



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

SÉRGIO HENRIQUE COSTA JÚNIOR

**DINÂMICA HORMONAL E TAXA DE EMBRIÕES *IN VITRO* DE FÊMEAS
BOVINAS PREVIAMENTE TRATADAS COM SOMATOTROPINA
RECOMBINANTE BOVINA (rbST)**

SÃO LUÍS – MA

2017

SÉRGIO HENRIQUE COSTA JÚNIOR

**DINÂMICA HORMONAL E TAXA DE EMBRIÕES *IN VITRO* DE FÊMEAS
BOVINAS PREVIAMENTE TRATADAS COM SOMATOTROPINA
RECOMBINANTE BOVINA (rbST)**

Monografia apresentada ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão para a obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior

SÃO LUÍS – MA

2017

Costa Júnior, Sérgio Henrique.

Dinâmica hormonal e taxa de embriões in vitro de fêmeas bovinas previamente tratadas com somatotropina recombinante bovina (rbST) / Sérgio Henrique Costa Júnior. – São Luís, 2017.

50f.

Monografia (Graduação) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Maranhão, 2017.

Orientador: Prof. Felipe de Jesus Moraes Júnior.

1. Bovinos. 2. PIV. 3. RbST. I. Título.

CDU 636.2:612.646

SÉRGIO HENRIQUE COSTA JÚNIOR

**DINÂMICA HORMONAL E TAXA DE EMBRIÕES *IN VITRO* DE FEMÊAS
BOVINAS PREVIAMENTE TRATADAS COM SOMATOTROPINA
RECOMBINANTE BOVINA (rbST)**

Monografia apresentada ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão para a obtenção do grau de Bacharel em Medicina Veterinária.

Monografia de Graduação defendida e aprovada em ____/____/____ pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo de Macêdo Chaves
1º examinador

Msc. Luciana Cordeiro Rosa
2º examinador

Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha mãe, Shirleide (Bam), por ter paciência, tentar me entender em todos os momentos e não desistir de mim.

Aos meus avós Glória, Sidney, Flordimar e minha prima Yasmin (*in memoriam*) que não estão mais presentes ao nosso lado, mas tenho certeza que estão orgulhosos desta etapa da minha vida.

Aos meus familiares que sempre contribuíram com minha vida acadêmica, me auxiliando em diversas atividades. Em especial, aos meus primos, Letícia e Fernando (Dedel) e minha avó Fátima, os quais sei que poderei contar sempre.

Aos meus amigos de curso: Rildon, Douglas, Joanna, Alcindo, Sarah, Larissa, Leandro e Marcella. Agradeço a vida por ter conhecido cada um de vocês e obrigado por me proporcionar momentos inesquecíveis.

A equipe do Laboratório de Reprodução – LABRA/UEMA, em especial, Luciana, Brenda, Hallef e estagiários pela ajuda nas execuções do projeto.

Aos professores Helder Pereira e Hamilton Pereira, CCA/UEMA, pela disponibilização dos animais para estudo e ao Mazinho, funcionário do Núcleo de Ruminantes/UEMA, sempre nos auxiliando no manejo das vacas durante todo o experimento.

Aos ex-colaboradores do LABRA Naia, Sâmara, Diego, Douglas e Paula, gratidão por cada ensinamento recebido desde que entrei no laboratório.

Ao Prof. Dr. Ricardo Chaves pela contribuição na minha formação na sala de aula e por ter aceito o meu convite para compor a presente banca examinadora.

Ao Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior, meu orientador, por ter me dado a oportunidade de trabalhar ao seu lado e por todos os ensinamentos desde a minha primeira iniciação científica até a confecção do trabalho de conclusão do curso.

Meu eterno agradecimento ao Hallef Trovão pela amizade e zelo que tivemos ao longo do curso, pelos conselhos trocados, pelo incentivo nos momentos difíceis durante a graduação e por servir como inspiração em vários momentos da minha vida.

E demais pessoas que passaram pela minha vida e fazem parte da minha história,
obrigado por todas as lições aprendidas para eu me tornar melhor a cada dia.

“They say I’m too young to love you. You say I’m too dumb to see, they judge me like a picture book. By the colors, like they forgot to read. I’m a Brooklyn baby”

Elizabeth Grant & Barrie-James O’Neill

RESUMO

O uso da rbST antes do início das sessões de punção folicular pode ser um valioso recurso para aumentar o número e a qualidade dos oócitos coletados *in vivo* e dos embriões produzidos *in vitro*. Avaliar o efeito do pré-tratamento da somatotropina recombinante bovina (rbST) sobre produção *in vitro* de embriões e na dinâmica hormonal da progesterona, estradiol, hormônio do crescimento e IGF-1 de fêmeas bovinas. Doze animais foram divididos em três grupos experimentais: controle (n = 4), 250mg (n = 4) e 500mg (n = 4) de rbST A *Ovum Pick-Up* (OPU) foi realizada em intervalos de 7 dias. Os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) foram classificados sob lupa estereomicroscópica. As amostras de sangue (plasma) ocorreram 60 dias antes da primeira aspiração, em intervalos de 12 dias, com as coletas realizadas nos mesmos dias das aplicações de rbST. O período de maturação *in vitro* (MIV) foi de 24h. Posteriormente, os CCOs e os espermatozoides foram incubados por 22h. Após a fecundação *in vitro* (FIV), o desenvolvimento dos blastocistos foi avaliado aos sete dias após o início da FIV (D0). As dosagens hormonais foram efetuadas utilizando kits comerciais de acordo com as recomendações do fabricante. Os dados para as variáveis foram submetidos ao teste de normalidade, à análise de variância (ANOVA) ou ao teste não - paramétrico de Wilcoxon para comparação de médias, na probabilidade de 5%. As concentrações plasmáticas hormonais foram submetidas ao Teste de normalidade Cramer-von Mises e para comparação de média foi Student-Newman-Keuls (SNK) 5% de probabilidade. Dados qualitativos foram comparados pelo teste do Qui-quadrado, para $p < 0,05$. As análises foram executadas utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2015). O pré-tratamento da somatotropina recombinante bovina (rbST) nas fêmeas bovinas da raça Girolando não influenciou na taxa de desenvolvimento embrionário na produção *in vitro*, assim como não surtiu efeito sobre a dinâmica hormonal de fêmeas bovinas nas concentrações plasmáticas de progesterona, estradiol e IGF-1 quando entre os grupos tratados com 250 mg e 500 mg e o grupo não tratado, não havendo também variância significativa entre os dias de aplicação e OPU.

Palavras-chave: Hormônios; PIV; rbST.

ABSTRACT

The use of rbST before to the initiation of follicular puncture sessions may be a valuable resource for increasing the number and quality of oocytes collected *in vivo* and embryos produced *in vitro*. To evaluate the effect of pre-treatment of bovine recombinant somatotropin (brST) on the *in vitro* production of embryos and the hormonal dynamics of progesterone, estradiol, growth hormone and IGF-1 of bovine females. Twelve animals were divided into three experimental groups: control (n = 4), 250mg (n = 4) and 500mg (n = 4) of rbST. *Ovum Pick-Up* (OPU) was performed at 7-day intervals. The *cumulus*-oocyte complexes (COCs) were classified under a stereomicroscopic magnifying glass. Blood samples (plasma) occurred 60 days before the first aspiration, at intervals of 12 days, with collections performed on the same days as the rbST applications. The *in vitro* maturation period (IVM) was 24h. Subsequently, the COCs and spermatozoa were incubated for 22h. After *in vitro* fertilization (IVF), the development of blastocysts was evaluated seven days after the initiation of IVF (D0). Hormonal dosages were performed using commercial kits according to the manufacturer's recommendations. The data for the variables were submitted to the normality test, the analysis of variance (ANOVA) or the non - parametric Wilcoxon test for comparison of means, in the probability of 5%. The hormonal plasma concentrations were submitted to the Cramer-von Mises Normal Test and the Student-Newman-Keuls (SNK) mean score was 5% of probability. Qualitative data were compared by the chi-square test, for $p < 0,05$. The analyzes were performed using the Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2015). The pre-treatment of bovine recombinant somatotropin (brST) in Girolando cattle did not influence the rate of embryonic development in *in vitro* production, nor did it have an effect on the hormonal dynamics of bovine females in plasma concentrations of progesterone, estradiol and IGF -1 when between the groups treated with 250 mg and 500 mg and the untreated group, there was also no significant variance between the days of application and OPUs.

Keywords: Hormones; PIV; rbST.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Protocolo de aplicação do rbST e as seções de OPU's dos grupos experimentais.....24
- Figura 2.** Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base no estágio de desenvolvimento, para embriões produzidos in vitro a partir de CCOs aspirados in vivo por OPU de fêmeas bovinas.....30
- Figura 3.** Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base na qualidade morfológica, para embriões produzidos in vitro a partir de CCOs aspirados in vivo por OPU de fêmeas bovinas.....32
- Figura 4.** Média das concentrações plasmáticas de progesterona de fêmeas bovinas não tratadas (◆) e tratadas com 250mg (■) ou 500mg (▲) com somatotropina recombinante bovina nos dias de sua aplicação e aspiração *Ovum pick-up*.....33
- Figura 5.** Média das concentrações plasmáticas de estradiol de fêmeas bovinas não tratadas (◆) e tratadas com 250mg (■) ou 500mg (▲) com somatotropina recombinante bovina nos dias de sua aplicação e aspiração *Ovum pick-up*.....35
- Figura 6.** Média das concentrações plasmáticas de IGF-1 de fêmeas bovinas não tratadas (◆) e tratadas com 250mg (■) ou 500mg (▲) com somatotropina recombinante bovina nos dias de sua aplicação e aspiração *Ovum pick-up*.....35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de clivagem de CCOs de fêmeas bovinas da raça Girolando utilizados para a PIV de embriões, submetidas ou não ao tratamento com rbST em intervalo de doze dias.....28

Tabela 2. Taxa de desenvolvimento embrionário de CCOs de fêmeas bovinas da raça Girolando utilizados para a PIV de embriões, submetidas ou não ao tratamento com rbST em intervalos de doze dias.....29

