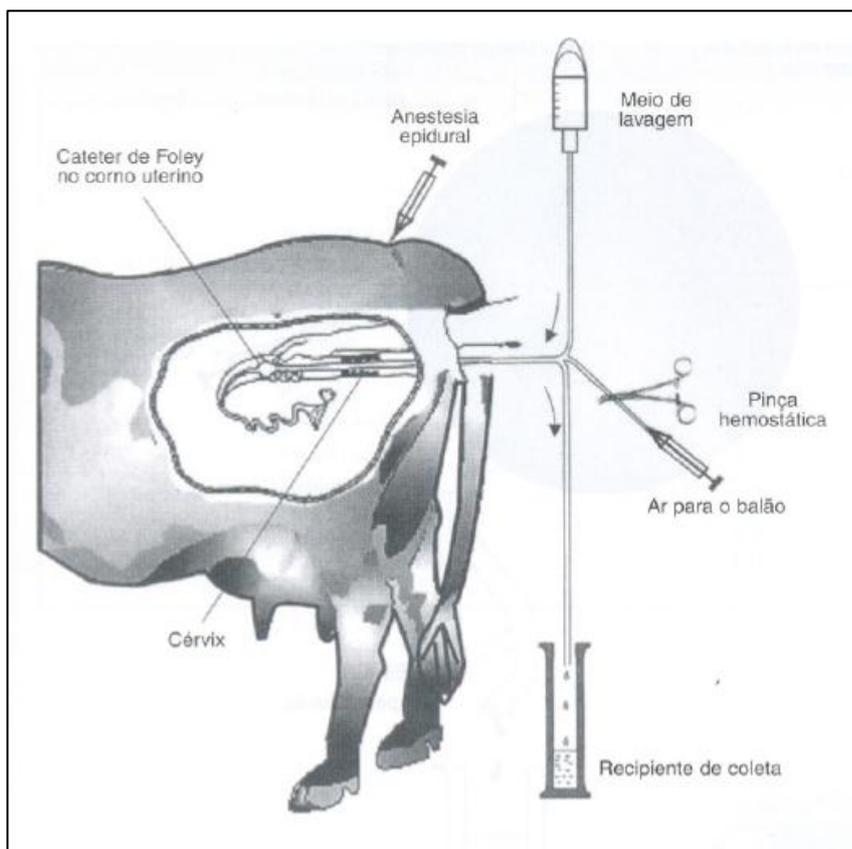
Já outras pesquisas com o intuito de minimizar custos testaram a utilização de uma única IA, em momentos diferentes, 16 horas (BARUSELLI, 2006) ou 24 horas após a administração de LH (BARROS; NOGUEIRA, 2004), nos quais apesar de ocorrer uma diminuição numérica (52,4 x 58,3% e 57,7 x 66,2, considerando uma x duas inseminações, respectivamente), não houve diferença significativa.

### **3.2.4 Colheita dos Embriões**

No início da utilização da TE a colheita dos embriões era realizada nos ovidutos ou úteros de doadoras através do abate ou cirurgia. A partir do ano de 1976, começou a se realizar a recuperação transcervical de embriões de vaca, búfala e égua. Esta por sua vez recebeu destaque, uma vez que as técnicas cirúrgicas invariavelmente levam à formação de aderências, além disso, há menor risco de vida e de saúde para a doadora com métodos não-cirúrgicos (JAINUDEEN *et al.*, 2004).

O procedimento transcervical é realizado através da utilização de um cateter de Foley, que ajudado por um mandril, para guiar sua passagem através da cérvix por

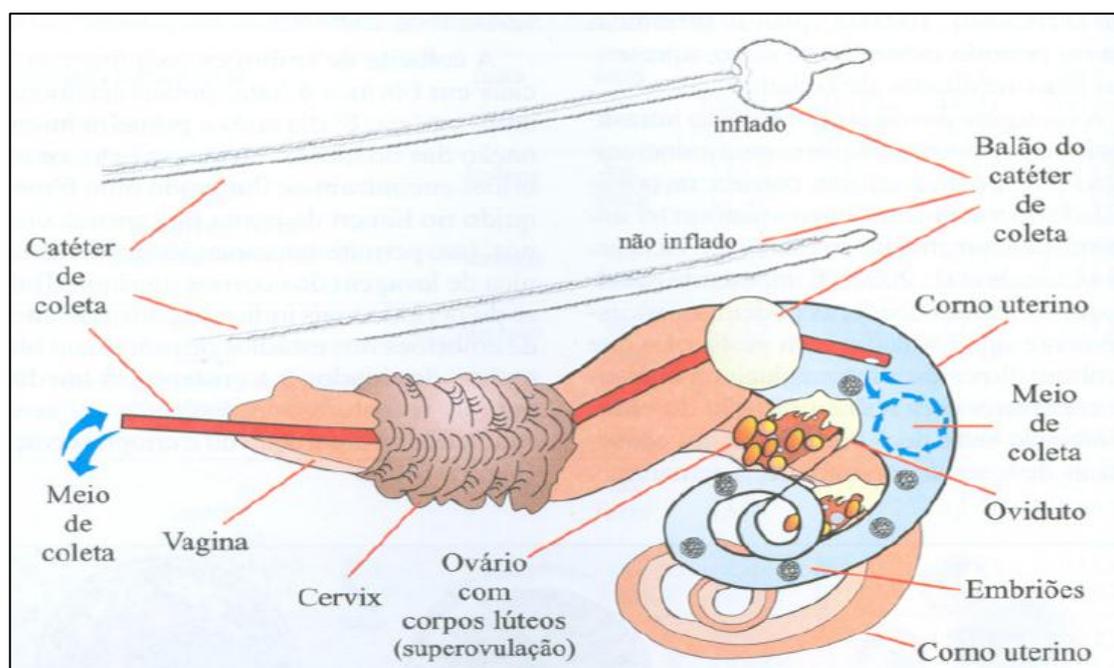
manipulação retal, podendo ser posicionado no corpo uterino ou em cada corno por vez, passando-se a inflar o balão do cateter, sendo antes realizada uma anestesia peridural. Depois é realizada a lavagem do útero, com solução salina tampão-fosfato (PBS) aquecido, permitindo sua passagem por uma recipiente de coleta, a medida que o útero é massageado delicadamente, conforme figura abaixo. (JAINUDEEN *et al.*, 2004)



**Figura 5** - Recuperação, via transcervical, de embriões do útero de uma vaca nos dias 6-8 após o cio (JAINUDEEN *et al.*, 2004).

Esse procedimento pode ser realizado através do método aberto ou fechado. No primeiro a lavagem é efetuada em frações de 40 a 50 mL de solução salina tampão-fosfato (PBS), com o auxílio de uma seringa descartável acoplada diretamente ao cateter posicionado no corno uterino. Quando obtidas essas frações são depositadas em um recipiente graduado, com capacidade para 500 a 1000 mL. Já pelo sistema fechado de coleta, que difere do anterior por impedir que o PBS entre em contato com o ambiente exterior. Neste, o meio de lavagem introduzido no corno uterino é recolhido através de um sistema composto por dois tubos de plástico flexíveis, sendo que um é o recipiente contendo o meio de coleta e o outro, um filtro para a obtenção dos embriões. Esse meio de coleta deve fluir por gravidade através do tubo acoplado ao recipiente, bem como através

do cateter em direção ao corno uterino, sendo necessário que o recipiente seja posicionado cerca de um metro acima da garupa do animal. Após a lavagem do corno uterino, o meio de coleta retorna através do outro tubo plástico para o filtro acoplado nesse tubo retendo os embriões juntamente com dez a 30 mL do meio de lavagem (REICHENBACH *et al.*, 2002).



**Figura 6** – Desenho esquemático de introdução e controle do posicionamento do cateter de coleta (REICHENBACH *et al.* 2002)

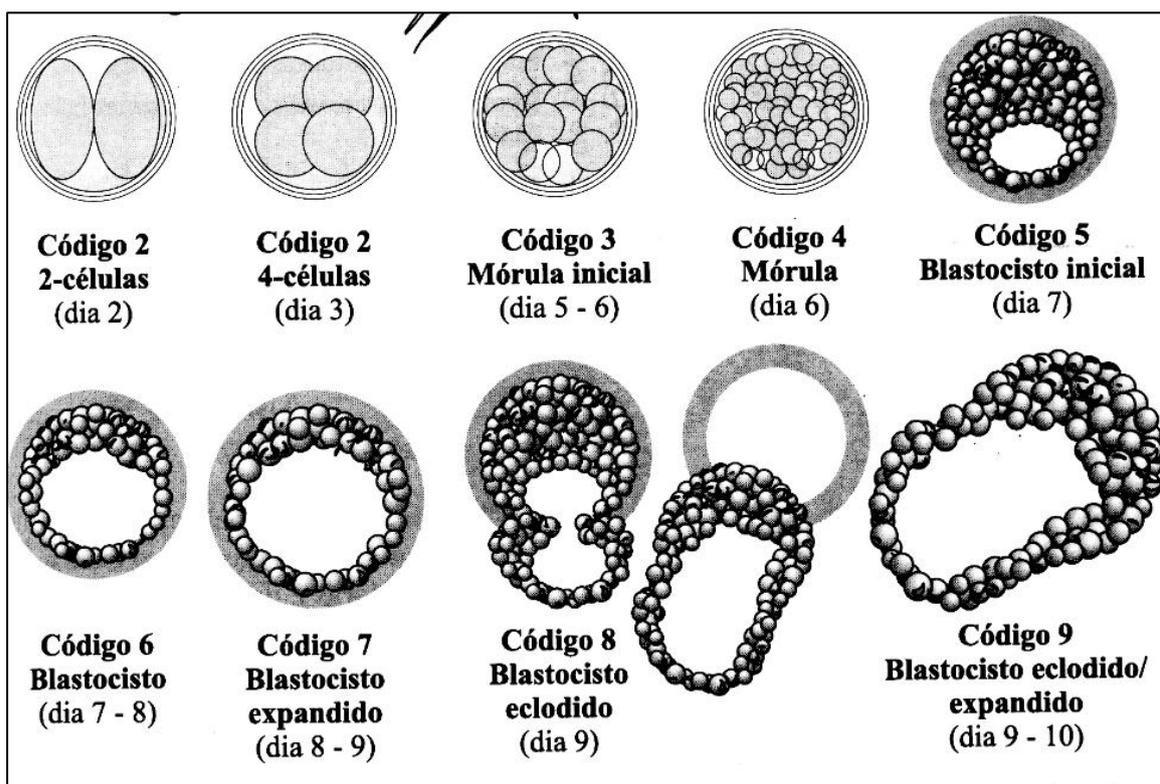
Por meio desse método os embriões devem ser colhidos entre o sexto e oitavo dia, pois nesse período encontram-se flutuando no lúmen da ponta dos cornos uterinos, permitindo sua captação através da técnica de lavagem dos cornos uterinos (REICHENBACH *et al.*, 2002). Sendo encontrado, nesse período, entre os estágios de Mórula inicial a Blastocisto expandido, segundo a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (ROBERTSON;NELSON, 1998).

