

**EFEITO DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (rbST) NA
RESPOSTA OVULATÓRIA E NA QUALIDADE DOS EMBRIÕES DE
VACAS DA RAÇA NELORE**

FELIPE DE JESUS MORAES JUNIOR

Médico Veterinário

Dissertação apresentada a pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Morfofisiologia, fisiopatologia, biotécnicas da reprodução e fisiopatologia do estresse.

Teresina

Estado do Piauí – Brasil

Março – 2008

**EFEITO DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (rbST) NA
RESPOSTA OVULATÓRIA E NA QUALIDADE DOS EMBRIÕES DE
VACAS DA RAÇA NELORE**

FELIPE DE JESUS MORAES JUNIOR

Médico Veterinário

Orientador: Prof. Assoc. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Co-Orientador: Prof. Assoc. Dr. Rômulo José Vieira

Dissertação apresentada a pós-graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Morfofisiologia, fisiopatologia, biotécnicas da reprodução e fisiopatologia do estresse.

Teresina

Estado do Piauí – Brasil

Março – 2008

M827e

Moraes Junior, Felipe de Jesus

Efeito da Somatotropina Recombinante Bovina (rbST) na Resposta Ovulatória e na Qualidade Dos Embriões de Vacas da Raça Nelore/ Felipe de Jesus Moraes Junior. Teresina, 2008. 52sf.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí. 2008.

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

1. Reprodução Animal 2. Transferência de Embriões 3. Superovulação I. Título

CDD - 636.089 26

**EFEITO DA SOMATOTROPINA RECOMBINANTE BOVINA (rbST)
NA RESPOSTA OVULATÓRIA E NA QUALIDADE DOS EMBRIÕES
DE VACAS DA RAÇA NELORE**

FELIPE DE JESUS MORAES JUNIOR

Dissertação aprovada em:

Prof. Assoc. Dr. José Adalmir de Sousa/UFPI
Orientador

Prof. Assoc. Dr. Rômulo José Vieira/UFPI
Examinador interno

Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Junior/UFRPA
Examinador externo

DEDICATÓRIA

Dedico este momento tão importante aos meus pais Felipe Moraes e Maria de Lourdes que o tempo todo apoiou minhas decisões.

Aos meus irmãos Fábio Henrique e Flávio Moraes; irmãs Fabíola Cristina e Fabiane Cristina; e as minhas sobrinhas Kaline, Kethene, Alicia, Alexsandra, Ana Clara e minha cunhada Catia que pela amizade e convivência agradáveis de tantos anos.

À Aline Brito pela amizade, carinho, paciência e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pelos caminhos apresentados em busca do conhecimento, a quem devo toda esta força, coragem, inteligência que me fizeram chegar até aqui.

À Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade e realização desta pós-graduação.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza pelos ensinamentos, orientação, atenção, paciência e estímulo para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. José Ribamar de Souza Torres Junior pela atenção, colaboração, paciência e dedicação para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. José Rômulo Vieira pelo apoio.

Ao Msc. Antonio de Souza Junior pelo exemplo de competência profissional, incentivo e apoio.

Aos criadores, Sr. João, Daniel, Igor e família, pela dedicação, desempenho diário nas atividades desenvolvidas e por cederem aos animais, que participaram desta pesquisa.

Aos professores do curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, Dr. Luis Carlos Rêgo, Msc. José de Ribamar da Silva Junior, Msc. Ricardo Chaves, Dr. Helder Pereira de Moraes e Dra. Rita Maria Seabra Candenado Guerra, pela amizade e conhecimentos adquiridos no decorrer do curso.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Maranhão (FAPEMA) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos funcionários da fazenda Canarana, Sr. Raimundo, Sr. Ribamar, Sr. Itacide, Sr. Quiriziu, Carminho, Puiuka, Pajú, em fim, todos do escondido que contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

Aos amigos de laboratório, Mauricio, James, Isolda e João Mendes pelo desempenho diário nas atividades desenvolvidas.

Aos amigos Médicos Veterinários, Claudio Felipe, Onel, Modesto, Paulo Victor e a todos os amigos que cultivei na graduação.

Aos amigos e colegas da pós-graduação, Bruno Maranhão, Fernanda Tércia, Fabricio Brito, Danilo Brito, Maxwell, Rodrigo, Carol Moura, Augusto, Sandovaldo, Gina Azar, Lucina, Tatiana, Mara, Castelo, Lidiana e Laí pela cumplicidade durante esses anos de convivência.

Ao prof. Dr. Nicodemos Alves de Macedo, pelo conhecimento e atenção.

Aos professores, Dr. Severino, Dr. Solano, Msc. Darcio e aos médicos veterinários Rosvaldo e Dário pelos ensinamentos nas horas vagas na clinica de grandes animais.

Aos funcionários da pós - graduação pela convivência e auxílio durante o curso.

Muito obrigado!!!!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURA	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Bases Fisiológicas do Ciclo estral	13
2.2 Transferências de Embriões	16
2.2.1 Superovulação	16
2.2.1.1 Hormônio Folículo Estimulante	17
2.2.1.2 Hormônio do Crescimento	19
2.2.1.2.1 Sistema Ovariano do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF- I e IGF- II)	20
2.2.1.2.2 Somatotropina Recombinante Bovina	21
2.2.2 Qualidade Embrionária	22
3. CAPITULO 1	24
RESUMO	24
ABSTRACT	25
INTRODUÇÃO	26
MATERIAL E METODOS	27
<i>Local e Animais Experimentais</i>	27
<i>Protocolo de Superovulação</i>	27
<i>Avaliação Ultrassográfica e Colheita de Embriões</i>	29
<i>Delineamento Experimental</i>	30
<i>Analise Estatística</i>	30
RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
CONCLUSÃO	36
LITERATURA CITADA	36
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Médias e erros padrão dos corpos lúteos e estruturas recuperados de vacas da raça Nelore, superovuladas com FSH, associado ou não à rbST.....31
- Tabela 2** - Médias e erros padrão dos estádios de desenvolvimento dos embriões recuperados de vacas da raça Nelore superovuladas com FSH, associada ou não à rbST.....34
- Tabela 3** - Médias e erros padrão da qualidade dos embriões recuperados em vacas da raça Nelore superovuladas com FSH, associada ou não à rbST.....35

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Protocolo de superovulação com FSH e rbST.....	28
Figura 2. Protocolo de superovulação com FSH e sem rbST.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

- BE** - Benzoato de estradiol
- c/rbST** – Com somatotropina recombinante bovina
- CL** - Corpo lúteo
- E-17 β** – Estradiol
- eCG** - Gonadotrofina coriônica eqüina
- FSH** - Hormônio folículo estimulante
- FSH-p** - hormônio do folículo estimulante de hipófise suína
- GH** - Hormônio do crescimento
- GnRH** - Hormônio liberador de gonadotrofina
- hCG** - Gonadotrofina coriônica humana
- IGF – I** - Fator de crescimento semelhante à insulina - I
- IGF – II** - Fator de crescimento semelhante à insulina - II
- IGFBP** – Proteína carreadora do fator de crescimento semelhante à insulina
- mg** – Miligrama
- mm** – Milímetro
- P2 e P3** – Receptores para Somatotropina
- P₄** – Progesterona
- P450_{scc}** - Enzima esteroidogênica que converte o colesterol em pregnenolona
- P450 aromatase** - Enzima esteroidogênica que converte o androgênio em estrógenos
- PGF_{2 α}** - Prostaglandina F_{2 α}
- PM** – Peso molecular
- PO** – Puro de origem
- rbST** – Somatotropina recombinante bovina
- s/rbST** – Sem somatotropina recombinante bovina
- ST** - Somatotropina
- TE** - Transferência de Embriões
- μ g** - Micrograma

Efeito da Somatotropina Recombinante Bovina (rbST) na Resposta Ovulatória e na Qualidade dos Embriões de Vacas da Raça Nelore

Autor: Felipe de Jesus Moraes Junior

Orientador: Prof. Assoc. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Co-Orientador: Prof. Assoc. Dr. Rômulo José Vieira

RESUMO – o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da rbST na produção *in vivo* de embriões de vacas da raça Nelore. Foram utilizadas oito doadoras, todas superovuladas com FSH, sendo que a metade o FSH foi associado à rbST. As superovulações foram realizadas em duas etapas, uma em julho e outra em outubro de 2007. Na primeira etapa, quatro animais (G1) receberam apenas FSH e quatro (G2) receberam além do FSH, 250mg de rbST, por via intramuscular, no dia denominado D0, dia do implante de progestágeno. Na segunda etapa, no sistema *crossover*, os animais que receberam apenas FSH, receberam 250 mg rbST. As superovulações foram iniciadas no D4, com 133mg de FSH, aplicadas em quatro dias consecutivos, com doses decrescentes, a intervalo de 12 horas. Os implantes foram retirados em D7 após aplicação de duas doses de PGF em D6. No D8 foram aplicadas 200 µg de um análogo do GnRH e as inseminações realizadas 12 e 24 horas após aplicação do GnRH. As colheitas foram realizadas no sétimo dia após a primeira inseminação. A resposta superovulatória (presença de corpos lúteos), total de estruturas, estádios de desenvolvimento e qualidade dos embriões recuperados não foram afetados ($p>0,05$) pelo tratamento com a rbST. As médias obtidas nos tratamentos G1 e G2 foram, respectivamente: estruturas colhidas, $9,5\pm 3,0$ e $7,6\pm 2,2$; embriões viáveis, $8,1\pm 2,6$ e $5,0\pm 1,6$; estruturas não fertilizadas, $0,3\pm 0,2$ e $0,5\pm 0,3$; estruturas degeneradas, $1,0\pm 0,5$ e $0,5\pm 0,3$; mórulas, $0,5\pm 0,2$ e $2,3\pm 1,9$; blastocistos iniciais, $2,2\pm 2,1$ e $1,3\pm 0,9$; blastocistos, $4,7\pm 1,6$ e $2,5\pm 0,5$; blastocistos expandidos, $0,6\pm 0,3$ e $0,5\pm 0,5$; embriões grau I, $7,3\pm 2,5$ e $5,0\pm 0,8$; embriões grau II, $0,5\pm 0,3$ e $1,1\pm 0,5$ e embriões grau III, $0,2\pm 0,1$ e $0,5\pm 0,5$.