LISTA DE SIGLAS

°C - Graus Celsius

µL - Microlitro

CAP - Meio de Capacitação

CCA - Centro de Ciências Agrárias

CCOs - Complexos *cumulus*-oócito

CIV - Cultivo *in vitro*

cm - Centímetro

CO₂ – Gás carbônico

D - Dia

E2 - Estradiol

ELISA - Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay

FIV - Fertilização *in vitro*

G - Gauge

g – Força G

GH – Hormônio do Crescimento

IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo

IETS - International Embryo Technology Society

IGF-1 - Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1

IGFPB - Proteínas transportadoras de IGF

LABRA - Laboratório de Reprodução Animal

mg - Miligrama

mm - Milímetro

mmHg - Milímetro de mercúrio

MHz - Megahertz

MIV - Maturação *in vitro*

mL - Mililitro

ng - Nanograma

OPU - *Ovum Pick-up*

P4 - Progesterona

PBS - Solução fosfato salina tamponada

PHE - Penicilina, Heparina e Epinefrina

PIV - Produção de embriões *in vitro*

PO - Puro de Origem

rbST - Somatotropina Recombinante Bovina

RPM - Rotação por minuto

SFB - Soro fetal bovino

SPTZ - Espermatozoides

SOF - Synthetic Oviduct Fluid

ST - Somatotropina

TCM 199 - Tissue culture medium 199

TE - Transferência de embriões

UEMA - Universidade Estadual do Maranhão

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS	15
2.1 Geral	15
2.2 Específicos	15
3. REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1 Produção <i>in vitro</i> (PIV) de embriões	16
3.1.1 Punção folicular transvaginal guiada por ultrassonografia ou “ <i>Ovum Pick-Up</i> ” (OPU)	16
3.1.2 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	17
3.1.3 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	18
3.1.4 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	19
3.2 Hormônio do Crescimento (GH) ou Somatotropina (ST)	19
3.3 Somatotropina Recombinante Bovina (rbST)	20
3.4 Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1)	22
3.5 Estradiol (E2)	23
3.6 Progesterona (P4)	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1. Local do Experimento	24
4.2. Grupos Experimentais	24
4.3. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	24
4.3.1. Punção folicular transvaginal guiada por ultrassonografia ou “ <i>Ovum Pick-Up</i> ” (OPU)	24
4.3.2. Lavagem, Seleção e Transporte	25
4.3.3 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	25
4.3.4. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV)	26
4.3.5. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	26
3.4. Dosagens Hormonais	26
3.5. Delineamento Experimental e Análise Estatística	27
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6. CONCLUSÃO	37
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a produtividade dos rebanhos bovinos tem aumentado significativamente e isso tem sido atribuído principalmente à intensa seleção de características produtivas através do aperfeiçoamento de biotécnicas de manejo reprodutivo.

Desse modo, biotécnicas como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* (PIV) de embriões vêm sendo desenvolvidas a fim de se maximizar o potencial reprodutivo de fêmeas bovinas e melhorar os indicadores de produtividade (Buratini Jr., 2006).

A produção *in vitro* (PIV) de embriões consiste na recuperação de oócitos imaturos de folículos ovarianos, sendo uma biotécnica que permite a intensificação do uso de animais de alto valor genético obtendo resultados comparáveis ou superiores àqueles obtidos pela tecnologia tradicional de produção *in vivo* de embriões (MERTON et al., 2003).

A produção de embriões *in vitro* (PIV) constitui-se nas seguintes etapas: aspiração folicular *post-mortem* ou *Ovum Pick-up* (OPU), maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV), cultivo *in vitro* (CIV) e, por fim a transferência de embriões (TE) para as fêmeas receptoras denominado de inovulação.

Em 2011, foi registrada no Brasil a produção de 350.762 embriões bovinos no ano, dos quais 90,7% foram produzidos *in vitro* (Viana, 2012). Nos últimos anos, segundo VIANA (2012), tem se observado um crescimento anual na produção de embriões PIV no Brasil e uma queda na produção de embriões produzidos *in vivo*.

É importante ressaltar que em 2014 o Brasil foi considerado o maior produtor mundial de embriões com 366.517 unidades produzidas por ano, cerca de 70% do total mundial (IETS, 2014).

Contudo, as taxas médias de embriões obtidos *in vitro* ainda precisam ser estudadas visando resultados mais satisfatórios, levando em conta que a qualidade e a viabilidade dos embriões obtidos *in vitro* são inferiores à dos embriões obtidos *in vivo* (REICHENBACH, 2003) com variação de 50 a 80% (RIZOS et al., 2002).

A manipulação da dinâmica folicular em bovinos permitiu maior disponibilização de complexos *cumulus*-oócito (CCOs). Alguns hormônios vêm sendo utilizados com o intuito de sincronizar a onda folicular ovariana, incrementar a quantidade de folículos ovarianos para a OPU, a qualidade oocitária após a recuperação por punção

folicular e melhorar o desenvolvimento *in vitro* de embriões (HANSEL et al., 1996; GOODHAND et al., 1999).

Dessa forma, a qualidade e a integridade dos complexos *cumulus*-oócito (CCOs) influenciam o sucesso da fertilização *in vitro*, assim como a competência do desenvolvimento até o estágio de embrião (TAKADA, 2008).

1. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito do pré-tratamento da somatotropina recombinante bovina (rbST) sobre produção *in vitro* de embriões e na dinâmica hormonal de fêmeas bovinas.

2.2 ESPECÍFICOS

- Produzir embriões a partir dos CCOs recuperados.
- Analisar a taxa de clivagem;
- Analisar a taxa de blastocisto;
- Avaliar o desenvolvimento e qualidade embrionária;
- Produzir embriões a partir dos CCOs recuperados.
- Determinar as concentrações plasmáticas: Progesterona (P4); Estradiol (E2); Hormônio do crescimento (GH); Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1).

2. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Produção *in vitro* (PIV) de embriões

CCOs imaturos são obtidos por aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal ou por aspiração utilizando seringa e agulha em ovários de animais abatidos, estas estruturas são maturadas, fecundadas e cultivadas em laboratório podendo ser transferidas para vacas denominadas de receptoras (PONTES et al., 2008; VIANA et al., 2010).

Contudo, a PIV ainda é uma biotecnologia considerada de baixa eficiência, pois os sistemas são sub-ótimos (RIZOS et al., 2002), embriões *in vitro* resultam em menor taxa de prenhez (33,52%) do que embriões *in vivo* (41,52%) derivados das mesmas doadoras (PONTES et al., 2009). Dessa forma, novos estudos são necessários para que se alcance resultados satisfatórios.

Embriões produzidos *in vitro* possuem estruturas diferentes dos produzidos *in vivo*, apresentam mais lipídeos, menos microvilosidades e debris celulares (RIZOS, 2002; FAIR et al., 2002). Estes fatores influenciam nas taxas de gestação após transferência de embriões e menor tolerância à criopreservação (PONTES et al., 2009).

Vários estudos utilizando distintos tratamentos hormonais em fêmeas doadoras têm sido desenvolvidos visando fundamentalmente o aumento da eficiência da produção *in vitro* de embriões (HANSEL et al., 1996; GOODHAND et al., 1999).

3.1.1 Punção folicular transvaginal guiada por ultrassonografia ou “*Ovum Pick-Up*” (OPU)

A coleta de oócitos para a produção *in vitro* de embriões pode ser feita por diversas técnicas, sendo *post-mortem* ou *in vivo* por meio da laparotomia, laparoscopia e pela técnica da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom – OPU (VARAGO et al., 2008).

A técnica de aspiração folicular transvaginal tem apresentado uma maior flexibilidade e tem sido a melhor opção para a recuperação de oócitos *in vivo* na espécie bovina (Bols et al., 2004; Gonçalves et al., 2007; Andrade et al., 2012), uma vez que pode-se obter oócitos de fêmeas a partir dos 6 meses de idade vacas prenhes até o terceiro mês de gestação entre 2 a 3 semanas após o parto (GALLI et al., 1996).

Com o auxílio de um aparelho de ultrassom e um transdutor linear acoplado a um guia, a aspiração ocorre mediante introdução de uma agulha no interior dos folículos ovarianos (AVELINO, 2002) pela manipulação transretal.

Um sistema de bomba a vácuo permite a recuperação dos oócitos e do líquido folicular para um tubo coletor (GALLI, 1996) que será transportado até o laboratório.

Devido à dinâmica folicular em novilhas e vacas zebuínas e europeias serem caracterizadas pela presença de duas ou três ondas desenvolvimento folicular (CASTILHO et al., 2000), é possível realizar a recuperação de oócitos durante todo o ciclo estral (KRUIP et al., 1994). Ainda é possível dobrar os resultados mediante a estimulação hormonal (GOODHAND et al., 1999).

A aspiração folicular, em geral, não promove danos ao sistema reprodutor feminino, embora em alguns casos já tenha sido relatada em algumas vacas doadoras que estavam sendo submetidas a sessões de aspiração quinzenais (THOMPSON, 2000). A periodicidade pode variar desde a realização de sessões de aspiração de forma esporádica em intervalos de duas semanas, durante várias semanas ou meses (NAGAI, 2001).

Após a recuperação dos CCOs, realiza-se a seleção, com o auxílio de uma lupa estereomicroscópica, levando em consideração o número de camadas de células do *cumulus* e o aspecto do citoplasma do oócito (LEIBFRIED e FIRST, 1979). Os três processos biológicos subsequentes que ocorreriam *in vivo* são realizados no laboratório e compreendem as etapas de maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro* (VARAGO et al., 2008).

3.1.2 Maturação *in vitro*

A partir do rastreamento e classificação morfológica, os CCOs ainda não se encontram competentes a serem fecundados, sendo necessário mudanças citoplasmática e nuclear (GALLI et al., 2003) em condições *in vitro*, o que consiste na maturação oocitária.

No entanto, a maturação oocitária começa logo após o pico pré-ovulatório de LH, no caso da aspiração folicular, este processo inicia-se com a remoção dos CCOs no interior do folículo ovariano (HOSHI, 2003). Para que ocorra a maturação nuclear, são necessárias 18-22 horas para que a estrutura passe do estágio de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica para o estágio de metáfase II. Modificações no citoplasma

consistem na reorganização de organelas citoplasmáticas, migração dos grânulos corticais e alterações de síntese proteica (THOMPSON et al., 2000).

Outro evento que ocorre na maturação é a expansão das células do *cumulus* que circundam os oócitos. Essas são células da granulosa especializadas, que estão metabolicamente associadas entre si e com o oócito. Projeções celulares das células do *cumulus* atravessam a zona pelúcida e formam pequenas junções com o oócito (gap). Essas junções são a única entrada de substâncias ou estímulos no plasma.

Essas competências se referem à capacidade do oócito de completar a divisão meiótica, descondensar a cabeça do espermatozoide, formar os pró-núcleos e suportar o desenvolvimento embrionário subsequente (WARSSAMAN & ALBERTINI, 1994).

Para que todos os eventos de maturação ocorram *in vitro*, é necessário que os meios utilizados durante este período mimetizem as condições encontradas durante o processo de maturação *in vivo* (SANGILD, 2000). Existem vários métodos diferentes que podem ser utilizados e que já foram testados durante a maturação *in vitro* (MIV) em bovinos, sendo que a grande maioria dos laboratórios tem optado pela suplementação do meio de maturação com soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas em condições controladas de atmosfera gasosa e temperatura (RODRIGUES et al., 2000).

A eficiência da maturação *in vitro* pode ser influenciada por vários fatores, como temperatura, atmosfera gasosa, uso de soros, osmolaridade. Após o período de MIV, os CCOs completam sua maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e subsequente fecundação (AVELINO et al., 2002).

3.1.3 Fertilização *in vitro*

Na fertilização *in vitro* são utilizados sêmen criopreservado que sofre um processo de descongelamento e, posteriormente, é submetido ao gradiente Percoll. Esse processo tem como objetivo a separação dos espermatozoides vivos pós-descongelamento. Embora outros sistemas possam ser usados, como o swim-up (GALLI, 1996).