### 3.2.5 Avaliação embrionária

Após a lavagem uterina o lavado obtido deve ser colocado em placas de Petri, sendo realizadas repetidas lavagens do filtro coletor até retirada de todo o muco presente, com PBS. O líquido obtido deverá ser colocado em placas de Petri para localização dos embriões (GAMBARINI, 2004).

Através do esteromicroscópio, ou lupa, é possível mensurar tamanho e formato do embrião, visualizar células do trofoblasto ou botão embrionário. A partir dessas observações é possível classificar os embriões em diferentes graus de qualidade e estágio durante o cultivo *in vitro*, para avaliação de índices de sobrevivência e eclosão ou, antes da inovulação, para mensuração de taxa de prenhez. Podendo ser classificado em uma escala de 1 a 4, dependendo da proporção de células extrusas, consideradas inviáveis, e heterogeneidade da coloração entre as células embrionárias, que podem caracterizar degeneração embrionária (ROBERTSON; NELSON, 1998).

Segundo recomendações da IETS (ROBERTSON; NELSON, 1998) os embriões podem ser classificados com relação a seu estágio de desenvolvimento como: não fertilizados; de 2 a 12 células; mórula inicial; mórula; blastocisto inicial; blastocisto; blastocisto expandido; blastocisto eclodido; blastocisto expandido eclodido; recebendo código de 1 a 9 respectivamente, conforme figura 7.



**Figura 7** - Desenho esquemático dos diferentes estágios embrionários segundo IETS (1998) (REICHENBACH et al. 2002)

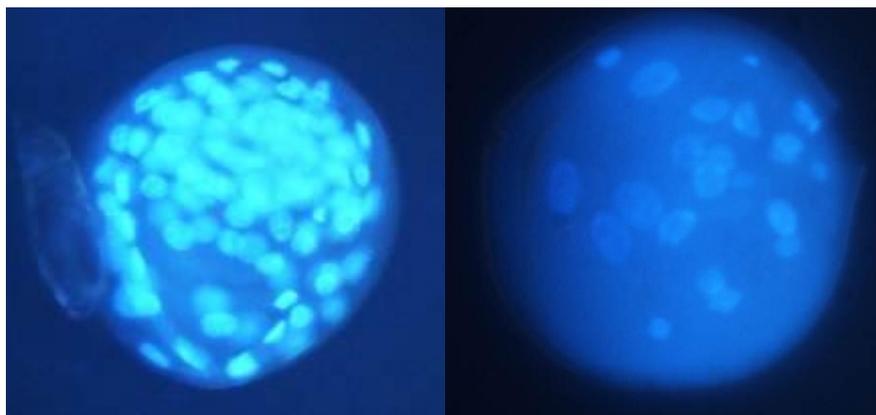
Em relação a sua qualidade podem ser descritos como excelentes ou bom, regular, pobre, morto ou degenerado, conforme quadro abaixo.

**Tabela 1** - Critérios para avaliação de embriões bovinos segundo os parâmetros de qualidade propostos pela IETS (1998)

Código Da IETS	Avaliação	Principais Características Morfológicas
1	Excelente ou Bom	<ol style="list-style-type: none"> <li>' Estádio de desenvolvimento corresponde ao esperado;</li> <li>' Massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros individuais que são uniformes em tamanho, cor e densidade;</li> <li>' Forma regular, a ZP não deve apresentar superfície côncava ou plana, deve lisa, preferencialmente intacta, especialmente se o embrião é destinado a exportação;</li> <li>' Células extrusadas da massa celular do embrião compreendem menos de 15% do material celular total.</li> </ol>
2	Regular	<ol style="list-style-type: none"> <li>' Estádio de desenvolvimento corresponde ao esperado;</li> <li>' Forma regular, ZP intacta ou não, irregularidades moderadas na</li> <li>forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e</li> <li>densidade das células individuais;</li> <li>' Células extrusadas da massa celular do embrião compreendem</li> <li>mais de 15% do material celular total;</li> <li>' Pelo menos 50% das células compõem uma massa embrionária</li> <li>viável, intacta.</li> </ol>
3	Pobre	<ol style="list-style-type: none"> <li>' Estádio de desenvolvimento não corresponde ao esperado;</li> <li>' Irregularidades maiores na forma geral da massa embrionária ou</li> <li>no tamanho, cor e densidade das células individuais;</li> <li>' Menos de 75% das células degeneradas;</li> <li>' Pelo menos 25% das células compõem uma massa embrionária</li> <li>viável, intacta.</li> </ol>
4	Morto ou degenerado	<ol style="list-style-type: none"> <li>' Estádio de desenvolvimento não corresponde ao esperado,</li> <li>embrião em degeneração;</li> <li>' Massa embrionária de menos de 25% de todo material celular</li> <li>presente no interior da ZP;</li> <li>' Oócitos ou estruturas unicelulares degeneradas.</li> </ol>

(Fonte: REICHENBACH et al., 2002).

A microscopia de fluorescência é outra ferramenta de avaliação embrionária, que torna possível localizar estruturas intracelulares marcadas por compostos específicos que se combinam com certas substâncias presentes na estrutura celular e que florescem ao serem excitados por radiações de determinados comprimentos de onda, geralmente a ultravioleta. Podendo assim ser avaliada a quantidade de células viáveis em um embrião, sendo um importante parâmetro na avaliação da qualidade de embriões (COSTA, 2010).



**Figura 8** - Fotos de dois embriões em diferentes estágios e quantidade, marcados com Hoechst e avaliados em microscópio de fluorescência (Bertolini, M. 2014)

### 3.3 Hormônio do Crescimento

O hormônio do crescimento (GH) tem como resultado bem elucidado o estímulo do crescimento linear dos ossos longos e o equilíbrio nitrogenado positivo, concomitantemente com o efeito lipolítico (SWENSON, 1996), tendo como função estimular as células somáticas, sendo necessário principalmente durante a fase de crescimento. O GH é uma proteína que possui 191 aminoácidos com duas pontes dissulfeto, tendo a glicina como o aminoácido mais importante presente em sua constituição e atividade biológica, quando esta é substituída por outro aminoácido, o GH é convertido de potencializador para um supressor ou um antagonista de GH (MORAES JR, 2008; MARTINS et al., 2009).

O GH é liberado pelos somatotropos da hipófise por intermédio do hormônio de liberação do hormônio do crescimento (GHRH), de origem hipotalâmica, através do sistema porta hipofisário (SWENSON, 1996). Além desse mecanismo a sua liberação pela adenohipófise decorre mediante uma série de fatores, tais como: bloqueio pela somatostatina (SRIF ou GHIH), flutuações nas concentrações sanguíneas de glucagon, insulina, IGF-I e IGF-II, hormônios estrogênicos, além dos processos metabólicos e fisiológicos (LUCY, 2000).

O fígado é estimulado através do GH, secretando as somatomedinas, mediadores da ação do GH, sendo eles sinérgicos. Entretanto o próprio GH pode ajustar o metabolismo tecidual (LAWRENCE; FOWLER, 2002; SWENSON, 1996). Suas atuações ocorrem, provavelmente, pelo aumento na atividade dos ribossomos no processo de tradução. Exercendo efeitos metabólicos importantes, como a inibição do transporte de glicose para

os tecidos periféricos (resistência à insulina), elevação da glicemia (atividade diabetogênica), e concomitante elevação da taxa de oxidação de lipídeos (atividade lipolítica) e aminoácidos (LAWRENCE; FOWLER, 2002).

Além de ações no crescimento e na nutrição dos animais, a GH tem importante função reprodutiva, pois, uma variedade de receptores RNAm para GH foram encontrados no hipotálamo, hipófise, corpos lúteo, folículos ovarianos, ovidutos, endométrio, miométrio e a placenta (KIRBY et al., 1996; BASTOS, 2008). A tabela abaixo demonstra a presença de RNAm em diferentes espécies e estruturas ovarianas (SILVA *et al*, 2009)

**Tabela 2-** Expressão de RNAm para o IGF-I, IGF-II e receptores de IGF em folículos do ovário de mamíferos.

<b>Estrutura</b>	<b>IGF-I</b>	<b>IGF-II</b>	<b>IGF-RI</b>	<b>IGF-RII</b>
Folículo primordial	+ (c, p), - (b)	+ (c), - (b)	+ (p), - (b)	
Folículo primário	+ (c, p), - (b)	- (b)	+ (b, p)	
Folículo secundário	+ (c, b, m, p),	- (b)	+ (b, p)	
Folículo antral em Crescimento				
Oocito	+ (p), - (s, m)	- (b, s),	+ (b, p) - (s)	
Cúmulos	+ (s, m)	+ (s), - (b)	+ (p, b) - (s)	
Granulosa	+ (s, m)	+ (s), - (b)	+ (p, o, b, s)	+ (o, b)
Teca	+ (p), - (s, m)	+ (s, b, o, p)	+ (o, b), - (s)	+ (o, b)
Folículo pré-ovulatório				
Oocito	- (s, m)	- (s)	- (s)	
Cúmulos	+ (s, m)	+ (s)	+ (s)	
Granulosa	+ (s, m), - (p)	+ (p, s)	+ (s, p)	+ (p)
Teca	- (s, m, p)	+ (s)	- (s)	+ (p)

(+) A expressão positiva de mRNA, (-) Expressão negativa do mRNA.

b: bovina, c: caprinos, m: muar, o: ovinos, p: primatas, s: suínos.

(SILVA, 2009)

A utilização farmacológica do GH é através de sua forma recombinante, conhecida como somatotropina recombinante bovina, do inglês recombinant bovine somatotropin (r-bST) ou hormônio do crescimento biosemelhante, um dos primeiros hormônios produzidos em escala comercial como proteína recombinante. O r-bST já é bastante utilizado para aumentar a produção de leite com a aplicação de 500mg de r-bST em intervalo de 14 dias, aumentando, a produção, em 3 a 5 kg/dia (RIBEIRO FILHO, 2009). Porém vem sendo estudada sua utilização também com o intuito de sincronizar a onda folicular ovariana, incrementar a quantidade de folículos ovarianos e melhorar a qualidade oocitária após a recuperação por punção folicular, e o desenvolvimento *in vitro* e *in vivo* de embriões (VASCONCELOS, 2009).

