

MÁRCIO LEÃO FERRAZ

**Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares e do tratamento  
com somatotropina bovina recombinante na população folicular e  
na produção *in vitro* de embriões bubalinos**

**São Paulo**

**2008**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

MÁRCIO LEÃO FERRAZ

**Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares e do tratamento com somatotropina bovina recombinante na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

**Departamento:**  
Reprodução Animal

**Área de Concentração:**  
Reprodução Animal

**Orientador:**  
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

**São Paulo**

**2008**

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

#### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2021  
FMVZ

Ferraz, Márcio Leão

Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares e do tratamento com somatotropina bovina recombinante na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos / Márcio Leão Ferraz. – São Paulo : M. L. Ferraz, 2008.

130 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2008.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.  
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. OPU. 2. bST. 3. Búfalo. 4. Produção embrionária. I. Título.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**

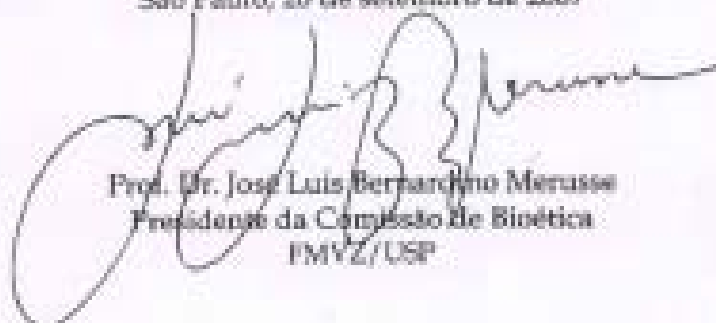
Comissão Bioética

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares e do tratamento com somatotropina bovina recombinante na população folicular, na qualidade e taxa de recuperação de óocitos e na produção *in vitro* embriões bubalinos", protocolado sob o nº1199/2007, utilizando 16 (dezesseis) búfalos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 19/09/07.

We certify that the Research "Effects between intervals of ovum pick-up and treatment with BST in follicular population, oocyte quality and recovery rate and *in vitro* embryo production of buffalos", protocol number 1199/2007, utilizing 16 (sixteen) buffalos, under the responsibility Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/19/07.

São Paulo, 20 de setembro de 2007



Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse  
Presidente da Comissão de Bioética  
FMVZ/USP

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: FERRAZ, Márcio Leão

Título: Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares e do tratamento com somatotropina bovina recombinante na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

A DEUS,

a meus pais, CARLOS OBERG FERRAZ e MARIA DE LOURDES LEÃO FERRAZ,

a minha santa, MARIA ROSA PEREIRA,

em gratidão ao que me fizeram ser,

OFEREÇO

À minha esposa, **ADRIANA HELENA DE SOUZA**, pela presença constante em minha vida, sempre iluminando meu caminho,

a meu querido filho, **VINÍCIUS DE SOUZA FERRAZ**, que, tão novo ainda, preencheu um vazio na minha vida, que eu nem sabia que existia,

pelo amor que me são, que tão pleno me tornam, a vocês

**DEDICO**



## AGRADECIMENTOS

Esta dissertação é resultado do trabalho em conjunto, da cooperação e da amizade de muitas pessoas antigas e novas na minha vida. Por isso, muitíssimo obrigado a todos aqueles de quem o apoio, a amizade e a compreensão foram decisivos e fizeram grande diferença. Sinceros agradecimentos

ao Prof. Dr. **PIETRO SAMPAIO BARUSELLI**,

pela oportunidade de aprendizado e de crescimento profissional, pela seriedade com o nosso projeto, pelo grande apoio praticado exaustivamente, pelo amigo, pelo educador que é, por todas as sugestões para tornar minha formação técnica e pessoal mais completa, pela compreensão, confiança e respeito com o meu trabalho e minha vida. Faltam palavras para agradecer por tudo e me sinto honrado de ter convivido com alguém que admiro tanto, como profissional e como gente,

aos amigos e proprietários da Vitrogen: **ANDRÉ DAYAN, YEDA FUMIE WATANABE e MICHELE RODRIGUES WATANABE**,

pelo apoio nas várias etapas deste e de outros trabalhos, desde sempre confiando em mim; por disponibilizar seu laboratório e equipe, que foi essencial para minha formação. Pela amizade, apoio e ensinamentos de tantos anos de ótima convivência.

a todo o grupo de trabalho e amigos da Vitrogen,  
em especial àqueles que participaram diretamente deste trabalho, sem os quais seria impossível de se realizar: **DANIEL CARLINO, EVA CRISTIANE, MÔNICA ACCORSI, RICARDO FAVATI, TATIANA TONELLO, BEATRIZ, ALINE DANTAS** Obrigado pela oportunidade da convivência, risadas e, principalmente, pela ajuda incondicional durante o desenrolar da fase experimental. Espero que tenham aprendido tanto quanto eu com as dificuldades, divergências, risadas e trabalho em conjunto. Mais uma vez, agradeço ao grande amigo que descobri durante esse trabalho em equipe, **DANIEL CARLINO**, que, nunca demonstrou sequer um traço de desânimo em todo o seu apoio, imprescindível para este trabalho

à Sra. **WILMA PENTEADO**, proprietária da Fazenda Santa Eliza,  
pela disponibilização das búfalas e pelo seu exemplo de vida, com tanta paixão pela bubalinocultura,

aos funcionários da Fazenda Santa Eliza, em especial a **DORICO, CARLINHOS e LAERTE**,

pelo apoio e disposição durante todo o período experimental

ao Sr. **OTÁVIO BERNARDES**,

por ceder gentilmente as doses de sêmen utilizadas neste trabalho e pelo conhecimento dividido em tão pouco tempo de contato,

aos amigos de trabalho, ANDERSON E ANA PAULA ARAÚJO,

que sempre me ajudaram, ajudam e ajudarão com muita vontade e interesse no difícil dia a dia da prestação de serviços em Reprodução Animal,

a toda minha família,

meus irmãos CYRO, CÁSSIO, ANÁLIA, SÉRGIO, ANA MARIA, MARIA DULCE

minha tia e madrinha DULCE

meus sogros SEBASTIÃO e MARTA

meus cunhados GEORGIA, GESIANE, ROBERTO, JÚLIO, CRESSONI, CLEUCIMAR,  
GEISE, RICARDO, ANA MIRNA

meus sobrinhos MARIANA , VÍTOR, RAFAEL, GABRIELA, FELIPE, LUIGI, GUILIA,  
PIETRA, ALEXANDRE

e todos os tios e tias, primos e primas que de alguma forma fizeram parte de todo esse sonho,

aos Professores Doutores JOSÉ ANTÔNIO VISINTIN, MAYRA, HELENA ORTIZ  
D'ÁVILA ASSUNÇÃO, FLÁVIO VIEIRA MEIRELLES, MÁRIO BINELLI, ED  
HOFFMANN MADUREIRA, RUBENS PAES DE ARRUDA, e todos os professores,  
funcionários e alunos da USP, que passo a considerar como novos amigos e colegas, pelo  
carinho, amizade e exemplo de dedicação e profissionalismo com o sistema educacional,

aos todos colegas e amigos de pós-graduação, especialmente, MANOEL FRANCISCO DE SÁ FILHO, LINDSAY UNO GIMENEZ, NÉLCIO ANTÔNIO TONIZZA DE CARVALHO, HENDERSON AYRES, JOSÉ NÉLIO DE SOUZA, GABRIEL CREPALDI, EVERTON LUIS REIS, JOSÉ RIBAMAR TORRES JÚNIOR, LUIZ FERNANDO NASSER

pela preciosa ajuda e por todas as dicas, mesmo à distância, fundamentais para a conclusão deste trabalho. Pela amizade que nasceu desse contato e pelo futuro que nos espera,

ao Prof. JACOMINI

pelo apoio e contribuição na finalização deste projeto,

à Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal e a todos os professores, funcionários e alunos, em especial ao Prof. Dr. JOAQUIM MANZANO GARCIA,

pela minha formação acadêmica, onde iniciei meu caminho pela profissão de Médico Veterinário,

Um agradecimento especial às secretárias do Departamento de Reprodução Animal da USP-SP, HARUMI SHIRAISHI e THAÍS SOTO, pela competência e compreensão com que me ajudaram nas horas mais difíceis da burocracia,

às funcionárias da Seção de pós-graduação, sempre atenciosas e pacientes com as minhas solicitações,

às funcionárias da Biblioteca da USP-VETERINÁRIA  
pela paciência, carinho e atenção e por todos os serviços prestados,

e a todos aqueles que direta ou indiretamente estiveram envolvidos na realização desse projeto de pesquisa e de vida e que, por acaso, eu tenha deixado de mencionar aqui.

Ando devagar porque já tive pressa  
levo esse sorriso porque já chorei demais  
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe  
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, eu nada sei..

[...]

Penso que cumpri a vida seja simplesmente  
compreender a marcha ir tocando em frente  
como um velho boiadeiro  
levando a boiada eu vou tocando os dias  
pela longa estrada eu vou, estrada eu sou

[...]

Ando devagar porque já tive pressa  
levo esse sorriso porque já chorei demais  
cada um de nós compõe a sua história  
cada ser em si carrega o dom de ser capaz  
de ser feliz

“Tocando em frente”- Almir Sater

## RESUMO

FERRAZ, M. L. **Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares e do tratamento com somatotropina bovina recombinante na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos.** [Effect of OPU interval and recombinant bovine somatotropin treatment on embryo production in buffalo]. 2008. 135 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Foram avaliados os efeitos do intervalo entre aspirações foliculares (IEA; OPU) e do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) na produção *in vitro* de embriões bubalinos. Dezesesseis fêmeas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos (fatorial 2x2): (1) G-Cont7: sessões de OPU uma vez por semana; (2) G-bST7: sessões de OPU uma vez por semana + 500mg de bST a cada 14 dias; (3) G-Cont14: sessões de OPU a cada 14 dias e (4) G-bST14: sessões de OPU + 500mg de bST a cada 14 dias. Os animais do G-Cont7 e G-bST7 foram submetidos a 16 sessões de OPU, e os animais do G-Cont14 e G-bST14 a oito sessões de OPU. Nas sessões realizadas uma vez por semana (G-s/bST) reduziu-se o número de folículos aspirados, de oócitos totais recuperados e de oócitos viáveis ( $P \leq 0,004$ ). O tratamento com bST aumentou o número de folículos aspirados ( $P < 0,0001$ ), o total de oócitos recuperados e a taxa de recuperação ( $P = 0,07$ ). No entanto, nem o IEA e nem o tratamento com bST aumentaram a produção *in vitro* de embriões bubalinos.

Palavras-chave: OPU. bST. Búfalo. Produção embrionária.

## ABSTRACT

FERRAZ, M. L. **Effect of OPU interval and recombinant bovine somatotropin treatment on embryo production in buffalo.** [Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares e do tratamento com somatotropina bovina recombinante na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos]. 2008. 135 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

It was evaluated the effect of OPU interval and bST treatment on embryo production in buffalo. Sixteen females were randomly assigned in 4 groups, in a 2x2 factorial experimental design: (1) G-Cont7: OPU session each seven days; (2) G-bST7: OPU session each seven days plus 500mg of bST each 14 days; (3) G-Cont14: OPU session each 14 days and (4) G-bST14: OPU session plus 500mg of bST each 14 days. Animals of G-Cont7 and G-bST7 were submitted to 16 OPU sessions, and those of G-Cont14 and G-bST14 to 8 OPU sessions. The OPU session performed every week (G-s/bST) decreased the number of aspirated follicles, and the number of total and viable recovery oocytes ( $P \leq 0.004$ ). The treatment with bST increased the number of aspirated follicles ( $P < 0.0001$ ), the number of recovery oocytes and the oocyte recovery rate ( $P = 0.07$ ). However, neither OPU interval nor bST treatment increased the *in vitro* embryo production in buffalo.

Key words: OPU. bST. Buffalo. Embryo production.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diagrama experimental do uso ou não de bST em fêmeas bubalinas submetidas a aspiração folicular a cada sete ou 14 dias..... 70

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação oocitária segundo Lonergan (1992).....	76
---	----

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Efeitos do intervalo entre aspirações e do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) no número de folículos aspirados (média±EPM) em fêmeas bubalinas. A) OPU realizada em intervalos regulares de sete dias; B) OPU realizada em intervalos regulares de 14 dias (\* =  $p < 0,05$ ) - Dourado - 2007..... 83
- Gráfico 2 - Efeitos do intervalo entre aspirações e do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) no número de oócitos viáveis (média±EPM) em fêmeas bubalinas. A) OPU realizada em intervalos regulares de sete dias; B) OPU realizada em intervalos regulares de 14 dias (\* =  $p < 0,05$ ) - Dourado - 2007..... 85
- Gráfico 3 - Efeitos do intervalo entre aspirações e do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) no número de número de embriões em D7 (média±EPM) em fêmeas bubalinas. A) OPU realizada em intervalos regulares de sete dias; B) OPU realizada em intervalos regulares de 14 dias (\* =  $p < 0,05$ ) - Dourado - 2007..... 89
- Gráfico 4 - Efeitos do intervalo entre aspirações e do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) na população folicular, qualidade oocitária e produção de blastocisto em D7 (média±EPM) em fêmeas bubalinas. Letra distinta denota diferença entre os grupos ( $P < 0,05$ ) - Dourado - 2007..... 90
- Gráfico 5 - Efeitos do intervalo entre aspirações na população folicular, qualidade oocitária e produção de blastocisto em D7 (média±EPM) em fêmeas bubalinas. Letra distinta denota diferença entre os grupos ( $P < 0,05$ ) - Dourado - 2007..... 91

Gráfico 6 - Efeitos do tratamento com somatotopina bovina recombinante (bST) na população folicular, qualidade oocitária e produção de blastocisto em D7 (média±EPM) em fêmeas bubalinas. Letra distinta denota diferença entre os grupos ( $P < 0,05$ ) - Dourado - 2007..... 92

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos do intervalo entre aspirações e do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) na produção <i>in vitro</i> de embriões bubalinos ( <i>Bubalus bubalis</i> ) - Dourado - 2007.....	93
Tabela 2 - Efeitos do intervalo entre aspirações na produção <i>in vitro</i> de embriões bubalinos ( <i>Bubalus bubalis</i> ) - Dourado - 2007.....	95
Tabela 3 - Efeitos do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) na produção <i>in vitro</i> de embriões bubalinos ( <i>Bubalus bubalis</i> ) - Dourado - 2007.....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS

bFGF	fator de crescimento fibroblástico
BI	Blastocisto
BMP15	Proteína morfogenética óssea
BSA	Albumina bovina sérica
bST	Somatotropina bovina recombinante
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CL	corpo lúteo
COC	Complexos <i>cumulus</i> -oócito
DNA	ácido desoxiribonucléico
DPBS	Solução salina fosfatada
EGF	fator de crescimento epidermal
FD	Folículo dominante
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FO	Folículo ovulatório
FS	Folículos subordinados
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDF9	Fator de crescimento de diferenciação 9
GH	Hormônio do crescimento
IA	Inseminação artificial
IGFBP-2	proteínas de ligação ao IGF – 2
IGFBP-3	proteínas de ligação ao IGF – 3
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-II	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
IL-1 $\beta$	Interleucina -1 $\beta$
IL-6	Interleucina -6
LH	Hormônio luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
Mo	Mórula
NO	Óxido nítrico
OPU	“ <i>Ovum Pick-Up</i> ”
<i>P</i>	Probabilidade

PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
RGD	Registro Geral Definitivo
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucléico mensageiro
SAS	Sistema de análise estatística
SC	Subcutâneo
SFB	Soro fetal bovino
SOV	Superovulação
TE	Transferência de embrião
TGF- $\alpha$	Fator de crescimento e de diferenciação celular – $\alpha$
TCM	meio de cultura tecidual
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
USP	Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	25
2	<b>HIPÓTESES DO TRABALHO</b> .....	29
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	30
4	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	31
4.1.	FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA BÚFALA.....	31
4.1.1	<b>Anatomia dos Ovários</b> .....	31
4.1.2	<b>Foliculogênese</b> .....	31
4.1.3	<b>Dinâmica Folicular</b> .....	35
4.1.4	<b>Ciclo Estral</b> .....	36
4.2	ASPIRAÇÃO FOLICULAR E PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.	37
4.2.1	<b>Histórico</b> .....	37
4.2.2	<b>Recuperação de complexos <i>cumulus</i>-oócito</b> .....	40
4.2.2.1	Variáveis biológicas que afetam a aspiração folicular .....	41
4.2.2.1.1	<i>Disponibilidade de folículos para aspiração</i> .....	41
4.2.2.1.2	<i>Recuperação oocitária</i> .....	44
4.2.2.1.3	<i>Competência oocitária</i> .....	46
4.2.3	<b>Intervalo entre aspirações</b> .....	52
4.3.	AÇÃO HORMONAL DA SOMATOTROPINA.....	55
4.3.1	<b>Somatotropina bovina recombinante (bST)</b> .....	56
4.3.2	<b>Fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I)</b> .....	60
4.3.3	<b>Utilização de bST em programas de aspiração folicular</b> .....	63
5	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	66
5.1	LOCAL DO EXPERIMENTO.....	66
5.2	ANIMAIS.....	66
5.2.1	<b>Doadoras de oócitos</b> .....	66
5.2.2	<b>Touro</b> .....	67
5.2.2.1	Avaliação do sêmen na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	67
5.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	68
5.3.1	<b>Grupos experimentais</b> .....	68
5.3.2	<b>Intervalo entre aspirações foliculares (IEA)</b> .....	69
5.3.3	<b>Tratamentos</b> .....	71
5.4	PROCEDIMENTOS.....	71



<b>5.4.1</b>	<b>Avaliação da população folicular.....</b>	<b>71</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Aspiração folicular (OPU).....</b>	<b>72</b>
5.4.2.1	Montagem dos equipamentos e preparo dos meios de aspiração.....	72
5.4.2.2	Preparo dos Animais.....	73
5.4.2.2.1.	<i>Sedação</i> .....	73
5.4.2.2.2	<i>Anestesia</i> .....	73
5.4.2.2.3.	<i>Higienização da doadora</i> .....	74
<b>5.4.2.3</b>	<b>Aspiração Folicular.....</b>	<b>74</b>
5.4.2.4	Manipulação e classificação dos oócitos aspirados.....	75
<b>5.4.3</b>	<b>Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....</b>	<b>77</b>
5.4.3.1	Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	77
5.4.3.2	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	78
5.4.3.3	Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	79
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	79
<b>6</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
6.1	ESCOLHA DO ACASALAMENTO.....	81
6.2	RESULTADOS DO PERÍODO EXPERIMENTAL.....	82
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>108</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>109</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos 40 anos a população mundial de búfalos, estimada em 170 milhões de cabeças, cresceu cerca de 90%, em contraste aos 34% registrados na população de bovinos, sendo que, somente na última década, o rebanho bubalino apresentou taxa de crescimento de 9,1% (FAO, 2005; PERERA et al., 2005). A produção de leite bubalino registrou aumento de 70,6% nos últimos anos, sendo, atualmente, responsável por 12,4% da produção mundial de leite (FAO, 2005).

A introdução do búfalo no Brasil ocorreu por volta de 1895, e vem tornando-se, nas últimas décadas, fonte viável de proteína animal, tendo se adaptado bem às condições climáticas, resultando em bom desempenho produtivo para carne e leite (BARUSELLI, 1994). Sua população no país tem mostrado crescimento expressivo (MATTOS, 1992), em função desta dupla aptidão produtiva. Segundo a Associação Brasileira de Criadores de Búfalos, a população de bubalinos estimada no Brasil é de aproximadamente quatro milhões de animais (ABCB, 2004), com crescimento acumulado de 1.806 % entre 1961 e 2005, um resultado sem precedentes na evolução de outras espécies de interesse econômico exploradas no país (BERNARDES, 2007).

Desta forma, é de se esperar que a bubalinocultura obtenha marcantes progressos tecnológicos, entre os quais estão os avanços na aplicação de biotecnologias da reprodução, visando aumentar a produção e a produtividade dos rebanhos visto que, apesar desse panorama promissor, existe pouca seleção genética para essa espécie no Brasil e no mundo (VALE; RIBEIRO, 2005).

No rebanho brasileiro, detentor do maior potencial zootécnico do mundo ocidental para a espécie, existe poucos animais selecionados geneticamente para melhoria das características produtivas e reprodutivas. Este potencial genético necessita ser multiplicado mais rapidamente por meio de biotecnologias, visando aumentar o rigor e a velocidade de seleção, utilizando fêmeas bubalinas de alto valor genético-produtivo e reduzindo o intervalo entre gerações (BARUSELLI, 1997).

No Brasil, o potencial genético masculino é explorado com certo sucesso pela inseminação artificial, em contraste ao da fêmea, que necessita ser efetivamente multiplicado por biotecnologias da reprodução como a aspiração folicular associada à produção *in vitro* de embriões (OPU-PIVE; BARUSELLI; CARVALHO, 2003). Assim, com o intuito de alcançar a disseminação rápida desse potencial produtivo, os programas de OPU-PIVE são considerados biotecnologias promissoras, uma vez que a superovulação (SOV) e a transferência de embriões (TE) ainda não são procedimentos bem-sucedidos (GASPARRINI, 2002; OHASHI et al., 2002; DROST, 2007). Desde o início dos trabalhos com SOV para TE (DROST et al., 1983), as búfalas apresentaram baixa eficiência devido à reduzida resposta à SOV e à baixa recuperação de embriões (CARVALHO et al., 2002) e menores taxas de prenhez em comparação com a fêmea bovina, provavelmente por problemas na captação e/ou transporte dos oócitos pela tuba uterina (MISRA et al., 1998; BARUSELLI; CARVALHO, 2003). Tais resultados não favorecem, portanto, a utilização em grande escala destas técnicas em bubalinos (OHASHI et al., 2003).