A partir destes resultados, se determina a concentração de espermatozoides ideal para cada grupo de estruturas em meio sintético. Em geral, a concentração usada para a fertilização *in vitro* é de 2×10^6 sptz/mL, calculada de acordo com a motilidade e concentração da fração viva de espermatozoides obtida após a centrifugação em gradiente Percoll (YOUNG, 1998). O período de incubação dos CCOs com os espermatozoides varia entre 20 a 22 horas.

3.1.4 Cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro* consiste na etapa de desenvolvimento do oócito fertilizado até o estágio de blastocisto (SANGILD et al., 2000).

É neste período de desenvolvimento que ocorrem eventos como ativação do genoma embrionário, processo de divisão celular, compactação dos blastômeros no estágio de mórula, início da diferenciação embrionária com a formação da blastocele (HOSHI, 2003).

As condições de cultivo *in vitro* influenciam nos índices da produção de embriões, razão pela qual inúmeras pesquisas tem sido realizadas visando avaliar o efeito que diferentes fatores, intrínsecos e extrínsecos, possam exercer sobre o metabolismo e capacidade de desenvolvimento destes embriões, como por exemplo a composição dos meios de cultivo e condições de temperatura e atmosfera gasosa, a adição de aminoácidos, vitaminas, macromoléculas e fatores de crescimento, assim como o uso de soros (NAGAI, 2001).

O desenvolvimento embrionário *in vitro* é avaliado no D7 (Dia 7) de cultivo analisando a compactação dos blastômeros e início da formação da blastocele, sendo feita a seleção e avaliação final dos embriões para a transferência a fresco ou para criopreservação.

3.2 Hormônio do Crescimento (GH) ou Somatotropina (ST)

O GH ou Somatotropina (ST) age estimulando as células somáticas, algo necessário principalmente durante a fase de crescimento (ENRIGHT et al., 1993).

O hormônio é liberado pela adenohipófise mediante uma série de estímulos fisiológicos que envolvem, entre outros fatores, ações do fator liberadores, flutuações nas concentrações sanguíneas de glucagon, insulina, fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2, respectivamente), hormônios estrogênicos (ENRIGHT et al., 1993), além de processos metabólicos e fisiológicos (LUCY, 2000).

O GH pode influenciar na formação de proteínas e ácidos nucléicos dos tecidos corporais (LAWRENCE & FOWLER, 2002). Esse estímulo à síntese proteica é, provavelmente, resultante de um aumento na atividade dos ribossomos envolvidos no processo de tradução. Outra forma de atuar do GH é de forma direta ou

indireta, através do IGF-1, que estimula os processos anabólicos como a divisão celular e o crescimento do esqueleto.

No crescimento pós-natal, o GH não possui uma glândula-alvo, mas o órgão com maior concentração de receptores para o GH é o fígado (LUCY et al., 1998). A ST quando se liga ao seu receptor no fígado estimula uma série de mudanças metabólicas que influenciam no crescimento e metabolismo dos bovinos (ETHERTON e BAUMAN, 1998). Estas mudanças aumentam a síntese e secreção do fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1), assim como a proteína carreadora do IGF-1 (JONES e CLEMMONS, 1995).

Por sua vez, o IGF-1 estimula o crescimento e o desenvolvimento de vários tipos celulares. O efeito da ST no crescimento e na reprodução é pela liberação de IGF-1 do fígado (JONES & CLEMMONS, 1995). Uma vez liberado pelo fígado, o IGF-1, via circulação sanguínea, atua no receptor para o IGF-1 (IGF-1r) no tecido reprodutivo, como os folículos ovarianos, oócitos, células da granulosa, corpo lúteo, ovidutos, endométrio, miométrio, placenta, hipotálamo e hipófise (ARMSTRONG & WEBB, 1998; HEAP et al. 1996; SPICER et al., 1995).

3.3 Somatotropina Recombinante Bovina (rbST)

Os efeitos desejáveis da somatotropina podem ser obtidos através da administração exógena de um análogo sintético denominado somatotropina recombinante bovina (rbST) que, quando biologicamente ativo, exerce funções similares (WALLIS, 1975; WOOD et al., 1989)

A somatotropina recombinante bovina (rbST) ou hormônio do crescimento bio-similar foi um dos primeiros hormônios produzidos em escala comercial como proteína recombinante (BAUMAN, 1999).

A meia-vida plasmática do rbST é menor do que o GH endógeno (8 vs. 40 min.), devido a diferenças quanto a modificações pós-traducionais (BYATT et al., 1992). Porém, as preparações farmacológicas de rbST utilizadas comercialmente para o incremento da produção de leite são manufaturadas para a liberação lenta do hormônio.

A rbST causa crescimento de todos os tecidos corporais que apresentam essa capacidade, através da promoção tanto no aumento do tamanho celular como no aumento do número de mitoses que favorece o surgimento de um número maior de células (Lucci et al., 1998).

Sobre o sistema reprodutor, o hormônio atua sobre os receptores do útero e ovário induzindo à produção de IGF-1 (LUCY, 2000) e persiste circulando por até três semanas após a aplicação (CUSHMANN et al., 2001).

A maior quantidade de receptores para o rbST é encontrada no fígado, onde é responsável pela produção de um fator de crescimento semelhante a insulina, o IGF-1, e proteínas transportadoras de IGF (IGFPB) (GONG et al., 1997). Entretanto a maioria dos outros tecidos também responde ao rbST.

A somatotropina recombinante bovina (rbST) possui influência nos mecanismos relacionados ao crescimento e maturação folicular em vacas (LUCY et al., 1993; PAVLOK et al., 1995).

SHIMIZU et al. (2008) apontam que o aumento da expressão de receptores para a somatotropina em células da granulosa pode propiciar a entrada do folículo antral no estágio pré-ovulatório durante o final do desenvolvimento folicular, portanto, auxiliando no processo de maturação de folículos pré-ovulatórios.

Quando administrada em fêmeas bovinas, a rbST aumenta a população de folículos ovarianos (GONG et al., 1991; 1993; KIRBY et al., 1997), aumentou a taxa de clivagem e a produção de blastocistos e, quando associado ao FSH, melhorou a qualidade dos oócitos obtidos de vacas da raça Gir (RAMOS et al., 2007) e tem sido demonstrado um efeito positivo em oócitos e embriões bovinos quando adicionada aos meios de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de embriões, aumentando a proporção de embriões viáveis produzidos *in vitro*.

A adição de rbST (IZADYAR et al., 1998) ou de IGF-1 (MARKKULA e MAKAREVICH, 2001) ao meio da maturação *in vitro* atuou positivamente na maturação nuclear e na capacidade de desenvolvimento embrionário.

Entretanto, Bols et al. (1998) e Iga et al. (1998) relataram que, embora o recrutamento de folículos tenha aumentado antes da aspiração em animais tratados com rbST, o número e a qualidade dos ovócitos, assim como o número de blastocistos cultivados *in vitro* não foi afetado. PAVLOK et al. (1996), isso se deve ao fato da rbST melhorar a qualidade dos oócitos de animais tratados previamente.

Esses achados podem se tornar úteis, no melhor aproveitamento dos gametas femininos, e favoráveis na aplicabilidade das biotécnicas de superovulação, aspiração folicular guiada por ultrassom e transferência de embriões.

3.4 Fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1)

A ST promove ainda a liberação do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-1) ou somatomedina C, numa ação obtida pela sua interação com receptores predominantemente encontrados no fígado (LUCY, 2000). A partir do estímulo, a produção do IGF-1 é contínua, portanto, não sendo armazenado e sua secreção pode agir de forma parácrina ou autócrina quando sintetizados por tecidos-alvo como útero e ovário (MAGALHÃES et al., 2012).

O IGF-1 tem papel no desenvolvimento folicular nos estágios iniciais da foliculogênese, controlando o processo de maturação oocitária (FORTUNE, 2003). O IGF-1 de origem periférica está envolvido na modulação nutricional do eixo neuroendócrino reprodutivo e sabe-se que os níveis circulantes deste fator de crescimento estão elevados na puberdade, em ruminantes (BURTON et al., 1994), além de serem necessários à produção animal.

Estudos comprovam que a adição de IGF-1 em associação ao FSH durante o cultivo *in vitro* promoveu o crescimento folicular de folículos pré-antrais de bovinos, camundongos, ratos e humanos (GUTIERREZ et al., 2000; LIU et al., 1998; ZHAO et al., 2001; LOUHIO et al., 2000), estimulou a proliferação e atividade esteroidogênica das células da granulosa de camundongos (LIU et al., 1998) e precaveu a apoptose de folículos pré-antrais de suínos.

Considerando o estímulo à função esteroidogênica, o IGF-1 em ponderáveis concentrações plasmáticas promove incremento no desenvolvimento inicial do corpo lúteo e antecipa a segunda onda folicular, demonstrando sua participação na dinâmica folicular de bovinos da raça holandesa (LUCY et al., 1994).

Vários grupos relataram que tanto o rbST quanto o FSH e os estrógenos estimulam a expressão de IGF-1 nas células da granulosa. De fato, a administração de rbST em animais duplicou os níveis de IGF-1 sanguíneo (BAUMAN, 1999).

Na prática, é difícil distinguir os efeitos diretos do rbST e de outros hormônios metabólicos na função reprodutiva, mas a administração do rbST aumentou as concentrações circulantes do fator decrescimento semelhante à insulina do tipo 1 (IGF-1) e insulina, estimulando a proliferação, diferenciação e desenvolvimento celular, e regulando a esteroidogênese e a apoptose nas células da granulosa (BAUMAN, 1999).

3.5 Estradiol (E2)

O hormônio esteroide estradiol também pode ser responsivo à atividade do IGF-1. Estudos em camundongos comprovam que a utilização de 1 mg/mL de ST promoveu a produção de estradiol, secreção de inibina e proliferação das células da granulosa e da teca (KOBAYASHI et al., 2000). Durante a fase antral os folículos necessitam de melhor atuação das gonadotropinas hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), que aumentam a ação esteroidogênica das células da granulosa e da teca promovendo síntese e acúmulo de estradiol. Além disso, peptídeos produzidos localmente atuam, através de mecanismos parácrinos e endócrinos, na regulação das exigências foliculares (FORTUNE, 1994; MAGALHÃES et al., 2012).

O FSH atua estimulando o recrutamento de folículos e na emergência de uma onda folicular onde, em espécies monovulatórias, apenas um folículo é selecionado e tem capacidade de ovular, enquanto os demais entram em processo atresico (FORTUNE, 1994). A supressão dos folículos que entraram em atresia se dá pela secreção de estradiol e inibina pelo folículo dominante (FORTUNE, 1994; GINTHER et al., 2003).

Para Magalhães et al. (2012) há indícios que o IGF-1 tenha alguma função na seleção do folículo dominante, enquanto que Fortune (2004) sugere que este atue de forma conjunta com o FSH na promoção não só do crescimento folicular, mas também na capacidade de síntese do estradiol.

3.6 Progesterona (P4)

Acredita-se que a ST atue diretamente em seus receptores nas células lúteas aumentando o peso do corpo lúteo e, por assim, a pulsatilidade de progesterona (LUCY et al., 1993; LUCY et al., 1994; LUCY et al., 1995; SCHEMM et al., 1990; GALLO & BLOCK, 1991). Sauerwein et al. (1992) demonstraram, *in vitro*, que a incubação do corpo lúteo com IGF-1 aumentou a liberação de progesterona. Isso valida a importância da atuação deste fator no controle da secreção de progesterona.