Como a r-bST atua em muitos órgãos, os IGFs podem ter origem sistêmica ou local, no caso dos folículos ovarianos, pelas células da granulosa e da teca, agindo por

mecanismos endócrino, parácrino ou autócrino, sofrendo interferência por influências de alterações ambientais, principalmente nutricionais (RIBEIRO FILHO, 2009).

A meia-vida plasmática do r-bST é menor do que o GH endógeno devido a diferenças quanto a modificações pós-traducionais. Porém, as preparações farmacológicas de r-bST utilizadas comercialmente para o incremento da produção de leite são manufaturadas para a liberação lenta do hormônio no organismo animal, o que permite persistir em circulação por até três semanas após a aplicação, sendo sua maior influência na reprodução feita de modo indireto, através do IGF-1 (LUCY *et al.*, 2000). Ocorrendo, segundo alguns autores, o aumento no número de folículos médios, ao redor do terceiro dia após a sua administração, intimamente relacionado com o aumento dos níveis circulantes de GH, IGF-I e insulina, porém em outros trabalhos esta alteração não foi encontrada (SÁ FILHO, 2006)

Vários estudos relataram que tanto o r-bST quanto o FSH e os estrógenos estimulam a expressão de IGF-1 nas células da granulosa (ATHANASSIOUS, 2000). E este, por sua vez, quando aumentado favorece a maturação de oócitos bovinos, incrementando as taxas de clivagem o que demonstra que o IGF-I é eficiente em promover a maturação dos oócitos (PONCHIROLLI, 2006). Sá filho et al. (2009) afirmam que o tratamento com r-bST em búfalas foi capaz de aumentar a população folicular, número de folículos aspirados e número de oócitos recuperados, porém não aumentou a qualidade oocitária e a produção *in vitro* de embriões.

Tal substância atua também desempenhando papel importante no reconhecimento materno da gestação. Isto ocorre devido à dependência parcial dos embriões ao IGF-I no sentido de secretar fatores essenciais ao processo de sinalização pelo embrião da sua presença no útero (LUCY *et al.*, 1995). Além disso o GH, IGF-I e a insulina, muitas vezes, estimulam a proliferação celular, aumentando a taxa de produção embrionária *in vitro* (MOREIRA *et al.*, 2002). Sendo a quantidade de células embrionárias e a taxa de ocorrência de morte celular fortes indicativos da qualidade de embriões produzidos *in vitro*.

### **3.3.1 Oogênese, foliculogênese e o Hormônio do Crescimento**

As gonadotrofinas compõem os fatores mais importantes de sobrevivência do desenvolvimento folicular, ao redor e além da fase antral, porém do folículo primordial para o início do desenvolvimento do antro tem sido considerado independente a esses

hormônios, não sendo ainda completamente esclarecidos. Talvez hormônios metabólicos, como o GH, desempenhem um papel essencial neste processo (MARTINS *et al.*, 2009). Silva (2008) afirma que o GH aumenta o desenvolvimento de pequenos folículos para as fases dependentes de gonadotrofinas e estimula a maturação dos oócitos.

Estudos demonstram que a aplicação *in vivo* de GH recombinante aumentou significativamente o número de folículos primários, secundários e antrais que expressam características favoráveis para reprodução, concluindo que o hormônio do crescimento está presente no controle das fases iniciais da foliculogênese (MARTINS *et al.*, 2009). Segundo Bachelot *et al.* (2002) estudos relatam que em ratos Knockout para receptores do GH e para proteínas de ligação do GH, o número de folículos por ovário é muito reduzido e a resposta ovulatória as gonadotrofinas foi três vezes menor, e em camundongos deficientes nessas proteínas, o número de folículos primordiais foi elevado, enquanto os primário, secundários e antrais eram muito baixos.

Bao & Garveric (1998) ressaltaram que a expressão de enzimas e receptores gonadotróficos participam da esteroidogênese, e que mudanças na expressão de RNAm para receptores de gonadotrofinas (FSH e LH) estão ligados às enzimas esteroidogênicas e aos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-I e IGF-II) associados aos diferentes estádios de crescimento e atresia folicular. A presença de RNA para receptores do GH, para seus mensageiros, IGFs, e para proteínas carreadoras das IGFs em quase todas as fases de desenvolvimento folicular, inclusive nos folículos primordiais e primários, reforça a importância de tais fatores para o desenvolvimento folicular (SILVA, 2009).

### **3.3.2 Superovulação e o Hormônio do Crescimento**

Alguns trabalhos têm sido desenvolvidos com o intuito de elevar o número de folículos recrutados, já que o pool folicular presente na fase de recrutamento é pré-requisito para melhorar a resposta aos protocolos de superovulação e conseqüentemente melhorar a eficiência reprodutiva dos animais domésticos (FORTUNE, 2003). Algumas alternativas são, o flushing nutricional (curto período de superalimentação) (GONG *et al.*, 2002) e o uso do r-bST (Somatotropina Bovina Recombinante) (GONG *et al.*, 1996; BURATINI *et al.*, 2000) mostraram ser os principais fatores capazes de influenciar positivamente o número de folículos recrutados e/ou a resposta aos protocolos de SOV.

O relato de que vacas em lactação, submetidas a tratamento com r-bST, no início do período pós-parto, aumentaram a incidência de parto gemelar sugeriu papel relevante desse

hormônio no controle do crescimento e desenvolvimento folicular ovariano em bovinos (CUSHMAN *et al.*, 2001). Isto é suportado pela evidência de que parto gemelar na vaca está associado com concentrações periféricas elevadas de IGF-I, que como já foi citado, é tido como o peptídeo mediador da ação do GH e regulador local da função ovariana (FONSECA, 1999).

O envolvimento do GH na regulação do crescimento e desenvolvimento folicular tem sido relatado (GONG *et al.*, 1993; WEBB *et al.*, 1994). A r-bST, quando associada a hormônios comerciais de superovulação, age no ovário melhorando as respostas superovulatórias, aumentando o número de folículos recrutados com diâmetro entre 2 e 5 mm (GONG *et al.*, 1996), estimulando o crescimento e desenvolvimento folicular (WEBB *et al.*, 1994) e controlando a função do corpo lúteo (LUCY *et al.*, 1995).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, P.R.L. Estudo de marcadores moleculares (macrossatélites) em vacas doadoras de embriões com diferentes respostas superovulatórias. 112f. Tese (Doutorado)– **Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre. 2008.

ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, New York, v.39, p.7-24, 1993.

ATHANASSIOUS, C. The potential role of intraovarian factors on ovarian androgen production. **Annals of the New York Academy of Science**, v.9, p.184-192, 2000.

BACHELOT, A. et al. Growth hormone is required for ovarian follicular growth. **Endocrinology**, v. 143, p. 4104-4112, 2002.

BAO, B.; GARVERICK, A. Expression of steroidogenic enzyme and gonatotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Science**, v.76, p. 1903-1921, 1998.

BARROS C.M.; NOGUEIRA M.F.G.; Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**; v. 56, p. 1483-1496. 2001

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulação em zebuínos de corte. **1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, p. 212-222. 2004.

BARUSELLI P.S. et al. Avanços nos protocolos reprodutivos em fêmeas bovinas utilizando sêmen sexado. **Biblioteca técnicas ABS pecplan**: in [http://www.abspecplan.com.br/upload/library/Avancos-Sexado\\_Baruselli.pdf](http://www.abspecplan.com.br/upload/library/Avancos-Sexado_Baruselli.pdf) acessado em 20/12/2013. 2006.

BASTOS, M.R. Influência da ingestão de matéria seca e da condição corporal na produção in vivo de embriões bovinos. Dissertação (Mestrado) – **Programa de Pós-Graduação em**

**Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2008.**

BÓ, G.A. et al. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307-326. 2003.

BURATINI J.R. Avanços no entendimento da fisiologia do desenvolvimento folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 55-68, 2005.

BURATINI, J. et al. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in Nelore (*B. indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421-431, 2000.

COSTA, E.P. et al. Nova técnica para contagem do número de células de blastocistos. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia**, vol.62, no.6, p.1507-1510. 2010.

CUNNINGHAM, J.G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 454p. 1993.

CUSHMAN R,A. Effect of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol in hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 55, p.1533 - 1547. 2001

FIGUEIREDO, R.A., et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*), **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

FONSECA, J.F. Corpo lúteo acessório, perfil plasmático de progesterona e taxa de gestação de receptoras de embriões bovinos tratadas com diferentes hormônios. Dissertação (Mestrado) - **Programa de Pós-Graduação, Escola da Universidade Federal de Minas Gerais**, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1999.

FORTUNE J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 135–163. 2003.

FREITAS, D.S. Uso de inibidor da síntese de prostaglandinas sobre a taxa de prenhez em receptoras bovinas com diferentes graus de manipulação cervical. Dissertação (Mestrado) **Pós-Graduação em Ciência Animal nos Trópicos**, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia, Salvador. 2007.

GAMBARINI, M. L. M. Curso de transferência de embriões em bovinos. **Universidade Federal de Goiás**, Goiânia, 2004.

GINTHER O.J. et al. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-30, 1989.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V.J..F. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V.J..F. **Biotécnicas Aplicadas a Reprodução Animal**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2008.

GONG, J.G. et al. Effect of recombinant bovine somatotropin, on the superovulatory response to pregnant serum gonadotropin in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 1141-1149, 1993.

GONG J.G. et al. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, v. 45, p. 611–622. 1996

GONG J.G. et al. The effect of increased dietary intake on superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, v. 57, p. 1591–1602. 2002.

HEAPE, W. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. **Proceedings of the Royal Society**, v. 48, p. 457–458. 1891.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2011**. Rio de Janeiro, v. 37, p.1-55, 2012  
Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2012/ppm2012.pdf>>. Acesso em: 20 de outubro de 2013.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. S. E. Indução, ovulação, produção e transferência de embriões. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Manole, cap. 29, p.409- 434. 2004.

KIRBY, C.J.; WILSON, S.J., LUCY, M.C. Response of dairy cows treated with bovine somatotropin to a luteolytic dose of prostaglandin F2. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 286-294. 1996.

