

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE SOBRE A
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO*

Autor: Gustavo de Arruda Bezerra
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

MARINGÁ
Estado do Paraná
Janeiro – 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE SOBRE A
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO*

Autor: Gustavo de Arruda Bezerra
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de Concentração: Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Janeiro – 2009

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE SOBRE A
PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS *IN VITRO*

Autor: Gustavo de Arruda Bezerra
Orientador: Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes

TITULAÇÃO: Mestre em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 30 de Janeiro de 2009.

Prof. Dr. Fabio Luiz Bim Cavalieri Prof. Dr Tatiana Carlesso dos Santos

Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes
(Orientador)

“Nascer, viver, morrer, renascer ainda
e progredir continuamente, esta é a lei”.

Allan Kardec

Ao

meu pai Eraldo Alves Bezerra,
meu maior incentivador.

À

minha mãe Maria Goretti de Arruda Bezerra,
pelo estímulo e cobrança.

Aos

irmãos Eraldo Jr. e Núbia,
pela compreensão, carinho e incentivo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo de bom que me acontece;

À Universidade Estadual de Maringá, pela possibilidade de realizar este trabalho;

Ao Centro Universitário de Maringá, pelo auxílio na condução da parte de campo deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Gentil Vanini de Moraes, pela orientação, apoio e estímulo;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em especial ao Prof. Dr. Luiz Paulo Rigolon, pelos ensinamentos proporcionados;

Ao Prof. Dr. Fábio Luiz Bim Cavalieri, pelo apoio, amizade, dedicação que teve comigo desde o dia que nos conhecemos e, em especial, na condução deste trabalho;

Ao grande amigo, Dr. Jair de Araujo Marques;

Aos colegas de curso, Jéferson Ruela de Azevedo, Fabíola Ramos Cavalieri, Maria Cecília Domingues, Marcela Mataveli, Danieli Maggioni, Fernando Zawadzki, Wander de Souza pela fidelidade, amizade, companheirismo;

Ao colega de profissão, Márcio Tibúrcio (Tiba), pela amizade e apoio na condução da parte de campo deste trabalho;

Aos funcionários do Biotec do Cesumar, pelo auxílio na condução do trabalho de campo;

A todos os que contribuíram para a realização desse trabalho.

BIOGRAFIA DO AUTOR

GUSTAVO DE ARRUDA BEZERRA, filho de Eraldo Alves Bezerra e Maria Goretti de Arruda Bezerra, nasceu em Campo Mourão, Paraná, no dia 31 de agosto de 1980.

Em dezembro de 2003, concluiu o curso de Medicina Veterinária pela Faculdade Integrado de Campo Mourão – PR.

Trabalha com Consultoria e Assistência Técnica em Bovinocultura e Biotecnologia da Reprodução na região noroeste do Estado do Paraná.

Em março de 2006, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de Mestrado, Área de Concentração Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na Área de Nutrição e Reprodução de Ruminantes.

No dia 30 de janeiro de 2009 submeteu-se à banca para defesa da dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	Vii
RESUMO	Viii
ABSTRACT.....	Iv
I. INTRODUÇÃO.....	10
1. Introdução geral.....	10
1.1. Dinâmica Folicular em bovinos.....	11
1.2. Fatores relacionados à aspiração folicular.....	13
1.3. Qualidade de ovócitos.....	15
1.4. Somatotrofina Recombinante Bovina.....	16
1.5. Fator de crescimento tipo insulina I (IGF-I).....	17
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19
II. SOMATOTROPINA BOVINA RECOMBINANTE SOBRE A PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS <i>IN VITRO</i>	28
Resumo.....	28
Abstract.....	29
Introdução	30
Material e Métodos.....	31
Resultados e Discussão.....	34
Conclusão.....	37
III. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Efeito da Aplicação de 500 mg de rBST cinco dias antes da aspiração no número e qualidade de oócitos viáveis em vacas da raça Nelore, resultante de duas aspirações por animal.....	35
TABELA 2. Efeito da Aplicação de 500 mg cinco dias antes da aspiração de rBST no número de oócitos inviáveis em vacas da raça Nelore.....	35
TABELA 3. Efeito da Aplicação de rBST cinco dias antes da aspiração na produção de embrião produzidos <i>in vitro</i> em vacas da raça Nelore.....	36

RESUMO

O Experimento foi realizado na Fazenda Cesumar, de outubro a dezembro de 2006, objetivando avaliar o efeito da aplicação de Somatotrofina Recombinante Bovina (rBST) na produção de embriões *in vitro*. Foram realizadas 50 aspirações foliculares, utilizando 25 animais Nelore, sendo que 13 delas foram controles e 12 animais que receberam 500 mg de rBST (Boostin®, Shering) cinco dias antes da aspiração. Decorridos 30 dias da primeira aspiração, os animais foram invertidos de tratamento e realizou-se outra aspiração. Os folículos maiores que 3 mm foram aspirados com auxílio de ultrasson aloka SSD 500 e os oócitos avaliados e, posteriormente, maturados e fertilizados *in vitro* e os presumíveis zigotos cultivados por 192 horas. Não houve efeito da aplicação do rBST administrado cinco dias antes da aspiração na quantidade de oócitos viáveis, inviáveis e totais, bem como no número de blastocistos expandidos e eclodidos. Todavia, o número de embriões viáveis total foi maior ($p < 0,07$) nos animais que receberam o rBST. Desta forma, conclui-se que a aplicação do rBST não influenciou no número de oócitos aspirados, mas aumentou o número de embriões viáveis produzidos.

Palavras chaves: oócitos, qualidade, quantidade, reprodução.

ABSTRACT

The experiment was conducted at Cesumar farm from October to December 2006, to evaluate the effect of rBST on embryos production *in vitro*. 50 follicular aspirations were performed using 25 animals of Nellore breed, where 13 were animals controls and 12 received 500 mg of rBST (BOOSTIN ®, SHERING) administrated five day before aspiration. Elapsed 30 days after, first aspiration the treatment were reversed and another aspiration was carried out. Follicles larger than 3 mm were aspirated with the animals have aspirated with Aloka SSD 500 ultrasond seamer and the recovered oocytes were matured and fertilized *in vitro* and the presumptive zygotes were cultured for 192 hours. There was no effect of rBST on the viable, un viable and the total oocytes number and on the expanded and hatched blastocysts number. However, the number of viable embryos was higher ($p < 0.07$) in animals that received the rBST. Thus we can conclude that the application of rBST did not increase the number of aspirated oocytes, but the other hand there was an increase on the viable embryo production.

KEYWORDS: oocytes, quality, quantity, reproduction.

1. Introdução Geral

O Brasil tem se destacado pela transferência de embriões *in vivo* (TE) e *in vitro* (PIV), contribuindo com, aproximadamente, 50% do total de embriões produzidos no mundo (Baruselli et al, 2005). Viana & Bols (2001) afirmam que houve aumento expressivo na produção de embriões na América do Sul e África, e que os índices de produção *in vitro* variam de 25 a 40%. A PIV é uma ferramenta que serve para aumentar o potencial reprodutivo das fêmeas consideradas excepcionais, principalmente como instrumento para acelerar o progresso dos programas de seleção animal (Gonçalves et al, 2002). O sucesso dessa técnica está na dependência da quantidade e qualidade de oócitos que, são obtidos pela técnica de aspiração folicular orientada por ultrassonografia (OPU), técnica desenvolvida na década de 1980 (Galli et al., 2001).

Tratamento de doadoras com Somatotropina Recombinante Bovina (rBST) para aumentar o número de folículos ovarianos antrais foi repetidamente relatada por diversos autores (Tanner & Hauser, 1989; Gong et al., 1991). Buratini et al. (1999) observaram aumento do número de folículos menores que 3 mm, acompanhado de elevação das concentrações plasmáticas do hormônio do crescimento e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), levando os autores a acreditar no uso do hormônio em protocolos superovulatórios de bovinos. Com base nesses dados, a hipótese é que o BST poderá melhorar a quantidade e a qualidade dos oócitos e embriões produzidos *in vitro* bem como contribuir para os trabalhos de produção e melhoramento genético animal.