A administração de rbST, de forma direta ou indireta, pode acelerar o crescimento do CL e a secreção de P4 (Lucy et al., 1995), estimular a atividade secretória das glândulas endometriais e aumentar o desenvolvimento e a sobrevivência embrionária (Moreira et al., 2002).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Reprodução Animal (LABRA) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA) com as colheitas dos CCOs por aspiração transvaginal dos folículos ovarianos de animais da raça Girolanda oriundas do núcleo de ruminantes do CCA/UEMA.

4.2 Grupos Experimentais

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal – CEEA/UEMA, conforme protocolo nº 13/16. Os animais foram previamente examinados por palpação retal, no intuito de eliminar fêmeas com problemas clínico-ginecológicos.

Os animais (n=12) foram divididos em três grupos experimentais: controle 0mg (n = 4), 250mg (n = 4) e 500mg (n = 4) de rbST, as aplicações ocorreram em intervalos de 12 dias. Sendo realizadas cinco seções de *Ovum Pick-Up* (OPU) em intervalos de 7 dias nos grupos experimentais (FIGURA 1).

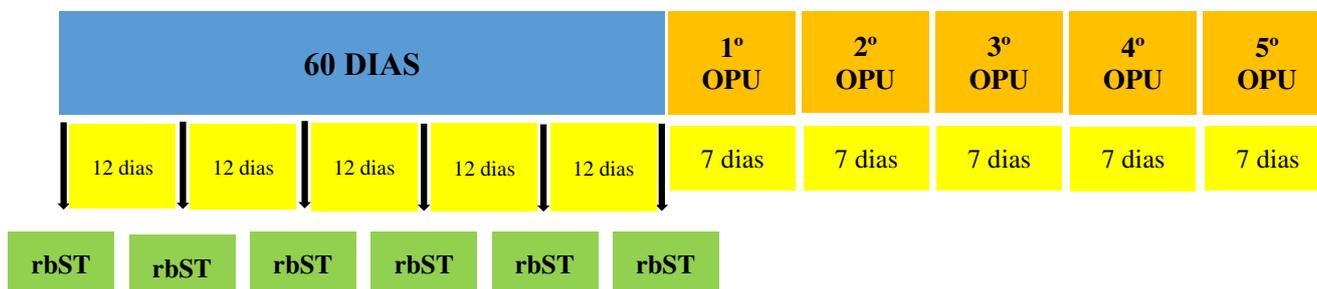


Figura 1. Protocolo de aplicação do rbST e as seções de OPU's dos grupos experimentais.

4.3 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

4.3.1 Punção folicular transvaginal guiada por ultrassonografia ou “*Ovum Pick-Up*” (OPU)

As doadoras foram contidas em tronco de contenção, submetidas à anestesia epidural com 5,0 mL de cloridrato de lidocaína a 2%, com antissepsia da região perineal com água, sabão neutro e álcool a 70%.

A OPU foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Pieterse et al. (1988) e adaptada por Seneda et al. (2003), com o uso da ultrassonografia (CHISSON

D600 VET, US Products Eletromedicina, Brasil), com transdutor convexo de 5,0 MHz acoplado à uma guia de aspiração transvaginal (WTA Ltda., Brasil).

As aspirações foram realizadas com agulhas descartáveis 20 G (WTA Ltda., Brasil), acoplada a uma tubulação de silicone com 2 mm de diâmetro e 80 cm de comprimento (WTA Ltda., Brasil), conectada a um tubo cônico de 50 mL contendo 10 mL de meio LAV (1 mL de PBS, 12,5 UI de heparina e 1% de soro fetal bovino).

A pressão da bomba a vácuo (WTA, Watanabe Tecnologia Aplicada BV-003) foi mantida entre 35 e 50 mmHg (fluxo de 15 mL de meio/min.). A guia de aspiração foi introduzida na vagina, posicionada no fundo de saco vaginal, junto à fórnix cervical e, com o auxílio da manipulação transretal, os ovários foram posicionados na linha de punção indicada na tela do aparelho de ultrassonografia onde os folículos acima de 2 mm foram puncionados e aspirados.

4.3.2 Lavagem, Seleção e Transporte

O material aspirado nos tubos Falcom de 50 mL foi transferido para um filtro de coleta de embriões (Nutricell[®]) e lavado com PBS a 37°C. O conteúdo folicular aspirado foi depositado em placas de Petri de 100 x 20 mm para a pesquisa sob lupa estereomicroscópica.

Os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) foram transferidos para placas de 30 x 15 mm contendo TCM 199 (com sais de Hanks) e classificados de acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV, conforme LEIBFRIED e FIRST (1979). Somente os CCOs GI, GII e GIII foram considerados viáveis.

4.3.3 Maturação *in vitro* (MIV)

Os CCOs foram lavados quatro vezes em gotas contendo meio de MIV (Nutricell[®]) em placas de Petri de 100 x 20 mm, sendo em seguida transferidos para microgotas contendo 100 µL de meio de MIV em cada placa de Petri de 60 x 15 mm, enumeradas e contendo dez gotas de MIV recobertas por óleo mineral (SIGMA-ALDRICH, EUA) à temperatura de 38,8°C, em atmosfera gasosa de 5% de CO₂.

Grupos de até 15 CCOs foram colocados em cada microgota, sendo individualizadas por animal. O período de MIV ocorreu em 24 horas contados a partir do momento da colocação dos CCOs em meio MIV.

4.3.4 Fecundação *in vitro* (FIV)

Os CCOs maturados foram lavados três vezes em 1000 µL de meio de fecundação (FEC-Nutricell[®]) suplementado com 20 µL de heparina e 40 µL de solução PHE (Nutricell[®]). O sêmen era proveniente de uma única partida comercial de touro da raça Gir Leiteiro PO e foi descongelado em água a 37°C por 30 segundos, sendo em seguida depositado em um tubo criogênico de 1 mL, sobre um gradiente de Percoll de 90 e 45% (Nutricell[®]) e submetido a uma força de centrifugação de 968 g durante 10 minutos.

Após a centrifugação, os espermatozoides (sptz) no fundo do tubo criogênico foram retirados e colocados em 1 mL de meio de capacitação (CAP; Nutricell[®]), sendo submetidos novamente à centrifugação a 968 g por 5 minutos.

Após a segunda centrifugação, o excesso de meio CAP foi retirado sendo adicionada do mesmo volume de meio FIV (Nutricell[®]) suplementado com 20 µL de heparina e 40 µL de solução PHE. Em seguida, retirou-se 5 µL da suspensão e depositou em 95 µL de água para a determinação da concentração espermática, pela contagem das células espermáticas em câmara de Neubauer.

A concentração espermática final foi ajustada para 25×10^6 sptz vivos/mL. Posteriormente, os CCOs e os sptz foram coincubados em temperatura de 38,8°C por 22 horas em 5% de CO₂ em ar com umidade saturada.

4.3.5 Cultivo *in vitro* (CIV)

Os CCOs maturados Após a FIV, os presumíveis zigotos passaram por três vezes lavagens em gotas de meio SOF (Nutricell[®]) e depositados em gotas de 100 µL, recobertas por óleo mineral. O desenvolvimento dos blastocistos deu-se pela avaliação aos sete dias (D7) após o início da fecundação (D0).

4.4 Dosagens Hormonais

As fêmeas foram divididas em três grupos: controle (n=2), 250 mg rbST (n=3) e 500 mg rbST (n=3). As amostras de sangue (plasma) foram coletadas de cada fêmea doadora 60 dias antes da primeira aspiração, em intervalos de 12 dias, com as coletas realizadas nos mesmos dias das aplicações de rbST e das aspirações foliculares (intervalos de 7 dias), diretamente da veia ou artéria coccígea, em tubos a vácuo heparinizados do tipo Vacutainer[®] (BD, EUA), e centrifugados (Centrífuga Fanen Exelsa Baby I, Modelo 206, Fanem, Brasil) a 3500 RPM por 15 min.

O plasma foi aliqotado em duplicatas em microtubos de 2,0 mL (Axigen Scientific MCT – 200B, EUA), e armazenados em freezer a -80°C com posterior determinação das concentrações plasmáticas hormonais pelo teste ELISA, desenvolvido de acordo com as especificações do fabricante.

4.5 Delineamento Experimental e Análise Estatística

O estudo ocorreu inteiramente ao acaso com três tratamentos (controle, 250mg e 500mg) em 12 repetições (número de animais), tratadas previamente com a rbST, sendo cinco aplicações ao longo de 60 dias, e 5 sessões de OPU-PIV como fatores principais. Na avaliação das concentrações hormonais, o delineamento foi dado inteiramente ao acaso em três tratamentos (controle, 250 mg e 500 mg x animais) e 8 repetições (número de animais), seis aplicações de rbST prévias e cinco sessões de OPU-PIV.

Os dados para as variáveis taxa de clivagem; taxa de blastocisto; total e proporção de embriões viáveis, proporção dos estádios de desenvolvimento e qualidade embrionária) foram submetidas ao teste de normalidade; os dados normais e os normalizados mediante transformações matemáticas (logarítmica, arco seno) foram submetidos à análise de variância (ANOVA) ou ao teste não - paramétrico de Wilcoxon para comparação de médias, na probabilidade de 5%.

As concentrações plasmáticas de progesterona (P4), estradiol (E2), hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) foram submetidas ao Teste de normalidade Cramer-von Mises e para comparação de média foi Student-Newman-Keuls (SNK) 5% de probabilidade.

Dados qualitativos foram comparados pelo teste do Qui-quadrado, para $p < 0,05$. As análises foram executadas utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2015).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas cinco sessões de aspiração folicular (OPU) intervalos de 7 dias, em um total de 60 aspirações das 12 fêmeas doadoras dos três grupos experimentais: Controle (n= 4), 250 mg (n= 4) e 500 mg (n= 4).

Das cinco sessões de OPU, obteve-se média e desvio padrão total dos CCOs ($9,85 \pm 6,83$; $7,75 \pm 3,09$ e $8,50 \pm 6,34$) e CCOs viáveis ($8,10 \pm 5,26$; $5,60 \pm 2,66$ e $5,27 \pm 5,96$) de acordo com os tratamentos: controle, 250 mg rbST e 500 mg rbST, respectivamente.

As taxas de clivagem dos grupos em estudo são representadas na tabela 1. Os grupos controle, 250 mg e 500 mg obtiveram, respectivamente, 51,85%, 51,78% e 56,86% na taxa de clivagem *in vitro* no D3. Não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 1. Taxa de clivagem de CCOs de fêmeas bovinas da raça Girolando utilizados para a PIV de embriões, submetidas ou não ao tratamento com rbST em intervalo de doze dias.

Desenvolvimento	TRATAMENTOS								
	Controle			250 mg			500 mg		
Embrionário	Clivados	n	%†	Clivados	n	%†	Clivados	n	%†
Taxa de Clivagem	84	162	51,85 ^a	58	112	51,78 ^a	54	95	56,86 ^a

^{ab}Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente, para $p < 0,05$.