LAWRENCE, T.L. J.; FOWLER, V.R. **Growth of farm animals**. 2ed. New York: Cab International, 337p. 2002.

LIU X. et al. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. **Endocrinology**, v.139, p.2342-2347, 1998.

LUCY, M.C. Regulation of follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1635-1647, 2000.

LUCY, M.C. et al. Effects of somatotropin the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy on cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, n.1, p.73-82, 1995.

MARTINS, F.S. et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.36-49. 2008

MARTINS, F.S. et al. Growth and Differentiation Factor-9 Stimulates Goat Primordial Follicles Activation In vitro and the Progression to Secondary Follicles. Dissertação (Mestrado) - **Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará**. Ceará. 2009.

MORAIS JR., F.J. Efeito da somatotropina recombinante bovina (rbst) na resposta ovulatória e na qualidade dos embriões de vacas da raça nelore. Dissertação (Mestrado). **Universidade Federal do Piauí**. Piauí, 2008.

MOREIRA F, et al. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 895–907. 2002.

MOTA, G.B. Desenvolvimento e expressão gênica em oócitos bovinos imaturos selecionados por azul cresil brilhante. Tese (Magister Scientiae) – **Programa de Pós-Graduação, Universidade Federal de Viçosa**, Minas Gerais. 2008.

New York, v.39, p.7-24, 1993.

PONCHIROLLI, C.B. Desenvolvimento de embriões bovinos in vitro na presença de IGF-1, GH e insulina nos meios de maturação de ovócitos e cultivo embrionário. 2006, 79p. Dissertação (Mestrado) - **Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2006.

PTASZYNSKA M. et al. Compêndio de Reprodução Animal. **Intervet**, 9ed, p 399. 2007.

REICHENBACH, H.D. et al. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**, São Paulo, Livraria e Editora Varela, p. 127-178, 2002.

RENESTO, A. associação das biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultra-sonografia e superovulação na produção in vitro e in vivo de embriões bovinos. Dissertação (Mestrado) **Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp**, Jaboticabal, São Paulo. 2004

ROBERTSON, I.; NELSON, R. E. Certificação e identificação de embriões. In: International Embryo Transfer Society. USA, abril, Trad. OLIVEIRA FILHO, E. B. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. Uberlândia:SBTE, Cap. 9, p.109- 122. 1998.

SÁ FILHO M.F. et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle **Theriogenology**, v 65, p. 77–88. 2006.

SÁ FILHO, M.F. et al. Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on in vitro buffalo embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p.51-59, 2009.

SARTORI, R.; MOLLO, M. R. Influência da ingestão alimentar na fisiologia reprodutiva da fêmea bovina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.197-204, abr./jun. 2007.

SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R.; VAN DEN HURK R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. **Theriogenology**, v. 71, p. 1193–1208. 2009

SILVA, C.F. Efeito do estresse térmico calórico na expressão de alguns genes relacionados à implantação e desenvolvimento inicial de embriões nelore (*Bos indicus*) e jersey (*Bos taurus*) produzidos in vitro. Dissertação (Mestrado) - **Programa de Pós-Graduação, Veterinária e Zootecnia**, Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2011.

STROUD, B.; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. **Animal Reproduction**, v.9, n.3, p.210-216, Jul./Sept. 2012

SWENSON, M.J., **Fisiologia dos animais domésticos**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

TROXEL, T.R. **Purebred cattle series: embryo transfer**. University of Arkansas Division of Agriculture, Cooperative Extension Service. 2007

VAN DE LEEMPUT E.E. et al. Do insulin-like growth factors play a role in final follicular maturation: superovulation as a test model. **Theriogenology**, v. 49, p.204. 1997.

VASCONCELOS, L.V. Efeito do pré-tratamento com somatotropina recombinante bovina (rbST) sobre a resposta superovulatória e viabilidade de embriões de doadoras Nelore, 89p, Tese (Doutorado) – **Programa de Pós-Graduação, Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal da Bahia**. Salvador. 2009.

VIANA, J. H. M. Estado atual da transferência de embriões (TE) e produção in vitro de embriões (FIV) no Brasil e no mundo. **O Embrião**, Jaboticabal, n. 29, p 1-3, 2006.

WEBB, R.; GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. **Theriogenology**, New York, v.41, p.25-30, 1994.

WEBB, R. et al. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in farm animals. **Theriogenology**, v. 68S, p. S22-S29, 2007.

WILLETT, E.L. et al. Successful transplantation of a fertilized bovine ovum. **Science**, v. 113, p. 247. 1951.

WRATHALL A.E., SIMMONS HA, VAN SOOM A. Evaluation of risks of viral transmission to recipients of bovine embryos arising from fertilisation with virus-infected sêmen. **Theriogenology**. 2005.

ZANENGA, C.A et al. Comparação entre dois protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 626-627, 2003.

## **5. ARTIGO CIENTÍFICO**

1 **A influência da somatotropina recombinante bovina na resposta superovulatória e**  
2 **qualidade embrionária em gado *Bos indicus***

3  
4 **The influence of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and**  
5 **embryo quality in *Bos indicus* cattle**

6  
7 **<sup>I\*</sup>Luis Eduardo P. de Andrade Ferreira, <sup>II</sup>Pollyane Raissa F. Oliveira, <sup>I</sup>Jomel Fransico**  
8 **dos Santos, <sup>I</sup>Flavia Camila S. P. Ramalho, <sup>III</sup>Sildivane Valcácia Silva, <sup>IV</sup>Marcelo**  
9 **Bertolini, <sup>IV</sup>Luís Henrique de Aguiar, <sup>V</sup>Romero R. Cintra, <sup>VI</sup>Thiago R. Viana, <sup>VII</sup>Jose**  
10 **Augusto B. Afonso, <sup>VIII</sup>Gustavo F. Carneiro.**

11  
12 **RESUMO**

13       Esse trabalho teve como objetivo estudar o efeito de pré-tratamentos consecutivos  
14 com somatotropina recombinante bovina (r-bST) sobre a resposta superovulatória de vacas  
15 *Bos indicus* avaliando-se número de folículos e de embriões recuperados, diâmetro folicular e  
16 qualidade embrionária no agreste meridional de Pernambuco. Foram utilizadas 20 vacas  
17 nelore divididas em dois grupos, BST (2000 mg de somatotrofina) dividida em quatro vezes  
18 com intervalos de sete dias e Controle (solução fisiológica), coincidindo a última aplicação  
19 com o início do protocolo de superovulação. Este se iniciou em dia aleatório do ciclo estral  
20 com a introdução do implante intravaginal de Progesterona (P4), associado a 2 mg de  
21 Benzoato de Estradiol, sendo considerado D0. No D4 se iniciou a estimulação folicular com  
22 133mg do Hormônio Folículo Estimulante, administrando em doses decrescentes por quatro  
23 dias, com duas aplicações diárias. Já no D6 foi aplicado 0,5 mg de Cloprostenol, sendo o  
24 dispositivo de P4 retirado no D7 e 24 horas depois aplicado 1500 UI de Gonadotrofina  
25 Coriônica Humana, e as inseminações artificiais feitas com 12 e 24 horas depois. Nos D15 e

1 D16 foram realizadas as coletas dos embriões, pelo método não cirúrgico, avaliados,  
2 classificados e armazenados para posterior contagem de células por microscopia de  
3 fluorescência. Todos os animais passaram por acompanhamento da dinâmica folicular nos  
4 dias de tratamento, da coleta e durante o protocolo de SOV e coleta dos embriões, sendo  
5 avaliados de sete em sete dias o seu escore de condição corporal (ECC). Os resultados obtidos  
6 foram analisados por ANOVA com nível de significância de 5%. O grupo BST apresentou  
7 diâmetro folicular e número de folículos mais elevados em alguns momentos e redução do  
8 ECC, ( $p < 0,05$ ), sendo observada elevação não significativa ( $p > 0,05$ ) no número de corpos  
9 lúteos, embriões totais e embriões viáveis, além de uma maior proporção de estágios  
10 embrionários mais maduros. Assim conclui-se que o r-bST favorece a uma potencialização  
11 dos resultados da SOV, sendo necessários mais estudos com relação à forma de aplicação, à  
12 dose utilizada e o número de coletas devido a variabilidade de seus resultados.

13 **Palavras-chave:** Hormônio do crescimento, dinâmica folicular, transferência de embrião,  
14 superovulação, Nelore.

15

## 16 **ABSTRACT**

17 This work aimed to study the effect of consecutive pre-treatment with recombinant bovine  
18 somatotropin (r-bST) on superovulatory response of *Bos indicus* cows by evaluating the  
19 number of follicles and recovered embryos, follicular diameter and embryo quality in the  
20 agreste of Pernambuco. Twenty Nelore cows were divided into two groups: bST treatment  
21 from 500 mg somatotropin and a control from saline as placebo medicated four times at 7  
22 day-interval, with the last dose coinciding with the start of the superovulation protocol. This  
23 began on a random day of the estrous cycle with the introduction of an intravaginal  
24 progesterone device, associated with an 2 mg dose of estradiol benzoate, day 0. On D4  
25 follicular stimulation began with 200 mg dose of follicle stimulating hormone, in decreasing

1 doses for 4 days , with twice daily applications. On D6 0.5 mg cloprostenol was administered  
2 , the Progesterone device removed on D7 and 24 hours later 1500 IU of human chorionic  
3 gonadotropin was injected, with inseminations performed 12 and 24 hours later. On D15 and  
4 D16 embryo collection was performed by nonsurgical method, evaluated, classified and  
5 stored for later evaluation by fluorescence microscopy. All animals underwent monitoring of  
6 follicular dynamics in the days of treatment, collection and during the SOV protocol and  
7 collection of embryos; body condition score ( BCS) was evaluated every 7 days. The results  
8 were analyzed by ANOVA with a significance level of 5% . The BST group showed a  
9 significant follicular diameter and number of follicles at some moments and also showed a  
10 significant reduction of BCS ( $p<0.05$ ). In other hand, only a numeric increase ( $p>0.05$ ) in the  
11 number of corpus luteum, total and viable embryos was observed. Also it was observed a  
12 higher proportion of embryonic development stages more mature in BST group. So it is  
13 concluded that r-bST favors a strengthening of SOV, although it was not targetted the  
14 ultimate goal, a greater number of embryos, however numerically this occurred in this study  
15 conditions. Further studies on the application form and dosage are necessary, due to high  
16 variability in different experiments.