A utilização das técnicas de OPU-PIVE na espécie bubalina foi relatada pela primeira vez por Boni et al., em 1993 e, desde então, tem sido descrita por diversos autores (BONI et al., 1994, 1995, 1997, 1999; PAVASUTHIPAISIT et al., 1995; GALLI, 1998, MANNIK et al., 2002; 2001; NEGLIA, 2003; FERRAZ et al., 2005;

GUPTA et al., 2006; SÁ FILHO, 2006). No entanto, a técnica não está completamente aprimorada para aplicação na espécie bubalina, principalmente devido à baixa quantidade e qualidade dos oócitos recuperados por sessão de aspiração e aos meios de cultivo dos oócitos e embriões (MEUR et al., 1988; GASPARRINI, 2002; NEGLIA et al., 2003; OHASHI et al., 2003; ZICARELLI, 2003; GUPTA et al., 2006). Desta forma, embora o processo de OPU-PIVE venha obtendo algum sucesso em produzir embriões (TOTEY et al., 1992; BONI, 1994; BONI et al., 1994, 1999; MADAN et al., 1996; CHAUHAN et al., 1997a, b; MADAN, 1998; GASPARRINI, 2000; GASPARRINI et al., 2000, 2001; OHASHI, 2002; SÁ FILHO, 2006) e prenhez em búfalas (MADAN et al., 1994; TOTEY et al., 1996; CHAUHAN et al., 1997b; GRUPTA et al., 2006; SÁ FILHO, 2006), a eficiência, em termos de embriões transferíveis e desenvolvimento a termo, tem sido muita baixa (MADAN et al., 1996; GRUPTA et al., 2006; SÁ FILHO, 2006). No entanto, apesar da produção embrionária ser de 1,8 a 2,8 menor do que em bovinos, ainda é cerca de duas a três vezes maior do que em sistemas de produção *in vivo* (SOV-TE; ABOUL- ELA, 2000).

Algumas particularidades anatômico-fisiológicas da espécie bubalina afetam diretamente a eficiência dos programas de OPU-PIVE. Ovários de fêmeas bubalinas apresentam tamanho e peso menores que os de bovinos (VITTORIA et al., 1997). A população folicular de búfalas possui número bastante reduzido (DANELL, 1987), se comparado ao número de folículos relatado em fêmeas bovinas (ERIKSON, 1966). Ademais, um aspecto importante para se obter melhores resultados na OPU-PIVE é a qualidade dos oócitos recuperados e búfalas apresentam alto grau de atresia na população folicular (LE VAN TY et al., 1989). Ohashi et al. (2003) relataram que oócitos bubalinos obtidos por OPU apresentam reduzido número de camadas de

células do *cumulus* e baixo grau de compactação, sendo que somente 38,4% do total de oócitos são considerados aptos ao cultivo.

Com base nestes conhecimentos, fica evidente que o sucesso da OPU-PIVE em búfalas depende de estratégias que propiciem um incremento na população folicular, ao mesmo tempo em que melhorem a qualidade oocitária.

Em bovinos, tanto o intervalo entre sessões de OPU quanto o tratamento com somatotrofina bovina recombinante (bST) podem influenciar a população folicular, a quantidade e qualidade de oócitos recuperados, bem como a taxa de produção embrionária (TRIPP et al., 2000; BURATINI JR et al., 2000; MERTON et al., 2003).

Em búfalas, o tratamento com bST aumenta a população folicular em fêmeas superovuladas e em novilhas submetidas a sessões de OPU (BARUSELLI et al., 2003). Também apresenta tendência em aumentar o número de oócitos recuperados por sessão de OPU e a proporção de oócitos de boa qualidade (SÁ FILHO, 2006).

Poucos são os relatos sobre o efeito do intervalo entre OPU nesta espécie. Sá Filho (2006) descreveu efeito da sessão de OPU em intervalos curtos (3 ou 4 dias), com diminuição gradativa do número de folículos aspirados e do resultado da PIVE a cada sessão. Gupta et al. (2006), por sua vez, demonstraram não haver efeitos adversos sobre o crescimento folicular ou a taxa de recuperação de oócitos quando as sessões de OPU foram realizadas em intervalos de sete dias.

Neste contexto, procurou-se avaliar, em búfalas, a influência da administração de bST e da frequência de OPU na população folicular, na qualidade dos oócitos, na taxa de recuperação e na produção *in vitro* de embriões bubalinos, já que estudos sugerem a interferência destes fatores na produção de embriões bovinos por OPU-FIV (FERRAZ et al., 2000, 2002).

## 2 HIPÓTESES DO TRABALHO

As hipóteses que pautaram este trabalho foram:

- O intervalo de 14 dias entre sessões de aspiração folicular e o tratamento com bST aumentam o número de folículos recrutados, o número e a qualidade dos oócitos aspirados e a eficiência da produção *in vitro* de embriões na espécie bubalina.

### 3 OBJETIVOS

Para testar as hipóteses deste trabalho, os seguintes objetivos foram traçados:

- Avaliar os efeitos da frequência de aspiração folicular, comparando intervalos de sete e 14 dias, na população folicular, na qualidade oocitária e na produção *in vitro* de embriões.
- Avaliar os efeitos da administração subcutânea (SC) de bST a cada 14 dias na população folicular, na qualidade oocitária e na produção *in vitro* de embriões.

## **4 REVISÃO DE LITERATURA**

### **4.1 FISIOLOGIA REPRODUTIVA DA BÚFALA**

#### **4.1.1 Anatomia dos ovários**

As particularidades anatômicas e fisiológicas do ovário da espécie bubalina estão diretamente relacionadas aos resultados obtidos nos programas de aspiração folicular. O ovário das búfalas é alongado e consideravelmente menor em tamanho e peso (30,0 x 14,0 x 10,0 mm e 2,9 a 6,1 g) em comparação com a gônada da fêmea bovina (37,0 x 25,0 x 15,0 mm e 5,0 a 15,0 g; VITORIA, 1997; EI-WHISHY, 2007).

O corpo lúteo (CL) da búfala é profundamente incorporado ao estroma ovariano, sendo seus valores máximos para peso (2,3 g) e diâmetro (15,0 mm) menores que em bovinos (ROY; MULLICK, 1964). A distribuição entre os lados de ovulação, indicada pela presença de CL, é similar nos ovários esquerdo (51,2%) e direito (48,8%; DANELL, 1987).

#### **4.1.2 Foliculogênese**

O estudo da foliculogênese em bubalinos é de grande importância, pois esta espécie possui capacidade reprodutiva inferior aos bovinos, com folículos ovarianos



em menor quantidade e qualidade, por isso apresentando resposta insatisfatória às biotecnologias de SOV-TE e OPU-PIVE.

A maioria ou mesmo todos os folículos primordiais são formados durante a vida fetal em algumas espécies como suínos e ruminantes, porém, em coelhos e roedores, aparecem durante a vida neonatal, sendo seu número variável de acordo com a espécie e com a idade. Os fatores responsáveis pelo início do crescimento são desconhecidos e representam um dos enigmas da biologia ovariana (TELFER, 1998). De acordo com Saumande (1991), a população de folículos ovarianos é heterogênea e varia de acordo com o grau de crescimento destes folículos, que são classificados em: pré-antrais ou não cavitários (primordiais, primários e secundários), diferenciados pela forma e pelo número de camadas de células da granulosa, que circundam o oócito; e folículos antrais ou cavitários (terciários e de De Graaf).

El-ghannam e El-naggar (1974, 1975) iniciaram os estudos sobre foliculogênese em fetos bubalinos, descrevendo seu início e desenvolvimento sem, no entanto, quantificá-la. Estudos posteriores relataram que a população total de folículos primordiais é estimada em 19.000 (SAMAD; NASSERI, 1979) sendo que os ovários esquerdo e direito apresentam números similares de folículos primordiais, com 49,3% e 50,7%, respectivamente (DANELL, 1987). Em animais adultos, a população de folículos primordiais em fêmeas cíclicas foi estimada em 12.636 e em não cíclicas 10.132, com uma variação individual ampla entre 1.222 e 40.327 (DANELL, 1987).

Comparativamente, a população folicular em bovinos é muito maior (LE VAN TY et al., 1989; SMITH et al., 1991; KUMAR et al., 1997), estimada em aproximadamente 235.000 folículos e também marcada por uma grande variação individual (entre 0 a 720.000), influenciada por fatores como raça, genética, idade e

estados sanitário, clínico e reprodutivo do animal (BETTERIDGE et al., 1989). Erickson, em 1966, registrou que o número médio de folículos primordiais em bovinos decresce de 133.000 ao nascimento para menos de 3.000 aos 20 anos de idade. Estes resultados são semelhantes ao de Gougeon e Chainy (1987) em humanos, que citam que a população total de folículos ovarianos e o número de cada tipo de folículo diminuem significativamente com o aumento da idade. A porcentagem de folículos primordiais diminui significativamente com o aumento da idade, enquanto a porcentagem de folículos primários e secundários aumenta, visto que os folículos primordiais evoluem para primários e secundários.

Em relação aos folículos antrais, os ovários bubalinos possuem cerca de 20% ( $47,5 \pm 23,8 \times 233,0 \pm 95,8$ ) da quantidade encontrada em ovários de bovinos. A média do número de folículos visíveis na superfície de cada ovário é de  $5,2 \pm 1,0$  (KUMAR et al., 1997). Esses resultados apontam para a possibilidade de o reduzido número de folículos na búfala ser o responsável pela limitada resposta à superovulação.

Smith et al. (1991) obtiveram diferentes resultados quando fizeram a quantificação folicular em búfalas de 6 ou 7 meses, 2 anos, 7 ou 8 anos e 12 a 14 anos observando 71.042,00 ( $\pm 14.696$ ), 41.478 ( $\pm 33.102$ ), 5.996 ( $\pm 2.517$ ) e 3.673 ( $\pm 1.970$ ) folículos primordiais, respectivamente, sendo que esta diferença pode ser explicada pelas ondas de degeneração que ocorrem durante a vida pré-natal em bubalinos (EL-GHANNAM; EL-NAGGAR, 1974, 1975).

Kacinskis et al. (2005) registraram que os resultados da morfometria de folículos de búfalas são próximos aos obtidos em vacas bovinas adultas, com folículo primordial medindo  $36,0 (\pm 0,9) \mu\text{m}$  de diâmetro, oócito  $28,1 (\pm 0,6) \mu\text{m}$ , com  $7,3 (\pm 0,4)$  células da granulosa; folículo primário com  $48,5 (\pm 1,4) \mu\text{m}$  de diâmetro,

oócito  $31,7 (\pm 0,7) \mu\text{m}$  e  $14,6 (\pm 0,7)$  células da granulosa; folículo secundário com  $88,4 (\pm 2,9) \mu\text{m}$  de diâmetro, oócito  $43,8 (\pm 1,4) \mu\text{m}$  e  $62,0 (\pm 4,6)$  células da granulosa. Estes resultados são próximos aos de Gougeon e Chainy (1987) em mulheres adultas, que observaram diâmetro folicular dos folículos primordial, primário e secundário entre  $30,0$  e  $42,5 \mu\text{m}$ ,  $37,5$  e  $52,5 \mu\text{m}$  e  $50,0$  e  $90,0 \mu\text{m}$ , respectivamente.

Segundo Danell (1987), o número de folículos com diâmetro maior que  $1,0$  mm é diferente entre as espécies bovina e bubalina, com os bovinos possuindo aproximadamente  $90,0$  destes folículos, enquanto as búfalas apresentam apenas  $46,3$ . O autor contou folículos maiores que  $1,0$  mm ( $46,3 \times 67,8$ ) e folículos maiores que  $2,0$  mm ( $16,8 \times 23,6$ ). A avaliação do número de folículos ovarianos maiores que  $2,0$  mm em três diferentes períodos do ciclo estral revelou maior número entre os dias 1 e 8 e 9 e 11 do ciclo estral do que entre os dias 12 e 21. Folículos grandes ( $7,0$  a  $8,0$  mm) podem ser palpados durante os dias 9 e 13 do ciclo estral em  $65\%$  de novilhas búfalas púberes (SINGH et al., 1984).

Existem, ainda, diferenças no número de folículos atrésicos entre as duas espécies, sendo  $2/3$  dos folículos em desenvolvimento nos bubalinos e  $50\%$  nos bovinos (DANELL, 1987). A proporção média de folículos antrais que pareciam ser atrésicos, histologicamente, foi de  $71\%$  em búfalas de rio (DANELL, 1987), comparada a  $82\%$  ( $71\%$  durante a fase folicular e  $94\%$  durante a fase luteínica) em búfalas de pântano (OCAMPO et al., 1994). Estudos demonstram ainda que a média do número de folículos não atrésicos ( $> 1,7$  mm), envolvidos na resposta ovariana à gonadotrofinas exógenas é de  $2,9$  para búfalos e de  $22,1$  para bovinos (DANELL, 1987; LE VAN TY et al., 1989).

### 4.1.3 Dinâmica folicular

Dinâmica folicular pode ser definida como o processo contínuo de crescimento e de regressão de um grupo de folículos antrais, dos quais somente um se desenvolve até folículo pré-ovulatório (LUCY et al., 1992).

Estudos endocrinológicos e ultra-sonográficos demonstraram que o crescimento folicular durante o ciclo estral em bovinos ocorre em ondas (FORTUNE, 1988; SAVIO et al., 1988; GINTHER et al., 1989; SIROIS; KNOPF et al., 1989; DRIANCOURT et al., 1991; FORTUNE et al., 1991). Em cada onda de crescimento folicular, um folículo dominante (FD) se desenvolve mais que os outros e suprime o crescimento dos folículos menores (folículos subordinados - FS). Os FD que crescem e atingem seu diâmetro máximo no meio do ciclo estral, sob ação de níveis altos de progesterona, não ovulam e regridem, permitindo o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular. O FD que se desenvolve durante a última onda de crescimento folicular de cada ciclo estral é o folículo ovulatório (FO - LUCY et al., 1992).

Os primeiros trabalhos relacionados ao crescimento folicular em bubalinos foram realizados por Singh et al. (1984), que observaram a presença de estruturas ovarianas durante o ciclo estral em novilhas da raça Surti. Os autores constataram que 65,4% das novilhas cíclicas apresentavam folículos maiores que 8,0 mm no meio do ciclo, entre o 9º e o 13º dia. Outros registros de dinâmica folicular demonstram que esta espécie apresenta desenvolvimento ovariano semelhante aos bovinos, apesar de o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular ser menor em búfalas do que em fêmeas bovinas (BARUSELLI et al., 1997).

Assim, as diferenças fase-dependentes no número e qualidade de folículos antrais relatadas nestes estudos respaldam a hipótese de que o desenvolvimento folicular ocorre num padrão de ondas em búfalas, similar a bovinos. Embora a ocorrência de duas ondas foliculares seja a mais relatada em fêmeas bubalinas (MANIK et al, 1994; BARUSELLI et al., 1997; ALI et al., 2003), também foi observado o padrão de uma (BARUSELLI et al., 1997) ou três ondas (MANIK et al., 1994; BARUSELLI et al., 1997). Danell (1987) também observou a presença de duas ondas de crescimento folicular em novilhas bubalinas: a primeira onda com início entre o 3º e o 4º dia após o estro, permanecendo até o 13º dia do ciclo e a segunda começando no 9º dia, mantendo-se até o término do ciclo estral.

#### **4.1.4 Ciclo estral**

A baixa eficiência reprodutiva em búfalas está diretamente relacionada com a sua produtividade. Dentre os fatores relacionados a esse desempenho reprodutivo estão: maturidade tardia inerente, pobre expressão de cio no verão, padrão reprodutivo sazonal e intervalo entre partos prolongado (MADAN; RAINA, 1984; MADAN, 1988).

Existem evidências de que, na espécie bubalina, o estro possui intensidade menor do que na bovina. Enquanto na fêmea bovina o comportamento de estro é previsível, na búfala, ao contrário, é muito variável e, por este motivo, é difícil prever o momento exato da ovulação, provavelmente ocorrendo ao final do período estral (ZICARELLI, 1997). No Brasil, observando visualmente o estro de búfalas quatro vezes ao dia, Baruselli (1994) verificou duração média de  $14,7 \pm 7,3$  horas,

com a ovulação ocorrendo  $16,9 \pm 6,5$  horas após o final do estro. Na Itália Seren e Parmeggiani (1997) encontraram média de 20 horas, com variação de 4 a 64 horas. Os autores verificaram que a ovulação ocorreu em média 54,6 horas após o início do estro.

A grande variação da duração do estro dos bubalinos (6 a 48 horas) torna o manejo de sua detecção mais trabalhoso e dificulta o emprego da inseminação artificial. Os bubalinos são poliéstricos estacionais de dias curtos, semelhantemente aos ovinos e caprinos, apresentando aumento da atividade reprodutiva nos meses de outono e inverno (BARUSELLI et al., 1996).

Assim, dentre os fatores que afetam a eficiência reprodutiva de rebanhos bubalinos, a detecção de cio é o que mais se destaca, devido à apresentação de sintomatologia discreta e a necessidade de pessoal mais capacitado para sua identificação (BARUSELLI et al., 1997; ZICARELLI et al., 1997).

## 4.2 ASPIRAÇÃO FOLICULAR E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

### 4.2.1 Histórico

A técnica de aspiração folicular guiada por ultra-sonografia foi desenvolvida na década de 80 do século passado, para atender à demanda por um procedimento de coleta de complexos *cumulus*-oócito (CCO) que fosse menos traumática que as abordagens cirúrgica ou por laparoscopia até então utilizadas, em humanos (VIANA; BOLS, 2005). Em 1987, Callesen et al. relataram pela primeira vez a utilização da técnica de aspiração folicular guiada por ultra-som para a recuperação de oócitos

bovinos em novilhas superestimuladas. A aspiração foi realizada no período pré-ovulatório, resultando em 42% de taxa de recuperação. A aspiração folicular orientada por ultra-som foi posteriormente adaptada para uso veterinário (PIETERSE et al., 1988), passando a ser denominada “Ovum pick-Up” (OPU).

Dentre as principais vantagens da técnica, está o fato de ser pouco invasiva, não depender de pré-estimulação hormonal e poder ser utilizada em qualquer fase do ciclo estral e, também, em animais pré-púberes e em início de gestação (VIANA; BOLS, 2005). Assim, esta técnica resolveu o principal problema relacionado ao uso comercial da fecundação *in vitro* (FIV) que era a recuperação de CCO em doadoras vivas, passando a ser considerada a melhor alternativa aos programas clássicos de produção de embriões por SOV (BOUSQUET et al., 1999), sendo rapidamente reconhecida como a técnica de eleição para a recuperação de CCO (GALLI et al., 2001).

A OPU foi usada pela primeira vez em fêmeas bubalinas em 1993, por Boni et al. (1994) que avaliaram o efeito da estimulação hormonal com a utilização de FSH em fêmeas Ítalo-Mediterrâneas em anestro. Desde então, a OPU tem sido aplicada em búfalas com relativo sucesso (PAVASUTHIPAISIT et al., 1994; BONI et al., 1995, 1997, 1999; GALLI, 1998; NEGLIA et al., 2003, 2004; FERRAZ et al.; 2005; GUPTA et al., 2006, SÁ FILHO, 2006), ainda que a eficiência seja menor que em bovinos, em termos de folículos aspirados e de oócitos viáveis para PIVE.

No Brasil, 40% dos embriões de bovinos transferidos em 2004 foram produzidos *in vitro* (CAMARGO et al., 2006), mostrando que a PIVE vem sendo utilizada com sucesso como instrumento para melhorar a produção no rebanho bovino. Entretanto, em bubalinos, a PIVE ainda apresenta limitações para uso comercial (OHASHI, 2006).

Apesar dos esforços dos pesquisadores do mundo todo, até o momento poucos bezerros bubalinos produzidos inteiramente pelo processo de OPU-PIVE foram obtidos. As primeiras descrições da aplicação da técnica de FIV em bubalinos foram feitas por Majundar et al. (1988) e Singh et al. (1989). Estes autores utilizaram oócitos maturados *in vitro*, fecundados com sêmen congelado e cultivados *in vitro* do estágio de zigotos até o estágio de mórula. Suzuki et al. (1991) relataram a primeira gestação em búfalas com embrião produzido *in vitro*, enquanto o primeiro registro de nascimento de um bezerro bubalino foi realizado na Índia, por Madan et al. (1991), mas com oócitos obtidos de ovários de matadouro.

Em 1998, na Itália, foi relatado pela primeira vez o nascimento de três bezerros de nove embriões transferidos após a associação de OPU com PIVE em búfalas. Nesta experiência, os CCO recuperados foram maturados e fecundados *in vitro*, sendo que o cultivo *in vivo* foi realizado em oviduto de ovelha (GALLI et al., 1998). Em 2003, Zicarelli et al. relataram o nascimento de dois bezerros produzidos *in vitro*, cujos embriões haviam sido vitrificados e transferidos para as receptoras, entretanto, cerca de vinte dias após o nascimento, os bezerros morreram.

Hufana-Duran et al. (2004) relataram taxa de gestação de 16,36% para embriões bubalinos vitrificados (9/55), dos quais foram obtidos seis bezerros normais (10,91%). No Brasil, Baruselli (2004) obteve gestação de três animais (9,4%) dos 32 embriões bubalinos transferidos após vitrificação. Em 2005, Baruselli e Carvalho relataram o nascimento de dois bezerros bubalinos produzidos pelo processo de PIVE. Sá Filho et al. (2006) obtiveram 14% de prenhez (1/7) com embriões bubalinos produzidos *in vitro* e transferidos a fresco e 8% de prenhez (2/25) quando foram transferidos após vitrificação.



Entretanto, apesar do marcante progresso nos processos de aspiração folicular, maturação e fecundação *in vitro*, os embriões bubalinos ainda apresentam baixa qualidade, evidenciando a necessidade de aprimoramentos nas diferentes etapas do processo de PIVE.

Para que a técnica de OPU-PIVE se torne uma alternativa viável para a produção de embrião na espécie bubalina é necessário que alguns pontos críticos sejam sanados, entre eles, a elaboração de meios mais adequados e específicos para o processo de capacitação espermática e cultivo dos gametas e embriões e a utilização de animais em boas condições de manejo e alimentação, resultando em blastocistos de melhor qualidade com maior taxa de prenhez e desenvolvimento normal da gestação (OHASHI, 2006).