†Taxa de clivagem no D3 baseada no número total de estruturas colocadas em CIV.

Ramos et al. (2007) obtiveram resultados divergentes ao submeter vacas zebuínas a protocolos com 0mg de rbST e 160 mg de rbST (Boostin®, Coopers) obtendo, respectivamente, 46,11% e 60,47%, o que não corrobora com o presente estudo que utilizou doses de 250 mg e 500mg de rbST nos grupos e não houve diferença estatística na taxa de clivagem. Tripp et al., 2000 e Bols et al., 1998 não obtiveram aumento nas taxas de clivagem e produção de blastocistos após a utilização de rbST *in vivo*.

Segundo Rieger et al. (1991), as doses hormonais de rbST necessárias para conseguir estimular os ovários devem ser maiores que as utilizadas para aumentar a produção de leite.

A administração da rbST associada a outras gonadotropinas proporciona taxas embrionárias *in vitro* satisfatórias, como Ramos et al., (2007) que obtiveram 50,34% de clivagem utilizando protocolo com rbST e FSH sendo superior ao grupo controle. No

entanto, Moraes Júnior et al. (2008) observaram que a associação e não-associação de rbST com FSH não influenciou nas proporções de estruturas durante o desenvolvimento embrionário.

A somatotropina recombinante bovina causa crescimento tecidual, através da promoção tanto no aumento do tamanho celular como no aumento do número de mitoses que favorece o surgimento de um número maior de células (Lucci et al., 1998), a associação desta a outros hormônios poderia aumentar as taxas obtidas no presente estudo.

As taxas de mórulas e blastocistos *in vitro* estão representadas na tabela 2. O grupo 500 mg (47,36%) foi melhor estatisticamente em relação aos grupos controle (33,95%) e 250 mg (30,35%) no desenvolvimento embrionário no D7. Não houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos controle e 250 mg de rbST submetidos ao protocolo experimental.

Tabela 2. Taxa de desenvolvimento embrionário de CCOs de fêmeas bovinas da raça Girolando utilizados para a PIV de embriões, submetidas ou não ao tratamento com rbST em intervalos de doze dias.

Desenvolvimento embrionário	TRATAMENTOS								
	Controle			250 mg			500 mg		
Taxa de mórula e blastocisto	CIV	n	%†	CIV	n	%†	CIV	n	%†
	162	55	33,95 ^b	112	34	30,35 ^b	95	45	47,36 ^a

^{ab}Números seguidos de letras desiguais na linha diferem estatisticamente, para $p < 0,05$.

[†]Taxa de desenvolvimento no D7 baseada no número total de estruturas colocadas em CIV.

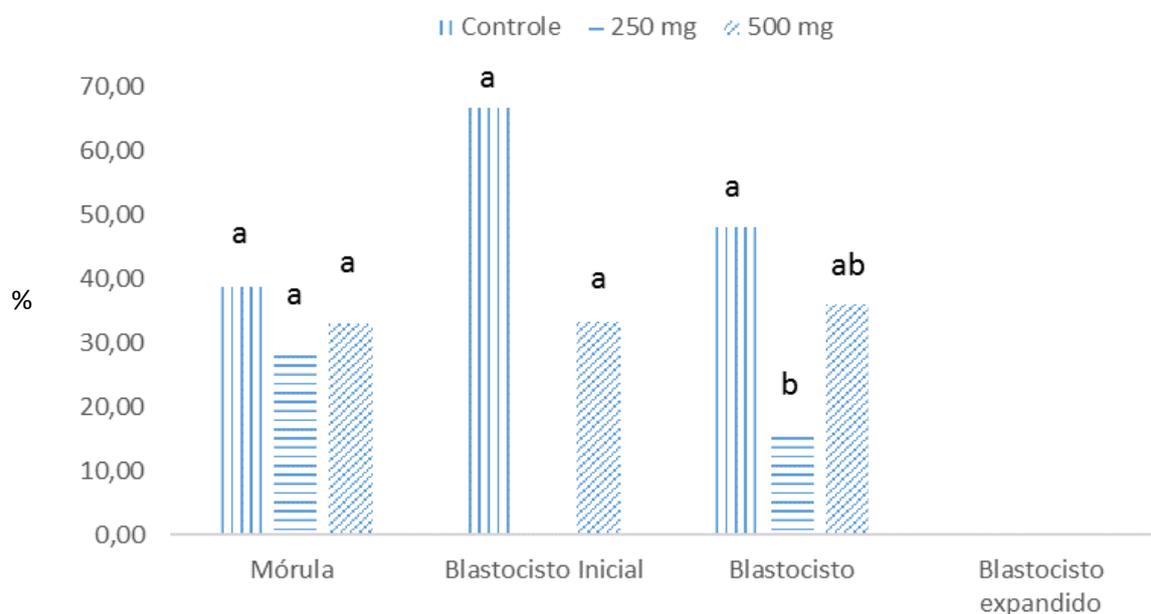
Lucy et al. (1996), atribuem os efeitos diretos e indiretos a este hormônio, pois a rbST aumenta as concentrações IGF-1, podendo melhorar a qualidade embrionária, o que não foi observado nesta pesquisa.

Moraes Júnior et al. (2001) submeteram fêmeas mestiças (Guzerá x Holandês) ao mesmo tratamento com rbST do presente estudo obtendo 41,3%, 35,2% e 36,0% de desenvolvimento embrionário dos grupos controle, 250 mg e 500 mg, respectivamente, não corroborando aos dados obtidos ao submeter fêmeas mestiças ao protocolo com rbST onde o grupo 500 mg foi superior aos demais tratamentos.

Coelho (1986), ao obter embriões no D7 de superovulação, também não observou diferença ($p > 0,05$) nas médias de mórulas e blastocistos, nos animais da subespécie *Bos taurus taurus*, assim como no número de mórulas e mórulas compactas em *Bos taurus indicus*, evidenciando variabilidade individual no desenvolvimento e na qualidade embrionária.

Em relação ao estágio de desenvolvimento embrionário (gráfico 1), a proporção de mórulas entre os tratamentos (controle, 250 mg e 500 mg) não obteve diferença estatística ($p < 0,05$). A taxa de blastocisto inicial não apresentou diferença estatística entre os grupos, sendo que o grupo 250 mg não apresentou blastocistos iniciais. A proporção de blastocistos para o grupo 500 mg não apresentou diferença estatística dos tratamentos controle e 250 mg, porém os grupos controle e 250 mg foram estatisticamente diferentes entre si.

Figura 2. Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base no estágio de desenvolvimento, para embriões produzidos *in vitro* a partir de CCOs aspirados *in vivo* por OPU de fêmeas bovinas.



^{ab}Colunas com sobrescrito desiguais diferem estatisticamente, $p < 0,05$.

Muitos autores têm relatado que o uso de rbST aumenta o número de embriões viáveis (GONG et al., 1993; KUEHNER et al., 1993). NEVES et al. (2005) obtiveram nos grupos controle, 250 mg e 500 mg, respectivamente, 39,37%, 63,11% e 54,03%, o

que difere do presente estudo onde as aplicações de rbST não influenciou na proporção de embriões viáveis.

Borges et al. (2001) obtiveram taxas de mórulas de 34,5% e 54,6% nos grupos controle e 500 mg de rbST, respectivamente, corroborando ao presente estudo onde a somatotropina recombinante bovina não influenciou na resposta superovulatória.

Bezerra (2009) obteve um maior número de blastocisto inicial no grupo que recebeu 500 mg de rbST em relação aos demais grupos, o que não corrobora no presente estudo onde o efeito da rbST não influenciou na taxa de blastocistos iniciais. Resultado similar foi obtido por Borges et al. (2001), onde a rbST não influenciou na proporção de blastocistos iniciais nos grupos controle e 500 mg, 33,8% e 54,6%, respectivamente.

Ramos et al. (2007) obtiveram dos grupos controle e rbST (160mg) taxa de blastocistos de 7,78% e 19,38%, respectivamente, onde foi evidenciada a superioridade do grupo submetido ao protocolo hormonal, não corroborando com os resultados obtidos no presente estudo, onde a dose de 500mg não proporcionou taxas superiores aos demais grupos.

De acordo Ramos et al. (2007), este aumento pode estar relacionado à influência direta ou indireta no microambiente folicular e ou no próprio oócito.

Um fator que pode ter contribuído para a não influência da rbST sobre as estruturas colhidas e embriões viáveis, foi a dose utilizada, pois, segundo RIEGER et al. (1991), em vacas da raça holandesa, para estímulo dos ovários são necessárias doses maiores que 500 mg de rbST. De modo geral, fêmeas zebuínas necessitam de menor dose hormonal para estimulação ovariana quando comparada com fêmeas de raças europeias. Na presente pesquisa a raça foi Girolandas e a dose utilizada 250mg e 500mg.

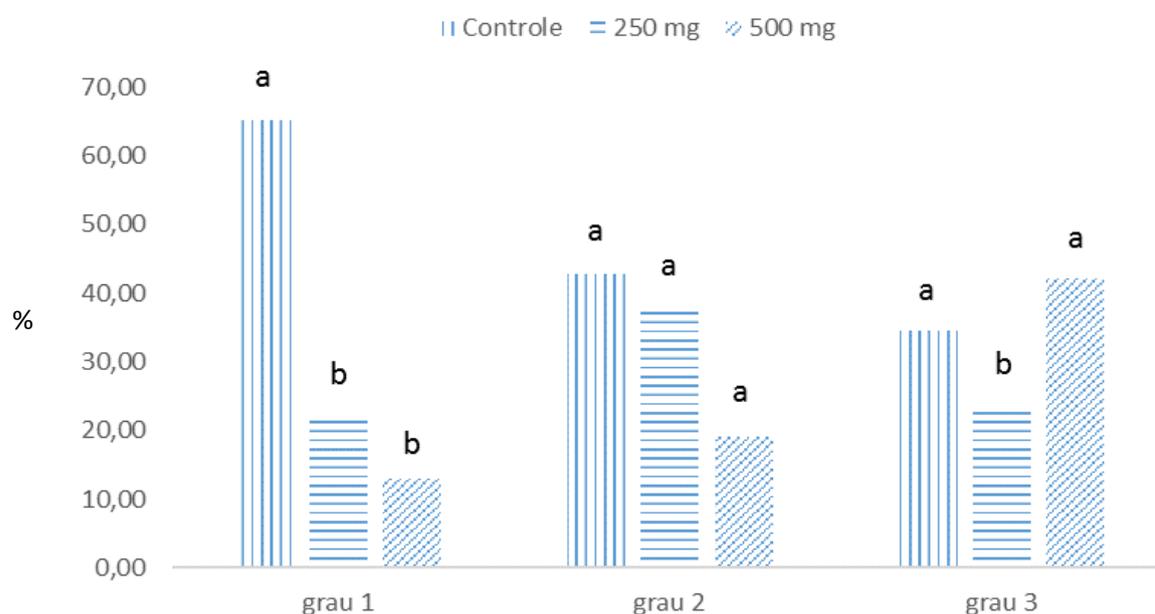
Hasler et al. (2003) indicam que o efeito da administração de rbST sobre a superovulação pode não ocorrer quando as fêmeas foram superovuladas repetidamente, o que pode explicar as baixas proporções nos grupos, pois as novilhas experimentais foram submetidas a protocolo hormonal anteriormente.