17 **Keywords:** Growth hormone, follicular dynamics , embryo transfer , superovulation , Nellore  
18 .

## 19 INTRODUÇÃO

20 A transferência de embriões (TE) por superovulação é uma das biotécnicas mais  
21 procuradas como alternativa para potencializar o melhoramento genético dos rebanhos, tendo  
22 a América do Sul importante papel na produção mundial de embriões bovinos (BARROS &  
23 Nogueira, 2007). O Brasil, país detentor do maior rebanho comercial do mundo (IBGE,  
24 2012), foi responsável por 14,8% dos embriões produzidos in vivo transferidos em todo o

1 mundo, que teve 263.036 transferências realizadas no ano de 2010 (STROUD &  
2 CALLESEN, 2012).

3           Mesmo em constante avanço, a TE ainda apresenta resultados insatisfatórios  
4 (VASCONCELOS, 2009), sendo o principal entrave a variabilidade de resposta das doadoras  
5 aos tratamentos superestimulatórios (ARMSTRONG, 1993; BARROS & NOGUEIRA, 2001;  
6 BARUSELLI et al., 2006). Com a utilização da ultrassonografia, avanços foram obtidos na  
7 compreensão da fisiologia ovariana, favorecendo o surgimento de diversos protocolos que  
8 diminuíram tal variação (BÓ et al., 2003). Porém ainda são necessárias práticas melhoradoras  
9 da qualidade e quantidade de folículos e oócitos, nos protocolos utilizados, que  
10 possibilitariam um avanço nos resultados obtidos. Alguns autores estão estudando o análogo  
11 sintético recombinante da somatotrofina bovina (r-bST), hormônio do crescimento  
12 amplamente utilizado para aumentar a produção leiteira, como um potencializador da  
13 dinâmica folicular (GONG et al., 1993; GONG et al., 1996; LIU et al, 1998; BURATINI et  
14 al., 2000; LUCY, 2000; CUSHMAN, 2001; BACHELOT et al, 2002; ; BARUSELLI et al,  
15 2006; MARTINS et al, 2008; MORAIS, 2008; SILVA et al, 2009; VASCONCELOS, 2009).  
16 O fato de folículos dominantes diferirem dos outros folículos antrais recrutados a um tempo  
17 similar, mesmo estando exposto ao mesmo ambiente gonadotrófico, sugere que as  
18 gonadotrofinas podem não ser exclusivamente responsáveis pelo controle da foliculogênese,  
19 demonstrando que outros mecanismos estão envolvidos e desempenham importante papel  
20 neste âmbito (GONG, et al., 1993).

21           Esse hormônio protéico sintetizado e secretado pela hipófise anterior (FONSECA,  
22 1999; CURSIO, 2005) interage com receptores nas membranas de muitos tecidos, tais como  
23 fígado, rim, músculo, dentre outros, estimulando a liberação de somatomedinas ou fatores de  
24 crescimento semelhante à insulina (IGFs). A interação dessas somatomedinas livres com seus

1 receptores na superfície de diversos tecidos resulta em efeito mitogênico (NOMAN e  
2 LITWACK, 1987).

3 Os IGFs regulam a proliferação e a diferenciação de vários tipos celulares e têm  
4 efeitos metabólicos semelhantes à insulina, com capacidade de atuar por via endócrina, assim  
5 como por mecanismos parácrino e/ou autócrino (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Um dos seus  
6 sítios de ação seriam os folículos ovarianos, pois expressam quantidades consideráveis de  
7 receptores, assim como RNAm para todos componentes do sistema IGF (PONCHIROLI,  
8 2006; VASCONCELOS, 2009)

9 Diante deste preâmbulo, objetivou-se estudar a variação da resposta superovulatória  
10 e da qualidade embrionária em vacas *Bos indicus* (Nelore) submetidas a consecutivas  
11 aplicações do r-bST na região do agreste meridional de Pernambuco.

12

## 13 **MATERIAIS E MÉTODOS**

### 14 **Local do experimento e animais**

15 O experimento foi desenvolvido juntamente com a iniciativa privada na região do  
16 agreste meridional do estado de Pernambuco, em uma fazenda localizada no Município de  
17 Canhotinho-PE (latitude -08° 52' 56" e Longitude -36° 11' 28"), no período de Julho a  
18 Setembro de 2013. Foram utilizadas 20 vacas Nelore, entre 4 e 7 anos, multíparas, cíclicas e  
19 com período de descanso médio de 180 dias, pré-selecionadas por exame clínico e  
20 ginecológico auxiliado por avaliação ultrassonográfica transretal consideradas aptas a  
21 reprodução. Os animais foram criados em regime extensivo, alimentadas com pastagem  
22 *Brachiaria decumbens*, sal mineral e água ad libitum. O escore de condição corporal (ECC)  
23 médio foi de  $2,8 \pm 0,2$  (escala de 1-5), e o peso corporal médio de  $419,5 \pm 56,4$  kg, para os  
24 dois grupos.

25

## **Grupos experimentais, dinâmica folicular e protocolo de Superovulação**

Os animais foram separados em dois grupos, 10 com utilização do r-bST por via subcutânea aplicado na prega caldal em lados alternados em cada aplicação (grupo BST) e 10 sem utilização (grupo Controle). O grupo Controle recebeu aplicação de solução fisiológica (placebo), nos mesmo momentos das aplicações de 500 mg r-bST do grupo BST, pela mesma via e volume, as quais ocorreram 21 dias antes do primeiro dia do protocolo (D-21) e foram repetidos de sete em sete dias até o início do protocolo descrito a baixo, totalizando quatro aplicações ( D-21, D-14, D-7 e D0).

As vacas foram submetidas a avaliação ultrassonográfica dos ovários durante as aplicações do r-bST, durante todo o protocolo de SOV (descrito abaixo) e no primeiro dia da coleta dos embriões. Foi acompanhada a dinâmica folicular avaliando-se o número de folículos e dimensionado o maior eixo, dos folículos com diâmetro maior de 5 mm. Foi utilizado ultrassom modo B, com transdutor de 5 mHZ (Pie Medical Akyla®).

O protocolo de SOV se iniciou com a introdução do implante de progesterona (dispositivo intravaginal bovino-DIB, Coopers Saúde Animal, São Paulo, Brasil), associado a 2,0 mg de Benzoato de Estradiol (BE) (Gonadiol, Coopers Saúde animal, São Paulo, Brasil) em qualquer dia do ciclo estral, correspondendo ao D0 do protocolo. No D4 se iniciou a aplicação de 133 mg FSH-p (Folltropin-V<sup>®</sup>, Bioniche Animal Health, Ontario, Canadá) de 12 em 12 horas, em doses decrescentes ate o D7. No D6 foi realizada a administração de 0,5 mg de Cloprostenol (Ciosin®, Coopers Saúde Animal, São Paulo, Brasil ), sendo o dispositivo de Progesterona retirado no D7 e 24 horas depois aplicado 1500 UI hCG (Vetecor, Hertape Callier, Barcelona, Espanha). Foram realizadas duas inseminações artificiais, transcervical, com sêmen da mesma partida de um reprodutor da raça Nelore proveniente de central de sêmen comercial, que ocorreram 12 e 24 horas após administração do hCG, Figura 1.

## 1 **Colheita e avaliação dos embriões**

2 As coletas dos embriões foram realizadas nos D15 e D16 pelo método não cirúrgico,  
3 sendo submetidos 5 animais de cada grupo por dia. As lavagens uterinas foram realizadas  
4 utilizando 1000 mL Solução Salina Tamponada Fosfatada (DPBS) (Nutricell, São Paulo,  
5 Brasil), em circuito fechado com fluxo descontínuo (REICHENBACH *et al.*, 2002). As  
6 estruturas recuperadas foram classificadas de acordo com o manual da Sociedade  
7 Internacional de Transferencia de Embriões (IETS) (ROBERTSON & NELSON, 1998).

8

## 9 **Análise estatística**

10 Os dados foram submetidos à análise de variância, nos casos em que houve  
11 significância no teste F, as médias foram comparadas pela diferença mínima significativa  
12 (d.m.s.) pelo teste de Tukey. Para todas as análises estatísticas realizadas foi adotado o nível  
13 de significância (p) de 5%. Para as variáveis número de corpos lúteos, folículos anovulatórios,  
14 estruturas recuperadas, embriões grau 1 e 2, embriões grau 3 e 4 foi empregado o teste *t* de  
15 students com nível de 5 % de significância. Em algumas variáveis a estatística realizada  
16 foi sob a forma descritiva (percentis) (CURI, 1997). Os dados foram analisados por meio do  
17 programa computacional *Sigma Stat 3.1*.

18

## 19 **RESULTADO e DISCUSSÃO**

20 Ao compararmos os resultados entre os grupos com relação as variáveis foliculares,  
21 diâmetro folicular e número de folículos, foram constatadas diferenças significativas, nos  
22 momentos D4 ( $p < 0,041$ ) e D7 ( $p = 0,002$ ), e D4 ( $p < 0,024$ ) e D5 ( $p < 0,031$ ), respectivamente,  
23 onde o grupo BST mostrou resultados mais elevados (Gráfico e Tabela 1). Isso demonstra que  
24 o GH aumentou o número de folículos, e diâmetro, presentes nas fases iniciais de  
25 desenvolvimento, o que é corroborado por muitas pesquisas *in vivo* (GONG *et al.*, 1993;

1 WEBB et al., 1994; SILVA, 2009; MARTINS et al, 2009) e *in vitro* (KIKUCHI et al., 2001;  
2 GILCHRIST, 2008). Levando a uma possível melhora na qualidade embrionária, pois é  
3 sabido que folículos maiores provavelmente geram corpos lúteos mais capazes, melhorando o  
4 desenvolvimento embrionário inicial e, conseqüentemente, aumentando a taxa de prenhez em  
5 fêmeas bovinas (VASCONCELOS, 2009). Além disso o fato de não ser observada diferença  
6 significativa do dia da IA, apesar de numericamente ocorrer aumento, pode ser justificado  
7 pela presença do FSH no momento da divergência levando a um resgate de folículos que  
8 naturalmente não cresceriam, os quais podem conter oócitos com atividade inferior aos dos  
9 folículos do grupo BST que já viam com um crescimento favorável. Tais interferências estão  
10 possivelmente relacionadas a ação do sistema IGF, onde uma maior biodisponibilidade da  
11 IGF-I leva a uma maior desenvolvimento oocitário e folicular, tendo papel crítico na seleção  
12 do folículo dominante (GINTHER *et al.*, 2007; FORTUNE *et al.*, 2004). Estando presente  
13 ainda nas secreções da tuba uterina, favorecendo o desenvolvimento do oócito e do possível  
14 embrião (PONCHIROLI, 2006).