Palavras-chave: embrião, FSH, GH

Effect of the Bovine Recombinant Somatotropina (rbST) in the Ovulatória Reply and the Quality of the Embryos of Cows of the Nelore Race

ABSTRACT - The present work had as objective to evaluate the effect of rbST in the alive production in of embryos of cows of the Nelore race. Eight givers, all superovulated with FSH had been used, being that the half the FSH was associated with rbST. The superovulation had been carried through in two stages, one in July and another one in October of 2007. In the first stage, four animals (G1) had received only FSH and four (G2) had received beyond the FSH, 250mg of rbST, for saw to intramuscular, in the called day D0, day of the implantation of progestágeno. In the second stage, in the system to crossover, the animals that had received only FSH, they had received 250 mg rbST. The superovulation had been initiated in the D4, with 133mg of FSH, applied in four days consecutive, with decreasing doses, the interval of 12 hours. The implantations had been removed in D7 after application of two doses of PGF in D6. In the D8 200 had been applied μg of analogous of the GnRH and carried through inseminations 12 and 24 hours after application of the GnRH. The harvests had been carried through in the seventh day after the first insemination. The superovulated reply (presence of Corpora lútea), total of structures, stadiums of development and quality of the recouped embryos had not been affected ($p > 0,05$) for the treatment with rbST. The averages gotten in the treatment G1 and G2 had been, respectively: Recovered structures, $9,5 \pm 3,0$ and $7,6 \pm 2,2$; viable embryos, $8,1 \pm 2,6$ and $5,0 \pm 1,6$; not fertilized, $0,3 \pm 0,2$ and $0,5 \pm 0,3$; Degenerated, $1,0 \pm 0,5$ and $0,5 \pm 0,3$; morulae, $0,5 \pm 0,2$ and $2,3 \pm 1,9$; early blastocysts, $2,2 \pm 2,1$ and $1,3 \pm 0,9$; blastocysts, $4,7 \pm 1,6$ and $2,5 \pm 0,5$; expanded blastocysts, $0,6 \pm 0,3$ and $0,5 \pm 0,5$; embryos degree I, $7,3 \pm 2,5$ and $5,0 \pm 0,8$; embryos degree II, $0,5 \pm 0,3$ and $1,1 \pm 0,5$ and embryos degree III, $0,2 \pm 0,1$ and $0,5 \pm 0,5$.

KEY-WORD: embryos, FSH, GH

1. INTRODUÇÃO

Os índices reprodutivos e produtivos da pecuária brasileira estão muito abaixo do desejável. O aumento na produção de leite nas últimas décadas deve - se mais, à expansão das áreas exploradas e aumento efetivo do rebanho do que pelo aumento real da produtividade. Quanto mais maximizada for a produção, utilizando biotecnologias como Inseminação Artificial (IA), Sincronização Estral, Transferência de Embriões (TE) e Fecundação in vitro (FIV), maior será a exigência de uma ótima eficiência reprodutiva (NEVES et al., 2000).

A TE, como técnica de melhoramento genético das raças zebuínas e taurinas, apresenta vantagens como aumento da eficiência reprodutiva das fêmeas, maior intensidade de seleção, rápida difusão de estoques genéticos melhoradores e possibilidade de armazenar e transportar zigotos à longa distância (DEMCZUC et al., 1998). Entretanto, a grande variabilidade com relação à resposta superovulatória, principalmente em animais zebuínos é um fator limitante do melhoramento genético (MOLINA & SATURNINO, 1993).

A utilização de hormônios exógenos na área reprodutiva vem aumentando consideravelmente na última década. Vários estudos são realizados e empregados com bastante sucesso (LUCY et al, 2000), permitindo incrementar os índices reprodutivos dos rebanhos de corte e leite, em programas de IA, ou mesmo de superestimulação ovariana, em animais de elevado valor genético (KOZICKI et al., 2005).

Entre os hormônios exógenos implicados na superestimulação ovariana dos animais para obtenção de maior número de folículos desenvolvidos, pode ser mencionado o hormônio folículo estimulante (FSH), a gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina coriônica humana (hCG), dentre outros. Além dos hormônios mencionados, pesquisa-se atualmente com intensidade, a utilização da somatotropina bovina recombinante (rbST), tida como substância que acarreta o aumento de receptores para o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) favorecendo o recrutamento folicular ovariano (LUCY et al., 2000)

Neste sentido, o presente trabalho teve como avaliar à rbST na produção in vivo de embriões de vacas raça Nelore.

O capítulo 1, está em forma de artigo científico, de acordo com as normas da Revista Científica de Produção Animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Bases Fisiológicas do Ciclo Estral

Na puberdade, ocorre um aumento na síntese e liberação hipotalâmica do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) que, via sistema porta hipotalâmico-hipofisário estimula a secreção hipofisária do FSH e o hormônio luteinizante (LH) (CUNNINGHAM, 1993; PALHANO et al., 2003). Segundo Campbell et al. (1995), das gonadotrofinas hipofisárias, apenas o FSH estimula o desenvolvimento folicular, enquanto que o LH atua no folículo pré-ovulatório. Essas alterações fisiológicas e morfológicas no sistema reprodutor estimulam modificações cíclicas no comportamento do animal, denominado de estro, ou seja, período de receptividade sexual (SILVA, 2001). Na foliculogênese tônica, o crescimento folicular é regulado pelo eixo hipotalâmico-hipofisário. O hipotálamo produz e libera o GnRH de forma pulsátil, diretamente no suprimento sangüíneo da hipófise, estimulando a liberação do FSH e do LH pela adenohipófise. Estes hormônios se ligam aos seus receptores específicos nas células da granulosa e células da teca. Durante o ciclo estral, muitos folículos se desenvolvem, mas somente um é selecionado para maturar e ovular. No caso da vaca esta atividade de crescimento folicular se dá em ondas de crescimento folicular (SANTOS, 1997).

O ciclo estral é uma seqüência de eventos sucessivos que ocorrem entre estros (PINEDA, 1979) e em fêmeas zebuínas, dura em média 21 dias (VALLE et al., 1994; FIGUEIREDO, 1995; MORAES et al., 2001), com ovulação ocorrendo de 25 a 30 horas após o início do estro.

O crescimento folicular, até a fase de antro, é feito por estímulo intraovariano (foliculogênese basal). Após a formação do antro, o crescimento e maturação dependem de estímulos de gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH) liberadas em resposta ao GnRH hipotalâmico, fase esta chamada de foliculogênese tônica (KENNEDY & MILLER, 1993).

Cada onda folicular é composta por uma fase de recrutamento ou emergência, no qual um grupo de folículos primordiais e primários inicia seu crescimento. Dentre estes, um folículo é selecionado, não sofre atresia e potencialmente pode chegar a ovular (fase de seleção ou divergência). O folículo selecionado passa a exercer dominância (fase de dominância) sobre os demais folículos que sofrem atresia, suprimindo o crescimento dos mesmos e inibindo o recrutamento de um novo grupo de folículos (GINTHER et al., 1989; SIROIS & FORTUNE, 1990). Os folículos que iniciam a formação do antro expressam receptores para FSH, mas podem apresentar poucos ou nenhum receptores para LH (EYESTONE & AX, 1984). Sob ação do FSH, as células da granulosa dos folículos em crescimento, têm capacidade de aromatizar os 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. Além disso, o estrógeno estimula a liberação de GnRH pelo hipotálamo e conseqüente liberação do LH. Assim, o folículo dominante fica sob o controle do LH até seu crescimento final (CUNNINGHAM, 1993).

O mecanismo fisiológico responsável pelo processo da dominância folicular é compreendido através do “modelo duas células - dois hormônios”. Segundo esta teoria, as células da teca intersticial respondem ao LH secretando androstenediona, a qual atravessa a lâmina basal até a célula da granulosa, onde é aromatizada até estradiol 17 β , sob controle hormonal do FSH. O estrogênio sintetizado é liberado na circulação periférica e no fluido folicular, um ambiente estrogênico e essencial para o desenvolvimento dos folículos. A manutenção deste processo é básica para a seleção e dominância folicular (SILVA et al., 1997).

No modelo do mecanismo de divergência do folículo proposto por Ginther et al. (1996), a emergência das ondas foliculares é antecipada pelo FSH circulante, o qual sofre um declínio após a fase de seleção (SUNDERLAND et al., 1994).

O mecanismo de divergência está associado ao declínio de FSH a níveis basais (GINTHER et al., 1997). O aumento inicial do FSH é atribuído à ausência de substâncias inibitórias existentes no folículo dominante, que secreta hormônios que inibem o crescimento de outros folículos (GINTHER et al., 1996). Injeções de fluido folicular com inibina suprimem o FSH plasmático (TURZILLO et al., 1993), observação esta também verificada por Taya et al. (1996). Além da inibina, existem a ativina e a folistatina, proteínas gonadais que modulam a secreção de FSH, estimulando ou inibindo, respectivamente, o FSH (YING, 1988).

O folículo dominante continua a crescer e desenvolver tornando-se LH dependente, enquanto os outros folículos subordinados entram em atresia (GINTHER et al., 1996).

Na tentativa de compreender melhor os aspectos endocrinológicos que envolvem o folículo dominante e os subordinados, Badinga et al. (1992) examinaram as diferenças endócrinas e bioquímicas entre os mesmos. Neste experimento, os autores trabalharam com vacas que tinham folículo dominante removidos nos dias 5 (seleção), 8 (dominância) e 12 (atresia) do ciclo estral e avaliaram as concentrações de estradiol, progesterona e a atividade da aromatase. No fluido folicular, as concentrações de estradiol foram maiores na fase de seleção em relação às fases de dominância e atresia; os níveis de progesterona permaneceram baixos durante os dias 5, 8 e 12; e a atividade da aromatase foi maior nos folículos dominantes colhidos nos dias 5 e 8, em relação ao dia 12. Quanto aos folículos subordinados, os níveis de estradiol e atividade da aromatase permaneceram baixos nos dias 5, 8 e 12 e os níveis de progesterona

aumentaram do dia 5 até o 12. O acúmulo de progesterona no fluido folicular dos folículos subordinados contribui para atresia (LUCY et al., 1992).

A limitação de andrógenos para síntese de estrógenos no folículo dominante da primeira onda, faz com que o mesmo entre em atresia (BADINGA et al., 1992) uma vez que o LH estimula a biossíntese de andrógenos (EVANS et al., 1997).

Bao & Garveric (1998) ressaltaram que a expressão de enzimas e receptores gonadotróficos participa da esteroidogênese, e que mudanças na expressão de RNA mensageiro para receptores de gonadotrofinas (FSH e LH) estão ligados às enzimas esteroidogênicas e aos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF I e II), associados aos diferentes estádios de crescimento e atresia folicular. Os autores reportaram também, que a expressão de RNA mensageiro para receptores de gonadotrofinas, enzimas esteroidogênicas e proteínas reguladoras, aumentam o desenvolvimento folicular (BAO et al., 1998), principalmente quando o folículo atinge o tamanho máximo e diferencie em folículos atrésicos (DE LA SOTA et al., 1996). Nos folículos dominantes os níveis de IGF-I produzidas pelas células da granulosa e o IGF-II pelas células da teca, estão elevados.

Além destes, o recrutamento está associada com o início do RNA mensageiro para P450_{scc} e P450 aromatase, nas células da granulosa. A seleção do folículo dominante está associada à expressão de RNA mensageiro para receptores de LH e 5-4 isomerase nas células da granulosa (BAO & GARVERIC, 1998).