1.1. Dinâmica Folicular em Bovinos

Ao nascer os bovinos apresentam cerca de 150.000 folículos primordiais nos ovários, e esse número de folículos diminui para 3.000, aos 15 a 20 anos de idade (Bao & Garverck, 1998). Os folículos primordiais estão constantemente entrando no pool de folículo sem crescimento, mas 99% entram em atresia, (Ireland, 1987).

O crescimento folicular ocorre em ondas que pode variar de duas e três durante um ciclo estral completo (Santos & Amstalden, 1998). Segundo Ginther et al. (1989), nos ciclos estrais com duas ondas, a primeira inicia-se no dia zero (D0 - estro) e a segunda no dia dez (D10), e no caso de três ondas de crescimento folicular, a primeira inicia-se no D0 (estro), a segunda no dia nove (D9) e a terceira no dia dezesseis (D16). O número de ondas foliculares pode estar relacionado com o estado fisiológico e ambiental do animal (Weeb, 1999). Murphy et al (1991) verificam que os animais alimentados com baixa energia na dieta apresentavam três ondas de crescimento folicular, enquanto que os animais alimentados com alta energia apresentavam somente duas.

Em cada onda de crescimento folicular, um grupo de folículos de 4 a 5 mm de diâmetro é recrutado e começa a se desenvolver (Fortune, 1993). Adams (1993) assinalou que isso ocorre após um aumento nas concentrações sanguíneas de FSH. Nesse grupo de folículos, rapidamente emerge um folículo dominante com 7 a 9 mm de diâmetro e, continua a se desenvolver, enquanto os outros sofrem atresia (Weeb, 1999). Segundo esse mesmo autor, se a luteólise acontecer naturalmente, ou através da aplicação de $PGF_{2\alpha}$, o folículo dominante irá ovular (Santos & Amstalden, 1998), mas ao contrário, o próprio folículo dominante entrará em atresia e uma nova onda de crescimento folicular terá início.

Na produção *in vitro*, além dos conhecimentos pertinentes ao crescimento folicular, deve-se estudar a dinâmica de maturação oocitária durante o desenvolvimento folicular *in vitro*, pois o oócito passa pela maturação nuclear (continuação da meiose) e maturação citoplasmática, deixando os oócitos com maior viabilidade para sofrerem a fertilização e o posterior desenvolvimento embrionário (Krisher, 2004).

Quanto à maturação nuclear, os oócitos oriundos de folículos em crescimento e dominantes permanecem parados no estágio de diplóteno da prófase I da meiose nos em situações *in vivo*, a meiose é reiniciada com o pico pré-ovulatório de LH, conduzindo a

mesma até fase de metáfase II e liberação do primeiro corpúsculo polar (Van den Hurk & Zhao, 2005). Tsafiriri (1983) relatou que no início do crescimento, a atividade de síntese do oócito é alta com a do RNA mensageiro e de proteínas que são utilizadas na fertilização e desenvolvimento embrionário inicial e fetal (Dieleman et al., 2002). Naturalmente, o ciclo meiótico só terminará com a penetração espermática e a liberação do segundo corpúsculo polar (Van den Hurk & Zhao, 2005).

Associado à maturação nuclear, existe uma variedade de outros processos que acontecem no citoplasma do oócito que são importantes para a sua fertilização do mesmo, eventos independentes da maturação nuclear e são denominados de pré-maturação e maturação citoplasmática (Krisher, 2004). Os eventos incluem: aumento no número e tamanho das gotículas de gordura, diminuição no número e tamanho do complexo de Golgi, aumento do espaço perivitelínico e movimento dos grânulos corticais para a periferia do oócito (Hittel et al., 1997).

Todavia, quando realiza-se aspiração folicular, em ovários de abatedouros ou em animais *in vivo*, obtêm-se oócitos oriundos de folículos de tamanhos heterogêneos, variando de 3 a 15 mm e que se encontram em diferentes níveis de maturação nuclear e citoplasmática, apesar de os folículos de 3 mm já serem capazes de se desenvolver *in vitro* (Dieleman et al, 2002). Folículo com 3 a 15 mm de diâmetro apresenta quantidade suficiente de RNA mensageiro e proteínas específicas para sustentar a fertilização, clivagem e desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Pavlok et al., 1992; Lonergan et al., 2004, Krisher, 2004). Isto pode se agravar ainda mais, pois quando aspiram-se os oócitos dos folículos e retiram-se os mesmos do ambiente folicular, a meiose se reinicia espontaneamente (Sá et al., 2003), impedindo a transcrição de RNA mensageiro devido ao início da compactação da cromatina.

Vassena et al. (2003) postularam que os oócitos que são mantidos no ambiente folicular por maior tempo podem ser mais eficientes em acumular RNA mensageiro. Desta forma, na maturação dos oócitos *in vitro* parece, quando colhidos de folículos de qualquer tamanho, haver ausência de alguns eventos citoplasmáticos essenciais para os oócitos (Gicchrist et al., 2007). Além disso, qualquer falha na maturação será observada na fase de desenvolvimento embrionário, na passagem de 8,0 para 16,0 células e não na maturação ou fertilização *in vitro* (Leibfried-Rutledge, et al, 1987).

Em consequência das falhas na maturação de oócitos obtidos de folículos de vários tamanho, começaram a se estudar o efeito do tamanho e da fase de crescimento folicular na produção de embriões *in vitro* (Vassena et al. 2003 Leibfried-Rutledge, et al

1987). Os resultados desses estudos, apontaram que oócitos provenientes de folículos maiores se desenvolvem melhor *in vitro*, nos quais se observou aumento na produção de embriões de oócitos aspirados de folículos médios e grandes quando comparados a folículos pequenos (Pavlock et al, 1992; Loonergan et al., 2004; Hagemann, et al, 1999).

No entanto, Carolan et al. (1996) e Seneda et al. (2001) não relataram influência do diâmetro folicular sobre a competência do oócito analisando oócitos aspirados de folículos pequenos e grandes. Machatkova et al. (1996), comparando a aspiração em diferentes estádios do ciclo estral, demonstraram que oócitos colhidos nos dias 14 a 16 do ciclo apresentavam melhores índices de competência para o desenvolvimento até blastocisto quando comparados aos aspirados nos dias sete, oito e nove. Em outro estudo, oócitos colhidos de folículos subordinados nos dias dois, três e, principalmente, no dia sete da onda folicular demonstraram menor competência que aqueles recuperados no dia cinco (Vassena et al, 2003).

1.2. **Fatores relacionados à aspiração folicular**

Os principais fatores que interferem na aspiração folicular transvaginal podem ser devidos ao aparelho de ultrassom, ao procedimento de aspiração, à pressão de aspiração ou ao tipo de agulha (mecânicos) e fatores biológicos como raça, espécie ou idade da doadora, pré-estimulação hormonal ou fase do ciclo estral em que se realiza a aspiração folicular (Seneda et al, 2002).

Em programas de aspiração folicular e na reprodução assistida em bovinos são utilizados diversos tipos de transdutores mecânicos ou eletrônicos com suas frequências variando de 3 a 8 MHz, sendo que a escolha varia de acordo com a profundidade das estruturas a serem visualizadas, bem como o grau de definição exigido para uma boa eficiência do procedimento (Viana et al, 2002). Especificamente, para aspiração folicular guiada, os transdutores são lineares ou convexos, sendo que a aspiração com o transdutor linear é desfavorável devido ao espaço limitado entre o transdutor e a agulha (Seneda et al, 2002). As áreas são um fator favorecido pela probe convexa (Seneda et al, 2002).

Os transdutores podem ser de 5,0 MHz (Gibbons et al., 1994), 6,5 Mhz (Boni et al., 1997; Fry et al., 1997) e 7,5 Mhz (Bols et al, 1995). A variação da frequência do

transdutor pode alterar a taxa de recuperação dos oócitos devido, principalmente, à melhor visualização, o que ocorre com probes de frequência maiores (Hashimoto et al., 1999), ocorrência que pode variar em função da experiência do operador (Fry et al., 1997).