#### **4.2.2 Recuperação de complexos *cumulus*-oócito**

A otimização da recuperação de CCO e, conseqüentemente, o sucesso da aspiração folicular transvaginal depende de dois fatores principais: fatores físico/mecânicos (aparelho de ultra-som, procedimento de aspiração, pressão de aspiração, tipo de agulha e conseqüentes aprimoramentos nos equipamentos utilizados para OPU) e fatores biológicos (espécie, raça e idade da doadora, pré-estimulação hormonal ou fase do ciclo estral) diretamente relacionados ao desenvolvimento e maturação intra-ovarianos de folículos e oócitos (BOLS et al., 1997; SÁ FILHO, 2006).

No que concerne aos fatores mecânicos, estes já foram intensamente estudados levando ao desenvolvimento, aprimoramento e/ou adaptação de diversas opções em sistemas de aspiração folicular, atualmente já testadas e plenamente

estabelecidas e difundidas (VIANA; BOLS, 2005). Entretanto, levando-se em conta os índices atualmente obtidos nas etapas de laboratório, o sucesso da PIVE está diretamente relacionado ao número e qualidade dos CCO que são destinados ao cultivo.

#### 4.2.2.1 Variáveis biológicas que afetam a aspiração folicular

##### 4.2.2.1.1 Disponibilidade de folículos para aspiração

As características físicas dos equipamentos de ultra-sonografia como, por exemplo, a formação da imagem e sua resolução, possibilitam apenas a identificação e, conseqüentemente, a aspiração dos folículos em fase antral e com diâmetro superior a dois milímetros (VIANA; BOLS, 2005). No entanto, estes folículos são representativos de uma pequena fração do total de folículos presentes nos ovários, sendo que seu número depende da mobilização da reserva ovariana, do desenvolvimento folicular nas fases iniciais e de sua associação com o *status* metabólico e endócrino da doadora e da dinâmica do crescimento na fase antral. Por esse motivo, uma das principais estratégias para melhorar a recuperação de CCO destinados à FIV é maximizar o número e qualidade de folículos em fase antral e, conseqüentemente, disponíveis para aspiração (VIANA; BOLS, 2005).

Em todas as fêmeas de mamíferos, a reserva de oócitos é estabelecida durante a vida fetal, sendo mobilizada gradualmente durante sua vida reprodutiva (VAN DER HURK, 2005). Apesar de ser uma das características mais importantes na determinação do potencial de uma determinada fêmea como doadora, quer seja

de oócitos ou embriões, não existe um procedimento preciso para sua avaliação *in vivo*. Na medicina humana, são adotados testes indiretos de reserva ovariana, baseados na relação inibina/FSH circulantes, mas com precisão limitada e objetivos diferentes. Contudo, parece haver uma relação entre tamanho da reserva de folículos primordiais e a proporção de folículos que iniciam seu desenvolvimento (HIRSHFIELD, 1994). Desta forma, o número de folículos em fase antral observado durante o ciclo estral pode refletir, pelo menos em parte, a reserva de folículos primordiais presente (GÜLEKLI et al., 1999).

Variações significativas no número de folículos em desenvolvimento nos ovários são relatadas entre indivíduos e entre raças (BONI et al., 1997) e a reserva ovariana pode ser a chave para explicar diferenças nos resultados de IA, SOV/FIV e TE obtidos em determinados grupamentos genéticos. Entretanto, em animais em produção esta relação pode ser obscurecida por diferentes fatores que interferem no processo de recrutamento folicular, como balanço metabólico, condição corporal, condições ambientais, entre outros (VIANNA; BOLS, 2005).

Os fatores responsáveis pelos estágios iniciais de desenvolvimento folicular são pouco conhecidos (FORTUNE, 2003). As fases iniciais do crescimento folicular não dependem da estimulação pelos hormônios hipofisários e são controladas por fatores intraovarianos. Diversos fatores com ação positiva (IGF-I, EGF, TGF- $\alpha$ , bFGF, GDF9, BMP15, ativina, IL-1 $\beta$ , NO) ou atretogênica (TNF- $\alpha$ , folistatina, andrógenos, radicais livres, IL-6) sobre o desenvolvimento e sobrevivência folicular vêm sendo caracterizados (ERICKSON; SHIMASAKI, 2001). A complexidade das interações entre estes fatores e a natureza autócrina e parácrina de sua ação, tornam a manipulação das fases iniciais do crescimento folicular bastante complexa. Neste contexto, o uso do bST em bovinos com o objeto de aumentar o número de

folículos em crescimento, efeito este atribuído ao aumento na concentração intra-ovariana de IGF-1, tem sido uma abordagem relativamente bem sucedida. Seu uso foi proposto como uma alternativa para maximizar os resultados da aspiração folicular (BURATINI JR. et al., 2000). Entretanto, os resultados desta e de outras estratégias de manipulação indireta das fases iniciais do crescimento folicular, como a indução de balanço energético positivo, são limitadas pela reserva ovariana das doadoras.

Quando o folículo atinge a fase antral, os fatores associados ao controle de seu crescimento são mais conhecidos e, conseqüentemente, mais controláveis. O número de folículos em fase antral varia ao longo do ciclo estral, em função do padrão de crescimento folicular característico dos bovinos e bubalinos (DRIANCOURT, 2001). Cada onda de crescimento folicular é caracterizada pela mobilização de um conjunto de folículos entre dois e quatro milímetros, diâmetro que também coincide com o estágio no qual o oócito adquire competência para sofrer maturação, meiose e manter o posterior desenvolvimento embrionário *in vitro* (HENDRIKSEN et al., 2004). Nesta fase, o estabelecimento da dominância folicular é o principal fator que afeta a qualidade do pool de folículos em desenvolvimento.

A dominância folicular, mecanismo de determinação da taxa de ovulação espécie-específica, baseia-se na inibição da liberação do FSH por meio da secreção de estradiol e inibina pelo FD (CROWE, 1999). Desta maneira, a presença de FD interfere tanto no número quanto na viabilidade dos folículos disponíveis para SOV (BUNGARTZ; NIEMANN, 1994) e também para aspiração folicular. A coleta de CCO no início do ciclo estral (coincidindo com a primeira onda de crescimento folicular), após a sincronização da onda de crescimento ou após a remoção mecânica do FD

resultam na recuperação de um maior número de CCO e/ou em um maior potencial de desenvolvimento *in vitro* dos mesmos (MACHATKOVA et al., 2000).

A redução do intervalo entre coletas sucessivas também tem sido utilizada para minimizar os efeitos da dominância folicular (PETYIM et al., 2003). Entretanto, a constante remoção dos folículos em desenvolvimento, combinada à ausência de CL, pode alterar o perfil endócrino e o padrão de crescimento folicular das doadoras (VIANA et al., 2004).

O aumento da concentração circulante de FSH pela administração de gonadotrofinas exógenas ou pela imunização contra inibina tem sido descrita como abordagem alternativa (BLONDIN et al., 2002; VIANA et al., 2003). Apesar do efeito positivo no número e qualidade dos CCO recuperados, esta estratégia apresenta alguns dos inconvenientes da produção de embriões pela SOV convencional, particularmente quanto ao intervalo necessário entre os tratamentos (GASPARRINI, 2006).

#### 4.2.2.1.2 *Recuperação oocitária*

A baixa taxa de recuperação de oócitos imaturos é o maior fator limitante na PIVE na espécie bubalina. Quando se emprega a OPU (folículos entre 2,0 e 8,0 mm de diâmetro) como método de recuperação oocitária, a média de recuperação de oócitos totais por ovário é variável: 0,7 (TOTEY et al., 1992), 1,7 (DAS et al., 1996), e 2,4 (KUMAR et al., 1997). Em função da alta incidência de atresia, a média de recuperação de oócitos de boa qualidade por ovário é ainda mais reduzida: 0,4 (TOTEY et al., 1992; MADAN et al., 1994), 0,9 (DAS et al., 1996), 1,76 (SAMAD et al., 1998), e 2,4 (GASPARRINI et al., 2000). A recuperação de oócitos é, portanto,

muito mais baixa quando comparada com a espécie bovina, na qual em média oito a 12 oócitos de boa qualidade são obtidos por ovário (GORDON, 1994).

Baruselli et al. (1997) observaram uma média de 7,6 folículos recrutados durante a primeira onda de desenvolvimento folicular em fêmeas bubalinas. Ohashi et al. (2003), utilizando ovários de matadouro obtidos de fêmeas bubalinas e fêmeas zebuínas observaram redução no número de folículos e oócitos recuperados por ovário na fêmea bubalina, em comparação com a zebuína ( $4,5 \pm 1,9$  x  $8,7 \pm 5,9$  folículos e  $2,2 \pm 1,1$  x  $4,1 \pm 2,3$  oócitos, respectivamente). Recentemente foi demonstrado reduzido número de folículos ovarianos (3,7) em fêmeas bubalinas ciclando e submetidas à sessão de aspiração folicular uma vez por semana (GRUPTA et al., 2006).

Essas informações não são surpreendentes se considerarmos alguns aspectos fisiológicos peculiares da espécie bubalina. Primeiro, observa-se menor número de folículos primordiais no ovário da búfala, variando de 10.000 a 19.000 (SAMAD; NASSERI, 1979; DANELL, 1987) em comparação aos 150.000 em bovinos (ERIKSON, 1966). Segundo, o número de folículos antrais é menor durante todo o ciclo estral (KUMAR et al., 1997). Danell (1987) e Le Van Ty (1989) observaram uma diferença de 20% no número de folículos antrais encontrados nos ovários bubalinos quando comparados aos ovários bovinos. Por último, existe alta incidência de atresia folicular, chegando a 82% *in vivo* (OCAMPO et al., 1994) ou 92%, como observado em ovários de matadouro (PALTA et al., 1998).

Diversos estudos têm demonstrado a influência do momento da onda folicular tanto na taxa de recuperação oocitária como na eficiência da produção embrionária (MACHATKOVÁ et al., 2000; SENEDA et al., 2001; VASSENA et al., 2003; HENDRIKSEN et al., 2004). O número de oócitos recuperados é maior quando a

aspiração é realizada na fase de desenvolvimento inicial da primeira onda de crescimento folicular (MACHATKOVÁ et al., 2004). Este resultado provavelmente é decorrente do maior número de folículos pequenos (4,0 mm), o que proporciona maiores taxas de recuperação (SENEDA et al., 2001).

#### 4.2.2.1.3 *Competência oocitária*

A diferença mais marcante entre os oócitos bovinos maturados *in vitro* e aqueles maturados *in vivo* é seu potencial de desenvolvimento, uma vez que não apresentam diferenças significativas no que diz respeito à maturação nuclear, taxas de fecundação e clivagem, sugerindo que as maiores diferenças encontram-se na maturação citoplasmática dos oócitos (HYTTEL et al., 1997). Ao reiniciar a meiose durante a maturação, tanto *in vivo* como *in vitro*, a habilidade de produzir proteínas nos oócitos não é afetada, porém, estes perdem a capacidade de sintetizar RNA (SIRARD; COENEN, 1994; BLONDIN; SIRARD, 1995; FOULADI NASHTA et al., 1998). Essa capacidade somente será restabelecida plenamente após a ativação do genoma do embrião, durante a fase denominada transição materno-zigótica, que no bovino ocorre no quarto ciclo celular, quando o embrião entra nos estágios de 8 a 16 células (BREVINI GANDOLFI; GANDOLFI, 2001).

O oócito é responsável por conter as instruções necessárias para dirigir as primeiras divisões zigóticas e a ativação do genoma embrionário (SIRARD, 2001). Antes da ativação do genoma do embrião, o desenvolvimento embrionário é suportado por RNA e proteínas maternas, sintetizados durante a oogênese.

No oócito, ao contrário do que ocorre com qualquer outra célula somática, o intervalo entre a síntese e a utilização do RNA e moléculas protéicas pode ser de

várias semanas. Existe uma série de estratégias para o armazenamento dessas moléculas em uma forma quiescente e seu emprego no tempo certo ao longo da maturação do oócito e desenvolvimento embrionário inicial (BREVINI GANDOLFI; GANDOLFI, 2001). A eficiência de tal armazenamento, assim como a reativação oportuna das moléculas armazenadas determina a qualidade do oócito e a sua competência para o desenvolvimento embrionário.

Dessa maneira o cultivo *in vitro* possibilita aos oócitos bovinos expressarem somente seu próprio potencial de desenvolvimento, de forma que a produção *in vitro* é limitada pelas características iniciais dos oócitos cultivados (SIRARD, 2001). Portanto, oócitos de boa qualidade, com boas características morfológicas e de desenvolvimento, são o primeiro requisito para o sucesso da produção *in vitro* de embriões (SENEDA et al., 2001).

Alguns estudos descrevem a relação entre o potencial de desenvolvimento do oócito e o diâmetro do folículo (OTOI et al., 1997) o que, indiretamente, aponta para uma conexão entre o crescimento do oócito e sua competência para o desenvolvimento após fecundação *in vitro* e cultivo. Yang et al. (1997) observaram taxas crescentes de maturação nuclear e desenvolvimento embrionário de oócitos oriundos de folículos com diâmetros de 1,0 até 8,0 mm. Essa informação corrobora aquela descrita por Pavlock et al. (1992), quando estes autores observaram que oócitos de folículos com 1,0 a 2,0 mm foram ineficientes em produzir embriões *in vitro*. Lonergan et al. (1994) experimentaram melhor desenvolvimento *in vitro* de oócitos recuperados de folículos maiores que 6,0 mm, comparados a oócitos de folículos de 2,0 a 6,0 mm. Outros estudos não encontraram diferenças na competência de oócitos oriundos de folículos de 3,0 a 5,0 mm ou 6,0 a 8,0 mm (BLONDIN; SIRARD, 1995; HAGEMANN et al., 1997). Essa discrepância deve estar



atribuída ao fato de que, naqueles estudos, folículos de 2,0 mm estavam inclusos no grupo de pequenos folículos, pois se sabe que estes oócitos não completaram sua fase de desenvolvimento e síntese de RNA e, portanto, não são competentes (HENDRIKSEN et al., 2000).

A influência do diâmetro do oócito na progressão da maturação nuclear e produção *in vitro* de embriões foi bem estudada por Hyttel et al. (1997) e Otoi et al. (1997). Os resultados descritos pelos dois grupos de pesquisadores foram bastante similares e sugerem que o oócito adquire a competência para reiniciar a meiose quando seu diâmetro atinge entre 110-115  $\mu\text{m}$ . Entretanto, o potencial de desenvolvimento embrionário se estabelece mais tardiamente, no momento em que o oócito alcança um diâmetro de 120  $\mu\text{m}$ . O crescimento do oócito e do folículo são eventos paralelos, de modo que o oócito atinge 110  $\mu\text{m}$  quando seu folículo atinge 3,0 mm e o diâmetro de 120  $\mu\text{m}$  para o oócito será encontrado em folículos maiores de 3,0 mm. A capacidade de progressão da meiose *in vitro* aumenta de 21,2% para 80,7% quando se utilizam oócitos com 120  $\mu\text{m}$  em relação aos com diâmetros inferiores a 100  $\mu\text{m}$  (FAIR et al., 1996).

Em fêmeas bubalinas, as taxas de fecundação, clivagem e desenvolvimento embrionário são aumentadas quando os CCO são obtidos de folículos grandes (>8,0 mm) em relação aos obtidos de folículos médios (3,0 a 8,0 mm) e pequenos (>3,0 mm), sendo que oócitos derivados de folículos médios promovem melhores resultados em relação aos de folículos pequenos (RAGHU et al., 2002). Neste mesmo estudo, os autores observaram relação entre o diâmetro do oócito e a taxa de produção de blastocistos. A média do diâmetro dos oócitos obtidos em diferentes diâmetros foliculares foi de 146,4  $\mu\text{m}$ , porém maiores taxas de blastocistos foram obtidas quando os oócitos alcançavam tamanhos superiores a 145  $\mu\text{m}$ . Yousaf e

Chohan (2003) sugerem que a capacidade oocitária em alcançar a maturação nuclear é dependente do diâmetro folicular e que os melhores resultados são obtidos quando se utiliza aspiração de folículos >4,0 mm de diâmetro.

Apesar do diâmetro folicular ser utilizado como indicativo da capacidade de desenvolvimento *in vitro* em bovinos, em geral 60 a 80% dos oócitos selecionados dos CCO coletados de folículos de 2,0 a 6,0 mm não se mostram competentes e portanto, não atingem o estágio de blastocisto (ZUELKE; BRACKET, 1993; SIRARD, 2001).

A aspiração folicular durante fases aleatórias do ciclo estral, pode gerar até 85% de oócitos atrésicos, já que o período de total eliminação do oócito leva cerca de uma a duas semanas (KRUIP et al., 1982). Portanto, a aspiração de folículos de mesmo diâmetro pode gerar diferentes resultados devido às grandes variações dos momentos fisiológicos (desenvolvimento e atresia) dos oócitos obtidos (VASSENA et al., 2003).

O CCO é a última porção do folículo a ser afetada pela atresia e, mesmo em estados avançados de atresia folicular, apenas 25% dos complexos apresentam sinais claros de degeneração (HENDRIKSEN et al., 2000). Folículos com mais de 73% de células apoptóticas ainda podem oferecer oócitos competentes (HAGEMANN et al., 1999). Os estágios iniciais de atresia folicular não afetam negativamente o potencial do oócito, pelo contrário, parecem estimular a competência do oócito para desenvolver-se (BLONDIN et al., 1997). A competência do oócito somente será comprometida por estágios avançados de atresia (HAGEMANN et al., 1999).

A atresia é predominantemente induzida durante a fase de dominância de uma onda folicular. Hagemann et al. (1999) avaliaram o efeito da dominância

folicular sobre a competência dos oócitos dos FS. As melhores taxas de produção de blastocistos foram obtidas de oócitos recuperados durante a fase de crescimento da onda folicular (dias 2 e 10 do ciclo) comparadas a de oócitos aspirados durante a fase de dominância (dias 7 e 15 do ciclo).

Hendriksen et al. (2000) compararam oócitos obtidos nos dias 2, 5 e 8 da onda folicular, a qual foi induzida pela ablação de todos os folículos grandes. Os resultados indicaram uma menor competência de oócitos recuperados durante a fase mais avançada de dominância (dia 8), em relação à fase de crescimento (dia 2) ou de dominância inicial (dia 5).

Essa variação pode estar diretamente relacionada ao fato de que o oócito, para ser fecundado *in vivo*, é obtido através da ovulação de um folículo saudável, durante uma fase específica do ciclo estral e os oócitos aspirados para a produção *in vitro* são obtidos de folículos em diferentes estágios do desenvolvimento (LONERGAN et al., 1994; HENDRIKSEN et al., 2000), em fases distintas do ciclo estral (MACHATKOVA et al., 1996), portanto expostos a diferentes concentrações de FSH, o que pode levar a uma diminuição na competência oocitária (MACHATKOVA et al., 2004).

Vários estudos têm demonstrado que a fase do ciclo estral e inclusive do desenvolvimento folicular influenciam a competência oocitária, uma vez que o diâmetro do folículo afeta diretamente o oócito (MACHATKOVA et al., 2004). Em alguns estudos (PAVLOK et al., 1992; LOONERGAN et al., 1994; ARLOTTO et al., 1996; HAGEMANN et al., 1999), observou-se que oócitos provenientes de folículos maiores se desenvolvem melhor *in vitro* e o aumento na produção de embriões de oócitos aspirados de folículos médios e grandes quando comparado a folículos pequenos. Provavelmente devido à fase de dominância do ciclo estral, na qual o FD

afeta negativamente a competência oocitária dos FS, é induzido o avanço no estágio de atresia (HENDRIKSEN et al., 2004). Machatkova et al. (1996), comparando a aspiração em diferentes estágios do ciclo estral, demonstraram que oócitos coletados nos dias 14 a 16 do ciclo apresentavam melhores índices de competência para o desenvolvimento até blastocisto quando comparados aos aspirados nos dias 7, 8 e 9. Por outro lado, oócitos coletados de folículos subordinados nos dias 2, 3 e, principalmente, no dia 7 da onda folicular, demonstram menor competência que aqueles recuperados no dia 5 (VASSENA, 2003).

Dessa maneira o desenvolvimento até blastocisto é significativamente maior em oócitos coletados durante a fase de crescimento folicular em comparação àqueles coletados na fase de dominância, independente do diâmetro do folículo, porém a competência oocitária tende a aumentar em oócitos oriundos de folículos maiores (HAGEMAN, 1999; MACHATKOVA et al., 2000).

Em bovinos, existe forte correlação entre morfologia e competência oocitária em termos de rendimento embrionário após PIVE (RAMOS et al., 2006). Chauhan et al. (1997) estabeleceram um esquema de classificação baseado na avaliação microscópica da morfologia oocitária, que pode ser usado para prever o rendimento embrionário em búfalas. Segundo os autores, os CCO são classificados em Grau 1 (CCO compactados, com massa do cumulus não expandida, tendo número de camadas de células do cumulus  $\geq 5$  e citoplasma homogêneo), Grau 2 (CCO com número de camadas de células do cumulus  $\leq 4$  e com citoplasma homogêneo) ou Grau 3 (oócitos sem células do cumulus e citoplasma heterogêneo). O fato das taxas de maturação e clivagem, assim como a proporção de embriões clivados que se desenvolvem aos estágios de mórula e blastocisto, decrescerem

linearmente de Grau I a Grau III faz deste um critério plenamente confiável (GASPARRINI, 2002).

#### 4.2.3 Intervalo entre aspirações

O êxito da associação entre as técnicas de OPU e PIVE depende da qualidade e da quantidade de oócitos recuperados, variáveis que, direta ou indiretamente, afetam a eficácia dos sistemas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* dos embriões (ARLOTTO et al., 1996; HENDRIKSEN et al., 2000).

Diversos fatores mecânicos relacionados ao procedimento de aspiração folicular já foram associados às alterações que ocorrem na taxa de recuperação oocitária, na integridade dos CCO e em seu potencial de desenvolvimento sob condições de cultivo *in vitro* (BOLS et al., 1996, 1997; HASHIMOTO et al., 1999; WARD et al., 2002). Contudo, uma expressiva parte da variação observada nos resultados de OPU parece estar relacionada ao estágio de desenvolvimento das populações foliculares ovarianas no momento em que são aspiradas.