Não foi obtido taxas de blastocistos expandidos nos grupos controle e submetidos as aplicações de rbST. Borges et al. (2001) submeteram fêmeas mestiças (Holandês x Zebu) em dois grupos: controle e 500mg de rbST, onde não houve influência do hormônio obtendo 2,2% e 6,0%, respectivamente, de blastocistos expandidos.

Estes dados evidenciam que existe ampla variabilidade particular no desenvolvimento e na qualidade embrionária, assim como variações entre as doadoras (idade, raça, nutrição).

Em relação a qualidade morfológica do embrião (gráfico 2), a proporção de embriões grau 1 no grupo controle foi estatisticamente superior aos grupos tratados com rbST, não havendo diferença estatística entre os grupos 250 mg e 500 mg. A proporção de embriões grau 2 não diferiu entre os grupos em estudo. Para embriões grau 3, não houve diferença significativa entre os grupos controle e 500 mg, porém o grupo 250 mg diferiu aos demais tratamentos.

Figura 3. Taxa de desenvolvimento embrionário (%), com base na qualidade morfológica, para embriões produzidos *in vitro* a partir de CCOs aspirados *in vivo* por OPU de fêmeas bovinas.



^{ab}Colunas com sobrescrito desiguais diferem estatisticamente, $p < 0,05$.

Neves et al. (2005) estudaram o efeito da rbST sobre o número e qualidade dos embriões, em vacas, distribuídas aleatoriamente em três grupos: controle, tratadas com 250mg e 500mg de rbST, no sexto dia do ciclo estral. Os autores constataram que tanto a administração de 250 como de 500mg de rbST aumentaram a qualidade embrionária.

Moraes Júnior (2008) submeteu fêmeas da raça Nelore ao tratamento de FSH associado ou não com 250 mg de rbST, não obtendo resultado divergente entre os grupos, o que corrobora ao presente estudo onde o grupo 250 mg não sofreu influência da rbST.

Maffili et al. (2001) descreveram que o uso da rbST, em associação com a superovulação não aumentou a quantidade de embriões produzidos, mas melhorou o desenvolvimento e a qualidade dos embriões. Além da categoria animal, raça e dose,

outros fatores podem ter interferido nos resultados como a idade, a época do ano e o número de superovulações (CUSHMAN et al., 2001).

Não foi possível utilizar os dados obtidos da absorbância, e conseqüentemente as concentrações plasmáticas dadas em ng/mL, do hormônio do crescimento (GH) devido à dificuldade na leitura da placa do kit ELISA culminada por falha do espectrofotômetro.

As concentrações médias de progesterona durante o período de aplicação de rbST e OPU em fêmeas bovinas estão representadas na Figura 4 e demonstraram variação ($p < 0,05$) entre os dias de coleta das amostras. Estas foram inferiores a 8 ng/mL para todos os animais dos três grupos monitorados durante o período das aplicações do hormônio, com posterior emergência para valores superiores a 10 ng/mL durante o período das OPU.

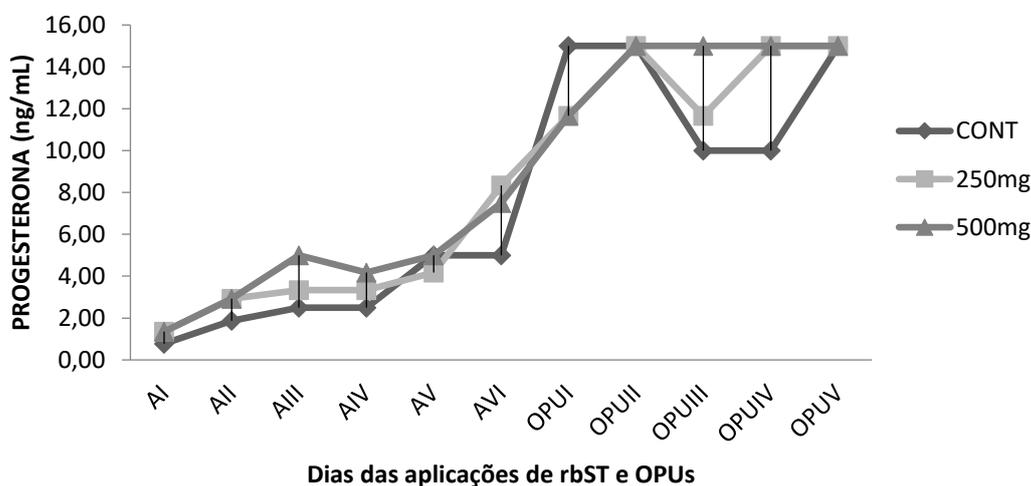


Figura 4. Média das concentrações plasmáticas de progesterona de fêmeas bovinas não tratadas (\blacklozenge) e tratadas com 250mg (\blacksquare) ou 500mg (\blacktriangle) com somatotropina recombinante bovina nos dias de sua aplicação e aspiração *Ovum pick-up*.

Neste estudo, não foi observada diferença estatística nas concentrações plasmáticas de progesterona entre os grupos tratados com diferentes doses de rbST e o grupo não tratado. Estes dados corroboram com os resultados obtidos por Da Silva Haas et al. (2007) que, com a aplicação única de 250 mg de rbST em novilhas mestiças receptoras de embrião durante o estro, não observaram efeito na concentração sérica de progesterona entre o sexto e o oitavo dia.

Entretanto, Borges et al. (2001) obtiveram médias das concentrações plasmáticas de P4 para o grupo tratado com dose de 500 mg de somatotropina recombinante bovina inferiores ao do grupo não tratado, utilizando novilhas mestiças holandês-zebu. Segundo

Foxcroft et al. (2000), o *clearance* hormonal da progesterona pode ocorrer devido ao aumento no metabolismo e no fluxo sanguíneo hepático causado pela rbST.

Gallo & Block (1991), no entanto, reportaram aumento nas concentrações sérica de P₄ com a utilização de doses de 320 mg e 600 mg de rbST por 28 dias em vacas Holandesas em lactação, em concordância ainda com Schemm et al. (1990) que, utilizando vacas da mesma raça e durante a lactação, obtiveram concentrações séricas de progesterona superiores em relação ao grupo não tratado, fazendo uso da somatotropina recombinante bovina em 25 mg com doses diárias durante 200 dias.

Esses dados podem sugerir que o possível aumento na concentração sérica de P₄ pode estar relacionado com a frequência de administração exógena do hormônio.

A capacidade de incremento nas taxas de estradiol plasmático da somatotropina recombinante bovina ainda é controversa. Alguns estudos utilizando tratamentos com diferentes doses de administração de rbST comprovam tanto seu efeito sobre o aumento (DE LA SOTA et al., 1993; LUCY et al., 1993), a diminuição (LUCY et al., 1994; LUCY et al., 1995) e inexistente (GONG et al., 1991, 1993; JIMENEZ-KRASSEL et al., 1999; KIRBY et al., 1997) nos níveis de estradiol plasmático e no líquido folicular.

Nesta pesquisa, entre os grupos experimentais tratados e não tratados com somatotropina recombinante bovina e entre os dias das aplicações e OPUs não foi observada diferença estatística nas concentrações plasmáticas médias de estradiol (Figura 5), ou seja, a somatotropina recombinante bovina não surtiu efeito positivo ou negativo sobre o estradiol plasmático.

As concentrações plasmáticas médias de estradiol dos animais variaram no grupo controle de 100 a 137 ng/mL; grupo tratado com 250 mg de rbST de 75 a 333,3 ng/mL; e grupo tratado com 500 mg de rbST de 75 a 333,3 ng/mL durante todo o período experimental.

Em um estudo realizado utilizando ovários de abatedouro com isolamento e cultivo *in vitro* das células da granulosa de bovinos com meio adicionado de rbST não foi observado efeito significativo desse hormônio sobre a produção de estradiol frente ao grupo não tratado (JIMENEZ-KRASSEL & IRELAND, 2002).

In vivo, Schemm et al. (1990) também não observou efeito positivos da rbST sobre a flutuação sérica de E₂. Em contrapartida, Andrade et al. (1996) em experimento utilizando a rbST em protocolos de indução e sincronização de cio de bovinos constatou aumento nos níveis plasmáticos de E₂, hipotetizando sua ação sobre a foliculogênese.

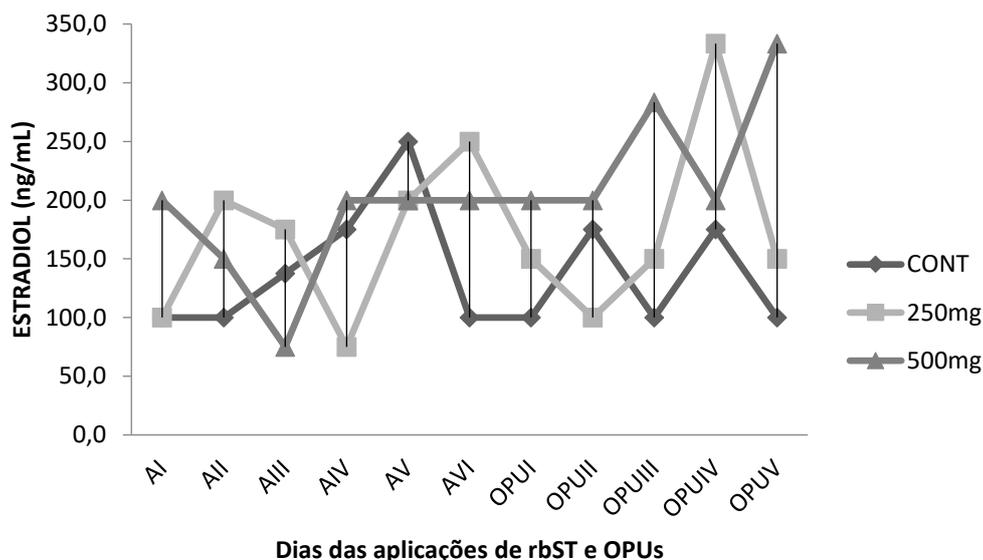


Figura 5. Média das concentrações plasmáticas de estradiol de fêmeas bovinas não tratadas (◆) e tratadas com 250mg (■) ou 500mg (▲) com somatotropina recombinante bovina nos dias de sua aplicação e aspiração *Ovum pick-up*.

Os níveis circulantes de IGF-1 não tiveram interação significativa entre os tratamentos e entre os períodos de aplicação/OPUs ($P < 0,05$), exceto durante a última OPU, onde o grupo tratado com 500mg de rbST obteve média de 23,33 ng/mL, estando abaixo das outras médias encontradas durante o período experimental (frequentemente superiores a 50 ng/mL).