As agulhas de 17G (diâmetro interno de 2 mm) e de 21G (diâmetro interno de 0,45 mm) e comprimentos variados, descartáveis ou não, são normalmente utilizadas para aspiração folicular em bovinos (Viana et al, 2002). A utilização de agulhas menores que 21 G ou maiores que 17G dificultam o uso devido à impossibilidade de colher complexos cumulus-oócitos (CCOs) intactos ou pela dificuldade na aspiração de folículos de menor diâmetro (Hashimoto et al., 1999). As agulhas de diâmetros de 17 e 18 G são mais rígidas e, portanto, menos sujeitas a entortar durante a manipulação do ovário (Fry et al., 1997).

De acordo com Seneda et al. (2002), as agulhas com diâmetros maiores de 18 G relacionaram-se a maiores taxas de recuperação, embora com maior percentual de oócitos desnudos, além de maiores danos ao estroma e maior quantidade de sangue no líquido aspirado. Já as agulhas de diâmetro menor que 19 G apresentam índices reduzidos de recuperação de oócitos, possivelmente pela lentidão da aspiração do líquido folicular no momento da punção. O calibre interno é a característica mais importante da agulha de punção, pois está diretamente relacionado à velocidade do fluxo do fluido, ao volume de espaço morto e à ocorrência de turbulência no sistema de aspiração (Viana et al, 2002).

Agulhas de menores calibre 20 e 21 G são menos sujeitas à variação na velocidade de fluido aspirado por minuto do que agulhas com 17 e 18 G (Bols et al, 1996). Agulhas de menor diâmetro resultam na recuperação de maior percentual de CCOs de melhor qualidade e menor percentual de oócitos total ou parcialmente desnudos (Bols et al., 1996, Hashimoto et al, 1999). Uma explicação para esses resultados seja fato de que o movimento dos fluidos em agulhas de menor diâmetro é mais lento e laminar, resultando em menor turbulência (Horne et al, 1996). A utilização de agulhas maiores, mesmo aplicando-se menores pressões de vácuo, levam a diferenças na velocidade do fluxo entre o centro e a periferia do lúmen destas, gerando forças mecânicas sobre os CCOs (Viana et al, 2002).

Outro aspecto a ser considerado na escolha da agulha para afetar aspiração folicular é o tamanho do bisel, o que levou Bols et al. (1997) a testar o efeito de pressões de vácuo de 50, 70, 90, 110 e 130 mmHg com agulha de 20 G com bisel curto

ou longo. Para os com os autores, nesse estudo as agulhas de bisel longo promoveram maiores taxas de recuperação quando se utilizou a mesma pressão de vácuo utilizadas com agulha de menor bisel. Uma das possíveis explicações poderia ser de que no momento da perfuração da parede folicular, agulhas mais afiadas e de bisel longo ocasionam menor pressão intrafolicular, reduzindo o risco de perda de fluido folicular entre a parede do folículo e a agulha (Horne et al., 1996).

Estreitamente relacionado com as características da agulha utilizada encontra-se a pressão de vácuo de 50 mm Hg, que foi pouco eficiente para a aspiração, enquanto pressões maiores, como 120 mm Hg, danificavam o revestimento do *cumulus oophorus*, há uma grande variação entre os dados encontrados na literatura, com valores de 40 a 400 mm Hg, embora isto deva ser considerado com reservas, já que todo o sistema com o comprimento e diâmetro de conexões, altura do equipamento de vácuo, diâmetro da agulha pois podem influenciar na pressão de vácuo final, (Seneda et al, 2002)

Para quantificar a pressão negativa de forma mais real, sugere-se mensurar o volume de fluido por minuto (Antosik et al, 2007). Mesmo assim, há variações consideráveis de 4,4 a 40 L de água/minuto, mas o intervalo entre 10 a 20 mL de fluido por minuto tem sido o mais utilizado, atualmente, sendo pertinente que a aferição seja readequada a cada procedimento (Seneda et al., 2002).

As bombas de Vácuos Handle Cook possuem grande estabilidade na pressão de vácuo, permitindo considerável eficiência na recuperação dos oócitos (Seneda et al, 2002), mas o aspecto desfavorável é o custo elevado, fator que motivou a busca de bombas de vácuo alternativas. Verifica-se, atualmente, a utilização de bombas de aspiração odontológica, de fluidos endotraqueais, além de bombas de infusão controlada, equipamentos que prestam-se à geração de vácuo, porém podem gerar pressão negativa que compromete a quantidade e a qualidade dos oócitos aspirados (Seneda et al, 2002).

1.3. Qualidade de Oócitos

A qualidade do oócito se relaciona com a capacidade de ser fertilizado e ativar e sustentar eficazmente o desenvolvimento embrionário subsequente (Hazeleger et al, 1995), características do próprio oócito, mas que só podem ser avaliadas mais tarde, em uma situação em que outros fatores, principalmente fatores uterinos, exercem papéis

centrais que podem influenciar o resultado. A idade do oócito primário antes de entrar na fase de crescimento e o aspecto morfológico do citoplasma do oócito influenciam a qualidade do gameta feminino (Runpf et al, 2007). A oogénese que apresenta perfeita fase de crescimento do oócito seguida por período curto de maturação é considerada sinónimo de geração de oócito de boa qualidade (Martins et al, 2002).

Os oócitos são classificados de acordo com morfologia (número de camadas de células do *cumulus* e aspecto do citoplasma) em graus I, II e III, oócitos sem *cumulus* (s/c), expandidos (exp), degenerados (deg) e atrésicos (atr), conforme Lonergan, (2004) e ainda os oócitos considerados viáveis são classificados como I, II e III.

1.4. Somatotrofina Recobinante Bovina

O hormônio de crescimento (GH) é um peptídeo com 190 ou 191 aminoácidos é sintetizado pelas células acidófilas da adeno hipófise (Guyton & Hall, 1997). Com o objetivo de aumentar a produção de leite em ruminantes (Borges et al., 2001) foram desenvolvidos processos de produção da somatotropina bovina recobinante (rBST) em escala industrial, a partir da técnica de DNA recobinante em *Eschericia coli* (Santos et al 2001).

A secreção e liberação do rBST se deve à ação do fator liberador de GH (GHRH) inibida pela somatostatina, fator inibidor da síntese de liberação de GH, produzidos pelo hipotálamo junto com GnRH (Bauman, 1992). A somatotropina age nos tecidos muscular, adiposo e hepático, mostrando efeitos no aumento dos tecidos esqueléticos e musculares, no aumento da disponibilidade de glicose na circulação e no estímulo sobre o pâncreas para a liberação de insulina (Prado et al., 2003).

A administração de rBST aumenta a síntese hepática de IGF-I e consequentemente, as concentrações plasmáticas (Gong et al., 1991; McGuire et al., 1992). As mudanças nas concentrações sanguíneas das proteínas carreadoras de IGF (IGFBPs) podem modificar as ações do IGF-I através do aumento ou da diminuição da disponibilidade no sangue ou nos tecidos de IGFBPs, pois o aumento diminui a IGF-I ou a diminuição eleva IGF-I (Clemmos, 1998; Webb et al., 1999). Além disso, o aumento da síntese e secreção de IGF-I aumenta a atividade de diversas rotas metabólicas, tais como a gliconeogénese e a lipólise (Etherton & Bauman, 1998).

Vários estudos têm comprovado a tendência de melhora de qualidade do oócitos nos animais tratados com rBST (Pavlok et al., 1996; Bevers et al., 1997; Pivato et al., 1999) e outro que efetivamente que melhora (Peres et al., 2003), ao aplicar o rBST média de 3 a 6 dias pós parto, respectivamente, com aspiração aos 10 dias. O BST age em nível de ovário (Tanner e Hauser, 1989), aumentando o número de folículos recrutados com diâmetros entre 2 e 5 mm (Pavlok et al., 1996; Hwang et al., 1997), estimulando o crescimento e o desenvolvimento folicular (Webb et al., 1994) e controlando a função do corpo lúteo (Lucy et al., 1993). O mecanismo de ação do rBST é mediado pela elevação das concentrações intrafoliculares de IGF-I (Gong et al., 1991), que estimula a ploriferação e a esteroidogênese pelas células da granulosa (Lobie et al., 1990; Gonc et al., 1994), a atividade de aromatase (Adashi et al., 1985) além de prevenir ou retardar o processo de atresia folicular (Mondschein et al., 1989).