A cada ciclo estral, com a regressão luteal ocorre o desenvolvimento, maturação e ovulação de um folículo, criando uma nova oportunidade de concepção (PATE, 1994). O corpo lúteo (CL) é controlado por inúmeros componentes biológicos, os quais promovem a luteinização das células da granulosa e conseqüente formação do CL. Ocorrendo fertilização o CL se mantém durante a prenhez, ao contrário, o mesmo sofre regressão morfológica e funcional. Este processo, chamado luteólise, é caracterizado por uma cessação da produção de progesterona (P₄) e colapso dos componentes celulares do CL, incluindo redução do suplemento vascular, proliferação de tecidos conectivos, aumento na desorganização celular, degeneração e fagocitose das células luteais (MILVAE et al., 1996).

A prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), secretada pelo endométrio uterino, é conhecida como a principal luteolisina endógena dos ruminantes domésticos (MCCRACKEN & SCHRAM, 1986). Esta, chega até o CL por um mecanismo de contracorrente veno-arterial (GINTHER et al., 1974), sendo que o sinal hormonal que leva à liberação de PGF_{2α} em quantidades luteolíticas é do estradiol proveniente dos folículos ovarianos (FERNANDES, 1998), o qual age estimulando a

síntese de receptores para ocitocina no endométrio uterino. A ocitocina proveniente do CL ou da neurohipófise, estimula a secreção de $\text{PGF}_{2\alpha}$, a qual promove a regressão do corpo lúteo (MCCRACKEN et al., 1984) mantendo assim a ciclicidade ovariana.

2.2 Transferências de Embriões (TE)

A principal meta do programa da TE é a superovulação, para obtenção de um maior número de embriões viáveis por doadora, decorrente ao aumento do número de ovulações após administração de hormônios exógenos e posterior transferência dos embriões para o trato reprodutivo de receptoras, para completarem a gestação (RUMPF et al., 2000).

O crescimento folicular pode ser sincronizado com diferentes hormônios tal como progesterona, estradiol, e combinação de progesterona e GnRH. O emprego de progesterona ou progestágenos em doses elevadas pode suprimir o suporte de LH para o folículo dominante, induzindo assim atresia (THATCHER et al., 2001).

O tratamento superestimulatório com gonadotrofinas continua sendo um dos maiores problemas nos programas comerciais de TE (BARROS & NOGUEIRA, 2004). A variação individual ao tratamento superovulatório em vacas Nelore *Bos taurus indicus*, tem sido relatada por grupos de pesquisas (BARUSELLI et al., 2003; BÓ et al., 2004;).

2.2.1 Superovulação

Bó et al. (1995) observaram que o protocolo convencional de superestimulação ovariana no diestro foi baseado originalmente em informações experimentais nas quais se verificou maior resposta superovulatória quando o tratamento foi iniciado 8 a 12 dias após o estro, o que, naturalmente, viria coincidir com início da segunda onda folicular.

Uma alternativa para controlar a dinâmica folicular, é a ablação folicular transvaginal, guiada por ultra-sonografia (BERGFELT et al., 1997). Os autores mostraram que a aspiração folicular, guiada por ultra-sonografia, de todos os folículos maiores ou iguais a 5 mm, é uma alternativa eficiente, mas ainda pouco usada para sincronizar a emergência folicular.

A sincronização do início da onda folicular pode ser obtida com a administração de GnRH ou LH. No entanto, foi registrado uma assincronia na emergência folicular de 3 dias antes a 5 dias depois, sugerindo que este protocolo não seria apropriado para a superestimulação ovariana (MARTINEZ et al., 1999).

Outro método hormonal usado para controlar o desenvolvimento folicular é a combinação de estrógenos com progestágenos, que consiste em induzir a atresia de folículos antrais

presentes, fazendo com que ocorra uma emergência folicular 4,3 dias após o tratamento (BÓ et al., 1995).

O benzoato de estradiol (BE) é o estrógeno mais utilizado em protocolos de sincronização de estros. Meyer et al. (2000) observaram, em tratamento com 2,5mg de BE, associado à aplicação de 50 mg de P₄, administrados no momento da inserção do implante vaginal (CIDR-B), sincronia de uma nova onda folicular 2 a 3 dias após, resultados semelhantes aos verificados quando as fêmeas foram superestimuladas convencionalmente, entre os dias 8 e 12 do ciclo estral.

Zanenga et al. (2000), ao estudarem a superovulação em vacas zebuínas, inseminados sem detecção de cio, associando progestágeno e estrógeno, sugeriram que a IA, 12 a 24 horas após a aplicação de PGF2 α , é viável para programas de TE.

Bó et al. (2001) sugeriram a sincronização da emergência da onda folicular, aplicando 5mg de E-17 β e 100 mg de progesterona, intra muscular, no momento da aplicação do implante de progesterona, com a superovulação iniciada quatro dias depois com FSH. Os autores concluíram que a resposta superovulatória do grupo E-17 β + P₄ foi similar ao tratamento convencional, além do que, apresenta a vantagem de iniciar o tratamento em dia aleatório do ciclo estral, melhorando a sincronização do grupo de doadoras, facilitando o manejo e permitindo a realização dos tratamentos em dias previamente programados (BÓ et al., 2001).

2.2.1.1 Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

Na superovulação de bovinos, utilizando o FSH, os resultados têm sido satisfatórios, especialmente em termos de embriões transferíveis. Em relação às concentrações de FSH e LH, comumente usada para estimular a resposta ovulatória, Callesen et al. (1986) encontraram melhores resultados em preparações com baixa concentração de LH.

O FSH é essencial no desenvolvimento dos folículos (MONNEAUX et al., 1983). Estes se desenvolvem em um padrão de ondas de crescimento onde cada onda é caracterizada pela emergência de um folículo dominante, entre todos que estão em crescimento. As ondas de crescimento folicular são precedidas por aumento recorrente na secreção do FSH (SUNDERLAND et al., 1996), que fornece o estímulo inicial para o recrutamento dos folículos e início do desenvolvimento (TURZILLO & FORTUNE, 1990).

O protocolo de aplicação do FSH representa um problema do ponto de vista prático, pelo número de aplicações e doses necessárias utilizadas em programas de TE. Segundo Moor et al. (1984), a administração do FSH para estimular a superovulação deve ser feita durante 4 a 5 dias,

em intervalos de 12 horas. Demoustier et al. (1988) relataram que a concentração plasmática de FSH aumenta imediatamente após sua administração (intramuscular), atingindo a concentração máxima às 3 horas e diminuindo gradualmente até não ser mais detectada às 12 horas. Este fato, deve-se à meia vida curta do hormônio, levando a necessidade de múltiplas aplicações nos protocolos de superovulatórios.

Tentando contornar o problema, a administração de FSH em dose única, foi sugerida por Bó et al. (1990). Segundo os autores, a administração de 400 mg de FSH (Folltropin®) por via subcutânea, diluído em 20 mL, promoveu uma resposta superovulatória semelhante ao grupo controle, superestimulado pelo método tradicional. Diferentemente, Purwantara et al. (1994), sugeriram administração de uma dose diária, durante quatro dias de superestimulação, mas este modelo não teve aceitação na prática, devido a meia vida do FSH que é de 12 a 14 horas.

Doses elevadas de FSH mostraram diminuição no número de embriões coletados e transferíveis (LERNER et al., 1986). Santiago et al. (2002), citam que diminuição no número de estruturas recuperadas, com o aumento da dose de FSH, em vacas, pode ser atribuída à superestimulação dos ovários. Quando vários folículos são estimulados, limitações físicas dentro do ovário, como suprimento sanguíneo, quebra dos mecanismos endócrinos normais e produção excessiva de esteróides ovarianos, podem interferir no desenvolvimento folicular ou ovulação. Altas doses de FSH, podem estimular o desenvolvimento de maior número de folículos, mas poucos seriam capazes de ovular e sofrer luteinização ou tornar-se atrésicos.

Baruselli et al. (2003) avaliaram a resposta superovulatória de vacas Nelore sob diferentes doses de FSH (Folltropin-V): com 100, 133, ou 200mg, com inseminação artificial em tempo fixo. Foi empregado o delineamento experimental “*cross-over*” para evitar o efeito individual na resposta aos tratamentos. A produção de embriões transferíveis foi semelhante para os grupos, indicando que não existem diferenças na resposta superovulatória, no número de embriões transferíveis e congeláveis após o emprego de reduzidas doses de FSH.

Neste sentido, Bó et al. (2004) citam que a administração de FSH durante o período de níveis basais de FSH, pode levar a crescimento de pequenos folículos anterior ao dia esperado da emergência da nova onda de crescimento folicular (os efeitos da supressão pelo folículo dominante são diminuídos pelo FSH). Entretanto, maiores doses de FSH exógeno em esquemas superovulatórios convencionais podem suprimir o ritmo endógeno e mascarar o efeito da onda na resposta ovariana. No entanto, o recrutamento dessincronizado pode resultar em maior variabilidade na resposta folicular e na qualidade dos embriões colhidos (NIGRO et al., 2002). Martins et al. (2006) avaliaram diferentes doses de FSH ovino (Ovagen®), adotando o

delineamento experimental *cross-over* e dividindo as doadoras em três grupos: 4,5; 6,0 e 9,0 mg de FSH. Os resultados indicaram que, a dose de 4,5 mg de FSH proporcionou menor resposta superovulatória e produção de embriões transferíveis. Apesar dos tratamentos com 6mg e 9mg não apresentarem diferenças estatisticamente significativas quanto à produção embrionária, foi verificado menor resposta superovulatória no grupo tratado com 6mg. Não foi confirmada a hipótese inicial que reduzindo a dose de FSH melhoraria o tratamento superovulatório, em doadoras Nelore.

Diante dessa variedade de respostas superovulatórias, alguns autores vêm sugerindo o uso da somatotropina recombinante bovina (rbST), para melhorar a resposta superovulatória e a viabilidade embrionária em vacas doadoras (MOREIRA et al., 2001; THATCHER et al., 2001)

2.2.1.2 Hormônio do Crescimento (GH)

O GH ou Somatotropina (ST) é um hormônio da hipófise que tem função no crescimento e metabolismo animal (ETHERTON & BAUMAN, 1998). É um polipeptídeo com 191 resíduos e PM 21000, sendo obtido artificialmente pela abordagem do DNA recombinante originando a somatotropina recombinante bovina (rbST) (LEHNINGER, 1991).