Os bovinos apresentam ondas de crescimento e regressão de folículos ovarianos durante o ciclo estral (SIROIS; FORTUNE, 1988; KNOPF et al., 1989; TAYLOR; RAJAMAHENDRAN, 1991). De maneira similar, o padrão de duas e três ondas de desenvolvimento folicular já foi reportado em bubalinos (BARUSELLI et al., 1997; MANIK et al., 1998). Outros estudos têm demonstrado também a ocorrência de uma onda de desenvolvimento folicular em búfalos, (AWASTHI et al., 2006).

A seleção de FD, em sucessivas ondas foliculares, determina a flutuação no número e estágio de desenvolvimento dos folículos disponíveis para aspiração em diferentes momentos durante o ciclo estral (VIANA et al., 2004). A seleção do FD

também é apontada como uma das principais fontes de variação nos resultados de SOV (HAHN, 1992; ADAMS, 1994).

A retirada de populações foliculares por OPU resulta no estabelecimento de nova onda de desenvolvimento folicular (GARCIA; SALAHEDDINE, 1998), sendo esse procedimento também utilizado para sincronizar estágios de crescimento folicular (ADAMS, 1994; BO et al., 1995). O estágio de desenvolvimento dos folículos no momento subsequente à aspiração, em fêmeas submetidas a sucessivas sessões de OPU, depende do intervalo entre as aspirações (VIANA et al., 2004).

Diferentes programas de OPU foram avaliados em raças bovinas européias (*Bos taurus*) com intervalos variando entre dois e 100 dias, na tentativa de aumentar o número e qualidade dos oócitos recuperados (STUBBINGS et al., 1990; PIETERSE et al., 1991; GIBBONS et al., 1994; BONI et al., 1997; REIS et al., 2002; PETYIM et al., 2003).

Em bovinos, o intervalo entre aspirações sucessivas influencia tanto a qualidade quanto a quantidade de oócitos recuperados (MERTON et al., 2003). Após a aspiração dos folículos presentes no ovário a emergência de uma onda nova de desenvolvimento folicular é induzida em 1,5 dias (ADAMS et al., 1992). Um número maior de CCO por sessão é coletado em intervalos de sete dias em relação a intervalos de três ou quatro dias. No entanto, a qualidade morfológica dos oócitos, isto é, o número de células do *cumulus*, é melhor quando se empregam intervalos de três a quatro dias em relação aos de sete dias (MERTON et al., 2003).

Viana et al. (2004), avaliando vacas Gir sob condições tropicais, relataram que o intervalo entre aspirações a cada sete dias ou de três a quatro dias não afetou a qualidade de folículos aspirados. No entanto, quando a aspiração foi realizada a

cada sete dias, observou-se aumento no número de oócitos obtidos por sessão, resultando em maior taxa de recuperação. Os autores também observaram uma porcentagem maior de oócitos selecionados para produção *in vitro* quando as aspirações foram realizadas intensivamente, comparado a intervalos de sete dias, assim como uma produção embrionária maior.

Outros autores não observaram diferenças na utilização de diferentes intervalos entre as aspirações na quantidade de oócitos recuperados (GIBBONS et al., 1994; BROADBENT et al., 1997; GARCIA; SLAHEDDINE, 1998). Broadbent et al. (1997) não observaram diferenças no número de folículos visualizados, no número de folículos aspirados, no número de oócitos recuperados e na taxa de recuperação entre animais aspirados uma ou duas vezes por semana.

Grupta et al. (2006) trabalhando com búfalas da raça Murrah submetidas à aspiração folicular uma vez por semana relataram que o número de folículos pequenos, médios e grandes e o número total de folículos observados por animal e por sessão não apresentaram diferença entre os animais ou entre as sessões de aspiração. A média de folículos aspirados foi de  $3,0 \pm 0,3$  e a média de recuperação oocitária foi de  $2,0 \pm 0,3$  por animal por sessão, com taxa de recuperação de 68%. Os autores concluíram que a aspiração realizada uma vez por semana não causou nenhum efeito adverso no crescimento folicular e na recuperação oocitária.

Manjunatha et al. (2007), trabalhando com búfalas indianas, avaliaram os efeitos da OPU realizada duas vezes por semana durante 12 semanas sob a recuperação de oócitos e relataram que a média de folículos observados por animal por sessão não diferiu entre os animais ou entre as sessões. O número médio de folículos observado foi de  $3,62 \pm 0,32$ . Foram aspirados em média  $2,90 \pm 0,15$  e foram recuperados, em média,  $1,21 \pm 0,07$  por animal por sessão, com uma taxa de

recuperação média de 42%. Deste total, 64% foram destinados à PIVE resultando em uma taxa de embriões transferíveis de 32% o que demonstrou que a realização da OPU duas vezes por semana pode ser aplicada repetidamente, sem nenhum efeito adverso ao crescimento folicular e recuperação oocitária, sendo que a utilização destes oócitos para a PIVE resulta em uma taxa razoável de produção embrionária, em búfalas.

#### 4.3. AÇÃO HORMONAL DA SOMATOTROPINA

O processo de foliculogênese é controlado por fatores endócrinos, representados pelas gonadotrofinas, inibinas, prolactina, esteróides e por complexos fatores locais, como as prostaglandinas, a ocitocina, o hormônio do crescimento e os fatores de crescimento. Os fatores de crescimento são complexos sistemas que desempenham papel regulatório e modulatório sobre as funções ovariana e uterina, resultando em efeitos tróficos sobre o endométrio e o embrião, bem como sobre o crescimento e regeneração tissulares (JENNISCHE *et al.*, 1992).

O eixo somatotrópico é tido como componente essencial para a diferenciação de diversas células e tecidos, sendo formado pelo hormônio do crescimento (GH), o receptor de GH, o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I), as proteínas carreadoras de IGF, e os receptores de IGF (RADCLIFF *et al.*, 2004).

Entre as influências do eixo somatotrópico sobre as funções ovarianas estão suas ações no eixo hipotálamo-hipofisário, modulando a secreção de gonadotrofinas, bem como, sua própria ação sob as gônadas (LUCY, 2000; ARMSTRONG *et al.*, 2001, GONG, 2002; BILBY *et al.*, 2004; HUNTER *et al.*, 2004).



Sabe-se atualmente, que o GH e o IGF-I podem exercer efeitos estimulatórios e/ou sinérgicos em diferentes níveis hipotálamo-hipofisário-gonadal, no trato reprodutivo, na genitália externa e na glândula mamária (CHANDRASHEKAR; ZACZEK; BARTKE, 2004).

#### **4.3.1. Somatotropina bovina recombinante (bST)**

A somatotropina bovina (bST) ou hormônio de crescimento (GH) foi identificada, a partir da hipófise bovina, por influenciar vários processos metabólicos e fisiológicos (LUCY, 2000, KOZICKI et al., 2005).

Visando, inicialmente, o aumento da produção leiteira em ruminantes (BORGES et al, 2001), foram desenvolvido processos de produção da bST em escala industrial, a partir da técnica de DNA recombinante (SANTOS et al., 2001) e desde então, a utilização de bST exógena tem sido amplamente utilizada tanto com a finalidade de aumentar a produção leiteira quanto para produzir melhores índices reprodutivos em resposta ao tratamentos superovulatórios.

Em bovinos, a aplicação de 500mg de bST em intervalos de 14, 21 ou 28 dias têm demonstrado aumento significativo na produção leiteira (HARTNELL et al., 1991, BAUMAN et al.,1992, LUCCHI et al., 1998) e o seu uso para fins produtivos também já foi relatado em outras espécies, entre elas, a ovina (FERNANDES et al., 1995), a caprina (GALO et al.,1997), bem como a bubalina (POLIDORI et al., 1997).

Um dos primeiros relatos da utilização de GH em vacas superovuladas foi realizado por Gong et al. (1991) onde foi observado um aumento na população de

folículos antrais mediado por aumento da concentração de IGF-1 e insulina circulante (GONG et al., 1993).

A associação de GH e FSH em protocolos de SOV em vacas favorece, não só um aumento na população de folículos antrais, como também melhora a maturação oocitária e aumenta a quantidade de embriões transferíveis (GONG et al., 1993, HERRLER et al., 1994). Ao utilizar bST em fêmeas bubalinas, Soogsasen et al. (1999) também observaram o aumento no número de embriões transferíveis por coleta, demonstrando uma significativa melhora no protocolo de SOV com a associação de GH e FSH.

Outras vantagens em se utilizar o GH exógena em vacas superovuladas seriam de auxiliar no desenvolvimento nos estágios embrionários iniciais e aumentar as taxas de prenhez (GONG et al., 1996; THATCHER et al., 2001; MOREIRA et al., 2002b).

Inúmeros trabalhos tem demonstrado os efeitos do tratamento com bST na alteração da população folicular de diferentes espécies, entre elas bovinos taurinos (GONG et al., 1991, DE LA SOTA et al, 1993, GONG; BRAMLEY; WEBB, 1993, LUCY et al., 1993, ROTH et al., 2002), em zebuínos (CARTER et al., 1998, BURATINI JR. et al., 2000), como também em ovinos (JOYCE et al., 2000) e bubalinos (BARUSELLI et al., 2003).

Segundo, KRISBY et al. (1997), o número de folículos com diâmetro de 3 a 5 mm e de 6 a 9 mm é maior em vacas tratadas com BST em relação àquelas não tratadas e esse efeito seria devido a ação deste hormônio na fase de recrutamento do crescimento folicular, o que não afetaria a seleção de folículos grandes e a taxa de ovulação.

Por outro lado, outros autores, (BOLS et al., 1998) relataram que o número e a qualidade dos oócitos, assim como o número de blastocistos cultivados in vitro não foi afetado em animais tratados com bST, embora o recrutamento de folículos tenha aumentado antes da aspiração. Diversos estudos têm comprovado a tendência em melhorar a qualidade de oócitos em animais tratados com bST (PAVLOK et al., 1996; BEVERS et al., 1997; PIVATO et al., 1999).

BURATINI JR. et al. (2000) relataram que o tratamento bST em novilhas *Bos taurus indicus* aumentou a concentração plasmática de IGF-I, resultando em um aumento de 36% do número de folículos pequenos (<5mm) quando comparado a novilhas tratadas com solução fisiológica. Joyce et al. (2000) observaram aumento no número de folículos pequenos (>2mm) e uma redução no número de folículos de médios (>0,25 a 0,5mm) em ovelhas tratadas com bST. Lucy et al. (1993) relataram aumento na população de folículos de 3 a 9 mm quando comparados a vacas tratadas com solução fisiológica.

Em fêmeas bubalinas o bST aumentou ao redor de 20% ( $15,6 \pm 3,7$  x  $12,4 \pm 3,6$ ) o número de folículos >3mm recrutados após o tratamento com benzoato de estradiol e dispositivo intravaginal de progesterona em programas de superovulação e transferência de embriões (BARUSELLI et al., 2003).

O uso de bST promove aumento do IGF-1 no fluido folicular (HERRLER et al., 1994), e isso pode ser relacionado com a melhora da qualidade oocitária, e dessa forma, com melhores resultados na maturação e na formação in vitro de blastocistos. A adição de IGF-1 (MARKKULA; MAKAREVICH, 2001) ou de bST (IZADYAR et al., 1996) ao meio da maturação in vitro tem auxiliado a maturação nuclear e a capacidade de desenvolvimento dos oócitos, refletidas no aumento da formação de

blastocistos. Além disso, o uso da somatotropina pode evitar a degeneração atrésica dos oócitos (PAVLOK et al., 1996).

O efeito do bST no desenvolvimento dos folículos antrais é mediado por aumentos nas concentrações séricas de IGF-1 e/ou insulina (KIRBY et al., 1997, BURATINI JR. et al., 2000, LUCY, 2000, CUSHMAN et al., 2001, ROTH et al., 2002). Sugere-se que somente doses de bST capazes de promover aumento nas concentrações de IGF-1 aumentem o número de folículos pequenos (GONG et al., 1993; 1997).

Os efeitos do tratamento com bST no aumento da população folicular ocorre ao redor de 3 dias após a sua administração e está relacionado com o aumento dos níveis circulantes de GH, IGF-I e insulina (GONG, 2002). Diversos estudos foram conduzidos para avaliar a importância relativa do GH, IGF-I ou da insulina no aumento do número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular (GONG; BRAMLEY; WEBB, 1993; LUCY et al, 1993; GONG et al., 1997; BURATINI JR. et al., 2000).

Existe a associação temporal entre a aplicação de bST, o aumento na concentração de GH, IGF-I e insulina no sangue e, conseqüentemente, o incremento na população folicular (GONG; BRAMLEY; WEBB, 1993). Gong et al. (1997) relatam que a administração de diferentes doses de bST em novilhas resultam em aumento das concentrações de GH, no entanto somente altas doses de bST foram associadas ao incremento das concentrações de IGF-I e insulina. Os autores somente observaram alterações na população folicular quando os animais apresentaram aumento nas concentrações de IGF-I e não quando somente houve aumento somente do GH (GONG et al., 1997). Deste modo, parece que o

incremento na população folicular é mais associado a mudanças nas concentrações de IGF-I e insulina do que nas concentrações de GH.

Lucy et al. (1993) observaram expressão baixa de receptor para somatotrofina em folículos ovarianos em bovinos. Kirby et al. (1996) não encontraram alterações na expressão de RNAm codificadores de IGF-I, IGFBP-2 e IGFBP-3 no ovário, útero e oviduto de bovinos após o tratamento com bST. Estes estudos reforçam a hipótese de que o incremento na população folicular provavelmente não seja decorrente de efeitos diretos do bST no ovário e sim por alterações nas concentrações de IGF-I e/ou insulina.

Uma das mudanças obtidas com a administração de bST é o aumento das concentrações intrafoliculares de IGF-1 (ROTH et al., 2002), o que poderia resultar em aumento da eficiência do desenvolvimento embrionário in vitro. Receptores de somatotropina e IGF-1 têm sido encontrados em oócitos bovinos imaturos e nas células da granulosa e do cumulus (SPICER et al., 1994; SPICER; STEWART, 1996; IZADYAR et al., 1997; KÖLLE et al., 1998; YOSHIDA et al., 1998; LONERGAN et al., 2000).

#### **4.3.2. Fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I)**

O fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (*insulin like growth factor-I*; IGF-I) é um peptídeo com baixo peso molecular e características estruturais à pró-insulina, conhecido como somatomedina. Ele é membro de uma família de peptídeos

relacionados à insulina e está relacionado à maturação do oócito, ovulação, implantação e embriogênese (YOSHIMURA, 2003).

Os IGF-I está diretamente ligado ao crescimento e diferenciação da maioria das células e tecidos do organismo, bem como a própria sobrevivência (DAFTARY; GORE, 2005). O sistema é composto de IGF-I e IGF-II, receptores, proteínas de ligação e as proteases das proteínas de ligação e, além dos efeitos mitogênicos sobre o metabolismo e crescimento celulares em resposta ao estímulo de GH (COHICK, 1998), mas também exercem, localmente, efeitos parácrinos e autócrinos sobre a proliferação de diversas células somáticas, como nas gônadas (YOSHIMURA, 2003; CHANDRASHEKAR; ZACZAK; BARTKE, 2004).

A maior parte de receptores para a somatotropina é encontrada no fígado, sendo grande parte do IGF-I circulante produzido no organismo oriundo da síntese hepática (LUCY, 2000). No entanto, as ações locais do IGF-I não dependem do estímulo do GH por via hepática (CHANDRASHEKAR; ZACZAK; BARTKE, 2004).

É provável que expressão parácrina esteja relacionada ao crescimento de modo órgão-específico, enquanto as funções endócrinas IGF-I estejam associadas ao anabolismo e crescimento corporal de uma forma integrada (BANG; HALL, 1992).

Os efeitos dos fatores de crescimento semelhantes à insulina sobre as células ovarianas foram demonstrados experimentalmente em humanos, murinos, leporinos, bovinos, ovinos e suínos, sem a devida comprovação *in vivo* (QUETGLAS *et al.*, 2001; YOSHIMURA, 2003; KUMAR; PUROHIT, 2004).

O desenvolvimento folicular cíclico depende diretamente da cascata de estimulação gonadotrófica na regulação da ontogenia das células da granulosa. Os fatores de crescimento semelhantes à insulina podem atuar isoladamente ou em

sinergia com as gonadotrofinas na estimulação de uma variedade de funções das células da granulosa.

Tanto o GH quanto o IGF-I estão envolvidos no controle da liberação do GnRH pelo hipotálamo, liberação de gonadotrofinas pela pituitária, e aumento no número de receptor para gonadotrofinas nas células da granulosa (CHANDRASHEKAR; ZACZAK; BARTKE, 2004). As células da granulosa possuem uma capacidade intrínseca em responder à estimulação pelo IGF-I, a partir do qual ocorre a proliferação ou a diferenciação destas células. Esta capacidade sofre alterações durante o desenvolvimento do folículo. Em bovinos, o IGF-I tem a função de aumentar a sensibilidade dos folículos antrais pequenos (5mm) à gonadotrofinas, principalmente na transição do estágio de independência para o de dependência gonadotrófica (MONGET et al., 2002).

A utilização do IGF-I em bubalinos para melhorar os índices de maturação *in vitro* foi descrita por Kumar e Purohit (2004) que demonstraram que IGF-I e EGF aumentam a expansão do *cumulus*, entretanto a associação destes fatores de crescimento promove uma resposta melhor, sugerindo que ambos os fatores também aumentam as taxas de maturação nuclear e de fertilização dos oócitos.

Além disso, a adição de IGF-I no meio de maturação *in vitro* promove estímulo à maturação oocitária, atuando tanto em sinergismo com o FSH como no controle parácrino e autócrino das células da granulosa. Estes fatores associados promovem aumento da atividade mitogênica, da esteroidogênese e da síntese protéica (PAWSHE; RAO; TOTEY, 1998).

Em bovinos o IGF-I combinado ao EGF estimula a expansão do *cumulus*, o metabolismo oxidativo, a maturação nuclear, e a clivagem após a fertilização *in vitro* dos oócitos (RIEGER et al., 1998). A adição de IGF-I, EGF, FSH e estradiol ao meio

de maturação (TCM 199) de oócitos ovinos, foi avaliada por GULER *et al.* (2000). Na concentração de 100 ng/ml o IGF-I os autores não observaram melhorias sobre as taxas de maturação citoplasmática ou nuclear.

A expressão de IGF-I nas células da granulosa de bovinos não foi ainda totalmente esclarecida (HUNTER *et al.*, 2004). Em ovinos e bovinos a expressão de IGF-I parece não apresentar níveis significantes (MONGET *et al.*, 2002). Outros trabalhos demonstram a presença ou não de expressão de IGF-I nas células da granulosa de folículos antrais, bem como nos folículos pré-antrais de ovinos e bovinos (LEEJWENBURG *et al.*, 1996; SPICER *et al.*, 1995; SCHAMS *et al.*, 2002). Algumas evidências sugerem que o IGF-I atua autócrina e paracrinamente sobre o complexo-cúmulus-oócito (COC), uma vez que a expressão do ligante para IGF-I parece ser restrita as células do compartimento somático do folículo (células Teca e da Granulosa; NUTTINCK *et al.*, 2004).

#### **4.3.3 Utilização de bST em programas de aspiração folicular**

O uso da bST antes do início das sessões de punção folicular pode ser um valioso recurso de manipulação da dinâmica folicular permitindo maior disponibilização de oócitos e dessa maneira aumentar o número e a qualidade dos oócitos coletados *in vivo* e dos embriões produzidos *in vitro* (RAMOS *et al.*, 2007).

No entanto, a utilização do tratamento com bST em programas de aspiração folicular ainda é controversa apesar de sua utilização vir demonstrando eficiência em aumentar o número de folículos disponíveis para serem aspirados (BOLS *et al.*, 1998, TRIPP *et al.*, 2000), bem como a qualidade dos oócitos recuperados (PAVLOK *et al.*, 1996, ROTH *et al.*, 2002).



Ao testarem o efeito de uma única administração de bST 3 dias antes do abate, Pavlok et al. (1996) observaram que apesar do tratamento com bST não aumentar o número de folículos recuperados, o tratamento hormonal aumentou significativamente o número de oócitos de boa qualidade.

Bols et al. (1998) avaliaram o efeito do tratamento bST durante um longo período em novilhas de leite (*Bos taurus*) tratadas semanalmente com 640 mg de bST (SC) e submetidas à aspiração folicular duas vezes por semana, durante dez semanas. Os autores observaram aumento no número de folículos disponíveis para aspiração no grupo tratado com bST em relação ao grupo controle. No entanto o número médio de oócitos recuperados foi semelhante entre o grupo tratado (6,4) e o grupo controle (6,0). Os autores sugerem que possíveis alterações morfológicas nas células do cumulus induzidas pelo bST podem ter levado à dificuldade na remoção dos oócitos do interior dos folículos no momento da aspiração.

Tripp et al. (2000) estudaram o efeito do tratamento com bST em novilhas de corte (*Bos taurus*) submetidas a aspiração folicular a cada 7 dias. Os autores observaram aumento no número de folículos (9,7 x 6,8) quando os animais receberam o hormônio. No entanto, não foi observado aumento no número de oócitos recuperados (2,9 vs 3,0), provavelmente pela menor taxa de recuperação obtidas nos animais suplementados com bST (30 x 44%).

Sá Filho (2006), avaliou os efeitos do tratamento com bST em fêmeas bubalinas tratadas com 500 mg de bST a cada 14 dias e submetidas aspiração folicular duas vezes por semana durante 5 semanas e observou que o tratamento com bST aumentou a população folicular, o número de folículos aspirados e o número de oócitos recuperados. Entretanto, não houve aumento a qualidade oocitária ou da produção in vitro de embriões.

Ramos et al. (2007) demonstraram que o uso de bST, associado ou não ao FSH em vacas bovinas da raça Gir, não aumentou o número total de folículos submetidos à punção. A qualidade oocitária também não diferiu entre os grupos controle e o tratado com bST. Entretanto, a associação do bST com o FSH resultou em aumento no diâmetro do maior folículo em relação ao tratamento controle e no número de folículos grandes e médios, com redução no número de folículos pequenos em relação ao tratamentos controle e com bST. No entanto, o uso de bST antes das punções foliculares melhorou as taxas de clivagem e produção de blastocisto in vitro.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado na Fazenda Santa Elisa, especializada na produção de leite bubalino e seus derivados e localizada no município de Dourado, no estado de São Paulo, a cerca de 140 km do laboratório<sup>1</sup> onde foram produzidos os embriões.