1.5 Fator de Crescimento como Insulina do tipo I (IGF-1)

O fator de crescimento como insulina tipo I (IGF-I) é um polipeptídeo de 70 aminoácidos que exerce efeitos no desenvolvimento periféricos, de diferenciação celular e diversas células e tecidos do organismo (Daftary & Gore, 2005).

Diversos estudos estabeleceram, após o ponto de correlação das concentrações de IGF-I no sangue, com a função reprodutiva (Spicer et al., 1990; Luci., 2000). Thatcher et al. (1996) mostraram que vacas leiteiras, em anestro, tiveram níveis sanguíneos mais baixos de IGF-I quando comparados, às vacas ciclando. Nas observações de Lucy (2000), o IGF-I circulante foi correlacionado com o IGF-I do líquido folicular, porque a maior parte do IGF-I do líquido folicular tem origem no sangue.

O IGF-I, produzido pela ação do BST, influencia a função ovariana devido a produção de IGF-I para o líquido folicular. O IGF-I e as gonadotropinas (FSH e LH) são sinérgicos no crescimento e na diferenciação do folículo (Adashi, 1994; Adashi, 1998). O aumento na expressão do receptor do tipo I coincide com o aumento da expressão de receptores para FSH e LH dos folículos (Monget et al., 2002)

Scaramuzzi et al. (1999) apresentaram evidência do efeito de IGF-I no desenvolvimento folicular em ovinos ao fazerem infusão de um análogo do IGF-I no ovário de fêmeas ovinas. além de demonstrarem que o IGF-I é um potente regulador da foliculogênese bovina (Adashi, 1992; Webb, 1998; Armstrong *et al.*, 2000; O'Callaghan

et al., 2000) No entanto, o sistema IGF-I é regulado pela associação com seis proteínas ligantes específicas (IGFBP 1 - 6), o qual determina a biodisponibilidade do IGF-I e seus efeitos no crescimento folicular (De La Sota *et al.*, 1996). Neste sentido, forma, a diminuição folicular de IGFBP resultaria em aumento na atividade biológica do IGF-I produzido localmente, e, assim, aumentaria a resposta dos folículos às gonadotrofinas (Webb *et al.*, 1999).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS G.P.; KOT K.; SMITH C.A. et al. Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. **Animal Reproduction Science**, v.30, p.259-271, 1993.
- ADASHI, E. Y. Growth factors and ovarian function: the IGF-I paradigm. **Hormone Research**,v.42. p.44-48, 1994.
- ADASHI, E. Y. The IGF family and folliculogenesis. **Journal. Reproductive. Immunology**, v.39. p.13-19, 1998.
- ADASHI, E.Y. Intraovarian regulation: the IGF-I example. **Reproduction and Fertility. Development**, v. 4, p.497-504. 1992.
- ADASHI, E.Y.; RESNICK, C.E.; BRODIE, A M.H. et al. Somatomedin C- mediated potentiation of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity of cultured rat granulose cells. **Endocrinology**, v.117. p.2313-2320, 1985.
- ANTOSIK,P.; JASKOWOSKI, J.M.; JEZIORKOWSKI,M.; et al. The influence of vacuum pressure on quality and number of recovered oocytes aspirated ovarian follicles of swinw and cows. **Archives Tierz.**, v.50, m.3, p.260-266, 2007.
- ARMSTRONG, D.C.; McEVOY, T.G.; BAXTER, G. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: association

with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1624-1632. 2000.

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

BARUSELLI P.S.; MARTINS C.M.; SÁ FILHO M.F. et al. Novos avanços nos tratamentos de doadoras e de receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33 (Supl, 1), p.151-156, 2005.

BAUMAN, D.E. Bovine somatotropin: review of an emerging technology. **Journal of Dairy Science**, v.75, n.12, p.3432-3451, 1992.

BEVERS, M.M.; DIELEMAN, S.J.; HURK, V.D.R. et al. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v.47, p.13-22, 1997.

BOLS, P. E. J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T. et al. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p.1001-1014, 1996.

BOLS, P. E. J.; VANDENHEEDE, J. M. M.; VAN SOOM, A. et al. Transvaginal ovum pick-up(OPU) in the cow: a new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v.43, n.3, p.677-687, 1995.

BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; VAN SOOM, A. et al. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus–oocyte complexes. **Theriogenology**, v.47. n.6. p.1221–1236, 1997.

BONI , R.; ROVIELLO, S.; GASPARRINI, B. et al. Pregnancies established after transferring embryos yielded by ovum pick-up and in vitro embryo production in italian buffalo cow. **In: Proceedings of World Buffalo Congress, 5th**, 1997, p.787-792, 1997.

- BORGES, A.M.; TORRES, C.A.A.; RUAS, J.R. M. et al. Resposta superovulatória de novilhas mestiças, Holandês-Zebu tratadas com somatotropina bovina recobinante (rBST). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.5, p.1439-1444, 2001.
- BURATINI JR, J.; PRICE, C.A.; BÓ, G.A. et al. Os efeitos do BST e da ablação do folículo dominante sobre o desenvolvimento folicular. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.27, n.1, p.147-162, 1999.
- CAROLAN, C.; LONERGAN, P.; MONGET, P. et al. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Molecular Reproduction Development**, v. 43, p. 477-483, 1996.
- CLEMMONS, D.R. Roles of insulin-like growth factor binding proteins in controlling of IGF actions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.140, n.1-2, p. 19-24, 1998.
- DAFTARY, S.S, GORE, A.C. IGF-I in the brain as regulator of reproductive **Neuroendocrine function. Society for experimental biology and medicine**. 2005.
- DE LA SOTA, R.L.; SIMMEN, F.A.; DIAZ, T. et al. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 803-812, 1996.
- DIELEMAN, P.J.M.; HENDRIKSEN, D.V.; THOMSEN, P.D. Effects of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v.57, p.5-20, 2002.
- ETHERTON, T.D.; BAUMAN D.E. Biology of somatotropina in growth and lactation of domestic animals. **Physiology review**, n.3, p. 745-761, 1998.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v 50, p.225-232, 1993.

- FRY, R. C.; NIALL, E. M.; SIMPSON, T. L. et al. The collection of oocytes from bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 48, n. 6, p. 977–987, 1997.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C. et al. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v.55, p.1341-1357, 2001.
- GIBBONS, J.R.; BEAL, W.F.; KRISHER, R.J. et al. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v. 42, p. 405-419, 1994.
- GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.B. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67, p.6-15, 2007.
- GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and tree follicular waves. **Journal Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-230, 1989.
- GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L. et al. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FERITAS, V.J.F. (Eds.). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela. p.195-196, 2002.
- GONG, J.G.; McBRIDE, D.; BRAMLEY, T.A. et al. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis in vitro. **Journal of Endocrinology**, v. 143, p. 157-164, 1994.
- GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. The effects os recombinant bovine somatotropina on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. **Biology of Reproductrion**, v.454, n.6, p. 941-949, 1991.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Os Hormônios hipofisários e seu controle pelo hipotálamo** In: GUYTON, A.C.; HALL, J.E. (Ed). Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 9 ed., p. 847-857, 1997.

- HAGEMANN, L.J.; BEAUMONT, S.E.; BERG, M. et al. Development during IVP of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular of Reproduction and Development**, v.53, p.451-458. 1999.
- HASHIMOTO, S.; TAKAKURA, R.; MINAMI, N. et al. Ultrasound-guided follicle aspiration: effect of them frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 52, n. 1, p. 131–138, 1999.
- HAZELEGAR, N.L.; HILL, D.J.; STUBBINES, R.B. et al. Relationship of morphology and follicle fluid envolvimental of bovine oocytes to threw development potential in vitro. **Theriogenology**, v. 43, n.2, p.509-522, 1995.
- HORNE, R.; BISHOP, C. J.; REEVES, G. et al. Aspiration of oocyte for in vitro fertilization. **Human Reproduction Update**, v.2, n.1, p. 77- 85, 1996.
- 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.159-166, 1997.
- HYTTEL, P; FAIR, T; CALLESEN, H et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.
- IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. **Journal of Reproduction and Fertlity**, v.34, p.39-54, 1987.
- KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v.82, p.14-23, 2004.
- LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; CRITSER, E.S.; EYESTONE, W.H. et al. Development potencial of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v.36, p.376-383, 1987.