15         Analisando o efeito da aplicação do r-bST nas vacas com relação ao número de  
16 embriões entre os grupos foi constatado que ocorreu um aumento numérico de embriões do  
17 grupo BST (67) para o grupo Controle (44), porém não ocorreu diferença significativa  
18 ( $p>0,05$ ). O mesmo foi observado com relação ao número de embriões em suas diferentes  
19 classificações, de folículos anovulatórios e corpos lúteos (Tabela 2), Corroborando com  
20 trabalhos que não observaram aumento no número de embriões (BORGES et al., 2001,  
21 MORAIS JR et al., 2008; VASCONCELOS, 2009). Porém, segundo Nagano et al. (2004) a  
22 resposta a diferentes tratamentos com r-bST, embora seja geralmente positiva, varia com  
23 relação a sua magnitude. Desta forma, estes resultados são semelhantes aos observados por  
24 Gong et al. (1993 e 1996), Herrler et al (1994) e Nagano et al. (2004), nos quais o uso do r-  
25 bST aumentou o número total de embriões e embriões viáveis, onde o aumento é justificado

1 pelo maior número de pequenos folículos nos ovários do grupo BST (ROMERO et al 1991;  
2 GONG et al., 1996), fato este observado em nossos resultados. Isso pode ser explicado por  
3 ação direta do GH ou por aumento das concentrações de IGF-I, que podem também interferir  
4 na taxa de fecundação, através de ações já descritas anteriormente (LUCY et al., 1995;  
5 MOREIRA et al., 2002).

6 Com relação ao estadio embrionário foi observado proporções conforme Tabela 3,  
7 onde a maior taxa de estruturas coletadas encontravam-se nos estádios de mórula (37,3%) e  
8 blastocisto expandido (16,4%) para o grupo BST e mórula (47,7%) e blastocistos iniciais  
9 (29,5%) para o grupo Controle, tendo 44,7% entre blastocisto e blastocisto eclodido o grupo  
10 BST e apenas 15,9% o grupo Controle. Isso demonstra a existência de variabilidade no  
11 desenvolvimento e na qualidade embrionária, assim como variações entre as doadoras  
12 (LINDNER & WRIGHT, 1983). Porém o grupo BST apresenta uma maior proporção nos  
13 estádios mais desenvolvidos, que vai ao encontro com o descrito por Moreira et al. (2002) e  
14 Ramos et al (2007), em estudos in vitro, com a adição de GH e IGF-I ao meio de cultivo de  
15 embriões bovinos, e Maffili et al (2001) em estudo com superovulação em comundongas,  
16 demonstrando aceleração da cinética de desenvolvimento embrionário. Foi observada também  
17 uma redução proporcional dos blastocistos iniciais (10,4% - BST x 29,3% – Controle),  
18 corroborando por Nagano et al. (2004) e indo contra o encontrado por Moreira et al. (2002)  
19 que verificou um aumento de blastocistos. Outros trabalhos realizados in vivo, com  
20 superovulação em bovinos, não observaram diferenças entre os estádios embrionários,  
21 demonstrando alta variabilidade entre estudos (BORGES et al., 2001; MORAIS JR et al.,  
22 2008; VASCOCELOS 2009).

23 Analisando o escore de condição corporal nos grupos em diferentes momentos foi  
24 constatado que ocorreu uma diminuição significativa no grupo BST, entre o D-21 e o D7  
25 ( $p < 0,017$ ), não evidenciado no grupo Controle, explicado pela ação metabólica de tal fator de

1 crescimento, que parece não ser suficientes para interferir negativamente nos resultados. Pois  
2 este exerce efeitos metabólicos importantes, como a inibição do transporte de glicose para os  
3 tecidos periféricos (resistência à insulina), elevação da glicemia (atividade diabetogênica),  
4 concomitante elevação da taxa de oxidação de lipídeos (atividade lipolítica) e aminoácidos  
5 (LAWRENCE & FOWLER, 2002).

6 Os resultados favoráveis encontrados pela utilização do r-bST, em relação a alguns  
7 trabalhos, podem ser justificadas por uma provável manutenção de concentrações mais  
8 elevadas de tal hormônio, devido às aplicações mais frequentes. Isso está de acordo com o  
9 descrito por Rieger et al. (1991), onde doses maiores que as utilizadas para aumentar a  
10 produção leiteira devem ser utilizadas para conseguir-se estimular os ovários. Em adição a  
11 forma de aplicação, sendo realizada 21 dias antes do início do protocolo, pois é sabido que  
12 são necessários em torno de 60 dias para que um folículo primordial ativado, atinja o tamanho  
13 ovulatório (LUSSIER *et al.*, 1987). Dessa forma, a manutenção de altas doses de IGF-I  
14 induzidas pelo r-bST nos períodos pre-superovulação possibilitam um tempo maior de  
15 desenvolvimento dos oócitos e folículos em ambiente mais favorável para o seu  
16 desenvolvimento.

17

## 18 **CONCLUSÃO**

19 Em vacas *Bos Indicus*, da raça Nelore, submetidas a protocolos de SOB, a utilização  
20 do r-bST, em doses repetidas, favorece a uma potencialização do número de folículos,  
21 maiores que 5 mm, do diâmetro foliculares e a uma aceleração da cinética embrionária. Porém  
22 o presente estudo constatou não haver diferenças significativas ao final do protocolo, apesar  
23 de numericamente os resultados serem favoráveis. Podendo existir a interferência de outros  
24 hormônios, como o FSH. Sendo necessário mais estudos com relação a forma de aplicação e a  
25 dose utilizada, devido a variabilidade de seus resultados.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25

## AGRADECIMENTOS

A aqueles que fazem a Fazenda Murici, por disponibilizar estrutura física, animais e mão-de-obra para desenvolvimento do experimento. Ao Laboratório Coopers por fornecer parte dos hormônios utilizados demonstrando apoio a pesquisa. E a CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado ao primeiro autor.

## REFERÊNCIAS

ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, New York, v.39, p.7-24, 1993.

BARROS C.M.; NOGUEIRA M.F.G.; Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**; v. 56, p. 1483-1496. 2001

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulação em zebuínos de corte. **1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, p. 212-222. 2004.

BARUSELLI P.S. et al. Avanços nos protocolos reprodutivos em fêmeas bovinas utilizando sêmen sexado. **Biblioteca técnicas ABS pecplan**: in [http://www.abspecplan.com.br/upload/library/Avancos-Sexado\\_Baruselli.pdf](http://www.abspecplan.com.br/upload/library/Avancos-Sexado_Baruselli.pdf) acessado em 20/12/2013. 2006.

BÓ, G.A. et al. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 307-326. 2003.

BORGES, A.M. et al. Resposta superovulatória de novilhas mestiças holandês-zebu tratadas com somatotropina bovina recombinante (rbST). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1439-1444, 2001.

BURATINI, J. et al. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in Nellore (*B. indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421-431, 2000.

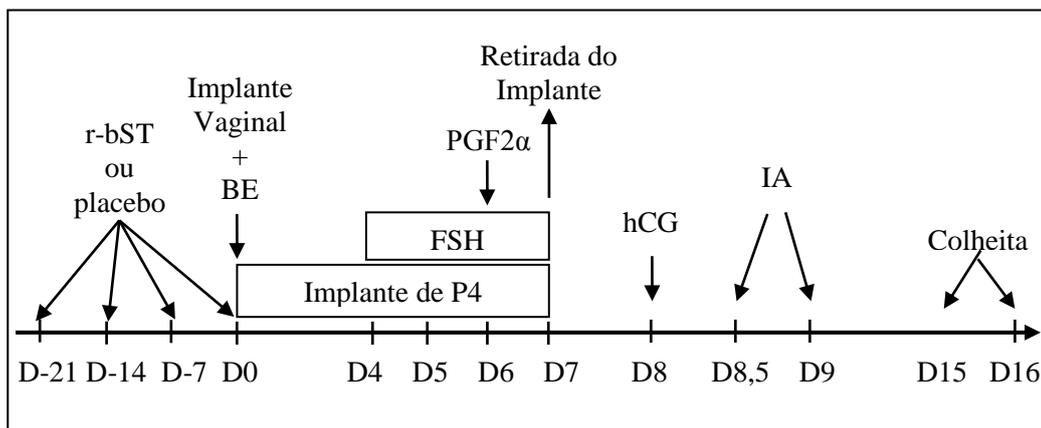
- 1 CURSIO, B. DA R. Maturação e vitrificação de oócitos eqüino incubados em meio contendo  
2 hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante a insulina. Tese (Mestrado) -  
3 **Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas, p. 63,2005.
- 4 FIGUEIREDO, R.A., et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*),  
5 **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.
- 6 FONSECA, J.F. Corpo lúteo acessório, perfil plasmático de progesterona e taxa de gestação  
7 de receptoras de embriões bovinos tratadas com diferentes hormônios. Dissertação (Mestrado)  
8 - **Programa de Pós-Graduação, Escola da Universidade Federal de Minas Gerais**,  
9 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 1999.
- 10 FORTUNE J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles  
11 and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 135–163. 2003.
- 12 Gilchrist RB, Lane M, Thompson JG. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell  
13 function and oocyte quality. **Hum Reprod Update**, v.14(2), p. 159-77. 2008;
- 14 GINTHER O.J. et al. Follicle deviation and diurnal variation in circulating hormone  
15 concentrations in mares. **Animal Reproduction Science**, v. 100, p. 197-203, 2007.
- 16 GONG, J.G. et al. Effect of recombinant bovine somatotropin, on the superovulatory response  
17 to pregnant serum gonadotropin in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 1141-1149,  
18 1993.
- 19 GONG J.G. et al. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the  
20 superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, v. 45, p. 611–622. 1996
- 21 HAFEZ, D; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução animal**. 7 ed. São Paulo: Manole, p. 69-82, 2004.
- 22 HERRLER, A., et al. Effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) on follicular IGF-I  
23 contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a  
24 preliminary tudy. **Theriogenology**, New York, v.41, p.601-611, 1994.