Além de ações no crescimento e na nutrição dos animais, a ST tem função reprodutiva, pois uma variedades de receptores mRNA da ST foram encontrados no hipotálamo, hipófise, corpos lúteo, folículos ovarianos, ovidutos, endométrio, miométrio e a placenta (KIRBY et al., 1996). No animal, o órgão com maior concentração de receptores para ST 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 & BAUMAN, 1998). Estas mudanças aumentam a síntese e secreção do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) assim como a proteína de carreadora do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFBP-3) (JONES & CLEMMONS, 1995). O IGF-I estimula o crescimento e o desenvolvimento dentro de varias células (JONES & CLEMMONS, 1995). O IGF-II é similar a IGF-I na estrutura e na função, mas tem baixa potência, e a ST não controla sua secreção (VICINI et al., 1991). O efeito da ST no crescimento e na reprodução é pela liberação de IGF-I do fígado (JONES & CLEMMONS, 1995), uma vez que liberado pelo fígado, o IGF-I, via circulação sanguínea atua nos tecidos reprodutivo (SPICER et al., 1995; ARMSTRONG & WEBB, 1997).

2.2.1.2.1 Sistema Ovariano do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF- I e IGF- II)

O receptor da ST é controlado por diversos genes que fazem a transcrição nas células. Foram relatados dois receptores da ST que faz a transcrição para dentro do ovário, P2 e P3 (HEAP et al., 1996). Estes receptores transcrevem aos receptores 1B e 1C mRNA da ST, respectivamente (JIANG et al., 1999). Os resultados *in vitro* indicam efeitos diretos da ST nos oócitos e na granulosa. No humano e no porco, a ST causou a síntese de IGF-I no ovário (BARRECA et al., 1993). A síntese ovariana de IGF-I é importante para o crescimento folicular ovariano (YAKAR et al., 1999).

O estágio de desenvolvimento do folículo depende da espécie animal, tendo diferenças no sistema ovariano de IGF. As células ovarianas sintetizam e secretam o IGF-I, sendo que granulosa sintetiza IGF-I e o teca sintetiza o IGF-II (PERKS et al., 1999). Ações importantes do IGF ovariano são observadas quando agem em sinergismo com as gonadotrofinas FSH ou LH, auxiliando na mitogênese e o esteroidogênese (GUTIERREZ et al., 1997). Esse sinergismo do IGF ovariano aumenta o número de receptores para as gonadotrofinas (ADASHI, 1998). Ao mesmo tempo, as gonadotrofinas aumentam o número dos receptores e a síntese de IGF-I nas células da granulosa (SPICER et al., 1995). Conseqüentemente, a quantidade de mRNA do IGF-I determina a quantidade de receptores de FSH. A síntese e secreção do IGF-I e IGF-II do ovário, promove degradação do IGFBP (ADASHI, 1998; BESNARD et al., 1997). Entretanto, a resposta do ovário ao IGF-I e IGF-II depende da quantidade de IGFBP no líquido folicular, pois altos níveis desta proteína inibiram o IGF-I e IGF-II no líquido folicular (DE LA SOTA et al., 1996).

A quantidade de IGFBP no líquido folicular depende da qualidade do folículo. Folículos atresícos têm altas concentrações de IGFBP (STEWART et al., 1996) que impedem a atuação do IGF-I nos seus receptores posicionados dentro da granulosa, afetando o crescimento e diferenciação dos folículos que entram em atresia. O IGFBP age diretamente no crescimento das células ovarianas (RECHLER, 1997). O IGF-I e a IGFBP parecem exercer papel fundamental na dominância folicular, durante o desenvolvimento dos folículos, já que as concentrações de IGF-I no fluido folicular aumentam, enquanto que as concentrações de IGFBP-2 diminuem, durante o estabelecimento da dominância (FORTUNE et al., 2001; GINTHER et al., 2002). Há uma síntese local de IGFBP-2 e IGFBP-4 na granulosa e teca, respectivamente, dos folículos de bovinos (ARMSTRONG et al., 1998). A proteína IGFBP é degradada pelas proteases, mantendo a concentração baixa no líquido folicular dos folículos dominantes (BESNARD et al., 1997). A concentração baixa de IGFBP permite maior ação de IGF-I nos folículos dominantes. Quando

testado in vitro, IGFBP-3 inibiu os efeitos estimulatórios de IGF-I na granulosa. Conseqüentemente, IGFBP diminuído, pode conduzir à maior ação de IGF (SPICER & CHAMBERLAIN, 1999).

2.2.1.2.2 Somatotropina recombinante bovina (rbST)

A rbST foi um dos primeiros fatores de crescimento produzidos em grande escala para a indústria animal, visando aumentar a produção de leite (BAUMAN, 1992). Este hormônio está ligado ao crescimento (GLUCKMAN et al., 1987) e regulação de processos fisiológicos e metabólicos dos animais por meio da síntese de IGF-I e proteínas transportadoras (IGFPB), que são seus mediadores hormonais nos processos metabólicos (LUCY, 1996).

A associação de rbST e FSH em protocolos de superovulação, têm apresentado não só aumento na população de folículos antrais, como também melhora da maturação oocitária e aumento de embriões transferíveis (GONG et al., 1996; HERRLER et al., 1994). Essa melhora da maturação oocitária e aumento de embriões transferíveis também foram observados por Gong et al. (1993) quando a rbST foi associado ao eCG.

Um dos primeiros relatos da utilização de rbST em vacas superovuladas foram realizados por Gong et al. (1991) onde observaram aumento na população de folículos, mediado por aumento das concentrações de IGF-I e insulina circulante (GONG et al., 1993). Em novilhas, o rbST aumenta o número de folículos menores que 5 mm (GONG et al., 1997; HWANG et al., 1997), e em vacas, aumenta o número de folículos médios (6 a 9 mm), sugerindo que a população folicular é alvo do tratamento com rbST, podendo variar em função da raça e condições metabólicas relacionadas à lactação (LUCY et al., 1993; DE LA SOTA et al., 1993; KIRBY et al., 1997).

A rbST persiste circulando por até três semanas após a aplicação (CUSHMANN et al., 2001) e, segundo Lucy et al. (2000), a maior influência da rbST na reprodução é feita de modo indireto, através do IGF-I.

A administração de rbST em animais duplica os níveis de IGF-I sanguíneo (BAUMAN, 1999). Vários pesquisadores reportaram que o rbST, o FSH e os estrógenos estimulam a expressão de IGF-I nas células da granulosa (MONGET e MONNIAUX, 1995; BLEY et al., 1997; ATHANASSIOUS, 2000).

Na tentativa de registrar a influência do rbST nas superovulações, Moreira et al. (2001), aplicou a rbST em doadoras, no momento da inseminação, mas não constataram diferença significativa no número e viabilidade dos embriões colhidos entre o grupo rbST e o grupo

controle; o número de ovócitos não fertilizados por colheita, foi menor no grupo rbST. O tratamento com rbST aumentou a percentagem de embriões classificados como transferíveis, assim como o número de blastocistos.

Segundo THATCHER et al. (2001), os efeitos que são atribuídos ao rbST são, basicamente, aceleração do desenvolvimento embrionário e modulação dos fatores de crescimento das proteínas do útero e oviduto.

2.2.2 – Qualidade Embrionária

Outras vantagens em se utilizar o rbST em superovulações, associada ao FSH, são melhorar no desenvolvimento e qualidade embrionária (GONG et al., 1996; MOREIRA et al., 2002).

Alguns autores têm estudado a possibilidade de melhorar a resposta superovulatória de fêmeas bovinas com a aplicação de rbST, pelo recrutamento de folículos no início da onda folicular, aumentando o número de folículos ovulatórios e, conseqüentemente, o número de ovulações e embriões viáveis (GONG et al. 1993; GONG et al., 1996; MOREIRA et al., 2002).

Rieger et al. (1991) observaram que o rbST, não modificou o resultado do grupo tratado em relação ao grupo controle, nas variáveis total de estruturas ($8.3 \pm 5.3 \times 7.2 \pm 6.6$) e embriões transferíveis ($5.3 \pm 4.0 \times 5.2 \pm 4.5$). O tratamento com rbST aumentou as concentrações de progesterona, condição também observados por Herrier et al. (1992) quando, em vacas, observaram maior número de embriões transferíveis no grupo do rbST em relação ao controle ($4.2 \pm 1.0 \times 2.5 \pm 0.7$). Além do maior número de embriões viáveis, Kuehner et al. (1993) relataram que o rbST aumentou o número dos corpos lúteo (18.1×13.4) e de embriões transferíveis ($74.6 \times 58.6\%$), em relação ao grupo controle.

Deaver & Bryan (1999) não observaram influência do rbST no número de folículos médios, fato este contestado por Buratini et al. (2000) que observaram aumento na população de folículos pequenos, ao administraram 320 mg de rbST, via subcutânea, em vacas, após ablação do folículo dominante.

Efeitos positivos decorrentes da utilização do rbST antes do tratamento superovulatório, com aumento do recrutamento folicular, número de ovulações, embriões recuperados e do número de embriões transferíveis tem sido relatados por vários autores (HERRLER et al., 1992; GRAY et al., 1993).

Maffili et al. (2001), relataram que o uso da rbST em conjunto com a superovulação não aumentou a quantidade de embriões produzidos, mas melhora o desenvolvimento e a qualidade

embrionária. Fato este, não verificado por Borges et al. (2001), onde o efeito do pré-tratamento com aplicação de 500mg de rbST, no terceiro dia o ciclo estral, não modificou a resposta superovulatória.

O aumento na produção de embriões transferíveis foram também relatados por, Nagano et al. (2004) ao avaliaram a ação de 500mg rbST aplicados no dia zero do tratamento superovulatório com FSH. Foi observado aumento no total de estruturas recuperadas e embriões viáveis, mas não influenciou o número de embriões degenerados e não fertilizados. Neste experimento a rbST afetou ($p < 0,05$) o desenvolvimento embrionário com aumento na proporção de mórulas e blastocistos, e diminuição dos blastocistos iniciais. 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 de rbST e tratadas com 500mg de rbST, no sexto dia do ciclo estral. No décimo dia após o estro, as doadoras foram superovuladas com 360mg de FSH em doses decrescentes, duas vezes ao dia, com intervalos de 12 horas. Os autores constataram que tanto a administração de 250 como de 500mg de rbST aumentaram o percentual de embriões viáveis.

3. CAPITULO 1

Efeito da Somatotropina Recombinante Bovina (rbST) na Resposta Ovulatória e na Qualidade dos Embriões de Vacas da Raça Nelore

Felipe de Jesus Moraes Junior¹, José Ribamar de Souza Torres Junior², Rômulo José Vieira³, José Adalmir Torres de Souza³

¹Doutorando em Ciência Animal/UFPI. Bolsista da FAPEMA

²Universidade Federal Rural da Amazônia, UDP-UFRA, Parauapebas-PA. ³Laboratório de Reprodução Animal – UFPI, Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Ininga, 64049 550, Teresina – PI, Brasil.
fmoraesjr@hotmail.com.