- LOBIE, P.E. ; BREIPOHL, W.; ARAGON, J.G. et al. Cellular localization of the growth hormone receptor/binding protein in the male and female reproductive systems. **Endocrinology**, v.126, p.2214-2221, 1990.
- LONERGAN, P; MONAGHAN, P; RIZOS, D. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. **Molecular of Reproduction and Development**, v.37, p.48–53, 2004.
- LUCY, M.C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. **Journal of Dairy Science**. v.83, n.7, 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.
- MACHATKOVA, M.; JOKESOVÁ, E.; PETELÍKOVÁ, J. et al. Developmental competence of bovine embryo derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v. 45, p. 801-810, 1996.
- MARTINS, O. G; PESTY,A.; GOUVEIA-OLIVEIRA, A. et al. Oocyte Ca²⁺-spike acquisition during *in vitro* development of early preantral follicles: influence of age and hormonal supplementation. **Zygote**. v.10, p.59-64, 2002.
- MCGUIRE, M.A.; VICINI, J.L ; BAUMAN, D.E. et al. Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. **Journal of Animal Science**, v.70, n.9, p. 2901-2910, 1992.
- MONDSCHHEIN, J.S.; CANNING, S.F.; MILLER, D.O. et al. Insulin-like growth factor (IGFs) as autocrine/paracrine regulators of granulosa cell differentiation and growth: studies with a neutralizing monoclonal antibody to IGF-I. **Biology of Reproduction**, v.40. p.79-85, 1989.

- MONGET P.; FABRE, S.; MULSANT, P. et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.139-54, 2002.
- MURPHY, M.G. Effects of dietary on pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle in beef heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.92, p.333-338, 1991.
- O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition hormone concentration in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.303-313, 2000.
- PAVLOK A.; LUCANS-HAHN; NIEMANN H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular of Reproduction and Development**, v.31, p.63-67, 1992.
- PAVLOK, A.; KOUTECKA, L.; KREJCI, P.; SLAVIK, T. et al. Effect of recombinant bovine somatotropina of follicular growth and quality of oocytes in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 41, n. 3-4, p. 183-921, 1996.
- PEREZ, O. Oocyte production in the early postpartum cow. 2003. 1152f. Tese de Doutorado, Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 2003,
- PIVATO, I.; PEREIRA, D.C.; PEIXER, M.A.S. et al. O efeito do BST sobre a taxa de recuperação e qualidade dos ovócitos em bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v.27, n.1, p.171-186, 1999.
- PRADO, I.N.; NASCIMENTO, W.G.; NEGRÃO, J.A. et al. Somatotropina bovina recombinante (rBST) nos aspectos hematológicos e metabólitos do sangue de novilhas (1/2 nelore x 1/2 Red Angus) em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n.2, p. 465-472, 2003.

- RUNF, R. Avanços Metabólicos na produção *invitro* de embriões. **Revista brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 229-233, 2007,
- SÁ, W.F.; VIZCARRA, V.E.L.; FERREIRA, A.M. et al. Desenvolvimento pós-fecundação de oócitos bovinos pré maturados em fluido folicular. **In: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, n.3, 2003.
- SANTOS, J.E.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. **ARQUIVOS DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE VETERINÁRIA**, 26, 1998, *Anais...* Atibaia, p.19-89, 1998.
- SANTOS, R.A.; TEIXEIRA, J.C.; ABREU, L.R. et al. Efeito de diferentes doses de somatotropina bovina (rBST) na produção e composição do leite. **Ciência Agrotecnica**. v.25, n.6, p. 1435-1445, 2001.
- SCARAMUZZI, R.J; MURRAY, J.F.; DOWNIN, J.A. et al. The effects of exogenous growth hormone on follicular steroid secretion and ovulation rate in sheep. **Domestic Animal Endocrinol**, v.17, p.269-277, 1999.
- SENEDA, M.M; ESPER, C.S.; GARCIA, J.M. et al. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v.67, p.37-43, 2001.
- SENEDA, M.M; ESPER C.R.; GARCIA, J.M. et al. Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 23, n. 1, p. 101-110, 2002.
- SPICER, L. J.; TUCKER, W. B.; ADAMS, G. D. Insulin-like growth factor-I in dairy cows: relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. **Journal of Dairy Science**, v.73, p.929-937, 1990.
- TSAFRIRI, A; BAR-ANHI, S; LINDNER, H.R. Control of the development of meiotic competence and of oocyte maturation in mammals. In Beier MM LH (eds), **Fertilization of the Human Egg In Vitro**, 1983.

- TANNER, J.W.; HAUSER, S.D. Molecular evidence for the presence of the somatotropin receptor in the bovine ovary. **Journal of Dairy Science**, v.67, p. 413-420, 1989.
- THATCHER, W. W.; DE LA SOTA, R. L.; SCHMITT, T. C. et al. Journal of Dairy Science troll and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility. **Reproduction Fertility and Development**, v. 83, n.7- 8, p. 203–217, 1996.
- VAN DEN HURK, R; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63. p.1717-51, 2005.
- VASSENA, R.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J. et al Ultrasound image characteristics of ovarian follicles in relation to oocyte competence and follicular status in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 76, n.1-2, p. 25-41, 2003.
- VIANA, J.H.M.; BOLS, P.E.J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus – oócitos por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (supl 1),P.1-4, 2001.
- VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FERREIRA, A.M.; et al. Ovarian pre-stimulation with FSH, active immunization against inhibin and follicular aspiration results in Gir cattle (*Bos indicus*). **Theriogenology**, v. 57, p. 630, 2002.
- WEBB, R.; GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. **Theriogenology**, v.41, p.24-30, 1994.
- WEEB, R.; ARMSTRONG, D.G. Control of ovarian function: effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. **Livestock of Production Science**, v.53, p.95-112, 1998.
- WEEB, R.; GOSDEN, R.G.; TELFER, E.E. et al. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Animal Science**, v.68, p.257-284, 1999.

RESUMO

Somatotropina bovina recombinante sobre a produção de embriões bovinos *in vitro*

O Experimento foi realizado na Fazenda Cesumar, de outubro a dezembro de 2006, objetivando avaliar o efeito da aplicação de Somatotrofina Recombinante Bovina (rBST) na produção de embriões *in vitro*. Foram realizadas 50 aspirações foliculares, utilizando 25 animais Nelore, sendo que 13 delas foram controles e 12 animais que receberam de 500 mg de rBST (Boostin®, Shering) cinco dias antes da aspiração. Decorridos 30 dias da primeira aspiração, os animais foram invertidos de tratamento e realizada outra aspiração. Os folículos maiores que 3 mm foram aspirados com auxílio de ultrasson aloka SSD 500 e os oócitos avaliados e, posteriormente, maturados e fertilizados *in vitro* e os presumíveis zigotos cultivados por 192 horas. Não houve efeito da aplicação do rBST administrado cinco dias antes da aspiração na quantidade de oócitos viáveis, inviáveis e totais, bem como no número de blastocistos expandidos e eclodidos. Todavia, o número de embriões viáveis total foi maior ($p < 0,07$) nos animais que receberam o rBST. Desta forma, conclui-se que a aplicação do rBST não influenciou no número de oócitos aspirados, mas aumentou o número de embriões viáveis produzidos.

Palavras chaves: oócitos, qualidade, quantidade, reprodução.

ABSTRACT

Recombinant bovine somatotropin on bovine s in vitro embryo production

The experiment was conducted at Cesumar farm from October to December 2006, to evaluate the effect of rBST on embryos production in vitro. 50 follicular aspirations were performed using 25 animals of Nellore breed, where 13 were animals controls and 12 received 500 mg of rBST (Boostin ®, Shering) administrated five day before aspiration. Elapsed 30 days after, first aspiration the treatment were reversed and another aspiration was carried out. Follicles larger than 3 mm were aspirated with the animals have aspirated with Aloka SSD 500 ultrasond seamer and the recovered oocytes were matured and fertilized *in vitro* and the presumptive zygotes were cultured for 192 hours. There was no effect of rBST on the viable, un viable and the total oocytes number and on the expanded and hatched blastocysts number. However, the number of viable embryos was higher ($p < 0.07$) in animals that received the rBST. Thus we can conclude that the application of rBST did not increase the number of aspirated oocytes, but the other hand there was an increase on the viable embryo production.