### 5.2 ANIMAIS

#### 5.2.1 Doadoras de oócitos

Para realização deste experimento foram utilizadas 16 fêmeas *Bubalus bubalis* com idade entre três e nove anos, condição corporal  $\geq 3,0$  (escala de 1,0 a 5,0) e peso corporal médio de aproximadamente 500 Kg. Estas búfalas não possuíam problemas reprodutivos, apresentavam ausência de gestação, histórico de uma a seis parições, estavam ciclando (presença de CL) e em lactação, com produção diária entre 5,4 e 11,4 L de leite e de 900 a 2.600 L na última lactação. O período pós-parto variou de 71 a 303 dias, no início do experimento.

A condição clínico-reprodutiva dos animais foi avaliada com auxílio de aparelho ultra-sonográfico. As búfalas foram submetidas a duas sessões de

<sup>1</sup> Vitrogen® Pesquisa e Desenvolvimento em Biotecnologia da Reprodução Animal. Cravinhos, São Paulo, Brasil.

aspiração folicular prévias para sincronização das ondas de crescimento folicular e escolha do acasalamento a ser utilizado no experimento. Durante estes procedimentos também foi realizada seleção dos animais com base na índole, presença de CL, número de folículos ovarianos e número de oócitos recuperados.

Durante o período experimental, todos os animais foram mantidos sob as mesmas condições de manejo e alimentação, com acesso a pastagem e água *ad libitum* e suplementados com mistura mineral.

## 5.2.2 Touro

### 5.2.2.1 Avaliação do sêmen na produção *in vitro* de embriões

O gameta masculino utilizado para a fecundação *in vitro* foi obtido do sêmen congelado de um mesmo touro e de uma mesma partida. Para a escolha do acasalamento a ser utilizado durante todo o período experimental, foram realizados dois procedimentos de aspiração folicular, antes do início do período experimental, denominados OPU prévias. O primeiro procedimento contou com 14 e o segundo com 19 búfalas, das quais 16 foram selecionadas para serem utilizadas durante o período experimental. Assim, foram testadas doses de uma determinada partida de dois touros diferentes, a fim de avaliar sua eficiência no processo de PIV.

Para determinação do touro com melhor resultado na PIV, foi feita a avaliação comparativa das taxas de clivagem e de produção embrionária de cada reprodutor, bem como o número de embriões produzidos. Além do critério baseado na PIVE, também foi considerada a ausência de consangüinidade entre touros e doadoras.

Estes procedimentos serviram também como teste de produção e padronização da técnica de PIVE para búfalas, uma vez que o laboratório no qual foi realizado o experimento trabalha rotineiramente com vacas bovinas.

### 5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

#### 5.3.1 Grupos experimentais

Os animais foram subdivididos homoganeamente em quatro grupos experimentais com quatro indivíduos cada, com base no número de folículos ovarianos e de oócitos recuperados nos procedimentos prévios, conforme descrito a seguir e ilustrado na Figura 1:

a) Grupo controle sete dias (G-Cont7, n=4): os animais deste grupo receberam 2,0 mL de solução fisiológica por via SC na fossa ísquio-retal a cada 14 dias e foram submetidos a 16 sessões de OPU, com intervalo de sete dias.

b) Grupo bST sete dias (G-bST7, n=4): os animais deste grupo receberam sete doses de 500 mg de bST<sup>2</sup> por via SC na fossa ísquio-retal a cada 14 dias e foram submetidos a 16 sessões de OPU, com intervalo de sete dias.

c) Grupo controle 14 dias (G-Cont14, n=4): os animais deste grupo receberam 2,0 mL de solução fisiológica por via SC na fossa ísquio-retal a cada 14 dias e foram submetidos a oito sessões de OPU, com intervalo de 14 dias.

d) Grupo bST 14 dias (G-bST14, n=4): os animais deste grupo receberam sete doses de 500 mg de bST por via SC na fossa ísquio-retal a cada 14 dias e foram submetidos a oito sessões de OPU, com intervalo de 14 dias.

---

<sup>2</sup> Boostin® - Schering-Plough Coopers, São Paulo, Brasil.

### **5.3.2 Intervalo entre aspirações foliculares (IEA)**

Os animais dos grupos com intervalo entre OPU de sete dias (G-Cont7 e G-bST7) foram submetidos a 16 sessões de OPU sucessivas, com intervalos regulares de sete dias. Os animais dos grupos com intervalo entre OPU de 14 dias (G-Cont14 e G-bST14) receberam oito sessões de OPU sucessivas, com intervalos regulares de 14 dias entre os procedimentos (Figura 1). Desta forma, o período experimental teve duração de 16 semanas e foi realizado na estação reprodutiva das búfalas, entre os meses de maio e setembro.

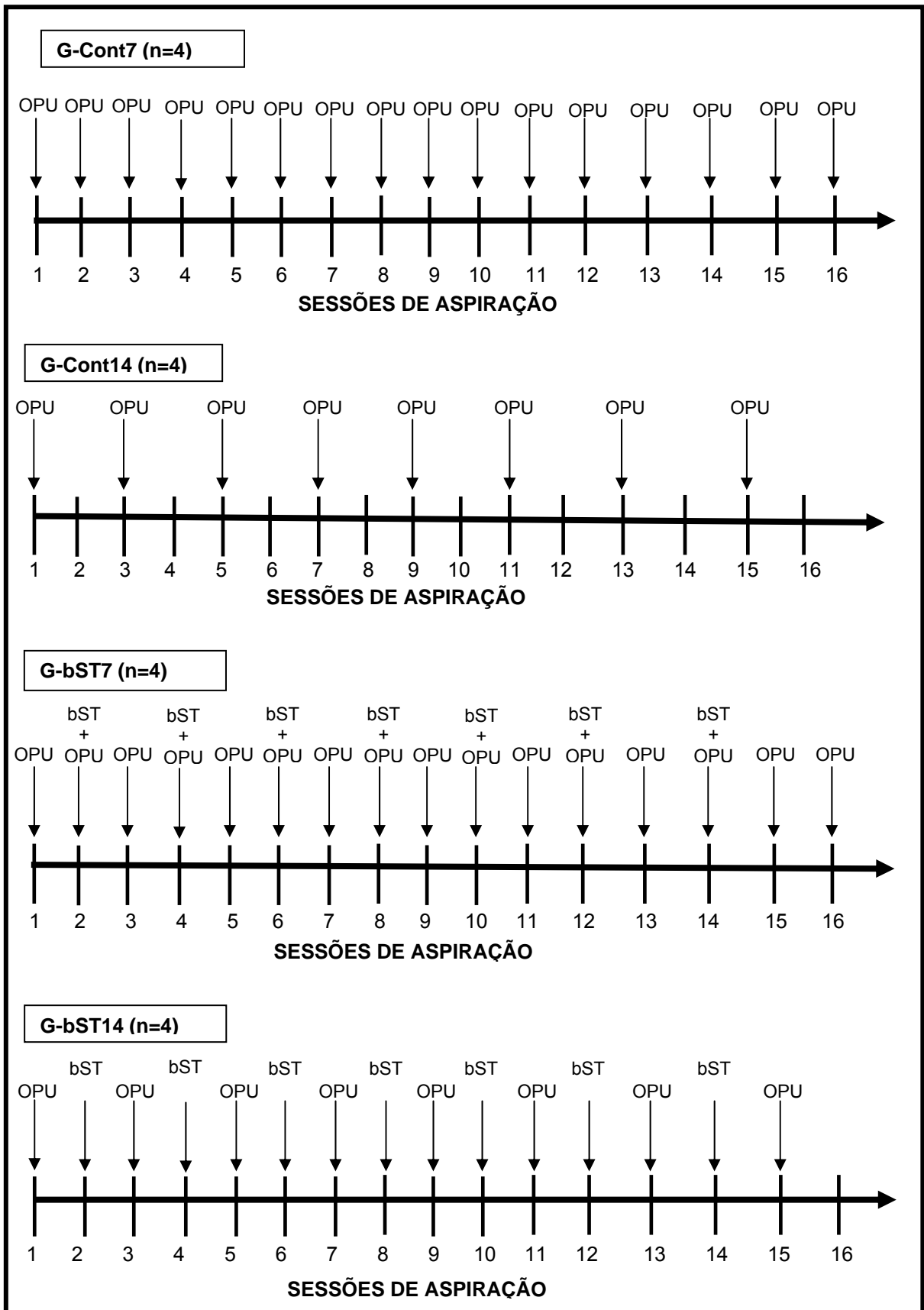


Figura 1 – Diagrama experimental do uso ou não de bST em fêmeas bubalinas submetidas a aspiração folicular a cada sete ou 14 dias

### 5.3.3 Tratamentos

As fêmeas dos grupos que receberam bST (G-bST7 e G-bST14) foram tratadas com 500 mg de bST por via SC na região da fossa ísquio-retal, a cada 14 dias, alternando-se os lados de aplicação do hormônio, conforme indicação do fabricante. A primeira aplicação foi realizada sete dias após a primeira sessão de aspiração.

## 5.4 PROCEDIMENTOS

### 5.4.1 Avaliação da população folicular

Antes de cada sessão de OPU, os ovários foram escaneados por meio de ultra-sonografia para contagem do número total de folículos. Desta forma, os folículos ovarianos a serem aspirados foram quantificados e o resultado utilizado como parâmetro para calcular a taxa de recuperação oocitária:

$$\text{Taxa de recuperação oocitária (\%)} = \frac{\text{número oócitos recuperados}}{\text{número de folículos aspirados}}$$



## 5.4.2 Aspiração folicular (OPU)

### 5.4.2.1 Montagem dos equipamentos e preparo dos meios de aspiração

As sessões de OPU foram realizadas com aparelho portátil de ultra-som<sup>3</sup> equipado com transdutor<sup>4</sup> endocavitário micro-convexo de 5,0 MHz, adaptado a uma guia de biópsia<sup>5</sup> para aspiração folicular e conectado a agulha<sup>6</sup> descartável de 18G e linha de aspiração<sup>7</sup> de teflon de 1,7 mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento, conectadas a um recipiente para coleta dos oócitos (tubos cônicos de centrifuga<sup>8</sup> de 50 mL). Este sistema de aspiração foi acoplado à bomba de vácuo<sup>9</sup> portátil, calibrada e regulada com pressão negativa de 68 mmHg (12 a 15 mL de água/minuto; KRUIP et al., 1994).

A montagem do transdutor foi feita segundo instruções do fabricante e a agulha inserida no mandril de forma asséptica para evitar contaminação. Na montagem dos equipamentos envolvidos na OPU, manteve-se rigorosa assepsia, principalmente com as partes que entravam em contato direto com o material aspirado ou com as mucosas das doadoras.

O meio de aspiração utilizado para lubrificação e lavagem do sistema de OPU e para o recebimento dos oócitos no tubo de coleta foi preparado com 1,0 L de solução salina fosfatada (DPBS)<sup>10</sup>, acrescido de 5000 UI de heparina sódica (5,0 UI/mL)<sup>11</sup> e 10,0 mL de soro fetal bovino (SFB)<sup>12</sup>, mantidos a aproximadamente 37°C.

<sup>3</sup> Aloka® SSD 500 – Aloka Co., LTD, Tóquio, Japão.

<sup>4</sup> Aloka® 9111-5 – Aloka Co., LTD Tóquio, Japão.

<sup>5</sup> WTA Ltda, Cravinhos, São Paulo, Brasil.

<sup>6</sup> V-OPAA-1855 – Cook Austrália, Queensland, Austrália.

<sup>7</sup> VBOAS 18L – Cook Austrália, Queensland, Austrália.

<sup>8</sup> Corning Life Science Incorporated, Massachusetts, EUA.

<sup>9</sup> V-MAR 5000 – Cook Austrália, Queensland, Austrália

<sup>10</sup> Dmpbs flush – Nutricell, São Paulo, Brasil.

<sup>11</sup> Liquemine®, Roche Brasil, São Paulo, Brasil.

<sup>12</sup> Nutricell, São Paulo, Brasil.

#### 5.4.2.2 Preparo dos Animais

##### 5.4.2.2.1 Sedação

No início da fase experimental, foi administrado 0,5 ou 1,0 mL de acetato de acepromazina 1,0%<sup>13</sup> por via intramuscular em algumas búfalas que apresentaram comportamento mais agitado. No entanto, a partir da terceira sessão de OPU, não foi necessária a continuidade da sedação, pois os animais já estavam adaptados ao novo manejo e, portanto, mais calmos.

##### 5.4.2.2.2 Anestesia

Após a contenção física do animal em brete apropriado, foi realizada lentamente anestesia epidural baixa entre a última vértebra coccígea e a primeira vértebra caudal, com 2,0 a 3,0 mL de cloridrato de lidocaína 2%<sup>14</sup>, sem vasoconstritor (KRUIP et al., 1994). Esta dosagem variava de acordo com o tamanho, raça, idade, sensibilidade individual e estado geral de cada búfala.

---

<sup>13</sup> Acepran® – Univet, São Paulo, Brasil.

<sup>14</sup> Lidovet® – Bravet, Rio de Janeiro, Brasil.

#### 5.4.2.2.3 Higienização da doadora

Após a perda dos reflexos caudais, a cauda da búfala foi amarrada e procedeu-se a remoção manual de fezes da ampola retal e higienização mecânica da região perineal, com água. A vulva e o vestíbulo vaginal também foram cuidadosamente higienizados, tomando-se o cuidado de não jogar água dentro da vagina.

#### 5.4.2.3 Aspiração Folicular

Após anestesia e higienização da doadora, o braço esquerdo do operador era mantido posicionado no reto do animal evitando assim a entrada de ar na ampola retal, o que dificultaria a realização da OPU. Visando a padronização da técnica e devido à dificuldade de acesso, o ovário esquerdo da búfala foi o primeiro a ser aspirado. O ovário foi palpado, inspecionado e isolado de outros tecidos (vasos sangüíneos, porções intestinais, tecido adiposo) para evitar sua perfuração acidental e, em seguida, o transdutor, acoplado à guia de biópsia e agulha, foi introduzido na vagina até alcançar o fundo de saco vaginal no lado correspondente ao ovário acessado. Por meio de manipulação transretal, este ovário foi apresentado ao transdutor na face abdominal da parede da vagina, de forma que os folículos a serem aspirados ficassem no percurso da agulha, indicado na tela do ultra-som pela linha de biópsia ou linha de punção (*punction line*). Devido à maior dificuldade de acesso e manipulação dos ovários das búfalas, o transdutor teve de ser forçado

cranialmente para dar apoio aos ovários, que não podem ser tão facilmente tracionados na direção caudal quanto as gônadas bovinas.

Antes do início da OPU, foi feito um mapeamento do ovário a fim de se planejar a aspiração, evitando perfurações desnecessárias, otimizando o procedimento e preservando os ovários da doadora. Seguiu-se a aspiração transpassando-se a agulha através da parede do fundo de saco vaginal ao mesmo tempo em que foi acionada a pressão negativa de vácuo por um pedal e o folículo foi aspirado (NIBART et al., 1995). Desta forma, foram aspirados todos os folículos visíveis (com diâmetro  $\geq 1,0$  mm) e acessíveis de cada ovário.

Ao término da OPU de cada animal o tubo contendo o líquido aspirado foi trocado, identificado com a ordem da aspiração e RGD da doadora e enviado para o técnico do laboratório-campo, para lavagem do conteúdo, procura, seleção e envase dos oócitos aspirados.

#### 5.4.2.4 Manipulação e classificação dos oócitos aspirados

O tubo com o conteúdo aspirado foi despejado em filtro de coleta de embriões<sup>15</sup> e lavado com o mesmo meio descrito no item 5.4.2.1. até se obter um líquido translúcido com cerca de 1,0 cm de altura e com um sedimento contendo os oócitos recuperados. Em seguida, o conteúdo do filtro foi vertido em placas de Petri para observação em esteriomicroscópio<sup>16</sup> e realização da procura, lavagem, classificação e seleção dos CCO.

Os critérios considerados para a avaliação dos CCO foram a presença, o número de camadas e o grau de expansão das células do *cumulus*, bem como o

<sup>15</sup> WTA - Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda, Cravinhos, São Paulo, Brasil.

<sup>16</sup> Neovet Ind. e Com. e Serviços Ltda, Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade. Desta maneira, os oócitos recuperados foram classificados de acordo com sua morfologia, mensurando-se a quantidade de camadas e compactação das células do *cumulus* e a homogeneidade do ooplasma, em sete categorias, semelhante ao descrito por Lonergan et al. (1992; Quadro 1).

Foram considerados como viáveis e, conseqüentemente, aproveitados para FIV somente os oócitos classificados como graus I, II e III, enquanto os demais, que não apresentavam aspecto de granulações citoplasmáticas homogêneo, foram descartados. No entanto, somaram-se àqueles para compor o número total de oócitos.

<b>QUALIDADE OOCITÁRIA</b>	<b>DESCRIÇÃO</b>
Grau I	Células do <i>cumulus</i> compactadas, contendo mais de três camadas de células.
Grau II	Células do <i>cumulus</i> compactadas parcialmente presentes em volta do oócito ou rodeando completamente o ócito, com menos de três camadas celulares.
Grau III	Células do <i>cumulus</i> , com apenas uma camada de células.
Sem <i>cumulus</i>	Ausência de camadas de células do <i>cumulus</i> .
Expandido	Células do <i>cumulus</i> expandidas.
Atrésicos	Células do <i>cumulus</i> em regressão celular.
Degenerado	Oócitos com sinais de degeneração

Quadro 1 – Classificação oocitária segundo Lonergan (1992).

Após a classificação, os oócitos foram lavados em solução de TCM199<sup>17</sup>, suplementada com 10% de SFB. Em seguida, foram efetuados a contagem por categoria e o envase dos oócitos para transporte em criotubos<sup>18</sup> com a mesma solução de lavagem, acrescido de HEPES<sup>19</sup>, em banho-maria a 37°C. O tempo médio de transporte foi de 1,5 horas, totalizando média de 5,0 horas desde o início da aspiração da primeira búfala até a chegada dos oócitos viáveis ao laboratório de FIV.

#### 5.4.3 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A fase de produção *in vitro* foi totalmente executada em laboratório de PIVE, onde os oócitos aspirados foram submetidos à maturação, fecundação e cultivo *in vitro*, num período total de oito dias. Foram realizadas 16 sessões de PIVE, referentes a 192 búfalas aspiradas em 16 sessões de OPU.

##### 5.4.3.1 Maturação *in vitro* (MIV)

Após transporte controlado, os oócitos foram transferidos para as placas de MIV, agrupados e maturados em microgotas de 100,0 µL de meio de maturação TCM199 suplementado com 10% de SFB, piruvato (22 µg/mL), gentamicina (50

<sup>17</sup> GIBCO® Invitrogen Corporation, Califórnia, EUA.

<sup>18</sup> Corning Life Science Incorporated, Massachusetts, EUA.

<sup>19</sup> Nutricell, Campinas, São Paulo, Brasil.

$\mu\text{g/mL}$ ), 5,0  $\mu\text{g/mL}$  de FSH<sup>20</sup>, 50,0  $\mu\text{g/mL}$  de LH<sup>21</sup> e 1  $\mu\text{g}$  de estradiol/ $\text{mL}$ , sendo cada microgota referente a um animal.

As microgotas de MIV foram cobertas com óleo mineral<sup>22</sup> e os oócitos permaneceram incubados durante 22 a 24 horas a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e com máxima umidade (WATANABE et al., 1998a,b).

#### 5.4.3.2 Fecundação *in vitro* (FIV)

Uma vez maturados, os oócitos foram submetidos à FIV, em microgotas de 100  $\mu\text{L}$  de meio TALP suplementado com heparina (10  $\mu\text{g/mL}$ ), piruvato (22  $\mu\text{g/mL}$ ), gentamicina (50  $\mu\text{g/mL}$ ), albumina sérica bovina (6  $\text{mg/mL}$ ), solução de PHE (2  $\mu\text{M}$  de penicilamina, 1  $\mu\text{M}$  de hipotaurina e 0,25  $\mu\text{M}$  de epinefrina) e recobertas com óleo mineral. O sêmen utilizado em todo o experimento foi do mesmo reprodutor (raça Murrah) e mesma partida. As palhetas contendo o sêmen diluído foram descongeladas em banho-maria a 35°C durante 30 segundos e o seu conteúdo foi centrifugado por meio da técnica de gradiente de Percoll (45 e 90%) para obtenção dos espermatozóides móveis e remoção do diluidor e do plasma seminal. A concentração foi ajustada para  $2,0 \times 10^6$  espermatozóides/ $\text{mL}$  e os gametas permaneceram incubados nas microgotas, durante um período de 18 a 20 horas a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar.

<sup>20</sup> Folltropin®, Bioniche Animal Health, Belleville, Ontário, Canadá.

<sup>21</sup> Profasi®, Serono, São Paulo, Brasil.

<sup>22</sup> SIGMA-Aldrich, São Paulo, São Paulo, Brasil.

#### 5.4.3.3 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após os procedimentos de MIV e FIV, os possíveis zigotos foram lavados e transferidos para microgotas com 50  $\mu$ L de meio CR2 modificado e suplementado com 10% SFB, 30 mg BSA/mL, acrescido de aminoácidos essenciais e não essenciais (WATANABE et al., 1999), onde permaneceram em desenvolvimento embrionário por sete dias, em incubadora a 38,5°C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima, até atingirem os estágios de mórula (Mo) e blastocisto (Bl).

Decorridas 48 horas de CIV, foi avaliada a taxa de clivagem e, em seguida, foi feito o *feeding* (renovação de 40  $\mu$ L de meio de CIV). No dia 6 do cultivo (D6), realizou-se o segundo *feeding*, classificação e contagem dos blastocistos. No D7, foi realizada a classificação e a contagem de blastocistos totais obtidos.