RESUMO – o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da rbST na produção *in vivo* de embriões de vacas da raça Nelore. Foram utilizadas oito doadoras, todas superovuladas com FSH, sendo que a metade o FSH foi associado à rbST. As superovulações foram realizadas em duas etapas, uma em julho e outra em outubro de 2007. Na primeira etapa, quatro animais (G1) receberam apenas FSH e quatro (G2) receberam além do FSH, 250mg de rbST, por via intramuscular, no dia denominado D0, dia do implante de progestágeno. Na segunda etapa, no sistema *cross-over*, os animais que receberam apenas FSH, receberam 250 mg rbST. As superovulações foram iniciadas no D4, com 133mg de FSH, aplicadas em quatro dias consecutivos, com doses decrescentes, a intervalo de 12 horas. Os implantes foram retirados em D7 após aplicação de duas doses de PGF em D6. No D8 foram aplicadas 200 µg de um análogo do GnRH e as inseminações realizadas 12 e 24 horas após aplicação do GnRH. As colheitas foram realizadas no sétimo dia após a primeira inseminação. A resposta superovulatória (presença de corpos lúteos), total de estruturas, estádios de desenvolvimento e qualidade dos embriões recuperados não foram afetados ($p>0,05$) pelo tratamento com a rbST. As médias obtidas nos tratamento G1 e G2 foram, respectivamente: estruturas colhidas, $9,5\pm 3,0$ e $7,6\pm 2,2$; embriões viáveis, $8,1\pm 2,6$ e $5,0\pm 1,6$; estruturas não fertilizadas, $0,3\pm 0,2$ e $0,5\pm 0,3$; estruturas degenerados, $1,0\pm 0,5$ e $0,5\pm 0,3$; mórulas, $0,5\pm 0,2$ e $2,3\pm 1,9$; blastocistos iniciais, $2,2\pm 2,1$ e

1,3±0,9; blastocistos, 4,7±1,6 e 2,5±0,5; blastocistos expandidos, 0,6±0,3 e 0,5±0,5; embriões grau I, 7,3±2,5 e 5,0±0,8 ; embriões grau II, 0,5±0,3 e 1,1±0,5 e embriões grau III, 0,2±0,1 e 0,5±0,5.

Palavras-chave: embrião, FSH, GH

Effect of the Bovine Recombinant Somatotropina (rbST) in the Ovulatória Reply and the Quality of the Embryos of Cows of the Nelore Race

ABSTRACT - The present work had as objective to evaluate the effect of rbST in the alive production in of embryos of cows of the Nelore race. Eight givers, all superovulated with FSH had been used, being that the half the FSH was associated with rbST. The superovulation had been carried through in two stages, one in July and another one in October of 2007. In the first stage, four animals (G1) had received only FSH and four (G2) had received beyond the FSH, 250mg of rbST, for saw to intramuscular, in the called day D0, day of the implantation of progestágeno. In the second stage, in the system to cross-over, the animals that had received only FSH, they had received 250 mg rbST. The superovulation had been initiated in the D4, with 133mg of FSH, applied in four days consecutive, with decreasing doses, the interval of 12 hours. The implantations had been removed in D7 after application of two doses of PGF in D6. In the D8 200 had been applied µg of analogous of the GnRH and carried through inseminations 12 and 24 hours after application of the GnRH. The harvests had been carried through in the seventh day after the first insemination. The superovulated reply (presence of Corpora lútea), total of structures, stadiums of development and quality of the recouped embryos had not been affected ($p > 0,05$) for the treatment with rbST. The averages gotten in the treatment G1 and G2 had been, respectively: Recovered structures, 9,5±3,0 and 7,6±2,2; viable embryos, 8,1±2,6 and 5,0±1,6; not fertilized, 0,3±0,2 and 0,5±0,3; Degenerated, 1,0±0,5 and 0,5±0,3; morulae, 0,5±0,2 and 2,3±1,9; early blastocysts, 2,2±2,1 and 1,3±0,9; blastocysts, 4,7±1,6 and 2,5±0,5; expanded

blastocysts, $0,6\pm0,3$ and $0,5\pm0,5$; embryos degree I, $7,3\pm2,5$ and $5,0\pm0,8$; embryos degree II, $0,5\pm0,3$ and $1,1\pm0,5$ and embryos degree III, $0,2\pm0,1$ and $0,5\pm0,5$.

INTRODUÇÃO

O maior entrave dos programas de Transferência de Embriões (TE) continua sendo o elevado custo e a variabilidade da resposta ao tratamento superovulatório entre as doadoras. Apesar do intenso número de pesquisas desenvolvidas em diversos países ainda não existe um protocolo capaz de contornar este problema. Alguns protocolos que sincronizam o desenvolvimento da onda folicular têm se revelado úteis por facilitarem o manejo das doadoras e produzirem o mesmo número de embriões dos tratamentos tradicionais utilizados (Nagano et al., 2004).

A utilização da somatotropina recombinante bovina (rbST), em doadoras, no início do ciclo estral, tem sido pesquisada com o objetivo de aumentar a população de folículos recrutados e, conseqüentemente, melhorar a resposta superovulatória (Gong et al., 1996).

Os principais hormônios utilizados para superovular fêmeas são o hormônio folículo-estimulante (FSH) e a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e quando associados à rbST têm a capacidade de aumentar o número de folículos recrutados e embriões viáveis (Gong et al., 1993; Gong et al., 1996).

A rbST foi um dos primeiros fatores de crescimento produzidos em escala comercial como proteína recombinante (Bauman, 1999). A maior quantidade de receptores para a rbST é encontrada no fígado, que é responsável pela produção do fator de crescimento semelhante à insulina, o IGF-I. Entretanto, a maioria dos outros tecidos também responde à rbST. Sobre o sistema reprodutor, esse hormônio atua sobre os receptores do útero e ovário induzindo-os à produção de IGF-I (Lucy, 2000).

Moreira et al. (2002) observaram que a rbST diminuiu o número de estruturas não fertilizadas, melhorou a taxa de sobrevivência embrionária e acelerou o desenvolvimento embrionário.

Por sua vez Nagano et al. (2004), observaram que 500 mg de rbST aplicados no dia zero do protocolo de FSH, em vacas, aumentaram o número total de embriões, de ovócito e de embriões viáveis.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a rbST na produção *in vivo* de embriões de vacas raça Nelore.

MATERIAL E MÉTODOS

Local e Animais Experimentais

O trabalho foi desenvolvido na fazenda Canarana, localizada no município de Vitória do Mearim, estado do Maranhão, que tem as coordenadas geográficas Latitude (S) 03° 27' 44" e Longitude (W) 44° 52' 14". O clima da região é quente e úmido, com períodos de chuvas que se estendem de dezembro a junho, temperatura variando de 22 a 35°C e precipitação pluviométrica média anual de 1404 mm (Geoprocessamento, UEMA, 2004). O experimento foi realizado nos meses de julho e outubro de 2007.

Foram utilizadas oito vacas puras de origens (PO) da raça Nelore, não lactantes, com escore da condição corporal variando de 3,0 a 3,5, em escala de 1 a 5, onde 1 corresponde ao animal muito magro e 5 ao muito gordo (Dirksen et al., 1993). Os animais foram previamente examinados no intuito de eliminar fêmeas com problemas clínico-ginecológicas e mantidas em pastagem de *Brachiaria brizanta*, sem suplementação, com água e sal mineral à vontade.

Protocolo de Superovulação

Todas as doadoras receberam dois implante auriculares com 6mg de Norgestomet (Crestar®, Intervet, Boxmeer, Holanda) e 2 mg de Benzoato de Estradiol (RIC-BE®, Syntex,

Buenos Aires, Argentina) associados a 250 mg de rbST (Boostin®, Schering-Plough Saúde Animal Indústria e Comércio Ltda.) em um dia aleatório do ciclo estral, denominado de dia zero (D0).

As superovulações foram realizadas com 133 mg do FSH (Folltropin®; Bioniche Canadá Inc., Ontário, Canadá) divididas em oito doses decrescente, aplicadas duas vezes ao dia, por quatro dias consecutivos. Na 5ª e 6ª administração de FSH as doadoras receberam 150 µg de D-Cloprostenol (Prolise®, Syntex, Buenos Aires, Argentina) e na 8ª aplicação foi retirado o implante auricular. No D8 foram administrados 200 µg de um análogo do GnRH (Fertagyl®, Intervet, Boxmeer, Holanda). A inseminação artificial, realizada com sêmen de uma única partida de um touro, foi efetivada 12 e 24 horas após aplicação do GnRH. Dois tratamentos, um com rbST e outro sem rbST foram definidos e estão apresentados nas figuras 1 e 2.