KEYWORDS: oocytes, quality, quantity, reproduction.

Introdução

O Brasil tem se destacado na transferência de embriões *in vivo* (TE) e *in vitro* (PIV), contribuindo com, aproximadamente, 50% do total de embriões produzidos no mundo (Baruselli et al, 2005). De acordo com Viana e Bols (2005), o aumento expressivo na produção de embriões da América do Sul e África e os índices de produção *in vitro* variam de 25% a 40%. A PIV é uma ferramenta que serve para aumentar o potencial reprodutivo das fêmeas consideradas excepcionais (Gonçalves et al., 2002). O sucesso dessa técnica está na dependência da quantidade e qualidade de oócitos que são obtidos através da técnica de aspiração folicular orientado por ultrassonografia (OPU), técnica desenvolvida na década de 1980 (Galli et al., 2001).

O tratamento de doadoras com Somatotropina Recombinante Bovina (rBST) e o poder para aumentar o número de folículos ovarianos antrais foi repetidamente relatados por diversos autores (Tanner & Hauser, 1989; Gong et al., 1991). Buratini et al. (1999) observaram aumento no número de folículos menores que 3 mm, acompanhado de elevação das concentrações plasmáticas do hormônio do crescimento e do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I). Estes autores sugerem que a associação de aspiração folicular e do tratamento com a BST podem ser utilizados com êxito em protocolos superovulatórios de bovinos.

A administração de rBST aumenta a síntese hepática de IGF-I e conseqüentemente as concentrações plasmáticas (Gong et al., 1991; McGuire. et al. 1992). As mudanças nas concentrações sanguíneas das proteínas carreadoras de IGF (IGFBPs) podem modificar as ações do IGF-I no sangue ou nos tecidos (Clemmos, 1998; Webb et al., 1999). Ademais, o aumento da síntese e secreção de IGF-I aumentam a atividade de diversas rotas metabólicas, tais como a gliconeogênese e a lipólise (Etherton & Bauman, 1998).

IGF-I é um potente regulador da foliculogênese no bovinos (Adashi, 1992; Webb, 1998; Armstrong *et al.*, 2000; O'Callaghan *et al.*, 2000). No entanto, o sistema IGF-I é regulado pela associação das IGFBP1-6, que determina a biodisponibilidade de IGF-I para estimular o crescimento folicular (De La Sota *et al.*, 1996).

Ao nascerem, as fêmeas bovinas contém cerca de 150.000 folículos primordiais nos ovários, número que diminui para cerca de 3.000 aos 15 e 20 anos de idade (Bao & Garverck, 1998). Os folículos primordiais entra constantemente no pool de folículos em crescimento, dos quais, 99% tornam-se atresícos (Ireland, 1987).

O crescimento folicular ocorre em ondas que pode variar de duas a três durante um ciclo estral completo (Santos & Amstalden, 1998). Segundo Ginther *et al.* (1989), nos ciclos estrais com duas ondas, a primeira inicia-se no dia zero (D0 - estro) e a segunda no dia dez (D10), e no caso de três ondas de crescimento folicular a primeira inicia-se no D0 (estro), a segunda no dia nove (D9) e a terceira no dia dezesseis (D16).

A qualidade do oócito está relacionada à capacidade de ser fertilizado e sustentar, eficazmente, o desenvolvimento embrionário subsequente, envolvendo características do próprio oócito e do ambiente uterino (Martins *et al.*, 2002).

Desta forma, objetivou-se, com este trabalho, avaliar a administração de rBST sobre a qualidade e a quantidade de oócitos obtidos de doadoras da raça Nelore, bem como os embriões produzidos *in vitro* a partir dos oócitos.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Centro de Biotecnologia do Cesumar - Biotec, localizado na estrada Morangueira, lote 31/35, Maringá, PR, tendo sido realizado de outubro a dezembro de 2006.

Foram utilizadas 25 fêmeas adultas, da raça Nelore, Puras de Origem (PO), com idade entre 4 e 7 anos, com peso médio de 600 Kg, com condição corporal entre 6 e 8 nas escala de 1 a 9, submetidas a exame ginecológico completo antes de iniciar o experimento, estando todas elas com saúde reprodutiva normal.

Os animais foram mantidos em piquetes de gramínea Cost-Cross, recebendo sal mineral à vontade, contendo 123 g de Cálcio e 90 g de fósforo, mais microminerais (Fosbovi Reprodução - Tortuga®)

As fêmeas foram distribuídas, aleatoriamente, em dois tratamentos: 1) 13 animais controle e 2) 12 animais tratados com de 500 mg de somatotropina Bovina

recombinante (rBST), por via subcutânea, administrado cinco dias antes da data de aspiração (Shering - Boosting®)

Para sincronizar a onda folicular das vacas foram utilizados implantes de progestágenos na face externa da orelha (3mg Norgestomet, Crestar®) e administração intramuscular de 2 mg de Benzoato de Estradiol (Estrogin®), juntamente com 500 mg de somatotropina bovina recombinante – 2 ml (BST - Boostin®) por via subcutânea, na fossa ísquio-retal no grupo tratamento, e no grupo controle 2 mL de solução fisiológica, por via subcutâneo na fossa ísquio-retal, como placebo.

A colheita dos oócitos foi realizada cinco dias após a aplicação do rBST. Os animais receberam uma anestesia epidural à base de lidocaína, sem vaso constritor, a 2% (Bravet®), antes da aspiração. Os oócitos foram obtidos através da aspiração folicular com ultrassom Aloka 500®, equipado com transdutor setorial intravaginal de cinco MHz e dispositivo com agulha WTA® 20G para punção folicular, conectado a uma bomba de vácuo (Cook®), com pressão de 40 a 50 mm de Hg. Foram aspirados todos os folículos que eram visualizados no equipamento.

Os oócitos foram aspirados em uma solução contendo 2% de soro fetal bovino (Nutricell), 25 UI/ mL de heparina sódica (Liquemine) e 98,0% de PBS (Nutricell), evitando a coagulação sanguínea no interior do sistema de aspiração.

O material aspirado foi imediatamente transferido para o filtro de colheita de embriões e lavado com a mesma solução utilizada durante a aspiração. O sedimento restante no filtro foi observado em placas de Petri e efetuado, a busca e contagem dos oócitos com posterior classificação da qualidade. Os oócitos foram classificados de acordo com sua morfologia (número de camadas de células do *cumullus* e aspecto do citoplasma) em graus I, II e III, desnudo (oócitos sem *cumullus*- s/c), expandidos (exp), degenerados (deg) e atrésicos (atr), conforme Lonergan (1992). Os oócitos considerados viáveis foram classificados como I, II e III, lavados em solução comercial MIV-T (Nutricell) e transportados em criotubos (Corning®), para o laboratório, contendo meio de maturação em banho maria a 35°C.

A maturação foi realizada em TCM199 (nutricell) com sais de Earles, glutamina e NaHCO₃, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 22 µg/mL piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg de FSH/mL, 50 µg de LH/mL e 1 µg de estradiol/mL, mantidos em estufa, a 39°C, 5% de CO₂ em ar com máxima umidade, durante 22 a 24

horas. Os oócitos foram colocados em microgotas de 90 µL de meio de maturação, coberta por óleo mineral.

A fecundação foi realizada em 100 µL de meio FERT-TALP suplementado com 10 µg/mL de heparina, 22 µl/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, albumina sérica bovina-BSA (sem ácidos graxos), solução de PHE (2 µM de penicilina, 1 µM de hipotaurina e 0,25 µM de epinefrina). O sêmen foi de touro Nelore, descongelado em banho-maria a 35 °C, submetido à centrifugação em gradiente percoll (90 e 45%), durante 20 minutos. Utilizou-se 1×10^6 espermatozoides/mL, e os oócitos. Foram transferidos para as microgotas (20 oócitos/gota), onde permaneceram por 15 a 18 horas, a 39°C, em atmosfera com 5% de CO₂ em ar.