### 5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (fatorial 2 x 2).

Os dados foram analisados pelo programa SAS System for Windows (STATISTICAL ANALYSES SYSTEM, 2000). Através do aplicativo *Guided Data Analysis*, os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias. Caso não obedecessem às premissas, eram transformados (logaritmo na base 10 – Log<sub>10</sub>X; Raiz quadrada – RQ X; Quadrado – X<sup>2</sup>). Quando não foram passíveis de transformação, os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis como sendo não paramétricos.



O nível de significância para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias para uma determinada variável resposta. Para nível de significância de 0,05 a 0,1 considerou-se tendência estatística entre as variáveis comparadas.

O número de folículos aspirados, o total de oócitos, os oócitos viáveis, o grau dos oócitos, o número de embriões clivados e o número de blastocistos em D6 e D7 foram analisados por meio de análise de variância (ANOVA) para repetições múltiplas utilizando-se o Mixed Procedure (SAS), seguida do teste de Duncan para comparação das médias. As taxas de recuperação, clivagem e de produção embrionária foram analisadas pelo teste  $\chi^2$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 ESCOLHA DO ACASALAMENTO

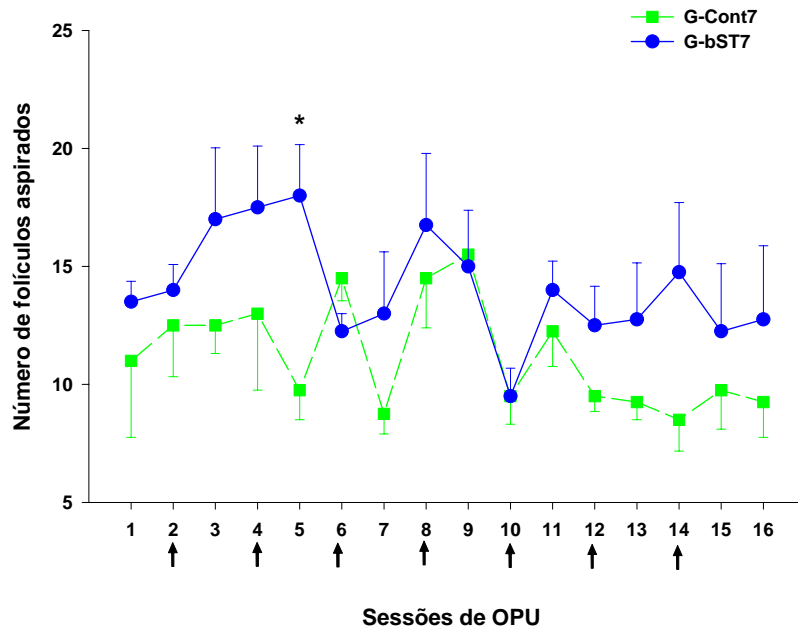
Na primeira OPU prévia foram aspiradas 14 búfalas, das quais se obteve 129 oócitos viáveis ( $9,21 \pm 0,95$  oócitos/búfala). Para teste do sêmen, foi feito um pool de oócitos, dividido entre dois reprodutores (A e B), que apresentaram taxa de clivagem (estruturas clivadas/oócitos viáveis) total de 40,3% (A=52,4%, 33/63; B=28,8%, 19/66). Foram produzidos 24 embriões em D6 (1,7 embriões/búfala; 18,6% de taxa de produção embrionária), sendo 18 embriões do reprodutor A e seis embriões do reprodutor B, representando 28,6% e 9,1% (A=18/63 e B=6/66) de taxa de produção embrionária sobre oócitos viáveis, respectivamente.

Na segunda OPU prévia foram aspiradas 19 búfalas, das quais se obteve 154 oócitos viáveis ( $8,11 \pm 0,78$  oócitos/ búfala). Também foi feito um pool de oócitos, dividido entre dois reprodutores (C e D), que apresentaram taxa de clivagem total de 35,1% (C=38,5%, 30/78; D=31,6%, 24/76). Foram produzidos 28 embriões em D6 (1,5 embriões/búfala; 18,2% de taxa de produção embrionária), sendo 14 embriões do reprodutor C e 14 embriões do reprodutor D, representando 17,9% e 18,4% (C=14/78 e D=14/76) de taxa de produção embrionária sobre oócitos viáveis, respectivamente.

## 6.2 RESULTADOS DO PERÍODO EXPERIMENTAL

O número de folículos aspirados foi considerado como a população folicular, uma vez que todos os folículos visíveis foram aspirados em cada procedimento. Para este parâmetro, observou-se efeito significativo de tratamento ( $P < 0,0001$ ) e de IEA ( $P < 0,0001$ ; Tabela 2). Não foi observada interação entre tratamento e IEA ( $P = 0,83$ ; Tabela 2, Gráfico 4). Os animais não tratados com bST apresentaram menor população folicular quando comparados aos tratados com bST ( $12,1 \pm 0,4$  x  $15,3 \pm 0,5$  folículos; Tabela 2, Gráfico 6). O aumento do IEA de sete para 14 dias resultou em maior número de folículos aspirados ( $12,8 \pm 0,4$  x  $15,6 \pm 0,7$ ; Tabela 1, Gráfico 4). Quando se comparou o efeito de tratamento a cada sessão de OPU, foi observado efeito significativo somente na quinta sessão entre os grupos G-Cont7 e G-bST7 (Gráfico 1-A), enquanto entre os grupos G-Cont14 e G-bST14 não houve efeito de tratamento (Gráfico 1-B).

A



B

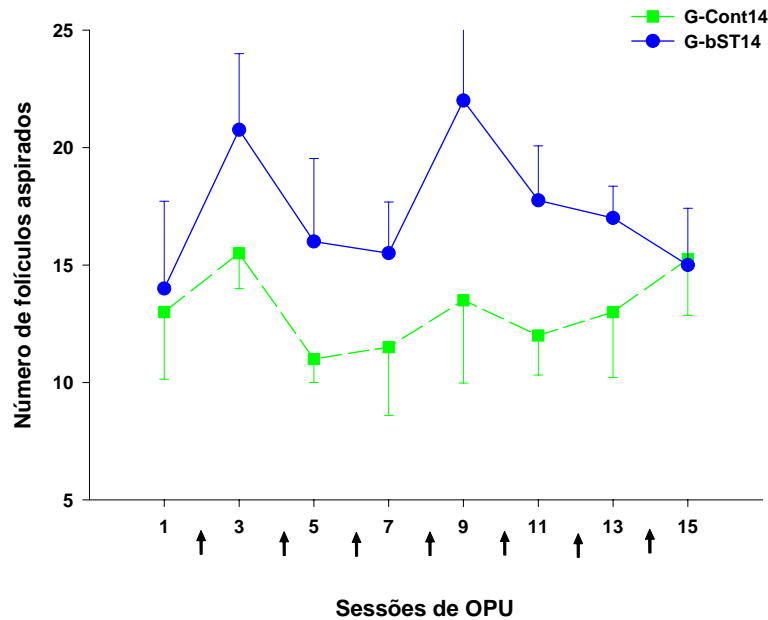


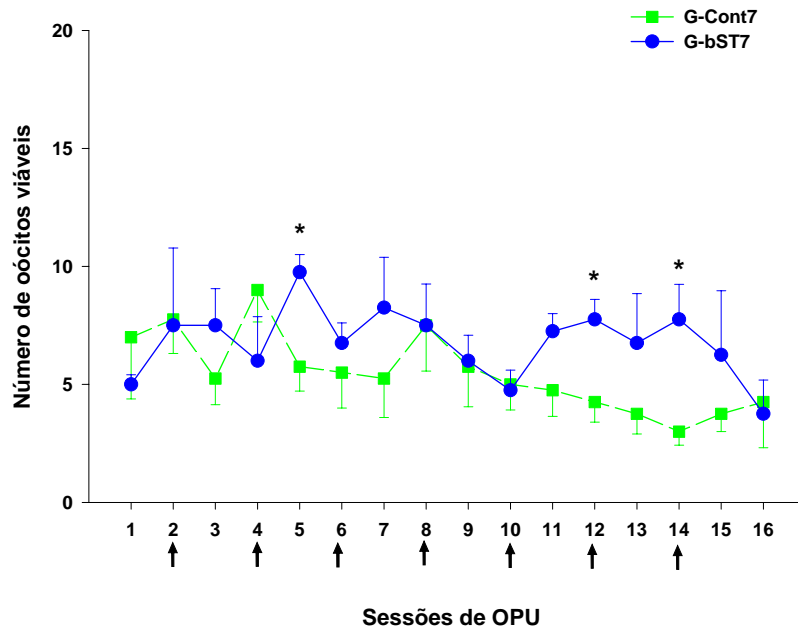
Gráfico 1 – Efeitos do intervalo entre aspirações e do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) no número de folículos aspirados (média±EPM) em fêmeas bubalinas. A) OPU realizada em intervalos regulares de sete dias; B) OPU realizada em intervalos regulares de 14 dias (\* = P<0,05). As setas indicam os momentos da administração do bST - Dourado - 2007

Para número total de oócitos recuperados, houve efeito de IEA ( $P=0,004$ , Tabela 4) e tendência de efeito de tratamento ( $P=0,07$ ; Tabela 3) e de interação entre tratamento e IEA ( $P=0,07$ ; Tabela 2). Assim, as búfalas tiveram maior recuperação de oócitos totais quando as OPU foram realizadas a cada 14 dias ( $10,0\pm 0,5$  oócitos) do que a cada sete dias ( $8,5\pm 0,3$  oócitos; Tabela 2, Gráfico 5). Os animais tratados com bST mostraram tendência de aumento no número de oócitos recuperados ( $9,6\pm 0,4$ ) se comparados aos que não receberam ( $8,4\pm 0,4$  oócitos; Tabela 3).

Observou-se efeito de tratamento ( $P=0,007$ ) e interação entre tratamento e IEA ( $P=0,03$ ) para taxa de recuperação. No entanto, essa variável não foi influenciada pelo IEA ( $P=0,45$ ). O grupo G-bST14 apresentou taxa de recuperação oocitária significativamente menor (58,5%) do que os grupos G-Cont7, G-bST7 e G-Cont14 (69,3%, 67,4% e 73,6%, respectivamente; Tabela 1).

Na análise de oócitos viáveis, observou-se efeito de IEA ( $P=0,01$ ), bem como interação entre tratamento e IEA ( $P=0,01$ ). Não foi evidenciado efeito de tratamento para esta variável ( $P=0,57$ ). Assim, o número de oócitos viáveis foi menor para o grupo G-Cont7 ( $5,5\pm 0,4$ ), quando comparado aos demais grupos (G-bST7 =  $6,8\pm 0,4$ ; G-Cont14 =  $7,6\pm 0,5$  e G-bST14 =  $6,8\pm 0,6$ ; Tabela 1, Gráfico 4). Quando se comparou o efeito de tratamento a cada sessão de OPU entre os grupos G-Cont7 e G-bST7, foi observado efeito significativo nas sessões de número 5, 12 e 14 (Gráfico 2-A), enquanto entre os grupos G-Cont14 e G-bST14 não houve efeito de tratamento (Gráfico 2-B).

A



B

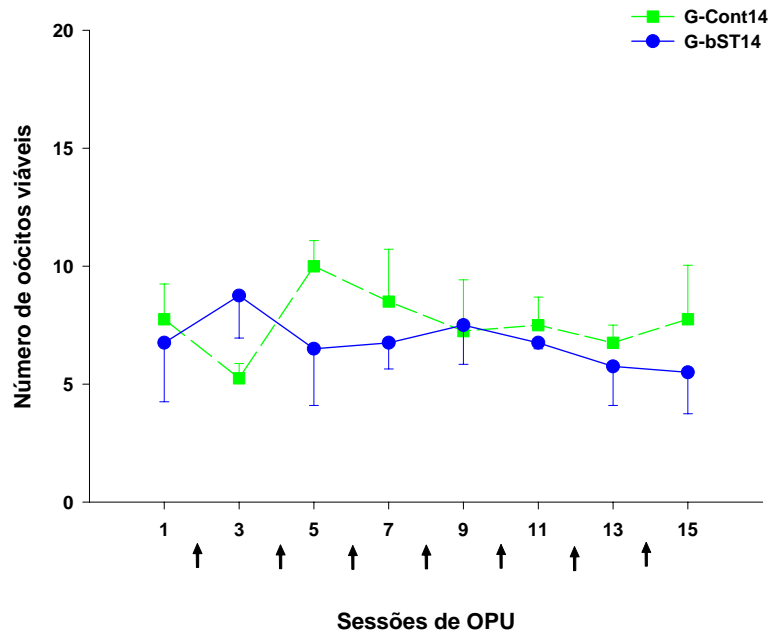


Gráfico 2 – Efeitos do intervalo entre aspirações e do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) no número de oócitos viáveis (média±EPM) em fêmeas bubalinas. A) OPU realizada em intervalos regulares de sete dias; B) OPU realizada em intervalos regulares de 14 dias (\* = P<0,05). As setas indicam os momentos da administração do bST - Dourado - 2007

Para número de oócitos Grau I, não houve efeito de tratamento ( $P=0,27$ ) ou de IEA ( $P=0,27$ ), nem interação entre eles ( $P=0,90$ ). No entanto, o número de oócitos Grau II variou em função do IEA ( $P=0,002$ ) e houve interação entre tratamento e IEA ( $P=0,001$ ), apesar de não se verificar efeito de tratamento ( $P=0,69$ ). O número de oócitos Grau II foi maior no grupo G-Cont14 ( $1,4\pm 0,2$ ) do que no restante dos grupos (G-Cont7 =  $0,4\pm 0,1$ ; G-bST7 =  $0,9\pm 0,1$  e G-bST14 =  $0,8\pm 0,2$  oócitos GII; Tabela 1).

Para número de oócitos Grau III, não houve efeito de tratamento ( $P=0,29$ ) ou de IEA ( $P=0,30$ ), nem interação entre eles ( $P=0,17$ ). De modo similar, o número de oócitos com *cumulus* expandido não foi alterado em função do tratamento ( $P=0,12$ ) ou do IEA ( $P=0,50$ ), nem ocorreu interação ( $P=0,26$ ).

O número de oócitos atrésicos não diferiu com o tratamento com bST ( $P=0,50$ ), nem com o IEA ( $P=0,79$ ) e não houve interação entre ambos ( $P=0,56$ ). Já o número de oócitos degenerados sofreu influência do tratamento ( $P=0,008$ ) e do IEA ( $P=0,04$ ), o que não ocorreu para interação entre tratamento e IEA ( $P=0,34$ , Tabela 1). Assim, os oócitos degenerados aumentaram significativamente no grupo bST ( $0,9\pm 0,1$  x  $1,3\pm 0,1$  oócitos degenerados) e no grupo aspirado a cada 14 dias ( $1,0\pm 0,1$  x  $1,4\pm 0,2$  oócitos degenerados; Tabela 1).

O número de estruturas que apresentaram sinais de clivagem ao *feeding* não diferiu em função do tratamento ( $P=0,59$ ), do IEA ( $P=0,96$ ), nem houve interação entre eles ( $P=0,24$ ). A taxa de clivagem também não foi afetada pelo tratamento ( $P=0,49$ ) ou pelo IEA ( $P=0,18$ ), nem sua interação foi evidenciada ( $P=0,24$ ; Tabela 1).

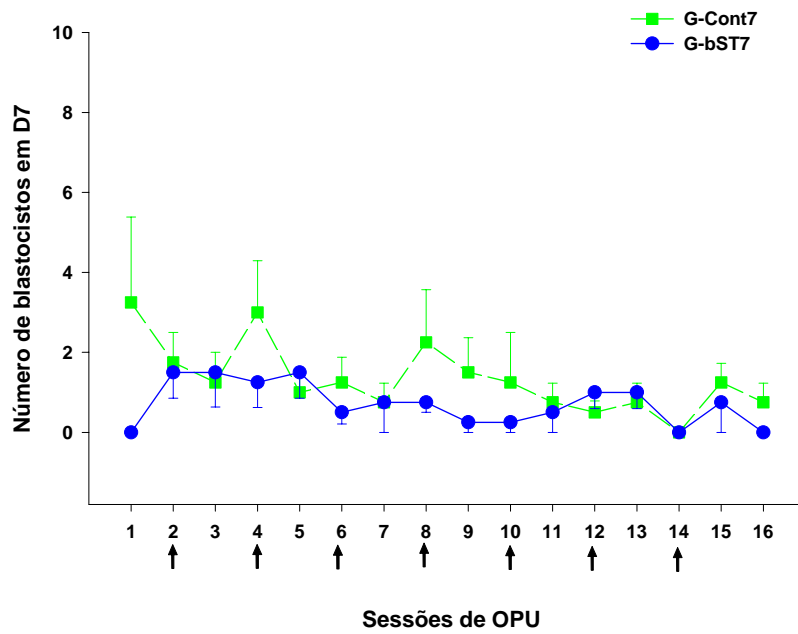
Para número de blastocistos em D6, observou-se efeito de tratamento ( $P=0,0007$ ), o que não ocorreu para IEA ( $P=0,86$ ), além da ausência de interação ( $P=0,60$ ) para esta variável. Assim, as búfalas tratadas com bST produziram menos embriões em D6 ( $0,5\pm 0,1$ ) do que as não tratadas ( $1,1\pm 0,1$  embriões D6; Tabela 3). A taxa de blastocisto em D6 também foi afetada pelo tratamento ( $P=0,003$ ), mas não pelo IEA ( $P=0,92$ ) e não houve interação entre ambos ( $P=0,85$ ). Desta forma, as búfalas tratadas com bST apresentaram menor taxa de blastocisto em D6 (6,8%) do que as não tratadas (13,7%; Tabela 3).

Efeito de tratamento ( $P=0,003$ ) foi observado no número de blastocisto em D7, porém não houve efeito de IEA ( $P=0,34$ ) nem interação entre ambos ( $P=0,67$ ; Tabela 1; Gráfico 4). As búfalas que não receberam bST produziram mais embriões em D7 do que as tratadas ( $1,4\pm 0,2$  x  $0,8\pm 0,1$  embriões em D7). Quando se comparou o efeito de tratamento a cada sessão de OPU entre os grupos G-Cont7 e



G-bST7 (Gráfico 3-A), e entre os grupos G-Cont14 e G-bST14 (Gráfico 3-B), não foi observado efeito de tratamento por sessão de OPU. Analisando a taxa de blastocisto em D7, observou-se efeito de tratamento ( $P=0,009$ ), mas não efeito de IEA ( $P=0,42$ ) ou interação entre tratamento e IEA ( $P=0,60$ ). As búfalas do grupo controle tiveram maior taxa de blastocisto em D7 do que as tratadas com bST (18,9% x 10,9% de blastocisto em D7; Tabela 3).

A



B

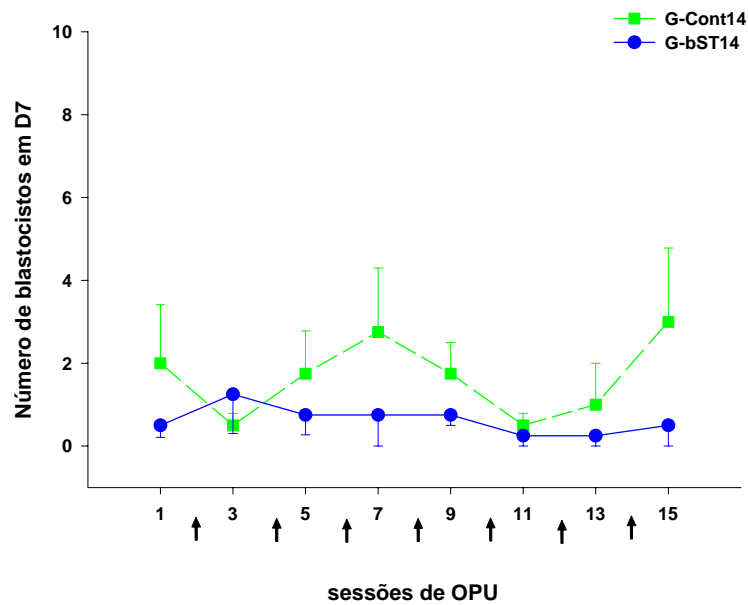


Gráfico 3 – Efeitos do intervalo entre aspirações e do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) no número de embriões em D7 (média±EPM) em fêmeas bubalinas. A) OPU realizada em intervalos regulares de sete dias; B) OPU realizada em intervalos regulares de 14 dias (\* = P<0,05). As setas indicam os momentos da administração do bST - Dourado - 2007

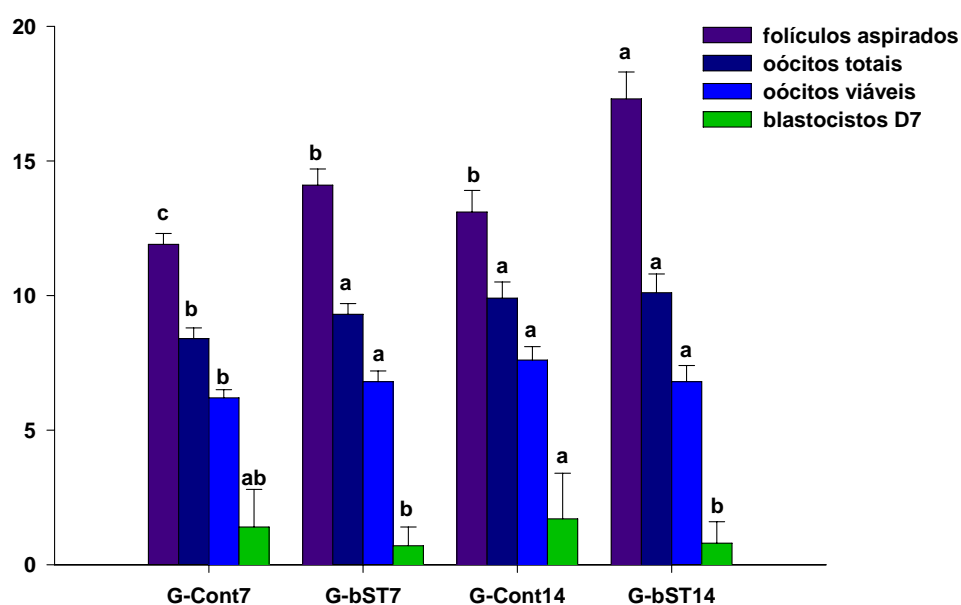


Gráfico 4 – Efeitos do intervalo entre aspirações e do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) na população folicular, qualidade oocitária e produção de blastocisto em D7 (média±EPM) em fêmeas bubalinas. Letra distinta denota diferença entre os grupos ( $P < 0,05$ ) - Dourado - 2007