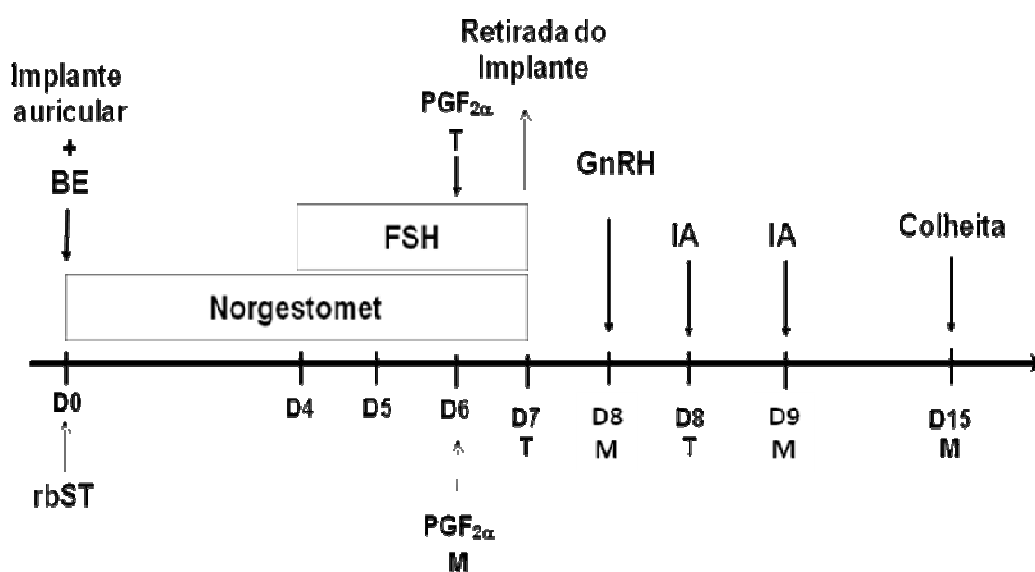


Figura 1. Protocolo de superovulação com FSH e rbST

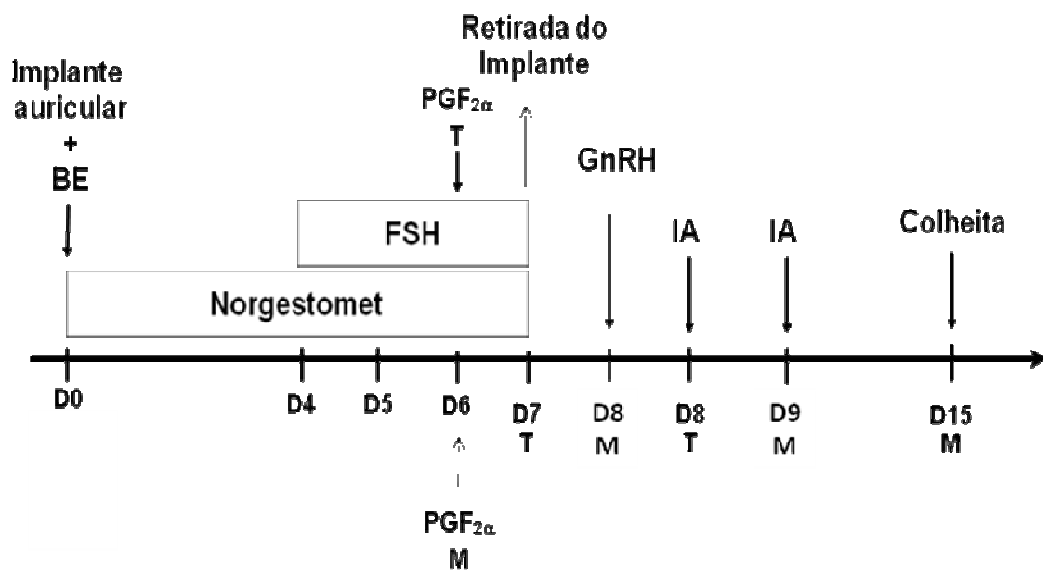


Figura 2. Protocolo de superovulação com FSH e sem rbST

Avaliação Ultra-sonográfica e Colheita de Embriões

No D15 do programa, após a contenção dos animais, os corpos lúteo foram quantificados através de ultra-sonografia, utilizando um aparelho Pie Medical, munido de um transdutor linear de 6/8 MHz. A seguir, foram feitas a anestesia epidural e higiene da região perineal, procedendo-se então a colheita das estruturas. Utilizou-se um cateter de duas vias com um balão em sua extremidade (sonda de Foley, nº 20) sendo este inflado após passagem pela cérvix e posicionado no corno uterino, vedando a passagem entre este e o corpo uterino, impedindo o refluxo de líquidos. O meio utilizado para lavagem foi o PBS (Phosphate Buffer Solution) aquecido a 37°C, utilizando cerca de 500 mL para lavagem de cada corno uterino. O líquido recolhido foi passado em filtro apropriado, onde ficaram retidos as estruturas em cerca de 50 ml do meio. Repetido o processo no outro corno uterino, o conteúdo foi colocado em uma placa de Petri, para identificação e captura estruturas, com um auxílio de uma lupa estereoscópica sob aumento de 40X. As estruturas capturadas foram colocadas em outra placa de Petri com meio de

manipulação (HOLDING Embriocare) e em seguida foram avaliados e classificados segundo as normas da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

Após a avaliação, os embriões (mórulas e blastocistos) de graus I e II, foram colocados em outra placa contendo meio de congelação (etilenoglicol), onde permaneceram por 10 minutos. A seguir, foram envasados em palhetas de 0,25 mL contendo cinco colunas, duas de PBS nas extremidades e três mais internas de etilenoglicol, sendo que a coluna central contendo o embrião. As palhetas, após vedadas com lacradores plásticos e identificadas, foram congelados utilizando-se uma máquina modelo TK 3000®.

Delineamento Experimental

O delineamento foi inteiramente ao acaso, com dois tratamentos (com rbST e sem rbST) e oito repetições (número de doadoras do experimento), no sistema *cross-over*. O intervalo entre os tratamentos foi de 90 dias (primeira etapa em julho e a segunda etapa em outubro).

Análise Estatística

Os dados foram analisados no programa SAS – “*Statistical analysis System*” (SAS, 1997). Para obtenção de médias e desvios-padrão para todas as variáveis estudadas (total de estruturas, embriões viáveis, estruturas não fertilizadas, degeneradas, estádios de desenvolvimento e qualidade embrionária). Foi utilizado o teste não-paramétrico Wilcoxon, com probabilidade de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 16 superovulações realizadas, 14 (87,5%) responderam três ou mais ovulações ao tratamento com FSH. Estes dados foram similares aos encontrados por Borges et al. (2001), onde cerca de 88,5% dos animais (n=23) responderam ao tratamento com FSH. Como pode ser

verificado na tabela 1, as médias das variáveis estudadas não obtiveram diferenças ($p>0,05$) de corpo lúteos entre os dois grupos estudados, com rbST ($11,1\pm 1,9$) e sem rbST ($13,7\pm 3,9$).

Tabela 1 - Médias e erros padrão dos corpos lúteos e estruturas recuperados de vacas da raça

Nelore, superovuladas com FSH, associado ou não à rbST.

Averages and errors standard of the corporas lutea and recovered structures of cows of the Nelore breed, superovulated with FSH, associate or not to rbST.

Variáveis <i>Variables</i>	FSH	
	Com rbST	Sem rbST
Corpos lúteos <i>Corpora lútea</i>	$11,1\pm 1,9^a$	$13,7\pm 3,9^a$
Estruturas recuperadas <i>Recovered structures</i>	$9,5\pm 3,0^a$	$7,6\pm 2,2^a$
Embriões viáveis <i>Viable embryos</i>	$8,1\pm 2,6^a$	$5,0\pm 1,6^a$
Não fertilizados <i>No fertilized</i>	$0,3\pm 0,2^a$	$0,5\pm 0,3^a$
Degenerados <i>Degenerated</i>	$1,0\pm 0,5^a$	$0,5\pm 0,3^a$

^a Não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P>0,05$; teste de Wilcoxon)

O número dos corpos lúteos diagnosticados, nos dois tratamentos ($11,1\pm 1,9$ e $13,7\pm 3,9$), diferem dos encontrados por Kuehner et al. (1993) onde o grupo tratado com 500mg de rbST foi maior em relação ao grupo controle ($18,1 \times 13,4$; $p<0,05$). Em novilhas a utilização da rbST,

não só incrementou o desenvolvimento inicial do corpo lúteo, como também antecipou a segunda onda folicular, demonstrando, a função que a rbST exerce sobre os ovários, modulando a dinâmica folicular (Lucy et al., 1994). Lucy et al. (2000) relatam que a rbST age no corpo lúteo, devido a presença de receptores para somatotropina. Este fato não foi verificado no presente trabalho, pois todas as doadoras passaram pelos dois tratamentos, onde o grupo sem rbST apresentou maior número de corpos lúteos em relação ao grupo com rbST, indicando pouca presença de receptores nos ovários. Essa variação, segundo alguns autores (Lucy et al., 1993, De La Sota et al., 1993; Kirby et al., 1997) é influenciada pela raça.

As médias das estruturas totais colhidas ($9,5 \pm 3,0$ e $7,6 \pm 2,2$) e dos embriões viáveis ($8,1 \pm 2,6$ e $5,0 \pm 1,6$) nos tratamentos com rbST e sem rbST, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$). As médias relatadas no presente estudo foram também observado por Cushman et al. (2001) que obtiveram um total de $7,9 \pm 1,3$ estruturas colhidas e $6,1 \pm 1,3$ embriões transferíveis. A rbST não influenciou positivamente no grupo tratado ($p > 0,05$), diferindo de pesquisas realizadas por outros autores (Gong et al. 1993; Gong et al., 1996; Moreira et al., 2002) onde a rbST influenciou positivamente no recrutamento dos folículos, no aumento do número de folículos ovulatórios e, conseqüentemente, no de embriões viáveis. Resultados semelhantes também foram relatados por Neves et al. (2005) em três grupos experimentais: controle, com 250mg e com 500mg de rbST. O número de estruturas recuperadas pelos autores foi $8,47 \pm 5,60$; $9,36 \pm 8,37$ e $8,86 \pm 6,88$ e de embriões viáveis $3,33 \pm 2,61$; $5,91 \pm 9,31$ e $4,79 \pm 5,79$, respectivamente. Segundo ainda esses autores, a utilização do rbST antes do início da superovulação não aumentou ($p > 0,05$) as médias das estruturas colhidas e embriões viáveis dos grupos tratados.

Segundo Gong et al. (1996) o aumento do número de embriões colhidos após tratamento com FSH deve-se ao aumento do número de pequenos folículos nos ovários induzido pelo tratamento com rbST, onde a produção de embriões após superovulação é diretamente

proporcional ao número de pequenos folículos, com 3-6 mm de diâmetro, presente nos ovários ao início do tratamento. Nagano et al. (2004), observam diferenças significativas entre os grupos tratados e controles para as variáveis estruturas totais ($10,25 \pm 2,5$; $7,125 \pm 3,2$) e embriões viáveis ($8,4 \pm 2,0$; $5,5 \pm 2,4$), diferindo dos relatados por Borges et al. (2001), onde as médias das estruturas totais $15,3 \pm 9,5$ e $17,4 \pm 10,9$ e embriões viáveis $8,5 \pm 8,3$ e $11 \pm 10,0$ foram menores em animais tratados com relação ou controle.

Um fator que pode ter contribuído para a não influência da rbST ($p > 0,05$) sobre as estruturas colhidas e embriões viáveis, foi a dose utilizada, pois, segundo Rieger et al. (1991), para conseguir estimular os ovários são necessárias doses maiores que 500 mg de rbST. A raça é outro fator que também pode influenciar nos resultados (Hazier et al., 1983; Segerson et al., 1984; Breuel et al., 1991).

Neste experimento não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre embriões degenerados e não fertilizados para os tratamentos com rbST ($0,3 \pm 0,2$ e $0,5 \pm 0,3$) e sem rbST ($1,0 \pm 0,5$ e $0,5 \pm 0,3$), corroborando com os dados de Nagano et al (2004) e contrapondo-se aos resultados de Moreira et al. (2002), que atribuíram à rbST o aumento da taxa de fertilização e melhoria na qualidade dos embriões. O fato é que a rbST não influenciou ($p > 0,05$) nas médias dos embriões degenerados e não fertilizados. Lucy et al. (1995), atribuem os efeitos diretos e indiretos a este hormônio, pois a rbST aumenta as concentrações IGF-I, podendo melhorar a qualidade embrionária. Estes efeitos não foram observados nos resultados desta pesquisa. As médias referentes aos estádios de desenvolvimento dos embriões recuperados para os tratamentos com rbST e sem rbST, estão distribuídos na tabela 3.

Tabela 2 - Médias e erros padrão dos estádios de desenvolvimento dos embriões recuperados de vacas da raça Nelore superovuladas com FSH, associada ou não à rbST.

Averages and errors standard of stadiums of development of the recovered embryos of cows of the superovulated Nelore breed with FSH, associate or not to rbST.