Após a fertilização, os zigotos foram cultivados *in vitro*, no meio SOF suplementado com SFB, com monocamada de células da granulosa, por 15 horas, em incubadora, com atmosfera gasosa contendo 20% CO₂, em ar, com máxima umidade. Decorridas 48 horas, avaliou-se a taxa de clivagem e realizou-se a renovação do meio de cultivo. Nesse período, quando ocorre a clivagem, observam-se embriões com duas, quatro e oito células. Durante a avaliação da clivagem, retiraram-se as estruturas não clivadas da gota, por liberarem metabólitos prejudiciais aos embriões em desenvolvimento e foram feitas duas outras avaliações, nos estágios de mórula (oito células) e blastocisto inicial.

O delineamento experimental foi um sistema de Cross-Over, inteiramente casualizado, em que os tratamentos iniciais, após trinta dias sem receber os tratamentos, foram invertidos. Os dados foram submetidos à análise da variância, sendo considerados os efeitos dos tratamentos (com e sem rBST), com 12 e 13 repetições, respectivamente, e para a comparação das médias foi utilizado o teste de F.

O modelo utilizado está descrito abaixo.

$$Y_{ij} = \mu + t_i + e_{ij}$$

em que:

Y_{ij} = observação no animal j submetido ao tratamento i;

μ = constante geral;

t_i = efeito do tratamento i; $i = 1; 2; \dots$

e_{ij} = erro aleatório associado a cada observação Y_{ij} .

Resultados e discussão

Existem fatores técnicos que influenciam o resultado da aspiração folicular. O sucesso da aspiração folicular é medido, parcialmente, pela taxa de recuperação de oócitos, o qual é calculado pela quantidade de oócitos obtidos com base no número de folículos aspirados. Essa taxa é influenciada pela visualização de folículos no monitor do ultrassom, pelo diâmetro, bisel e corte da agulha, vácuo exercido pela bomba de aspiração e experiência do operador. Além dos fatores técnicos, há fatores biológicos que exercem grande influência nos resultados, da taxa de recuperação e também no desenvolvimentos embrionário, destacando-se a qualidade dos oócitos, frequência e momento da aspiração folicular, fisiologia animal, condição corporal, raça e idade da doadora (Bols et al., 1995).

Pode-se observar, na Tabela 1, que não houve efeito da aplicação da Somatotropina Recombinante Bovina (rBST) na quantidade de oócitos de nível I, II, III desnudo, degenerado e no número de oócitos totais em vacas da raça Nelore ($p>0,07$). Ramos et al. (2007) e Sá Filho (2006) também não encontraram efeito da aplicação de rBST no número e qualidade dos oócitos aspirados, apesar de alguns trabalhos (Buratini et al., 1999, Kozicki et al., 2005) terem encontrado aumento no número de folículos recrutados, e esse aumento parece ser mediado pelo aumento das concentrações de IGF-I e insulina, combinado com as observações de Pivato (2006), de que tais hormônios atuam juntos na proliferação e esteroidogênese em cultivos de células da granulosa de bovinos. Todavia, isto parece não refletir na quantidade dos oócitos que são aspirados. Acredita-se que o rBST pode alterar a morfologia da parede folicular ou do complexo cumulus-oócito, direta ou indiretamente, pela ação do fator de crescimento tipo insulina Tipo I (IGF-I), resultando no impedimento da recuperação de oócito (Tripp et al., 2000). O rBST tem mostrado ser capaz de expandir as células do cumulus, *in vitro* (Izadyar et al., 1996), o que pode ter contribuído para a retenção do oócito no folículo aspirado. Isto também se aplica na superovulação e transferência de embriões, pois a aplicação do rBST aumenta o número de folículos recrutados, mas não a produção de embriões (Nagano et al., 2004; Borges et al., 2001), o que contraria os resultados obtidos por Peres (2003) de aumento de oócitos e qualidade I e embriões.

Em relação à qualidade dos oócitos, também não houve efeito ($p>0,07$) da aplicação de rBST no número de oócitos de nível I, II e III (Tabela 1) porque não

aumentou a porcentagem de oócitos viáveis, classificados como grau I, II e III. Por outro lado, Bols et al. (1998) e Tripp et al. (2000) evidenciaram melhora na qualidade dos oócitos ao utilizarem rBST antes da aspiração folicular. Roth et al. (2002), trabalhando com aspiração folicular, verificaram que utilizando duas doses de rBST durante o outono houve aumento na qualidade dos oócitos, que são prejudicados pelo estresse calórico do verão.

TABELA 1 - Efeito da aplicação de 500mg de rBST cinco dias antes da aspiração no número médio e qualidade média de oócitos viáveis em vacas da raça Nelore, resultante de duas aspirações por animal

Classificação de oócitos	Controle	rBST ⁶	EPM ⁷
Oócitos nível I ¹	5,28	5,40	0,9508
Oócitos nível II ²	2,16	2,84	0,4853
Oócitos nível III ³	6,36	6,64	1,3321
Oócitos desnudo ⁴	0,48	1,08	0,4282
oócitos expandidos ⁵	0,92	1,60	0,3672
Oócitos totais viáveis	15,20	17,56	2,5807

(p<0,07).

¹Nível 1: Cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células.

²Nível 2: Cumulus parcialmente compacto, contendo menos de 3 camadas de células.

³Nível 3: Cumulus com menos de três camadas.

⁴Desnudo: sem a presença de cumulus.

⁵Expandido: cumulus presente mais expandido.

⁶rBST: Somatotropina Recombinante Bovina.

⁷EPM: Erro padrão da média.

Em relação ao número de oócitos inviáveis (atrésicos ou degenerado), também não houve diferença de tratamento, conforme se observa na Tabela 2. Isso pode estar relacionado à quantidade de oócitos viáveis que também não apresentou efeito de tratamento (p> 0,07).

TABELA 2 - Efeito da aplicação de 500mg de rBST cinco dias antes da aspiração no número médio de oócitos inviáveis em vacas da raça Nelore

Classificação de oócitos	Controle	rBST ¹	EPM ²
Oócitos atrésico	0,40	0,84	0,3973
Oócitos degenerado	1,24	0,80	0,4458
Oócitos totais inviáveis	1,64	1,64	0,6791

(p<0,07)

¹rBST: Somatotropina Recombinante Bovina

²EPM: Erro padrão da Média

Pode-se verificar, na Tabela 3, que os animais ao receberem 500 mg de rBST cinco dias antes da aspiração folicular apresentaram aumento (p<0,07) no número de blastocistos iniciais e no número de embriões totais. No entanto, a aplicação de rBST, em vacas da raça Nelore não alterou o número de blastocistos, blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos (p<0,07).

Ramos et al. (2007), trabalhando com vacas da raça Gir, relataram que a aplicação de 160 mg de rBST quatro dias antes da aspiração folicular aumentou a taxa de clivagem e a produção de embriões. De acordo com os autores, este aumento pode estar relacionado à influência direta ou indireta no microambiente folicular e ou no próprio oócito. Suzuki et al. (2000) e Kuzima et al. (2007) também apontaram efeito positivo do hormônio de crescimento (GH) nos meios de maturação, fertilização e cultivo de oócitos bovino, o que se traduziu em maior proporção de embrião produzidos *in vitro*. Kuzmina et al (2007) verificaram que o GH influenciou a competência de desenvolvimento dos oócitos bovinos durante a maturação *in vitro* e que esse efeito pode ser modulado via célula da granulosa.

Entretanto, Pivato (2001), ao comparar vacas que foram aspiradas sob estimulação de gonadotrofinas associada com rBST ou sem rBST, observou que os animais tratados com rBST apresentaram maior número de ovócitos do que aqueles que não foram tratados, porém não houve diferença na taxa de clivagem e de blastocistos entre os grupos. Outro estudo comparando o efeito do rBST foi realizado por Bols et al. (1998) com vacas que receberam 640 mg de rBST, semanalmente, por 6 semanas consecutivas e vacas que receberam placebo, com aspirações duas vezes por semana, sendo que foi registrada diferença no número de ovócitos coletados nem no número de blastocistos por grupo. Já Peres (2003), administrando, em vacas de corte, suplementadas com 25% de energia além da requerida ou não, recebendo ou não 500 mg de somatotropina no terceiro dia e no sexto dias pós-parto, verificou, ao aspirar fêmeas aos dez dias pós-parto, que aquelas tratadas só com rBST obtiveram a média de 9,2 oócitos viáveis e 2,1 blastocisto, significativamente melhor que os demais resultados.