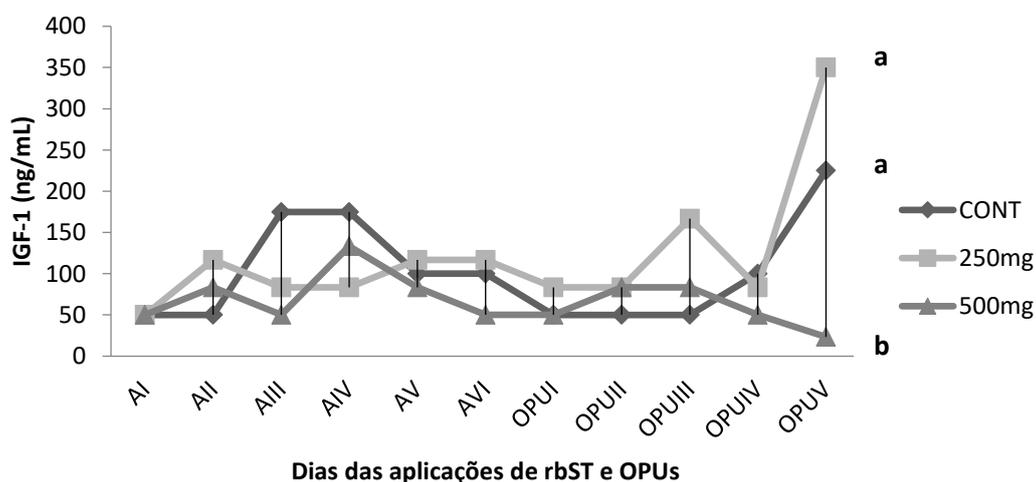


Figura 6. Média das concentrações plasmáticas de IGF-1 de fêmeas bovinas não tratadas (◆) e tratadas com 250mg (■) ou 500mg (▲) com somatotropina recombinante bovina nos dias de sua aplicação e aspiração *Ovum pick-up*. ^{a,b} Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Neste trabalho, as maiores amplitudes das concentrações séricas médias de IGF-1 foram encontradas na proporção de 225 ng/mL (OPUV), 350 ng/mL (OPUV) e 133,33 (AIV) para os grupos controle, 250mg e 500mg, respectivamente, indicando homogeneidade entre os grupos na concentração sérica dessa variável (Figura 3). Entretanto, estes dados diferem dos encontrados por PAULETTI et al. (2005) que, trabalhando com vacas holandesas prenhes, administraram 500 mg de rbST 35 dias antecedendo o parto, em intervalos de 14 dias, e observaram valores médios na segunda semana de 203,89 ng/mL para o grupo tratado *vs* 80,00 ng/mL para o grupo controle.

MOREIRA et al. (2002) acompanharam bezerras Simbrasil por 150 dias, após aplicação de 250mg de rbST em intervalos de 14 dias, e observaram aumento nas flutuações séricas de IGF-1, com média de 188,6 ng/mL.

Todavia, os achados deste estudo corroboram com os encontrados em estudo utilizando vacas com período seco de aproximadamente 60 dias, onde o pico de concentração de IGF-I sérico foi de 163 ng/mL aos 34 dias pré-parto e de 40 ng/mL duas semanas pré-parto (VEGA et al., 1991), sem qualquer tratamento hormonal.

É válido ressaltar que esse aumento é dependente, também, do plano de nutrição, incluindo porcentagem de energia e proteína na dieta. Animais bem nutridos respondem ao tratamento com rbST, elevando os níveis séricos de IGF-I, enquanto animais com alguma restrição nutricional exibem pouco ou nenhum aumento nas concentrações de IGF-I (BREIER et al., 1988).

Segundo Pinto Andrade et al. (1996), a ação da somatotropina sobre a função ovariana estão relacionadas a utilização de nutrientes e ao padrão de aporte conduzidos a estes tecidos. A diminuição no consumo ou baixa qualidade de alimentos pode reduzir a magnitude dessas respostas (RAUSCH et al., 2002), onde as concentrações séricas do IGF mudam em resposta à condição nutricional (LUCY, 2000).

Isso pode sugerir que a resposta nula da somatotropina recombinante bovina sobre os níveis circulantes de IGF-1, neste trabalho, pode advir da condição de escore corporal dos animais utilizados nos grupos experimentais, que estavam entre 2 – 2,5, segundo o escore da condição corporal entre 4 e 5 (1 = muito magra, 5 = muito gorda) de Ferreira & Torres (1993).

6. CONCLUSÃO

A administração de somatotropina recombinante bovina (rbST) em intervalos de 12 dias por 60 dias não surtiu na taxa de desenvolvimento embrionário na produção *in vitro* de fêmeas bovinas da raça Girolando.

Sobre a dinâmica hormonal de fêmeas bovinas nas concentrações plasmáticas de progesterona (P4), estradiol (E2) e IGF-1 quando entre os grupos tratados com 250 mg e 500 mg e o grupo não tratado, não houve também variância significativa entre os dias de aplicação e OPUs.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, L. P.; RHIND, S. M.; WRIGHT, I. A. et al. Effects of bovine somatotropin (bST) on ovarian function in post-partum beef cows. **Reproduction Fertility and Development**, v.8, p.951-960, 1996.

ANDRADE, G. A.; FERNANDES, M. A.; KNYCHALA, R.M.; PEREIRA JÚNIOR, M.V.; OLIVEIRA, A.J.; NUNES, D.P.; BONATO, G.; SANTOS, R. M. Fatores que afetam a taxa de prenhez de receptoras de embriões bovinos produzidos in vitro. **Rev Bras Reprod Anim**, v.36, p.66-69, 2012.

ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; GUTIERREZ, C. G. et al. Insulin-like growth factor binding protein -2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. **Endocrinology**, v.139, p.2146-2154, 1998.

AVELINO, K.B., VANTINI, E., SENEDA, M.M., *et al.* In vitro production of embryos of cows with acquired infertility. **Theriogenology**, v.57, p.656, 2002.

BAUMAN, D. E. Bovine somatotropin and lactation from basic science to comercial application. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, p.101-116, 1999.

BAUMAN, D. E. Bovine somatotropin: review of an emerging animal technology. **Journal of Dairy Science**. n. 75, p. 3432-3451. 1992.

BEZERRA, G., A. **Somatotropina Bovina Recombinante sobre a produção de embriões bovinos *in vitro***. Maringá, PR. Universidade Estadual de Maringá. Dissertação de Mestrado, 47 p., 2009.

BOLS, P.E.J. et al. Effect of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in OPU-IVF program. **Theriogenology**, v.49, p.983-995, 1998.

BOLS, P. E. J.; LEROY, J. L. M. R.; VANHOLDER, T.; SOOM, A.V. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. **Theriogenology**, v.62, p.906-914, 2004.

BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R.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.

BURATI JUNIOR, J. Foliculogênese em bovinos. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA**, Londrina, p 55-62. 2006.

BURTON, J.L., BLOCK, E., GLIMM, D.R. et al. A review of bovine growth hormone. **Can. J. Anim. Sci.**, v.74, p.167-201, 1994.

BYATT, J. C.; EPPARD, P. J.; VEENHUIZEN, J. J.; SORBET, R. H.; BUONOMO, F. C.; CURRAN, D. F.; COLLIER, R. J. Serum half-life and in-vivoactions of recombinant bovine placental lactogen in the dairy cow. **Journal of Endocrinology**, v.132, p.185-193, 1992.

CASTILHO, C.; GAMBINI, A. L. G., FERNANDES, P.; TRINCA, L. A.; TEIXEIRA, A. B.; BARROS, C. M. Synchronization of ovulation in crossbred dairy heifers using gonadotrophin-releasing hormone agonist, prostaglandin F₂ and human chorionic gonadotrophin or estradiol benzoate. **Brazilian Journal Medical Biology and Research**, Ribeirão Preto, v. 33, n.1, p. 91-101, 2000.

COELHO, E. N. **Alguns aspectos da transferência de embriões em bovinos**. Belo Horizonte, MG: Escola de Veterinária da UFMG, 1986. 83p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1986.

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

DA SILVA HAAS, G. T.; DE CARVALHO FERNANDES, C. A.; DA COSTA, E. P.; ALVES TORRES, C. A.; FERNANDES MARQUES, P. A.; GUISELLI LOPES, F.; RÊGO DE PAULA, T. A. Taxa de prenhez e concentração sérica de progesterona em novilhas receptoras de embrião tratadas com somatotropina recombinante bovina (rbst). **Revista Ceres**, Viçosa, v.54, n.311, p.26-32, 2007.

DE LA SOTA, R. L.; LUCY, M. C.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Effects of recombinant bovine somatotropin (somatotribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 76:1002–1013, 1993.

ENRIGHT, W.J.; PRENDIVILLE, D.J.; SPICER, L.J. et al. Effects of growth hormone releasing factor and thyrotropin-releasing hormone on growth, feed efficiency, carcass characteristics, and blood hormones and metabolites in beef heifers. **Journal of Animal Science**, v.71, p.2395-2405, 1993.

ETHERTON, T.D.; BAUMAN, D.E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. **Physiological Reviews**, v.78, p.745-761, 1998.

FAIR, T.; PAPADOPOULOS, S.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. **Mol Reprod Dev.** 2002;62(3):320–7.

FERREIRA, A.M.; TORRES, C.A.A. Perda de peso corporal e cessação da atividade ovariana luteínica em vacas mestiças leiteiras. **Pesq. Agropec. Bras.**, 28:411-418, 1993.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim Reprod Sci**, v.82/83, p.109-126, 2004.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.135-163, 2003.

FOXCROFT, G.; ALMEIDA, F. & AHERNE F. Management of the gilt and first parity sow. In: VII Simpósio Internacional de Reprodução Animal e Inseminação Artificial em Suínos, Foz do Iguaçu, **Anais**, ABRAVES. p.131-145, 2000.

GALLI, C., DUCHI, R., CROTIL, G. et al. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v.59, p.599-616, 2003.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM-IVF in cattle. **Anim. Reprod. Science.**, v.42, p.371-379, 1996.

GALLO, G. F.; BLOCK, E. Effects of recombinant bovine somatotropin on hypophyseal and ovarian functions of lactating dairy cows. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 71, p. 343–353, 1991.

GOODHAND, K.L.; WATT, R.G.; STAINES, M.E. et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p.951-961, 1999.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. B.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Rev Bras Reprod Anim**, v.31, p.212-217, 2007.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WILMUT, I. et al. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, v.45, p. 611-622, 1997.

GONG, J. G.; T. A. BRAMLEY; and R. WEBB. Webb. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: Follicular populations and peripheral hormones. **Biol. Reprod.** 45:941–949, 1991.

GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; WILMUT, I.; WEBB, R. Effect of recombinant bovine somatotropin, on the superovulatory response to pregnant serum gonadotropin in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 1141-1149, 1993.

GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; DONADEU, F.X.; BERGFELT, D.R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.239-257, 2003.

GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT I, WEBB R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biol Reprod**, v.62, p.1322-1328, 2000.

HANSEL, W.; ROCHA, A; BROUSSARD, J.R. et al. Treatment of beef cows with bovine somatotropin (bST) and fsh enhances the number of oocytes recovered without decreasing their developmental capabilities. **Biology of Reproduction**, v. 54, p.90, 1996.