Variáveis	FSH	
	Com rbST	Sem rbST
Mórulas	0,5±0,2 ^a	2,3±1,9 ^a
<i>Morulae</i>		
Blastocistos iniciais	2,2±2,1 ^a	1,3±0,9 ^a
<i>Early blastocystes</i>		
Blastocistos	4,7±1,6 ^a	2,5±0,5 ^a
<i>Blastocysts</i>		
Blastocistos expandidos	0,6±0,3 ^a	0,5±0,5 ^a
<i>Expanded blastocystes</i>		

^aNão houve diferença significativa entre os tratamentos (P>0,05; teste de Wilcoxon)

A rbST não afetou ($p > 0,05$) os estádios de desenvolvimento embrionários entre dois tratamentos quando colhidos sete dias após a primeira inseminação. As maiores médias, tanto no tratamento com rbST com e sem rbST referem-se aos estádios de blastocisto inicial (2,2±2,1 e 1,3±0,9) e blastocisto (4,7±1,6 e 2,5±0,5). Coelho (1986), ao obter embriões no sétimo dia de superovulação, também não observou diferença ($p > 0,05$) nas médias de mórulas compactas e blastocistos jovens, nos animais da subespécie *Bos taurus taurus*, como também no número de mórulas e mórulas compactas em *Bos taurus indicus*, demonstrando a variabilidade individual no desenvolvimento e na qualidade embrionária. Variações de 24 a 48 horas na idade dos embriões podem ocorrer no desenvolvimento embrionário (Lindner e Wright, 1983). Deste modo, é

importante considerar o dia das colheitas dos embriões em função da raça do animal trabalhado. As médias e erro padrão da qualidade dos embriões recuperados, estão na tabela 4.

Tabela 3 - Médias e erros padrão da qualidade dos embriões recuperados em vacas da raça

Nelore superovuladas com FSH, associada ou não à rbST.

Averages and errors standard of cows of the Nelore breed embryonic quality superovulated with FSH, associate or not to rbST.

Variáveis <i>Variables</i>	FSH	
	Com rbST	Sem rbST
Grau 1 <i>Degree 1</i>	7,3±2,5 ^a	5,0±0,8 ^a
Grau 2 <i>Degree 2</i>	0,5±0,3 ^a	1,1±0,5 ^a
Grau 3 <i>Degree 3</i>	0,2±0,1 ^a	0,5±0,5 ^a

^aNão houve diferença significativa entre os tratamentos (P>0,05; teste de Wilcoxon)

A qualidade dos embriões não foi favorecida pela administração da rbST (p>0,05). A rbST também não antecipou a emergência da onda folicular, melhorando a qualidade do folículo, e, conseqüentemente, a qualidade embrionária. Neste sentido, Maffili et al. (2001) relataram 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 raça e dose, outros fatores que também podem ter interferido nos resultados foram a idade dos animais (Desaulniers et al., 1995), a época do ano e o número de superovulações (Cushman, et al., 2001).

contribuído para os resultados variados do presente trabalho em relação aos citados são: a raça (Hazier et al., 1983; Segerson et al., 1984; Breuel et al., 1991),

CONCLUSÃO

O tratamento prévio de vacas da raça Nelore, superovuladas com FSH, em associação com dose única de 250mg de rbST, no D0, não modificou a resposta ovariana, no que se refere a estruturas colhidas, embriões viáveis, estruturas degenerados e não fertilizados, os estádios de desenvolvimento e qualidade embrionária, no sétimo dia após a inseminação.

LITERATURA CITADA

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

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, p.1439-1444, 2001.

BREUEL, K. F.; BAKER, R. D.; BUTCHER, R. L. et al. Effects of breed, age of donor and dosage of follicle stimulating hormone on the superovulatory response of beef cows. **Theriogenology**, v.36, p.241-255, 1991.

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.; DE SOUZA, J. C.; HELGPETH, V. S. 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.

DE LA SOTA, R. L.; LUCY, M. C.; STAPLES, C. R. et al. Effect of recombinant bovine somatotropin (sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1002-1013, 1993.

DESAULNIERS, D. M; LUSSIER, J. G.; GOFFAK, B.D. et al. Follicular development and reproductive endocrinology during and after superovulation in heifers and mature cows displaying contrasting superovulatory responses. **Theriogenology**, v.44, p.479-497, 1995.

DIRKSEN, G.; GRUNDER, H.; STOBER, M. et AL. **Exame Clínico dos Bovinos**. Traduzido por José Renato Junqueira Borges, Mariam Milz Lielbhold. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 72. 1993. [Tradução de Rosenberger, Die Klinische Untersuchung des Rindes].

GEO-PROCESSAMENTO, UEMA. Disponível em: <<http://www.uema.gov.br/geo-processamento>>. Acessado em: 19 Janeiro. 2008.

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

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, 1996.

HAZIER, J. F.; MCCAULEY, A. D.; SCHERMERHOM, E. C. et al. Superovulatory responses of Holstein cows. **Theriogenology**, v.19, p.83-99, 1983.

IETS. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões**. 3. ed. Illinois: Stringfellow, D.A. & Seidel, 1998.

KIRBY, C. J.; SMITH, M. F.; KEISLER, D. H. et al. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.273-285, 1997.

KUEHNER, L. F.; RIEGER, D.; WALTON, J. S. et al. The effect of a depot injection of recombinant bovine somatotropin on follicular development and embryo yield in superovulation Holstein heifers. **Theriogenology**, v.35, p.1003-1013, 1993.

LINDNER, G. M., WRIGTH, R. W. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v.20,p.407-416, 1983.

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.; COLLIER, R. J.; KITCHNELL, M. L. et al. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1219-1227, 1993.

LUCY, M. C.; CURRANT, T. L.; COLLIER, R. J. et al. Extend 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.; TATCHER, W. W.; COLLIER, R. J. et al. Effects of somatotropin the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy on cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v.12, p.73-82, 1995.

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.

MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C. et al. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v.57, p.1371-1387, 2002.

NAGANO, A.Y.; WEISS, R.R.; BÜCHELE, J.M. et al. A somatotropina bovina recombinamento (rbst) na superovulação de fêmeas bovinas. **Archives of Veterinary Science**, v.9, p. 101-106, 2004.

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 de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.205-209, 2005

RIEGER, D.; WALTON, J. S.; GOODWIN, M. L. et al. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v.35, p.863-868, 1991.

SAS INSTITUTE. SAS/STAT software: changes and enhancements through release 6.12. Cary: **Satistical Analysis System Institute**, 1997

SEGERSON, E. C; HANSEN, T. R.; LIBBY, D.W. et al. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v.59, p.1026-1046, 1984.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Um maior e melhor entendimento das particularidades das espécies domésticas quanto às alterações hormonais endócrinas e a dinâmica folicular é necessário para adequar o tratamento superovulatório para cada uma delas, visando uma melhoria na maturação folicular e, conseqüentemente, melhora na produção de embriões. O hormônio de crescimento surge como uma possibilidade para o avanço da técnica de superovulação nas diferentes espécies domésticas. Portanto os resultados ainda bastante divergentes, entre os mais renomados grupos de pesquisa, sendo indicativo da necessidade que outros estudos com número de animais maior devam ser conduzidos em diferentes regiões, faixa etária e espécie bovina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADASHI, E. Y. The IGF family and folliculogenesis. **Journal of Reproductive Immunology**, v.39, p.13–19,1998.
- ARMSTRONG, D. 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.
- 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.
- BADINGA, L. et al. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.47, p. 871 – 883, 1992.
- BAO, B.; GARVERICK, A. Expression of steroidogenic enzyme and gonatotopin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Science**, v.76, p. 1903-1921, 1998.
- BAO,B et al. Expression of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid is limited to theca of healthy bovine follicles collected during recruitment, selection and dominance of follicles of the first follicular wave. **Biology of reproduction**, v.59, p. 953-959, 1998.
- BARRECA, A. et al. In vivo and in vitro effect of growth hormone on estradiol secretion by human granulosa cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.77, p.61–67, 1993.
- BARROS, C.M.,; NOGUEIRA, M.F.G. Superovulação em zebuínos de corte. In: 1o. **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina, p. 212-222, 2004.
- BARUSELLI, P.S.et al. Adequação da dose de FSH (Folltropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Anais... XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES**, 2003, Fortaleza. 2003a. p. 244-245.
- BAUMAN, D.E. Bovine somatotropin and lactation from basic science to commercial 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**, v. 75, p. 3432-3451, 1992.

BERGFELT, D.R. et al. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrous cycle in cattle. **Animal Reproduction Science**, v.49, p.1-12, 1997.

BESNARD, N. et al. Proteolytic activity degrading insulin-like growth factor-binding protein-2, -3, -4, and -5 in healthy growing and atretic follicles in the pig ovary. **Biology of Reproduction**, v.56, p.1050-1058, 1997.

BLEY, M.A.; SARAGUETA, P. E.; BARANAO, J.L. Concerted stimulation of rat granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis by sex steroids and follicle-stimulating hormone. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.62, p.11-19, 1997.

BÓ, G.A. et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and oestradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, p. 193-204, 1995.

BÓ, G. A. et al. Bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 89, p. 643-653, 1990.

BÓ, G.A. et al. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.1-22, 2004. (suplemento)

BÓ, G.A. et al. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone vaginal devices and transferred without estrus detection. **Theriogenology**. v. 55, p. 357, 2001. (Abstract)

BORGES, A. M. et al. Resposta superovulatória de novilhas mestiças holandês-zebu tratadas com somatotropina bovina recombinante (rbST). **Revista Brasileira de Zootecnia**, vol.30, 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 Nelore (*B. indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421-431, 2000.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. **Theriogenology**, v.25, p.71-86, 1986.

CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R. J.; WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. **Journal of reproduction & fertility**, v.49, p.335-350, 1995. (Suplemento).

CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de fisiologia veterinária**. Tradução por Idilia Ribeiro Vanzellotti. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. 454p.[Tradução de Textbook of Veterinary Physiology].

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.

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

DE LA SOTA, R. L. et al. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. **Biology of Reproduction**, v.55, p.803–812, 1996.

DEAVER, D.R.; BRYAN, K.A. Effects of exogenous somatotropin (ST) on gonadal function in ruminants and swine. **Domestic Animal Endocrinology**. v.7, p.287-97, 1999.

DEMOUSTIER, J.M.et al. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. **Theriogenology**, v.30, p.379-86, 1988.

DEMCZUK, et al . Embryotransfer in Simmental cows in northwest Paraná and South of Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, 1998.

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

EVANS, A. C. O. et al. Changes on androgen secretion and luteinizing hormone pulse amplitude are associated with the recruitment and growth of ovarian follicles during the luteal phase of the bovine estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 394-401, 1997.

EYESTONE, W.H., AX, R.L., A review of ovarian follicular cysts in cows, with comparisons to the condition in women, rats and rabbits. **Theriogenology**, v.22, p.109-125, 1984.

FERNANDES, P. **Inseminação artificial com horário predeterminado em vacas Nelore tratadas com acetato de buserelina, prostaglandina F2 α e benzoato de estradiol.** 1998. 86p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Universidade Estadual de São Paulo – UNESP, Botucatu, 1998.