- 1 IBGE. **Produção da Pecuária Municipal 2011**. Rio de Janeiro, v. 37, p.1-55, 2012
- 2 Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2012/ppm2012.pdf)
- 3 [2012/ppm2012.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2012/ppm2012.pdf)>. Acesso em: 20 de outubro de 2013.
- 4 KIKUCHI, N., et al. Inhibitory action of leptin on early follicular growth differs in immature
- 5 and adult female mice. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 1, p. 66-71, 2001.
- 6 LAWRENCE, T.L. J.; FOWLER, V.R. **Growth of farm animals**. 2ed. New York: Cab
- 7 International, 337p. 2002.
- 8 LINDNER, G. M., WRIGTH, R. W. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation.
- 9 **Theriogenology**, v.20,p.407-416, 1983.
- 10 LUCY, M.C. et al. Effects of somatotropin the conceptus, uterus, and ovary during maternal
- 11 recognition of pregnancy on cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, n.1, p.73-82,
- 12 1995.
- 13 LUSSIER, J.G.; MATTON, P.; DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of cow.
- 14 **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p.301-307, 1987.
- 15 NAGANO, A.Y. et al. A somatotropina bovina recombinamento (rbST) na superovulação de
- 16 fêmeas bovinas. **Archives of Veterinary Science**, v.9, n.2, p.101-106, 2004.
- 17 NORMAN, A.W., LITWACK, G. Anterior pituitary hormones. **Hormones**. San Diego:
- 18 Academic, p.183-210, 1987.
- 19 AFFILI, V.V. et al. Efeitos da somatotropina bovina na resposta superovulatória e na taxa de
- 20 clivagem de zigotos de camundongas (*Mus musculus*). **Revista Brasileira de Reprodução**
- 21 **Animal**, Belo Horizonte, v.25, n.3, p. 377-379, 2001.
- 22 MAPA. Informativo nº 47 – 15 de novembro de 2013. Ministério da Agricultura, Pecuária e
- 23 Abastecimento. **Secretaria de Política Agrícola, Departamento de Economia Agrícola,**
- 24 **Cordenação-Geral de Estudos e Informações Agropecuárias**. Esplanada dos Ministérios,
- 25 Bloco D - 5º Andar - 70043-900 – Brasília, DF. 2014.

- 1 MARTINS, F.S. et al. Growth and Differentiation Factor-9 Stimulates Goat Primordial  
2 Follicles Activation In vitro and the Progression to Secondary Follicles. Dissertação  
3 (Mestrado) - **Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Veterinária da Universidade**  
4 **Estadual do Ceará**. Ceará. 2009.
- 5 MORAIS JR., F.J. Efeito da somatotropina recombinante bovina (rbst) na resposta ovulatória  
6 e na qualidade dos embriões de vacas da raça nelore. Dissertação (Mestrado). **Universidade**  
7 **Federal do Piauí**. Piauí, 2008.
- 8 MOREIRA F, et al. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on  
9 development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 895–907. 2002.
- 10 PONCHIROLLI, C.B. Desenvolvimento de embriões bovinos in vitro na presença de IGF-1,  
11 GH e insulina nos meios de maturação de ovócitos e cultivo embrionário. 2006, 79p.  
12 Dissertação (Mestrado) - **Programa de Pós-Graduação, Faculdade de Medicina**  
13 **Veterinária e Zootecnia**, Universidade Estadual Paulista. Botucatu. 2006.
- 14 PTASZYNSKA M. et al. Compêndio de Reprodução Animal. **Intervet**, 9ed, p 399. 2007.
- 15 RAMOS, A.A. et al. Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e  
16 produção in vitro de embriões em vacas Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2,  
17 p.380-386, 2007.
- 18 REICHENBACH, H.D. et al. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In:  
19 **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**, São Paulo, Livraria e Editora Varela, p. 127-  
20 178, 2002.
- 21 RIEGER, D. et al. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin on  
22 plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated  
23 Holstein heifers. **Theriogenology**, v.35, n.5, p.863-868, 1991.

- 1 ROBERTSON, I.; NELSON, R. E. Certificação e identificação de embriões. In: International  
2 Embryo Transfer Society. USA, abril, Trad. OLIVEIRA FILHO, E. B. **Manual da Sociedade**  
3 **Internacional de Transferência de Embriões**. Uberlândia:SBTE, Cap. 9, p.109- 122. 1998.
- 4 SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R.; VAN DEN HURK R. Involvement of growth hormone  
5 (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis.  
6 **Theriogenology**, v. 71, p. 1193–1208. 2009
- 7 STROUD, B.; Callesen, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. **Animal**  
8 **Reproduction**, v.9, n.3, p.210-216, Jul./Sept. 2012
- 9 VASCONCELOS, L.V. Efeito do pré-tratamento com somatotropina recombinante bovina  
10 (rbST) sobre a resposta superovulatória e viabilidade de embriões de doadoras Nelore, 89p,  
11 Tese (Doutorado) – **Programa de Pós-Graduação, Escola de Medicina Veterinária,**  
12 **Universidade Federal da Bahia.** Salvador. 2009.
- 13 WEBB, R.; GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A. Role of growth hormone and intrafollicular  
14 peptides in follicle development in cattle. **Theriogenology**, New York, v.41, p.25-30, 1994.
- 15 WEBB, R. et al. Intra-ovarian regulation of follicular development and oocyte competence in  
16 farm animals. **Theriogenology**, v. 68S, p. S22-S29, 2007.
- 17

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15



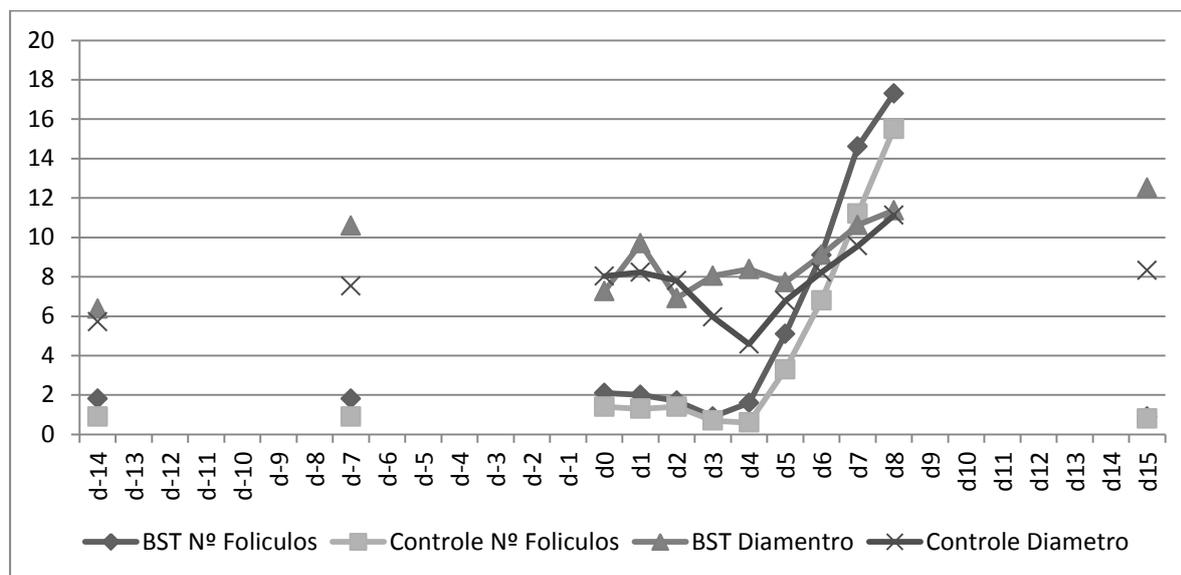
**Figura 1**-Desenho esquemático do protocolo de sincronização de estro e superovulação com manutenção da P4 por 36 horas após a aplicação PGF<sub>2α</sub>.

1 **Tabela 1 -** Médias dos diâmetros foliculares (BST e Controle) de vacas *Bos Indicus*, da raça Nelore  
 2 submetidas a superovulação.

Tratamento	Dias do Protocolo												
	D-14	D-7	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D15	
Diâmetro	BST	6,4	10,6	7,3	9,7	6,9	8,0	8,4 <sup>a</sup>	7,7	9,1	10,6 <sup>a</sup>	11,4	12,5
	Controle	5,7	7,5	8,0	8,2	7,8	6,0	4,6 <sup>b</sup>	6,8	8,2	9,6 <sup>b</sup>	11,1	8,3
NºFoliculos	BST	1,80	1,80	2,10	2,00	1,70	0,90	1,60 <sup>a</sup>	5,10 <sup>a</sup>	9,10	14,60	17,30	0,90
	Controle	0,90	0,90	1,40	1,30	1,40	0,70	0,60 <sup>b</sup>	3,30 <sup>b</sup>	6,80	11,20	15,50	0,80

<sup>ab</sup> Letras diferentes existe diferença entre grupos

3  
4  
5  
6  
7



8  
9  
10  
11  
12  
13

**Gráfico 1 –** Distribuição das médias dos diâmetros foliculares (BST e Controle) de vacas *Bos Indicus*, da raça Nelore submetidas a superovulação

1 **Tabela 2** – Total, medias ( $\bar{x}$ ) e percentes de Corpos Lúteos, foliculos anovulatórios, estruturar  
 2 recuperas, numero de blastómeros (BST e Controle) de vacas *Bos Indicus*, da raça Nelore submetidas  
 3 a superovulação.

	<b>Grupo Experimental</b>					
		<b>BST</b>			<b>CONTROLE</b>	
	<b>total</b>	$\bar{x}$	<b>%</b>	<b>total</b>	$\bar{x}$	<b>%</b>
<b>Corpos Lúteos</b>	139	13,9 ( $\pm 5,3$ )	-	109	10,9 ( $\pm 4,5$ )	-
<b>Foliculos anovulatórios</b>	9	0,9 ( $\pm 1,4$ )	-	8	0,8 ( $\pm 1,13$ )	-
<b>Estruturas recuperadas</b>	67	6,7 ( $\pm 6,3$ )	-	44	4,4 ( $\pm 5,6$ )	-
<b>Embriões grau 1 e 2</b>	48	4,8	71,6%	32	3,2	72,7%
<b>Embriões grau 3 e 4</b>	19	1,9	28,4%	12	1,2	27,3%

4 <sup>ab</sup> Letras diferentes entre grupos existe diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

5

6

7

8

- 1 **Tabela 3** – Percentagem dos estagios embrionarios dos grupos BST e Controle de vacas *Bos Indicus*, da raça  
 2 Nelore submetidas a superovulação.