HASLER, J.F.; BILBY, C.R.; COLLIER, R.J.; DENHAM, S.C.; LUCY, M.C. Effect of recombinant bovine somatotropin on superovulatory response and recipient pregnancy

rates in a commercial embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 59, p. 1919-1928, 2003.

HEAP, D.; COLLIER, R. J.; BOYD, C. K. et al. Expression of alternate growth hormone receptor messenger RNA in ovary and uterus of cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.13, p.421-430, 1996.

HOSHI, H. *In vitro* production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.

IGA, K.; NIWA, K.; BARTKE, A. Recombinant bovine growth hormone stimulates nuclear maturation of bovine oocytes in vitro and promotes subsequent embryonic development. **Journal of Reproduction and Development**, v.44, p.45-52, 1998.

IETS. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, p. 14-26, 2014.

IZADYAR, F.; HAGE, W. G.; COLENBRANDER, B. et al. The promontory effect of growth hormone on development competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.49, p.444-453, 1998.

JIMENEZ-KRASSEL & IRELAND. Development and Validation of a Short-Term, Serum-Free Culture System for Bovine Granulosa Cells: Evaluation of the Effects of Somatotropin and Growth Hormone-Releasing Factor on Estradiol Production **J. Dairy Sci.** 85:68–78, 2002.

JIMENEZ-KRASSEL; F., M. BINELLI; H. A. TUCKER; J. J. IRELAND. Effect of long-term infusion with recombinant growth hormone releasing factor and recombinant bovine somatotropin on development and function of dominant follicles and corpora lutea in Holstein cows. **J. Dairy Sci.** 82:1917–1926, 1999.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, v.16, p.3-33, 1995.

JUSKEVICH, J. C.; GUYER, C. G. Bovine growth hormone: human food safety evaluation. **Science**. 249:875, 1990.

KIRBY, C. J.; M. F. SMITH; D. H. KEISLER; M. C. LUCY; Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-released bovine somatotropin. **J. Dairy Sci.** 80:273–285, 1997.

KOBAYASHI, J.; MIZUNUMA, H.; KIKUCHI, N.; LIU, X.; ANDOH, K.; ABE, Y.; YOKOTA, H.; YOMADA, K.; IBUKI, Y.; HAGIWARA, H. Morphological assessment of the effect of growth hormone on preantral follicles from 11-day-old mice in an *in vitro* culture system. **Biochem Biophysiol Res Commun**, v.268, p.36-41, 2000.

KRUIP, T. A.; BONI, R.; KRUIP, T. A. M.; BONI, R.; WURTH, Y. A.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, Stoneham, v. 42, n. 4, p. 675-684, 1994.

KUEHNER, L. F.; RIGGER, D.; WALTON, J. S.; ZHAO, X.; JOHSON, W. H. The effect of a depot injections of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulation Holstein heifers. **Theriogenology**, v. 35, p. 1003-1013, 1993.

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

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 48, p.76-86, 1979.

LIU, X.; ANDOH, K.; YOKOTA, H.; KOBAYASHI, J.; ABE, Y.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. **Endocrinology**, v.139, p.2342-2347, 1998.

LOUHIO, H.; HOVATTA, O.; SJÖBERG, J.; TUURI, T. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long-term culture. **Mol Hum Reprod**, v.6, p.694-698, 2000.

LUCCI, C.S.; RODRIGUES, P.H.M.; SANTOS JR., E.J.; CASTRO, A.L. Emprego da somatotrofina bovina (bst) em vacas de alta produção. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.35, p.46-50, 1998.

LUCY, M.C.; De LA SOTA, R.L.; STAMPLES, C.R. et al. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1014-1027, 1993.

LUCY, M. C. *et al.* Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. **Theriogenology**, v. 41, p. 561–572, 1994.

LUCY, M.C. Use of bovine somatotropin to increase follicular growth in cattle: Applications to superovulation. **Annual Convention of American Embryo Transfer Association**, Portland, p. 61-70, 1996.

LUCY, M. C.; W. W. THATCHER; R. J. COLLIER; F. A. SIMMEN; Y. KO, J. D. SAVIO; AND L. BADINGA. Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy in cattle. **Domest. Anim. Endocrinol.** 12:73–82, 1995.

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

MAGALHÃES, D. M.; SALES, E.T.; PADILHA, R.T.; SILVA, T.F.P.; TONIOLI, R.; FIGUEIREDO, J.R. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.36, n.1, p.32-38, 2012.

MAFFILI, V. V.; TORRES, C. A. A.; BORGES, A. M. et al. Efeitos da somatotropina bovina na resposta superovulatória e na taxa de clivagem de zigotos de camundongos (*Mus musculus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.3, p.377-379, 2001.

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

MERTON, J. S.; DE ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-674, 2003.

MORAES JÚNIOR, F., J. **Efeito da Somatotropina Recombinante Bovina (rbST) na resposta ovulatória e na qualidade dos embriões de vacas da raça Nelore.** Teresina, PI, Universidade Federal de Piauí, Dissertação de Mestrado, 54 p., 2008.

MORAES JÚNIOR, F., J.; SCHUTZ, L., F.; FELTRIN, C.; MARTINS, L., T.; NETO, S., G.; SALVIANO, M., B.; TAVARES, K., C., S.; ALMEIDA, J., L.; RODRIGUES, V., H.; MACHADO JUNIOR, J.; FERNADES, C., C., L.; SANTOS, B., M., B.; CALDERON, C., E., M.; AGUIAR, L., H.; BERTOLINI, M., SOUSA, J., A., T. Efeito cumulative da Somatotropina Reombinante Bovina (rbST) na produção *in vitro* de embriões de fêmeas Guzolando lactantes. **XXV Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE)**. p, 394, 2001.

MOREIRA, F.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J.; BADINGA, L.; THATCHER, W. W. Effects of growth hormone and insuline-like growth factor-I on development of vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 57, p. 895-907, 2002.

NAGAI, T. The improvement of *in vitro* maturations systems for bovine and pordne oocytes. **Theriogenology**, v.55, p.1291-1301, 2001.

NEVES, E. F.; RAMOS, A. F.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Pré-tratamento com somatotropina bovina (rbST) na superovulação de doadoras da raça Holandesa. **Arquivos Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.205-209, 2005.

PAULETTI, P.; BAGALDO, A. R.; KINDLEIN, L.; DE PAZ, C. C. P.; LANNA, D. P. D.; NETO, R. M. IGF-I e IgG Séricos e nas Secreções Lácteas em Vacas Tratadas com rbST no Período Pré-Parto. **R. Bras. Zootec.**, v.34, n.3, p.976-986, 2005.

PAVLOK, A.; KOUTECKA, L.; KREJCI, P.; SLAVIK, T.; CERMAN, J.; SLABA, J.; DORN, D. Effect of recombination somatotropin on follicular growth and quality of oocyte in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.41, p.183–192, 1995.

PAVLOK, A.; KOUTECKÁ, L.; KREJCI, P.; SLAVIC, T.; CERMAN, J.; SLABA, J.; DORN, D. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 183-192, 1996.

PIETERSE, M. C.; KAPPEN K. A.; KRUIP, Th. A. M.; TAVERNE, M. A. M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v.30, n.4, p.751-762, 1988.

PONTES, J. H. F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B. V.; Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, n. 4, p. 690-7, 2009.

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

RAUSCH, M.I.; TRIPP, M.W.; GOVONI, K.E. et al. The influence of level of feeding on growth and serum insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-I binding proteins in growing beef cattle supplemented with somatotropin. **Journal of Animal Science**, v.80, n.1, p.94-100, 2002.

REICHENBACH, H-D. Embryo transfer and cryopreservatioin in cattle: practical considerations. **Acta Sci Vet**, 31: p. 28-50. 2003.

RIEGER, D., WALTON, J.S., GOODWIN, M.L. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotropi on plasma progesterone concentration and number of embryo collected from superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, 35(5):863-869. 1991.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocysts yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.

RODRIGUES, C. F. M., GARCIA, J. M. Fecundação *in vitro* em bovinos: aplicação comercial. **Arq. Fac. Vet. UFRGS Supl.**, v.28, p.186-187, 2000.

SANGILD, P.T., SCHMIDT, M., JACOBSEN, H., *et al.* Blood chemistry, nutriente metabolism, and organ weights in fetal and newborn calves derived from *in vitro* produced bovine embryos. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1495-1504, 2000.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT software: changes and enhancements through release 6.12. Cary: **Statistical Analysis System Institute**, 2015.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; ANDRADE, E. R.; BINELLI, M.; OLIVEIRA, J. A.; NASCIMENTO, A. B. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v.59, p.1435-1440, 2003.

SCHEMM, S. R. et al. Effects of recombinant bovine somatotropin on luteinizing hormone and ovarian function in lactating dairy cows. **Biology Reproduction**, v. 42, p. 815–821, 1990.

SHIMIZU, T.; MURAYAMA, C.; SUDO, N.; KAWASHIMA C.; TETSUKA M.; MIYAMOTO, A. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. **Anim Reprod Sci**, v.106, p.143-152, 2008.

SIROTKIN, A.V.; MAKAREVICH, A.V.; Growth hormone can regulate functions of porcine ovarian granulosa cells through the cAMP/protein kinase A system. **Anim Reprod Sci**, v.70, p.111-126, 2002.

SPICER, L.J.; ECHTERNKAMP, S.E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, p. 223-245, 1995.

TAKADA, L. **Efeito da melatonina sobre a maturação dos oócitos em sistemas tradicionais de produção *in vitro* de embriões**. 2008. 85 f. Tese (Doutorado), Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Departamento de Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

THOMPSON, J. G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos - a decade of achievement. **Anim. Reprod. Sci**, v.60-61, p.263-275, 2000.

TRIPP, M.W.; JU, J.C.; HOAGLAND, T.A. et al. Influence of somatotropin and nutrition on bovine oocyte retrieval and *in vitro* development. **Theriogenology**, v.53, p.1581-1590, 2000.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Rev Bras Reprod Anim**, v.32, p.100-109, 2008.

VIANA, J. H. M.; SIQUEIRA, L. G. B.; PALHÃO, M.P.; ALMEIDA CAMARGO, L. S. DE. Use os *in vitro* Fertilization Technique in the Last Decade and Its Effect on Brazilian Embryo Industry and Animal Production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v, 38, n. Supl 2, p s661-s674, 2010.

VIANA, J. H. M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. **O Embrião**, ano XVI, edição 51, p.6-10, 2012.

YOUNG, L.E., SINCLAIR, K.D., WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev. Reprod.**, v.3, p.155-163, 1998.

WALLIS, D. C. et al. The molecular evolution of pituitary hormones. **Biol. Rev.** n. 50, p. 35, 1975.

WASSARMAN, P. M.; ALBERTINI, D. F. The mammalian ovum. In: Knobil, E.; Neil, J. D. **The physiology of Reproduction**, New York: Raven, NY. p. 79- 122. 1994.

WOOD, D. C. et al. Purification and characterization of pituitary bovine somatotropin. **J. Biol. Chem.** 264: 14741. 1989.

ZHAO, J.; TAVERNE, M.A.M.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; BEVERS, M.M.; VAN DEN HURK R. Effect of activin A on *in vitro* development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biol Reprod**, v.65, p.967-977, 2001.