FIGUEIREDO, R.A. et al. Prevalência de duas ondas de crescimento folicular ovariano em vacas da raça Nelore. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.19, p.200-211, 1995.

FORTUNE, J.E. et al. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v.50, p.225-32, 1994.

GINTHER, O. J.; DEL CAMPO, C. H. Vascular anatomy of the uterus and ovaries and the unilateral luteolytic effect of the cattle uterus. **American Journal of Veterinary Research**, v.35, p.193-203, 1974.

GINTHER O. J. et al. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1187-1194, 1996.

GINTHER O.J.; KOT K.; KULICK L.J.; WILTBANK M.C. Emergence and desviation of follicle during the development of follicular waves in cattle. **Theriogenology**, v.48, p.75-87, 1997.

GINTHER, O.J. et al. Actin A, estradiol, and free insulin-like growth factor-1 in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v.67, p. 14-19, 2002.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **Journal of reproduction & fertility**, v.87, p.223-230, 1989

GLUCKMAN, P.D.; BREIER, B.H.; DAVIS, S.R. Physiology of the somatotropin axis with particular reference to the ruminant. **Journal of Dairy Science**, v.70, p.442-466, 1987.

GONG, J.G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, T.A.; WEBB,R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotropin: a dose-response study. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.110, p.91-97, 1997.

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

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

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

GRAY, B.D., STRINGFELLOW, D., RIDDELL, M. The effect of treatment with bovine somatotropin (BST) on the superovulatory response of cattle. **Theriogenology**, v.39, p.227 1993. (abstract)

GUTIERREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Development of a long-term granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of Reproduction** v.56, p.608-616, 1997.

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

HERRIER, G. et al. Effect of rBST on follicular IGF-I contests and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. **Theriogenology**, v.41, p.601-611, 1992.

HERRLER, G. et al. Effect of rBST on follicular IGF-I contests and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. **Theriogenology**, v.41, p.601-611, 1994.

HWANG, W.S.; LEE, K.N.; LEE, B.C. Effect of bst cotreatment with FSH or PMSG on transvaginal ultrasound guided oocyte retrieval in calves. **Theriogenology**, v. 47, p. 159, 1997. (abstract).

JIANG, H.; OKAMURA, C. S.; LUCY, M. C. Isolation and characterization of a novel promoter for the bovine growth hormone receptor gene. **Journal of Biological Chemistry**. v.274, p.7893–7900, 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.

KENNEDY, P.C.; MILLER, R.B. **The female genital system**. In: JUBB, K.V.E., KENNEDY, P.C.; PALMER, N. Pathology of domestic animal. 4.ed. New York: Academic Press, 1993, v.3, p.349-470.

KIRBY, C.J et al. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.273-285, 1997.

KIRBY, C. J. et al. Effects of growth hormone and pregnancy on expression of growth hormone receptor, insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -3 genes in bovine uterus, ovary and oviduct. **Biology of Reproduction** v.55, p. 996–1002, 1996.

KOZICKI, L.E. et al. A somatotrofina bovina (bst) e sua relação com o recrutamento folicular ovariano durante o ciclo estral de vacas. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, p. 35-44, 2005.

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

LEHNINGER, A. L. **Princípios de bioquímica**. 7. ed. São Paulo: Sarvier, 1991.

LERNER, S.P. et al. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. **Journal of Animal Science**, v.63, p.176-183, 1986.

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.

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. et al. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v.48, p.1219-1227, 1993.

LUCY, M. C. et al. Expression of somatotropin receptor messenger ribonucleic acid in bovine tissues. **Journal Dairy Science**, v.81, p.1889-1895, 1998.

LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, R.L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *Journal Animal Science*, v.70, p.3615-26, 1992.

MAFFILI, V. V. 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, p.377-379, 2001.

MARTINEZ, M.F.; ADAMS, G.P.; BERGFELT, D.; KASTELIC, J.P.; MAPLETOFT, R.J. Effect of LH or GnRH on the dominant follicle of the first wave in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 57, p. 23-33, 1999.

MARTINS, C. M. et al. Adequação da dose de FSH ovino em protocolos de superovulação com inseminação artificial em tempo fixo para doadoras da raça Nelore (*Bos indicus*). **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34,p. 530, 2006. (Suplemento 1)

MCCRACKEN, J. A.; SCHRAM, W. Prostaglandins and luteal regression. In: Curtis-Prior PB (ed.) Prostaglandins: Biology and chemistry of prostaglandins and related eicosanoids. Edinburg: **Churchill Livingstone**, p. 425-462, 1986.

MCCRACKEN, J. A.; SCHRAM, W.; OKULICZ, W. C. Hormone receptor control of pulsati secretion of PGF_{2α} from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v.7, p.31-56, 1984.

MEYER, J. A. et al. Embryo production rates of cattle superovulated with or without the presence of an intravaginal progesterone-releasing device. **Theriogenology**. v. 53, p. 504, 2000. (abstract)

MILVAE, R. A.; HINCKLEY, S. T. CARLSON, J. C. Luteotropic and luteolytic mechanisms in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, v.45, p. 1327-1349, 1996.

MOLINA, L. R.; SATURNINO, H. M. Resposta superovulatória de vacas Nelore tratadas com 25mg de FSH-P. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.17, p.81-88, 1993.

MONGET,P.; MONNIAUX, D. Growth factors and the control of folliculogenesis. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, supl., p.321-333, 1995.

MONNEAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMONDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v.19, p.55-61, 1983.

MOOR, R. M.; KRUIP, T. A. M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation? **Theriogenology**, v.21, p.103-116, 1984.

MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H.; GONCALVES, P. B. D. Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, São Paulo: Livraria Varela, 2001. Cap.3

MOREIRA, F. et al. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v.57, p.1371-1387, 2002.

MOREIRA, F. et al. Effects of bovine somatotropin on embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**. v. 53, p. 367 , 2001. (abstract)

NAGANO, A. Y. et al. A somatotropina bovina recombinamento (rbst) na superovulação de fêmeas bovinas. **Archives of Veterinary Science** v. 9, p. 101-106, 2004.

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.

NEVES, J. P. et al. Eficiência Reprodutiva em Gado Leiteiro. In: Galina, C.; Pimentel, C. A.; Neves, J. P.; Moraes, J. C. F.; Henkes, L.E.; Gonçalves, P.B.; Weiner, T. **Avanços na Reprodução Bovina 2000**, 1ªed. Pelotas, Ed. Universitária, 2000. p.35-37.

NIGRO, M. et al. Effect of different estrogen and progestogen treatments on superovulatory response in beef and dairy cattle. **Theriogenology**, v.57, p.769, 2002. (abstract)

PALHANO, H. B. et al. **Reprodução em bovinos**. Editora: A hora da veterinária, Porto Alegre, 2003. p. 153-154.

PATE, J.L. Cellular components involved in luteolysis. **Journal Animal Science**, v.72, p.1884-1890, 1994.

PERKS, C. M.; PETERS, A. R.; WATHES, D. C. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type I IGF receptor in the bovine ovary. **Journal of reproduction & fertility**, v.116, p.157–165, 1999.

PINEDA, M. H. Sistema reproductor de la hembra. In: McDONALD, L. E.; PINEDA, M. H. **Endocrinología Veterinaria y Reproducción**. 4 ed. Buenos Aires: Interamericana, 1979. P. 294-344.

PURWANTARA, B. et al. Follicular development and embryo recovery following 3 versus 8 FSH injections in heifers. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 35, p. 89-93, 1994.

RECHLER, M. M. Editorial: growth inhibition by insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3—what's IGF got to do with it? **Endocrinology**, v.138, p.2645–2647, 1997.

RIEGER, D. et al. The effect of co-treatment with recombinant bovine somatotrophin on plasma progesterone concentration and number of embryos collected from superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, v.35, p.863-868, 1991.

RUMPF, R; BEM, D.E.; PEIXER, M.A.S.; SOUZA, R.V. **Manual de transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e equina**. Brasília: EMBRAPA – Recursos genéticos e biotecnologia, 2000, p.71-103.

SANTIAGO, L. L. et al. Folículo Dominante e Resposta Superovulatória em Novilhas da Raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, n.1, p.363-368, 2002. (suplemento).

SANTOS, R. L. Dinâmica ovariana e crescimento folicular. **Veterinária Notícias**, v.3, n.1, p.159-167, 1997.

SILVA, A. M. R.; PRICE, C. A.; SMITH, L. **Temas avançados em reprodução**. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, 1997. 140p.(apostila)

SILVA, A.R.R. **Estudo ultra-sonográfico da dinâmica folicular em novilhas da raça Gir nos períodos pré e pós-puberal**. Dissertação(mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária, 2001.

SIROIS, J.; FORTUNE, J.E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. **Biology of Reproduction**, v.39, p.308-317, 1990.

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.

SPICER, L. J.; CHAMBERLAIN, C. S. Insulin-like growth factor binding protein-3: its biological effect on bovine granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology**. v.16, p.19–29, 1999.

STEWART, R. E. et al. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. **Endocrinology**, v.137, p.2842–2850, 1996.

SUNDERLAND, S. J. et al. Selection, dominance and atresia of follicles during the estrous cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 547-555, 1994.

SUNDERLAND, S.J. et al. Alterations in intrafollicular levels of different molecular mass forms of inhibin during development of follicular and luteal-phase dominant follicles in heifers. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 453-462, 1996.

TAYA, K. et al. Role of inhibin in the regulation of FSH secretion and folliculogenesis in cows. **Animal Reproduction Science**, v.42, p. 563- 570, 1996.

THACHER, W.W. et al. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v.5, p. 75-89, 2001.

TURZILLO, A. M.; FORTUNE, J.E. Effects of suppressing plasma FSH on ovarian follicular dominance in cattle. **Journal of Reproduction and fertility**, v.9, p. 113-119, 1993.

TURZILLO, A.; FORTUNE, J.E. . Suppression of the secondary FSH surge with bovine follicular fluid is associated with delayed ovarian follicular development in heifers. **Journal of Reproduction Fertility**, v. 89, p. 643-653, 1990.

VALLE, E. R. et al. Duração do cio e momento da ovulação em vacas Nelore. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.23, p. 853 – 859, 1994.

VICINI, J. L. et al. Nutrient balance and stage of lactation affect responses of insulin, insulin-like growth factors I and II, and insulin-like growth factor-binding protein 2 to somatotropin administration in dairy cows. **Journal of Nutrition**, v.121, p.1656–1664, 1991.

YAKAR, S. et al. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, p.7324–7329, 1999.

YING, S. Inhibins, activins and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. **Endocrine Reviews**, v.9, p. 267-292, 1988.

ZANENGA, C.A. et al. Embryo transfer without estrus observation. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**. Porto Alegre, Brasil, v. 28 p. 337, 2000. (Supplement).