TABELA 3 – Efeito da Aplicação de rBST cinco dias antes da aspiração na produção de embrião produzidos *in vitro* em vacas da raça Nelore

Número de embriões	Controle	rBST ²	EPM ³
Número de animais	25	25	
Número de blastocisto inicial	0,24a	1,44b	0,3249
Número de blastocistos	1,28	1,64	0,3038
Número de blastocistos expandidos	1,28	1,76	0,4878
Número de blastocistos eclodidos	0,00	0,08	0,0565
Total de embriões viáveis	2,80a	4,84b	0,7699
Taxa de embriões viáveis (%) ¹	18,40	27,60	0,0583

^{a,b} Médias seguidas de mesma letra na mesma linha diferem entre si estatisticamente $p < 0,07$.

¹ Número de embriões viáveis em relação a quantidade de oócitos viáveis.

² rBST: Somatotropina Recombinante Bovina.

³ EPM: Erro padrão da Média.

O número de blastocisto inicial foi maior no grupo que recebeu 500 mg de rBST, o que é um bom sinal. Provavelmente, nos blastocistos obtidos expandidos ou eclodidos não foi detectado efeito, possivelmente em função da dispersão dos dados, ficando evidenciado, ao se avaliar o trabalho de Perez (2003), que houve efeito em todas as categorias.

Os blastocisto (Tabela 3) não foram influenciados pelo tratamento ($p>0,07$) resultados que são idênticos aos alcançados por outros autores (Bols et al., 1998, Tripp et al., 2000 Pivato; 2001; Perez, 2003). Mesmo não tendo diferença entre a quantidade de oócitos, na taxa de blastocisto, a quantidade de embriões viáveis foi maior no tratamento com rBST, devido às aspiração de maiores quantidade de oócitos viáveis.

CONCLUSÃO

O tratamento com 500 mg de rBST administrado cinco dias antes da aspiração folicular não alterou a quantidade e a qualidade de oócitos aspirados, mas aumentou o número de blastocistos iniciais e o de embriões viáveis totais produzidos a partir de oócitos colhidos de vacas Nelore.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

- ADASHI, E.Y. Intraovarian regulation: the IGF-I example. **Reproduction Fertility and Development**, v. 4, p. 497-504. 1992.
- ARMSTRONG, D.C.; McEVOY, T.G.; BAXTER, G. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production in vitro: association with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 1624-1632. 2000.
- BAO, B.; GARVERCK, H.A. Expression of steroidogenic enzymes and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, v. 76, p.1903-1921, 1998.
- BARUSELLI, P.S.; MARTINS, C.M.; SÁ FILHO, M.F. et al. Novos avanços nos ratamentos de doadoras e de receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33 (Supl 1), p.151-156, 2005.
- BOLS, P.E.J.; VANNDENHEEDE, J.M.M.; VAN SOOM, A. et al. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow.: a new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v.43, n.3, p.677-687, 1995.
- BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; LEIN, A et al. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocysts yield in an OPU-IVF program. **Theriogenology**, v. 49, p. 983-995, 1998.

- 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.
- BURATINI JR, J.; PRICE, C.A.; BÓ, G.A. et al. Os efeitos do BST e da ablação do folículo dominante sobre o desenvolvimento folicular. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, v. 27, n.1, p.147-162, 1999.
- CLEMMONS, D.R. Roles of insulin-like growth factor binding proteins in controlling of igf actions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.140, n.1-2, p. 19-24, 1998.
- DE LA SOTA, R.L.; SIMMEN, F.A.; DIAZ, T. et al. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 803-812, 1996.
- ETHERTON, T.D.; BAUMAN D.E. Biology of somatotropina in growth and lactation of domestic animals. **Physiology review**, v.3, p. 745-761, 1998.
- GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C. et al. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v.55. p.1341-1357. 2001.
- GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrus cycles with two and tree follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-230, 1989.
- GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L. et al. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FERITAS, V.J.F. (Eds.). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p.195-196, 2002.
- 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.

IRELAND, J.J. Control of follicular growth and development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.34, p.39-54, 1987.

IZADYAR, F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. In vitro maturation of bovine oocytes in presence of growth hormone accelerates nuclear maturation and promotes subsequent embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.372-377, 1996.

KOZICKI, L.E.; SEGUI, M.S.; FANTINI FILHO, J.C. et al. A somatotropina bovina (bST) e sua relação com o recrutamento folicular ovariano durante o ciclo estral de vacas. **Archives of Veterinary Science**, v.10, n.1, p. 35-44, 2005.

KUZMIDA, T.I. ALM, H. DENISENKO, V. et al. Effect of recombinant bovine somatotropin (rBST) **Journal Reproduction Dev.** V.53, 2007,

LONERGAN, P; MONAGHAN, P; RIZOS, D et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v.37, p.48–53, 2004.

MARTINS, O. G; PESTY, A.; GOUVEIA-OLIVEIRA, A. et al. Oocyte Ca²⁺-spike acquisition during *in vitro* development of early preantral follicles: influence of age and hormonal supplementation. **Zygote**, v.10, p.59-64, 2002.

MCGUIRE, M.A.; VICINI, J.L.; BAUMAN, D.E. et al. Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. **Journal of Animal Science**, v.70, n.9, p. 2901-2910, 1992.

NAGANO, A.Y.; WEISS, R.R.; BUCHELE, J.M. et al. A somatotropina bovina recombinante (rBST) na Superovulação de fêmeas bovinas. **Archives of Veterinary Science** v.9, n.2, p.101-106, 2004.

O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition hormone

concentration in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.118, p.303-313, 2000.

PEREZ, O. Oocyte production in the early postpartum cow. 2003. 1152f. Tese de Doutorado, Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 2003,

PIVATO, I. Efeito de diferentes tratamentos hormonais e da nutrição em doadoras de ovócitos na produção de embriões bovinos in vitro, 2001. 62 f. Tese de Doutorado (Biotecnologia), Centro de Biotecnologia. Universidade de Pelotas, Pelotas, 2001.

PIVATO, I. Aspiração Folicular em bovinos – Efeito do BST. Workshop de reprodução animal, Pelotas 2006.

RAMOS. A.A.; FERREIRA. A.M.; SÁ. W.F. et al. Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção in vitro de embriões em vacas Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p. 380-386, 2007.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BRAW-TAL, R. et al. A effect of treatment with follicle-stimulating hormone or bovine somatotropin on the quality of oocytes aspirated in the autumn from previously heat-stressed cow. **Journal of dairy Science**, v. 85, n.6, p. 1398-1405,2002.

SÁ FILHO, M.F. Efeito do Tratamento com somatotropina recombinante (BST) na população folicular e na produção in de embriões bubalinos, 2006. 98 f. (mestrado em reprodução animal). Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo,, 2006.

SANTOS, J.E.; AMSTALDEN, M. Effects of nutrition on bovine reproduction. In: ARQUIVOS DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE VETERINÁRIA, 26, Atibaia. *Anais...* 1998.p.19-89. 1998

- SUZUKI, T.; DONG, Y.J.; AONO, M. ET AL. In vitro production of bovine embryos in the presence of growth hormone in CR1aa or CR2aa medium using an improved portable CO2 incubator. **Theriogenology**, v.53, p. 301, 2000,
- TANNER, J.W.; HAUSER, S.D. Molecular evidence for the presence of the somatotropin receptor in the bovine ovary. **Journal of Dairy Science**, v.67, p. 413-420, 1989.
- 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, n8,p.1581-1590, 2000.
- VIANA, J.H.M.; BOLS, P.E.J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus – oócitos por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33 (supl 1), p.1-4, 2005.
- WEEB, R.; GOSDEN, R.G.; TELFER, E.E. et al. Factors affecting folliculogenesis in ruminants. **Animal Science**, v.68, p.257-284, 1999.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)