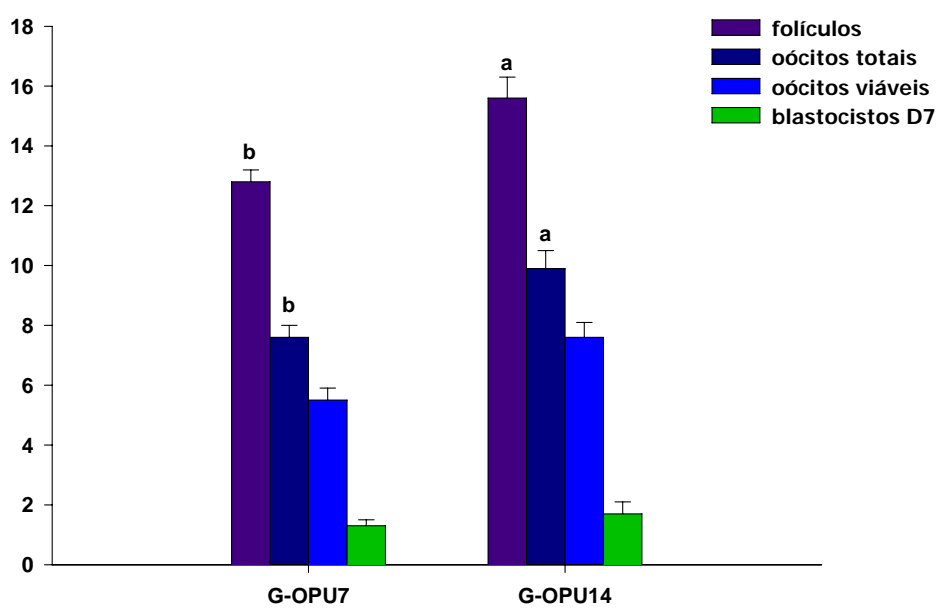


Gráfico 5 – Efeitos do intervalo entre aspirações na população folicular, qualidade oocitária e produção de blastocisto em D7 (média±EPM) em fêmeas bubalinas. Letra distinta denota diferença entre os grupos ( $P < 0,05$ ) - Dourado - 2007

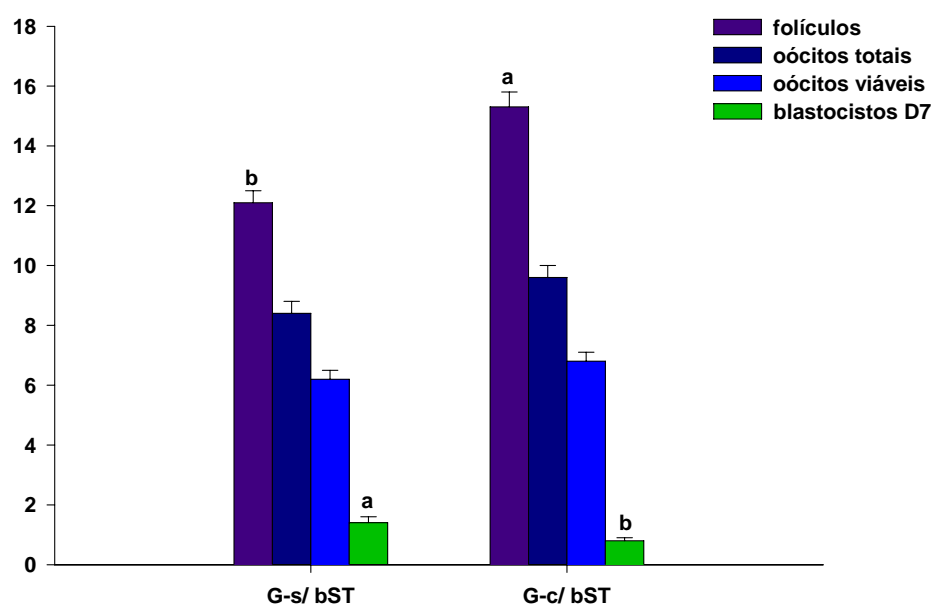


Gráfico 6 – Efeitos do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) na população folicular, qualidade oocitária e produção de blastocisto em D7 (média±EPM) em fêmeas bubalinas. Letra distinta denota diferença entre os grupos ( $P < 0,05$ ) - Dourado - 2007

Tabela 1 – Efeitos do intervalo entre aspirações e do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) na produção *in vitro* de embriões bubalinos (*Bubalus bubalis*) - Dourado - 2007

PARÂMETROS	VALORES DE P				
	G-Cont7	G-bST7	G-Cont14	G-bST14	Trat. Intervalo X Intervalo
nº de folículos aspirados	11,3±0,5 <sup>c</sup>	14,3±0,6 <sup>b</sup>	14,8±0,8 <sup>b</sup>	17,3±1,0 <sup>a</sup>	<0,0001 <0,0001 0,83
nº total de oócitos recuperados	7,6±0,4 <sup>b</sup>	9,3±0,4 <sup>a</sup>	9,9±0,6 <sup>a</sup>	10,1±0,7 <sup>a</sup>	0,07 0,004 0,07
Taxa de recuperação (%)	69,3 <sup>a</sup>	67,4 <sup>a</sup>	73,6 <sup>a</sup>	58,5 <sup>b</sup>	0,007 0,45 0,03
nº de oócitos viáveis	5,5±0,4 <sup>b</sup>	6,8±0,4 <sup>a</sup>	7,6±0,5 <sup>a</sup>	6,8±0,6 <sup>a</sup>	0,57 0,01 0,01
nº de oócitos Grau I	0,6±0,1	0,5±0,1	0,8±0,1	0,6±0,2	0,27 0,27 0,9
nº de oócitos Grau II	0,4±0,1 <sup>b</sup>	0,9±0,1 <sup>b</sup>	1,4±0,2 <sup>a</sup>	0,8±0,2 <sup>b</sup>	0,69 0,002 0,001
nº de oócitos Grau III	4,4±0,3	5,4±0,4	5,4±0,5	5,3±0,5	0,29 0,3 0,17
nº de oócitos com <i>cumulus</i> expandido	0,9±0,1 <sup>b</sup>	1,2±0,1 <sup>b</sup>	1,1±0,2 <sup>b</sup>	1,7±0,3 <sup>a</sup>	0,008 0,04 0,34
nº de oócitos atresícos	0,1±0,0	0,2±0,1	0,1±0,1	0,3±0,1	0,12 0,5 0,26
nº de oócitos degenerados	1,2±0,1	1,2±0,1	1,1±0,2	1,3±0,2	0,5 0,79 0,56

PARÂMETROS	VALORES DE P				Trat. X Intervalo		
	G-Cont7	G-bST7	G-Cont14	G-bST14		Trat. Intervalo	
nº de estruturas clivadas	2,0±0,2	2,2±0,2	2,4±0,4	1,9±0,3	0,59	0,96	0,24
Taxa de clivagem (%)	33,4	35,1	32,7	26	0,49	0,18	0,24
nº de blastocistos em D6	1,0±0,2 <sup>a</sup>	0,5±0,1 <sup>b</sup>	1,2±0,3 <sup>a</sup>	0,4±0,1 <sup>b</sup>	0,0007	0,86	0,6
Taxa de blastocistos em D6 (%)	13,7 <sup>a</sup>	6,6 <sup>b</sup>	13,5 <sup>a</sup>	7,3 <sup>ab</sup>	0,003	0,92	0,85
nº de blastocistos em D7	1,3±0,2 <sup>ab</sup>	0,7±0,1 <sup>b</sup>	1,7±0,4 <sup>a</sup>	0,8±0,2 <sup>b</sup>	0,003	0,34	0,67
Taxa de blastocistos em D7 (%)	18,6 <sup>a</sup>	9,6 <sup>b</sup>	19,5 <sup>a</sup>	13,4 <sup>ab</sup>	0,009	0,42	0,6

letra distinta denota diferença entre os grupos (p<0,05)

(conclusão)

Tabela 4 - Efeitos de intervalo entre aspirações na produção *in vitro* de embriões bubalinos (*Bubalus bubalis*) - Dourado - 2007

<b>PARÂMETROS</b>	<b>G-OPU7</b>	<b>G-OPU14</b>	<b>VALORES DE P</b>
<b>nº de folículos aspirados</b>	12,8±0,4	15,6±0,7	<0,0001
<b>nº total de oócitos recuperados</b>	8,5±0,3	10,0±0,5	0,004
<b>Taxa de recuperação (%)</b>	68,4	66,0	0,45
<b>nº de oócitos viáveis</b>	6,1±0,3	7,2±0,4	0,03
<b>nº de oócitos Grau I</b>	0,5±0,1	0,7±0,1	0,27
<b>nº de oócitos Grau II</b>	0,6±0,1	1,1±0,1	0,002
<b>nº de oócitos Grau III</b>	4,9±0,2	5,3±0,3	0,30
<b>nº de oócitos atrésicos</b>	1,2±0,1	1,2±0,1	0,79
<b>nº de oócitos degenerados</b>	1,0±0,1	1,4±0,2	0,04
<b>nº de estruturas clivadas</b>	2,1±0,2	2,1±0,2	0,96
<b>Taxa de clivagem (%)</b>	34,2	29,4	0,18
<b>nº de blastocistos em D6</b>	0,8±0,1	0,8±0,1	0,86
<b>Taxa de blastocistos em D6 (%)</b>	10,2	10,4	0,92
<b>nº de blastocistos em D7</b>	1,0±0,1	1,3±0,2	0,34
<b>Taxa de blastocistos em D7 (%)</b>	14,1	16,4	0,42



Tabela 3 - Efeitos do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) na produção *in vitro* de embriões bubalinos (*Bubalus bubalis*) - Dourado - 2007

PARÂMETROS	G-s/bST	G-c/bST	VALORES DE P
nº de folículos aspirados	12,1±0,4	15,3±0,5	<0,0001
nº total de oócitos recuperados	8,4±0,4	9,6±0,4	0,07
Taxa de recuperação (%)	70,7	64,4	0,07
nº de oócitos viáveis	6,2±0,3	6,8±0,3	0,60
nº de oócitos Grau I	0,7±0,1	0,5±0,1	0,27
nº de oócitos Grau II	0,8±0,1	0,9±0,1	0,69
nº de oócitos Grau III	4,8±0,3	5,4±0,3	0,29
nº de oócitos atrésicos	1,2±0,1	1,2±0,1	0,50
nº de oócitos degenerados	0,9±0,1	1,3±0,1	0,008
nº de estruturas clivadas	2,1±0,2	2,1±0,2	0,59
Taxa de clivagem (%)	33,1	32,1	0,49
nº de blastocistos em D6	1,1±0,1	0,5±0,1	0,0007
Taxa de blastocistos em D6 (%)	13,7	6,8	0,003
nº de blastocistos em D7	1,4±0,2	0,8±0,1	0,003
Taxa de blastocistos em D7 (%)	18,9	10,9	0,009

## 7 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo sugerem a possibilidade de multiplicação de animais de alto valor genético aplicando-se as técnicas de OPU-FIV. Mais estudos são necessários a fim de melhorar a eficiência de produção de embriões mediante este processo. Esta pode ser uma técnica alternativa para multiplicação do rebanho bubalino, uma vez que no presente estudo, foi produzido mais de um embrião (1,16) por sessão de OPU, a qual pode ser repetida semanal ou quinzenalmente. Estes resultados concordam com os obtidos anteriormente em bubalinos (SÁ FILHO, 2006, GRUPTA et al, 2006, Manjunatha et al, 2007). Porém, são inferiores aos observados para *Bos taurus* (CHAUBAL et al., 2006) e para *Bos indicus* (VIANA et al, 2004).

O tratamento com somatotrofina bovina recombinante foi eficiente para aumentar o número de folículos aspirados por onda de crescimento folicular, demonstrando seu potencial em aumentar a eficiência da técnica de aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões na espécie bubalina. Este incremento foi de 21% no presente estudo, semelhante aos achados descritos em fêmeas bubalinas por Sá Filho (2005), que obteve aumento de 28% (12,2 bST x 8,7 Controle) no número de folículos observados no momento da aspiração folicular, e por Baruselli et al. (2002), que observaram aumento de 20% (15,6 bST x 12,4 Controle) no número de folículos recrutados em protocolos de sincronização da ovulação.

Este efeito do tratamento com bST também condiz com o descrito em novilhas *Bos indicus* (BURATINI JR. et al., 2000), nas quais foi observado aumento de 36,5% nos folículos < 5,0 mm. Também, em *Bos taurus*, diversos estudos

corroboram com os achados do presente experimento, nos quais observaram-se aumentos de 27% (CRYSTAL et al., 1997) e de 55% (GONG et al., 1991) nos folículos totais, e aumento de 53% (DE LA SOTA et al., 1993) no número de folículos entre 2,0 e 9,0 mm em vacas lactantes. Ainda, nesta categoria animal, Bols et al. (1998) registraram aumento entre 20 e 25% no número de folículos disponíveis para aspiração no grupo tratado com bST em relação ao grupo controle. Em fêmeas taurinas de corte, Tripp et al., (2000) observaram aumento de 30% no número de folículos nos animais que receberam bST. Pavlok et al. (1996), por sua vez, não observaram aumento no número de folículos três dias após a administração de bST, provavelmente porque o efeito deste tratamento no aumento da população folicular ocorre após três dias da sua administração (GONG, 2002). Outros autores também relataram aumento do número de folículos aspiráveis em fêmeas *Bos taurus* (GONG et al., 1993; FERRAZ et al., 2002; ROTH et al., 2002). O incremento na população folicular, no entanto, discorda do observado por Jimenez-Krassel et al. (1999), que não detectaram mudanças no número de folículos em fêmeas *Bos taurus* lactantes.

Poucos estudos discutem os mecanismos envolvidos no aumento da população folicular promovido pelo tratamento com bST. Tais mecanismos ainda não são totalmente esclarecidos, mas se suspeita dos efeitos diretos do hormônio do crescimento (GH) no oócito ou via seu receptor nas células da granulosa, favorecendo a esteroidogênese (LUCY, 2000; HULL; HARVEY, 2001). Outros autores sugerem que seu efeito seja decorrente de alterações nos níveis plasmáticos ou ovarianos de IGF-I e insulina (GONG et al., 1993, 1994; BURATINI, 1999; GONG, 2002).

Os receptores de GH apresentam-se localizados nos tecidos ovarianos (LUCY et al., 1993b), principalmente no corpo lúteo, com baixa expressão destes

receptores em folículos de bovinos. No entanto, através de métodos mais sensíveis como PCR (reação da cadeia de polimerase), Izadyar et al. (1997) observaram a síntese de RNAm do receptor para GH nas células da granulosa, nas células do *cumulus* e nos oócitos. Kole et al. (1998) também observaram RNAm para receptor de GH e sua proteína no oócito e nas células da granulosa. Apesar destes achados, Gong (2002) descreve a ausência de efeito da suplementação com GH durante o cultivo *in vitro* de células da granulosa, obtidas de folículos pequenos, médios e grandes.

Outro possível mecanismo de ação a ser considerado seria a própria resposta ovariana ao aumento das concentrações de bST, promovendo maior síntese intra-ovariana de IGF-I. Entretanto, este mecanismo em fêmeas bovinas ainda é controverso na literatura (LUCY, 2000). Alguns trabalhos não identificaram a síntese da proteína de IGF-I e sua secreção nas células da granulosa de bovinos (GUTIERREZ et al., 1997). Além disso, a imunização de novilhas bovinas com agonista liberador de GH diminuiu a concentração plasmática do hormônio e de IGF-I, entretanto, falhou em diminuir a síntese de RNAm de IGF-I ovariano (COHICK et al., 1996).

Desta forma, as evidências apontam para o IGF-I como sendo o mediador do aumento no número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular em fêmeas tratadas com bST (LUCY, 2000). Este fato tem origem sistêmica, via aumento de sua síntese hepática, e/ou autócrina, pela maior produção de IGF-I no ovário, especialmente nas células luteínicas. Independentemente da origem, o aumento de IGF-I exacerba os efeitos de FSH e LH em células ovarianas em cultivo laboratorial, apresentando efeito significativo na atividade mitogênica e na esteroidogênese, de maneira dose-dependente, nas células da granulosa cultivadas

com a adição de IGF-I e/ou insulina (SPICER et al., 1993; GONG et al., 1993; 1994; GUTIERREZ et al., 1997; CHAMBERLAIN; MACIEL, 2002). Estes efeitos positivos são decorrentes, principalmente, do aumento no número ou na própria atividade dos receptores para gonadotrofinas presentes nestas células foliculares (LUCY, 2000).

Assim, considerando-se as diversas alterações promovidas pelo IGF-I e o reduzido número de informações sobre as ações diretas do GH, suspeita-se que o aumento no número de folículos recrutados e outros efeitos observados após o tratamento com bST seja decorrente das alterações dos níveis plasmáticos de IGF-I, corroborando com trabalhos já realizados (SÁ FILHO, 2006).

O aumento do intervalo entre sessões de OPU de sete para 14 dias mostrou efeito positivo no número de folículos disponíveis para aspiração e no número de oócitos totais recuperados para PIVE em fêmeas bubalinas. Este resultado demonstra que existe efeito positivo da adoção de intervalos entre aspirações menos intensivos, provavelmente, resultando em menores alterações no recrutamento folicular e, conseqüentemente, no número de folículos disponíveis para a OPU. Contudo, não há um consenso na literatura pesquisada sobre a melhor frequência para aspiração folicular em bubalinos, tampouco em bovinos. Alguns autores (REICHEMBACH et al., 1994; GARCIA; SALAHEDDINE, 1998) verificaram em fêmeas bovinas um aumento considerável no número de folículos visíveis e de oócitos recuperados, quando a aspiração foi repetida 2 vezes por semana, comparada a uma vez por semana. Contrariamente, Viana et al. (2004), obtiveram melhores resultados quando a aspiração folicular foi realizada uma vez por semana ao invés de 2 vezes por semana. Por outro lado, outros autores (GIBBONS et al., 1994) não encontraram diferenças relacionadas ao intervalo entre aspirações foliculares.

Para o tratamento com bST, o número de oócitos totais recuperados apresentou tendência de aumento nos animais que receberam bST (12,5%;  $p=0,07$ ), em concordância com os dados registrados por Sá Filho (2006), que observou incremento de 21% ( $P=0,07$ ) no número de oócitos recuperados quando o bST foi utilizado. Estes resultados, porém, discordam daqueles observados em fêmeas bovinas (BOLS et al., 1998; TRIPP et al., 2000), nas quais não foi observado aumento no número de oócitos recuperados após o tratamento com bST.

O número de oócitos recuperados no presente estudo é superior a alguns trabalhos descritos na literatura em fêmeas bubalinas (PAVASUTHIPAISIT et al., 1995; BONI, ROVIELO; ZICARELLI, 1996; BONI et al., 1997; NEGLIA et al., 2003; ZICARELLI, 2003; TECHAKUMPHU et al., 2004; GUPTA et al., 2006; SÁ FILHO, 2006). Entretanto, o resultado é semelhante a outras citações (OHASHI et al., 2002). Diversos são os fatores que acarretam tamanha variação nos resultados obtidos na PIVE de búfalas, tais como: raça, variação individual (BONI et al., 1997; BRIENZA et al., 2001), ciclicidade (BONI et al., 1994), estado nutricional, idade, presença de corpo lúteo no ovário e idade reprodutiva (KAMONPATANA; CHUANGSOONGNEON, 1994; PAVASUTHIPAISIT et al., 1995), qualidade da imagem do aparelho de ultra-som utilizado (HASHIMOTO et al., 1999; OHASHI et al., 2002), intervalo entre aspirações (GARCIA; SALAHEDDINE, 1998; VIANA et al., 2004), estímulo hormonal prévio (BONI et al., 1994; TRIPP et al., 2000), pressão de vácuo (BOLS et al., 1996, 1997; WARD et al., 2000), bem como a própria variação de acordo com a equipe que realiza os procedimentos (MERTON et al., 2003). Conforme descrito na literatura (KRUIP et al., 1994; NIBART et al., 1995; WATANABE et al., 1998a e DAYAN et al., 2000a,b), a variação individual é o fator mais relevante na PIVE de bovinos.

O número de oócitos recuperados variou conforme a sessão de aspiração. Comparando a repetição de sessões de OPU em bovinos, Ferraz et al. (2000) relataram que o primeiro procedimento de OPU apresenta melhores resultados, igualando-se apenas a intervalos superiores a 60 dias. Porém, a OPU semanal ou quinzenal mantém médias de 8,3 oócitos de boa qualidade (viáveis), por procedimento em bovinos. Hasler et al. (1995) demonstraram que o número de oócitos recuperados caiu consideravelmente após 50 sessões de aspiração em um mesmo animal. Em bubalinos, Sá Filho (2006) observou efeito significativo da sessão de aspiração no número de folículos disponíveis para a aspiração. Em estudo com 10 sessões de OPU, observou redução de 27% no número de folículos disponíveis para a aspiração nas cinco últimas sessões. Este efeito provavelmente é decorrente do reduzido intervalo entre aspirações adotado naquele estudo (duas e três vezes por semana), com reduzido período para a regeneração das lesões decorrentes das sessões anteriores, levando a formação de coágulos e/ou fibrose e prejudicando o recrutamento folicular. O resultado obtido no presente estudo discorda dos apresentados por Boni, Roviello e Zicarelli, (1996) em fêmeas bubalinas Mediterrâneas e também por outros autores em estudos com fêmeas bovinas, os quais não observaram diferenças na população folicular de animais submetidos à aspiração folicular com a mesma frequência (GIBBONS et al., 1994; BROADBENDT et al., 1997; GARCIA; SALAHEDDINE, 1998; GOODHAND et al., 1999; VIANA et al., 2004). Esta contradição entre os resultados pode ser decorrente de peculiaridades na fisiologia ovariana na espécie bubalina, relativas à sua resposta aos mediadores inflamatórios e/ou cicatriciais decorrentes das aspirações anteriores. Viana (2002) registrou, em bovinos, que o risco de lesões ovarianas decorrentes da técnica de

aspiração folicular é proporcional ao número de sessões de OPU ao qual as doadoras são submetidas e ao número médio de estruturas recuperadas por sessão.