	<b>Grupo Experimental</b>							
	<b>BST</b>				<b>CONTROLE</b>			
	<b>D6</b>	<b>D7</b>	<b>TOTAL</b>	<b>%</b>	<b>D6</b>	<b>D7</b>	<b>TOTAL</b>	<b>%</b>
<b>Não fertilizado</b>	0	0	0	0,0	2	1	3	6,8
<b>De 2 a 12 células</b>	1	0	1	1,5	0	0	0	0,0
<b>Mórula Inicial</b>	3	1	4	6,0	0	0	0	0,0
<b>Mórula</b>	11	14	25	37,3	20	1	21	47,7
<b>Blastocisto Inicial</b>	2	5	7	10,4	11	2	13	29,5
<b>Blastocisto</b>	0	7	7	10,4	0	3	3	6,8
<b>Blastocisto Expandido</b>	0	11	11	16,4	0	3	3	6,8
<b>Blastocisto Eclodido</b>	0	12	12	17,9	0	1	1	2,3
<b>Total</b>	17	50	67	100	33	11	44	100

## 6. ANEXO



### Normas para publicação

**1. CIÊNCIA RURAL** - Revista Científica do Centro de Ciências Rurais da Universidade Federal de Santa Maria publica artigos científicos, revisões bibliográficas e notas referentes à área de Ciências Agrárias, que deverão ser destinados com exclusividade.

**2. Os artigos científicos, revisões e notas** devem ser encaminhados via [eletrônica](#) e editados em idioma Português ou Inglês. Todas as linhas deverão ser numeradas e paginadas no lado inferior direito. O trabalho deverá ser digitado em tamanho A4 210 x 297mm com, no máximo, 25 linhas por página em espaço duplo, com margens superior, inferior, esquerda e direita em 2,5cm, fonte Times New Roman e tamanho 12. **O máximo de páginas será 15 para artigo científico, 20 para revisão bibliográfica e 8 para nota, incluindo tabelas, gráficos e figuras.** Figuras, gráficos e tabelas devem ser disponibilizados ao final do texto e individualmente por página, sendo que **não poderão ultrapassar as margens e nem estar com apresentação paisagem.**

**3. O artigo científico** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução com Revisão de Literatura; Material e Métodos; Resultados e Discussão; Conclusão e Referências; Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição; Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

**4. A revisão bibliográfica** (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) **deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Introdução; Desenvolvimento; Conclusão; e Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

**5. A nota (Modelo [.doc](#), [.pdf](#)) deverá conter os seguintes tópicos:** Título (Português e Inglês); Resumo; Palavras-chave; Abstract; Key words; Texto (sem subdivisão, porém com introdução; metodologia; resultados e discussão e conclusão; podendo conter tabelas ou figuras); Referências. Agradecimento(s) e Apresentação; Fontes de Aquisição e Informe Verbal; Comitê de Ética e Biossegurança devem aparecer antes das referências. **Pesquisa envolvendo seres humanos e animais obrigatoriamente devem apresentar parecer de aprovação de um comitê de ética institucional já na submissão.** Alternativamente pode ser enviado um dos modelos ao lado ([Declaração Modelo Humano](#), [Declaração Modelo Animal](#)).

**6.** Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no formato pdf no endereço eletrônico da revista [www.scielo.br/cr](http://www.scielo.br/cr).

**7.** Descrever o título em português e inglês (caso o artigo seja em português) - inglês e português (caso o artigo seja em inglês). Somente a primeira letra do título do artigo deve ser maiúscula exceto no caso de nomes próprios. Evitar abreviaturas e nomes científicos no título. O nome científico só deve ser empregado quando estritamente necessário. Esses devem aparecer nas palavras-chave, resumo e demais seções quando necessários.

**8.** As citações dos autores, no texto, deverão ser feitas com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação, conforme exemplos: Esses resultados estão de acordo com os reportados por MILLER & KIPLINGER (1966) e LEE et al. (1996), como uma má formação congênita (MOULTON, 1978).

**9.** As Referências deverão ser efetuadas no estilo ABNT (NBR 6023/2000) conforme normas próprias da revista.

#### **9.1.** Citação de livro:

JENNINGS, P.B. **The practice of large animal surgery**. Philadelphia : Saunders, 1985. 2v.

TOKARNIA, C.H. et al. (Mais de dois autores) **Plantas tóxicas da Amazônia a bovinos e outros herbívoros**. Manaus : INPA, 1979. 95p.

**9.2.** Capítulo de livro com autoria:  
GORBAMAN, A. A comparative pathology of thyroid. In: HAZARD, J.B.; SMITH, D.E. **The thyroid**. Baltimore : Williams & Wilkins, 1964. Cap.2, p.32-48.

**9.3.** Capítulo de livro sem autoria:  
COCHRAN, W.C. The estimation of sample size. In: \_\_\_\_\_. **Sampling techniques**. 3.ed. New York : John Willey, 1977. Cap.4, p.72-90.  
TURNER, A.S.; McILWRAITH, C.W. Fluidoterapia. In: \_\_\_\_\_. **Técnicas cirúrgicas em animais de grande porte**. São Paulo : Roca, 1985. p.29-40.

**9.4.** Artigo completo:  
O autor deverá acrescentar a url para o artigo referenciado e o número de identificação DOI (Digital Object Identifiers), conforme exemplos abaixo:

MEWIS, I.; ULRICH, CH. Action of amorphous diatomaceous earth against different stages of the stored product pests *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae), *Sitophilus granarius* (Coleoptera: Curculionidae) and *Plodia interpunctella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Stored Product Research**, Amsterdam (Cidade opcional), v.37, p.153-164, 2001. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X\(00\)00016-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0022-474X(00)00016-3)>. Acesso em: 20 nov. 2008. doi: 10.1016/S0022-474X(00)00016-3.

PINTO JUNIOR, A.R. et al (Mais de 2 autores). Resposta de *Sitophilus oryzae* (L.), *Cryptolestes ferrugineus* (Stephens) e *Oryzaephilus surinamensis* (L.) a diferentes concentrações de terra de diatomácea em trigo armazenado a granel. **Ciência Rural**, Santa Maria (Cidade opcional), v. 38, n. 8, p.2103-2108, nov. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782008000800002&lng=pt&nrm=iso)>. Acesso em: 25 nov. 2008. doi: 10.1590/S0103-84782008000800002.

#### 9.5. Resumos:

RIZZARDI, M.A.; MILGIORANÇA, M.E. Avaliação de cultivares do ensaio nacional de girassol, Passo Fundo, RS, 1991/92. In: JORNADA DE PESQUISA DA UFSM, 1., 1992, Santa Maria, RS. **Anais...** Santa Maria : Pró-reitoria de Pós-graduação e Pesquisa, 1992. V.1. 420p. p.236.

#### 9.6. Tese,

dissertação:

COSTA, J.M.B. **Estudo comparativo de algumas características digestivas entre bovinos (Charolês) e bubalinos (Jafarabad)**. 1986. 132f. Monografia/Dissertação/Tese (Especialização/ Mestrado/Doutorado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria.

#### 9.7. Boletim:

ROGIK, F.A. **Indústria da lactose**. São Paulo : Departamento de Produção Animal, 1942. 20p. (Boletim Técnico, 20).

#### 9.8. Informação

verbal:

Identificada no próprio texto logo após a informação, através da expressão entre parênteses. Exemplo: ... são achados descritos por Vieira (1991 - Informe verbal). Ao final do texto, antes das Referências Bibliográficas, citar o endereço completo do autor (incluir E-mail), e/ou local, evento, data e tipo de apresentação na qual foi emitida a informação.

#### 9.9. Documentos

eletrônicos:

MATERA, J.M. **Afecções cirúrgicas da coluna vertebral: análise sobre as possibilidades do tratamento cirúrgico**. São Paulo : Departamento de Cirurgia, FMVZ-USP, 1997. 1 CD.

GRIFON, D.M. Arthroscopic diagnosis of elbow displasia. In: WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 31., 2006, Prague, Czech Republic. **Proceedings...** Prague: WSAVA, 2006. p.630-636. Acessado em 12 fev. 2007. Online. Disponível em: <http://www.ivis.org/proceedings/wsava/2006/lecture22/Griffon1.pdf?LA=1>

UFRGS. **Transgênicos**. Zero Hora Digital, Porto Alegre, 23 mar. 2000. Especiais. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.zh.com.br/especial/index.htm>

ONGPHIPHADHANAKUL, B. Prevention of postmenopausal bone loss by low and conventional doses of calcitriol or conjugated equine estrogen. **Maturitas**, (Ireland), v.34, n.2, p.179-184, Feb 15, 2000. Obtido via base de dados MEDLINE. 1994-2000. Acessado em 23 mar. 2000. Online. Disponível em: <http://www.Medscape.com/server-java/MedlineSearchForm>

MARCHIONATTI, A.; PIPPI, N.L. Análise comparativa entre duas técnicas de recuperação de úlcera de córnea não infectada em nível de estroma médio. In: SEMINARIO LATINOAMERICANO DE CIRURGIA VETERINÁRIA, 3., 1997, Corrientes, Argentina. **Anais...** Corrientes : Facultad de Ciencias Veterinarias - UNNE, 1997. Disquete. 1 disquete de 31/2. Para uso em PC.

**10.** Desenhos, gráficos e fotografias serão denominados figuras e terão o número de ordem em algarismos arábicos. A revista não usa a denominação quadro. As figuras devem ser disponibilizadas individualmente por página. Os desenhos figuras e gráficos (com largura de no máximo 16cm) devem ser feitos em editor gráfico sempre em qualidade máxima com pelo menos 300 dpi em extensão .tiff. As tabelas devem conter a palavra tabela, seguida do número de ordem em algarismo arábico e não devem exceder uma lauda.

**11.** Os conceitos e afirmações contidos nos artigos serão de inteira responsabilidade do(s) autor(es).

**12.** Será obrigatório o cadastro de todos autores nos metadados de submissão. O artigo não tramitará enquanto o referido item não for atendido. Excepcionalmente, mediante consulta prévia para a Comissão Editorial outro expediente poderá ser utilizado.

**13.** Lista de verificação (Checklist [.doc](#), [.pdf](#)).

**14.** Os artigos serão publicados em ordem de aprovação.

**15.** Os artigos não aprovados serão arquivados havendo, no entanto, o encaminhamento de uma justificativa pelo indeferimento.

**16.** Em caso de dúvida, consultar artigos de fascículos já publicados antes de dirigir-se à Comissão Editoria