Outro aspecto que deve ser considerado é a possível alteração na saúde da doadora mediante um programa intensivo de OPU. No presente trabalho, não foram observadas alterações no estado geral, nem tampouco no trato reprodutivo das doadoras, mesmo após uma longa seqüência de aspirações foliculares. Não foram observados casos de aderência, nem outras alterações reprodutivas importantes. Os animais que sofreram grande número de intervenções apresentaram maior rigidez ovariana no momento de introdução da agulha, provavelmente ocasionada por fibrose. Porém parece que não houve alteração na produção de oócitos nem de embriões por este motivo. Viana (2002) registra o aumento de 28,6% (2/7) para 77,8% (7/9) da incidência de algum grau de aderência ou fibrose nos ovários de animais submetidos a mais de 20 sessões de aspiração. Em ovários que possuíam folículos grandes ou cistos, foi observada, eventualmente, a formação de corpos ecogênicos na semana subsequente à OPU, podendo representar coágulos intrafoliculares. Tais estruturas foram descritas também por Sá Filho (2006), que verificou queda significativa no número de oócitos recuperados a partir da sexta sessão de aspiração. O autor atribui como provável causa do aparecimento precoce de alterações nos ovários, a incapacidade dos animais se recuperarem das lesões adquiridas anteriormente. No entanto, são necessários estudos histológicos para determinar a real extensão das lesões ovarianas acarretadas pelo processo.

A taxa de recuperação oocitária obtida no presente estudo está dentro da faixa de variação observada em alguns trabalhos realizados em fêmeas bovinas (PIETERSE et al., 1991; KRUIP et al., 1994; GIBBONS et al., 1995; GARCIA; SALAHEDDINE, 1998; MANCHATKOVA et al., 2000; VIANA et al., 2004), bem como



aos descritos em fêmeas bubalinas (BONI; ROVIELLO, ZICARELLI, 1996; MANIK et al., 2002). Entretanto, observou-se menor taxa nas búfalas tratadas com bST e aspiradas a cada 14 dias, em comparação aos outros grupos testados. Este resultado está em concordância com o relatado por Tripp et al. (2000), os quais descrevem redução de 14% na taxa de recuperação de animais tratados com bST (30%) em relação aos não tratados (44%), porém discorda do obtido por Sá Filho (2006), que não registrou alteração na taxa de recuperação oocitária entre o grupo bST e o controle (54,5% x 57,7%, respectivamente). Segundo Sá Filho (2006), é possível que intervalos menos freqüentes (a cada 7 ou 14 dias) possam levar a uma assincronia entre a atresia folicular e oocitária, o que poderia determinar maiores dificuldades na remoção do oócito do interior do folículo durante a aspiração (BOLS et al., 1998). O tratamento com bST em fêmeas bovinas causa regressão prematura do folículo dominante, reduzindo seu período de dominância ao redor de 24 a 48 horas (LUCY et al., 1994; CRYSTAL et al., 1997; KIRBY et al., 1997). Este efeito ocorre provavelmente devido à maior secreção de estradiol em vacas tratadas com bST, levando a um *feedback* negativo na secreção LH e FSH na presença de progesterona, determinando o surgimento prematuro da segunda onda de desenvolvimento folicular (CRYSTAL et al., 1997). Adicionado a este efeito, sabe-se que a total eliminação do oócito do ovário pode levar ao redor de 1 a 2 semanas (KRUIP et al., 1982). Portanto, a aspiração de folículos de animais tratados com bST em intervalos menos intensos pode gerar diferentes resultados devido às grandes variações dos momentos fisiológicos (desenvolvimento ou atresia) entre os oócitos e os folículos puncionados.

Quanto ao número de oócitos viáveis (Graus I, II e III), verificou-se a interação entre o tratamento e o intervalo entre as aspirações, ou seja, o grupo controle com

intervalos de aspiração de 7 dias apresentou menor número de estruturas do que os outros grupos. Entretanto, o melhor resultado obtido nos grupos aspirados a cada 14 dias (controle ou tratados com bST), ou no grupo aspirado a cada 7 dias e tratado com bST, não foi acompanhado de elevação no número de oócitos de grau 1. Este resultado está parcialmente de acordo com Roth et al. (2002), que obtiveram maior porcentagem de oócitos de grau 1 quando foi administrado bST, em relação aos animais do grupo controle. Os autores discutem ainda que o efeito benéfico do bST sobre a qualidade oocitária pode ser mediado via IGF-1. Em estudo prévio, Roth et al. (2001) observaram que aspirações freqüentes, realizadas entre os dias 4 e 15 do ciclo estral de animais em estresse térmico, favoreceram o aumento do número de oócitos de grau 1, em comparação aos animais submetidos à OPU somente no dia 4 do ciclo. Segundo os autores, isto pode ser decorrente do efeito benéfico da alta freqüência de aspirações foliculares levando à emergência de folículos saudáveis, com oócitos de melhor qualidade. Ainda com relação ao intervalo de aspiração, os dados de Viana et al. (2004) corroboram com a hipótese de que maior freqüência de OPU melhora a qualidade oocitária, visto que obtiveram maior porcentagem de oócitos de Grau I quando os animais foram submetidos ao procedimento duas vezes por semana, ao invés de apenas uma. O autor sugere que a presença de um folículo dominante pode ser o responsável pela pior qualidade oocitária quando maiores intervalos de aspiração são adotados. Outro achado importante do presente estudo foi relativo ao número de oócitos degenerados, que foi maior nos animais aspirados a cada 14 dias, corroborando com a literatura descrita acima. Contudo, contrariamente ao esperado, também houve maior número de oócitos degenerados nos animais que receberam o tratamento com o bST.

O número de embriões clivados não variou conforme o uso ou não do bST. Este resultado está de acordo com o reportado por Roth et al. (2002) e Tripp et al. (1999), em bovinos, que verificaram que o bST não foi eficiente para elevar as taxas de clivagem. Também em bubalinos, Sá Filho (2006) não obteve diferenças na taxa de clivagem relacionadas ao tratamento com o bST. No presente estudo não foi verificado efeito de intervalo de aspiração sobre o número de estruturas clivadas, em concordância com Viana et al. (2004).

Houve efeito negativo do tratamento com bST sobre a produção embrionária, com redução de 8% na taxa de blastocistos no 7º dia de cultivo. Este resultado está em desacordo com o descrito por Sá Filho (2006), que não verificou efeito do bST sobre os blastocistos obtidos em fêmeas bubalinas (19,7% no grupo bST x 26,0% no grupo controle). Uma possível explicação para tal diferença, segundo o próprio autor, é que houve produção embrionária em metade das rotinas laboratoriais (somente nas 5 primeiras), e que este fator pode ter contribuído para a ausência de diferença decorrente do tratamento com o bST. Por outro lado, há autores que não observaram efeito positivo do bST nas taxas embrionárias em bovinos (BOLS et al., 1998; TRIPP et al., 2000; ROTH et al., 2002).

In vitro, a adição de GH ao meio de cultivo tem efeito favorável sobre a produção embrionária de bovinos (MTANGO et al., 2003), mais especificamente na fase de mórula quando o meio é suplementado com soro fetal bovino (IWATA et al., 2003). Outros estudos também suportam a idéia da importância do GH e do IGF-I para o desenvolvimento embrionário (MOREIRA et al., 2002). Porém, a superestimulação com IGF-I e insulina podem ser prejudiciais ao desenvolvimento do oócito (ARMSTRONG et al., 2003). Deste modo, é possível que a dose administrada no presente estudo seja inadequada para bubalinos, elevando de

forma exacerbada as concentrações de IGF-I intrafoliculares, e acarretando em comprometimento da competência oocitária para a produção de blastocistos. Neste sentido, são necessários estudos para adequação das doses de bST na espécie bubalina.

Pode-se verificar que as taxas médias de produção embrionária *in vitro* obtidas no presente estudo foram semelhantes às relatadas na literatura para a espécie bubalina, visto que são consideradas adequadas, taxas de produção embrionária entre 13 e 30% (BONI, ROVIELLO; ZICARELLI, 1996; GASPARRINI et al., 2000; NEGLIA et al., 2003).

Tendo em vista as considerações acima, pode-se verificar que a técnica de OPU-PIV em bubalinos embora ainda necessite de ajustes para melhoria de eficiência, mostra-se promissora para a difusão de material genético materno.

## 8 CONCLUSÃO

A hipótese de que o IEA e o tratamento com bST aumentam o número de folículos e de oócitos recuperados foi aceita. No entanto, foi rejeitada a hipótese de que tanto o IEA quanto o tratamento com bST aumentariam a eficiência da PIVE em bubalinos, apesar do aumento do número de oócitos viáveis no grupo aspirado a cada 14 dias.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ADAMS, G. P. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization & superstimulation. **Theriogenology**, v. 41, p. 19-24, 1994.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992.

ALI, A.; ABDEL-RAZEK, A. K.; ABDEL-GHAFFAR, S.; GLATZEL, P. S. Ovarian follicular dynamics in buffalo cows (*Bubalus bubalis*). **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 3, p. 214-218, 2003.

ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J.; FIRST, N. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 943-956, 1996.

ARMSTRONG, D. G.; MCEVOY, T. G.; BAXTER, G.; ROBINSON, J. J.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J.; WEBB, R.; SINCLAIR, K. D. Effect of dietary energy and protein on bovine follicular dynamics and embryo production *in vitro*: associations with the ovarian insulin-like growth factor system. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1624-1632, 2001.

ARMSTRONG, D. G.; WEBB, R. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. **Reviews of Reproduction**, v. 2, p. 139-146, 1997.

AWASTHI, M. K.; KHARE, A.; KAVANI, F. S.; SIDDIQUEE, G. M.; PANCHAL, M. T.; SHAH, R. R. Is one-wave follicular growth during the estrous cycle a usual phenomenon in water buffaloes (*Bubalus bubalis*)? **Animal Reproduction Science**, v. 92, n. 3-4, p. 241-253, 2006.

BANG, P.; HALL, K. Insulin-like growth factors as endocrine and paracrine hormones. Cap. 7. In: SCHOFIELD, P.N. (Ed.) **The insulin-like growth factors – structure and biological functions**, Oxford, p. 221-239, 1992.

---

<sup>1</sup> Conforme as diretrizes para apresentação de dissertação e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4 ed. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84 p.

BARUSELLI, P. S. Dinâmica folicular durante o ciclo estral e resposta superovulatória em fêmeas bubalinas (*Bubalus bubalis*). 1997. 96f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1997.

BARUSELLI, P. S., CARVALHO, N. A. T. Controle do desenvolvimento folicular para emprego de biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 94-102, 2003.

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; CAVALCANTE, A. K. S.; NICHI, M.; ZICARELLI, L. Use of rbST associated to a protocol for multiple ovulation and embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). **In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BUFALO**, 2003. p. 269-273.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; ARRUDA, R. P., CARVALHO, N. A. T.; OLIVEIRA, C. A. Plasma estradiol and progesterone concentrations in superovulated buffalo in presence of CIDR-B devices. **Theriogenology**, v. 57, p. 761, 2002.

BARUSELLI, P. S.; MUCCIOLO, R. G.; VISINTIN, J. A.; VIANA, W. G.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; OLIVEIRA, C. A.; MOLERO-FILHO, J. R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1531-1547, 1997.

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

BAUMAN, D. E.; EVERETT, R. W.; WEILAND, W. H.; COLLIER, R. J. Production responses to bovine somatotropin in northeast dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 12, p. 2564-2573, 1999.

BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B.; XU, K. P.; KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 87-98, 1989.

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

BILBY, T. R.; GUZELOGLU, A.; KAMIMURA, S.; PANCARCI, S. M.; MICHEL, F.; HEAD, H. H.; THATCHER, W. W. Pregnancy and bovine somatotropin in non lactating dairy cows: I. Ovarian, conceptus, and insulin-like growth factor system responses. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3256-3267, 2004.

BLONDIN, P.; BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; BARNES, F.; SIRARD, M. A. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 38-43, 2002.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M. A. *In vitro* production of bovine embryos: developmental competence is acquired before maturation. **Theriogenology**, v. 47, p. 1061-1075, 1997.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, p. 54-62, 1995.

BÓ, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTINEZ, M.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 39, n. 1, p. 193-204, 1995.

BOLS, P. E.; YSEBAERT, M. T.; LEIN, A.; CORYN, M.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF program. **Theriogenology**, v. 49, n. 5, p. 983-995, 1998.

BOLS, P. E.; YSEBAERT, M. T.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. 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.; DI PALO, R.; BARBIERI, V.; ZICARELLI, L. Ovum pick-up in deep anestrus buffaloes. In: World Buffalo Congress, 4; 1994, São Paulo **Proceedings...**1994, v. 3, p. 480-482.

BONI, R.; ROVIELLO, S.; CAMPANILE, G.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L. Single ovum pick-up performed from the sixth to the eleventh estrus cycle day in buffalo cows. In: Symposium on Reproduction and Animal Breeding: Advances and Strategies, 1995. **Proceedings...** p. 357-358,.

BONI, R.; ROVIELLO, S.; GASPARRINI, B.; LANGELLA, M.; ZICARELLI, L. *In vitro* production of buffalo embryos in chemically defined medium. **Buffalo Journal**, v. 1, p. 115-120, 1999.

BONI, R.; ROVIELLO, S.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI, L. Pregnancies established after transferring embryos yielded by ovum pick-up and *in vitro* embryo production in



Italian buffalo cow. In: **World Buffalo Congress**, 5; 1997. Caserda, Italy, **Proceedings...**p. 787-792, 1997.

BONI, R.; ROVIELLO, S.; ZICARELLI, L. Repeated ovum pick-up in Italian Mediterranean buffalo cows. **Theriogenology**, n. 46, v. 5, p. 899-909, 1996.

BORGES, A. M.; TORRES, C. A.; RUAS, J. R. M.; ROCHA JR., V. R.; CARVALHO, G. R. Resposta superovulatória de novilhas mestiças Holandês-Zebutratadas com somatotrofina recombinante bovina (rbST). **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 30, p. 1439-1444, 2001.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. *In vitro* embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v. 51, p. 59-70, 1999.

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

BRIENZA, V. C.; NEGLIA, G.; ROSSI, N. Comparison of in vitro embryo output with or without hormonal supplementation during oocyte handling and storage in Mediterranean Italian buffalo (*Bubalus bubalis*). In: **World Buffalo Congress**, 6; 2001. Maracaibo, v. 2, 2001.

BROADBENT, P. J.; DOLMAN, D. F.; WATT, R. G.; SMITH, A. K.; FRANKLIN, M. F. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 5, p. 1027-1040, 1997.

BUNGARTZ, L. et al. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. **Theriogenology**, v. 43, p. 667-675, 1995.

BUNGARTZ, L.; NIEMANN, H. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 583-591, 1994.

BURATINI JR. JR, J.; PRICE, C. A.; VISITIN, J. A.; BO, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bST) on ovarian follicular development in nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421-431, 2000.

CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO, V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Animal Reproduction**, v. 3, p. 19-28, 2006.

CARTER, J. A.; PARANAGUÁ, H. N.; PARANAGUÁ, H. F. N. et al. The effect of rbST on follicle populations of Nelore heifers during the dry season in Brazil. **Theriogenology**, v. 49, p. 342, 1998.

CHANDRASHEKAR, V.; ZACZEK, D.; BARTKE, A. The consequences of altered somatotrophic system on reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 1, p. 17-27, 2004.

CHAUHAN, M. S.; SINGLA, S. K.; MANIK, R. S.; MADAN, M. L. Increased capacitation of buffalo sperm by heparin as confirmed by electron microscopy and *in vitro* fertilization. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 35, n. 10, p. 1038-1043. 1997.

COHICK, W. S. Role of the insulin-like growth factors and their binding proteins in lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 6, p. 1769-1777, 1998.

COHICK, W. S.; ARMSTRONG, J. D.; WHITACRE, M. D.; LUCY, M. C.; HARVEY, R. W.; CAMPBELL, R. M. Ovarian expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, and growth hormone (GH) receptor in heifers actively immunized against GH-releasing factors. **Endocrinology**, v. 137, n. 5, p. 1670-1677, 1996.

CROWE, M. A. Gonadotrophic control of terminal follicular growth in cattle. **Reproduction Domestic Animals**, v. 34, n. 3, p. 157-166, 1999.

CUSHMAN, R.A.; DESOUZA, J.C.; HEDGPETH, V.S. et al. Alteration of activation, growth and atresia of bovine preantral follicles by long-term treatment of cows with estradiol and recombinant bovine somatotropin. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 581-586, 2001.

DAFTARY, S. S.; GORE, A. C. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, n. 5, p. 292-306, 2005.

DANELL, B. **Oestrus behaviour, ovarian morphology and cyclical variation infollicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers**. Tese de doutorado, Universidade de Uppsala, Sweden, 1987.

DAS, G. K.; JAIN, G. C.; SOLARTI, V. S.; TRIPATHI, V. N. Efficacy of various collection methods for oocytes retrieval in buffalo. **Theriogenology**, v. 46, p. 1403-1411, 1996.

DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; MEIRELLES, F. V.; LÔBO, R. B.; WATANABE, Y. F. *Bos indicus* and *Bos taurus* *in vitro* produced embryos develop similarly in tropical conditions. **Theriogenology**, v. 53, p. 348, 2000b.

DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; WATANABE, Y.F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arquivo Faculdade de Veterinária, UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 181-185, 2000a.

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

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

DRIANCOURT, M. A.; THATCHER, W. W.; TERQUI, M.; ANDRIEU, D. Dynamics of ovarian follicular development in cattle during the estrous cycle, early pregnancy and in response to PMSG. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 8, n. 2, p. 209-221, 1991.

EL-GHANNAM, F.; EL-NAGGAR, M. A. Studies of oocytogenesis of buffalo ovaries. **ZBL Journal of veterinary medicine series A**, v. 22, p. 248-255, 1975.

EL-GHANNAM, F.; EL-NAGGAR, M. A. The prenatal development of the buffalo ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, p. 479-483, 1974.

EL-WISHY, A. B. The postpartum buffalo I: Endocrinological changes and uterine involution. **Theriogenology**, v. 97, p. 201-215, 2007.

ERICKSON, B. H. Development and radio-response of pre-natal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 10, p. 97-105. 1966.

ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertility and Sterility**, v. 76, p. 943-949, 2001.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Nucleolus structure and transcriptional activity in relation to oocyte diameter in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v. 43, p. 503-512, 1996.

FERNANDEZ, N.; RODRIGUEZ, M.; PERIS, C.; BARCELO, M.; MOLINA, M.P.; TORRES, A. Bovine somatotropin dose titration in lactating dairy ewes. 1. Milk yield and milk composition. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1073-1082, 1995.

FERRAZ, M. L.; DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F. Influência da frequência de OPU-FIV em bovinos. **Arquivo Faculdade de Veterinária, UFRGS**, v. 28, n. 1, p. 251, 2000.

FERRAZ, M. L.; WATANABE, Y. F.; JOAQUIM, D. C.; WATANABE, M. R.; ACCORSI, M. F.; MEIRELLES, F. V.; SÁ FILHO, M. F.; BARUSELLI, P. S. Produção *in vitro* de embriões bubalinos: resultados preliminares. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 423, 2005, Supplement 1.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of pre antral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 135-163, 2003.

FORTUNE, J. E.; SIROIS, J.; TURZILLO, A. M.; LAVOIR, M. Follicle selection in domestic ruminants. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 43, p. 187, 1991, Suplemento.

FOULADI NASHTA, A. A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K. H. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development *in vitro*: A comparative evaluation of antral follicle culture with others methods. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 255-262, 1998.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, p. 1341-1357, 2001.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick-up in water buffalo. **Theriogenology**, v. 49, p. 400, 1998.

GALO, L.; BAILONI, L.; SCHIAVON, S.; CARNIER, P.; RAMANZIN, M.; ANDRIGHETTO, I.; BITTANTE, C. Effect of slow-release somatotropin on the pattern of milk yield between and within injection interval. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 46-51, 1997.

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. **Theriogenology**, v. 50, n. 4, p. 575-585, 1998.

GASPARRINI, B. *In vitro* embryo production in buffalo specie: state of the ART. **Theriogenology**, v. 57, p. 237-256, 2002.

GASPARRINI, B.; NEGLIA, G.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L. Effect of cysteamine during *in vitro* maturation on buffalo embryo development. **Theriogenology**, v. 54, p. 1537-1542, 2000.

GIBBONS, J. R.; BEAL, W. E.; KRISHER, R. L.; FABER, E. G.; PEARSON, R. E.; GWAZDAUSKAS, F. C. Effects of once- versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v. 42, p. 405-419, 1994.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, v. 32, p. 787-795, 1989.

GONG, J. G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 229-241, 2002.

GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; WILMUT, I.; WEBB, R. 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.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 6, p. 941-949, 1991.

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

GONG, J. G.; MCBRIDE, D.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on bovine granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, v. 143, n. 1, p. 157-164, 1994.

- GOODHAND, K. L. et al. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951-961, 1999.
- GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryo**. CAB International, University Press, Cambridge, 640p, 1994.
- GOUGEON, A.; CHAINY, G.B. Morphometric studies of small follicles in ovaries of women at different ages. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, n. 2, p. 433-442, 1987.
- GÜLEKLI, B.; BULBUL, Y.; ONVURAL, A.; YORUKOGLU, K.; POSACI, C.; DEMIR, N.; ERTEN, O. Accuracy of ovarian reserve tests. **Human Reproduction**, v. 14, n. 11, p. 2822-2826, 1999.
- GULER, A.; POULIN, N.; MERMILLOD, P.; TERQUI, M.; COGNIE, Y. Effect of growth factors, EGF and IGF-I, and estradiol on *in vitro* maturation of sheep oocytes. **Theriogenology**, v. 54, n. 2, p. 209-218, 2000.
- GUPTA, V.; MANIK, R. S.; CHAUHAN, M. S.; SINGLA, S. K.; AKSHEY, Y. S.; PALTA, P. Repeated ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval from cyclic Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*): oocyte recovery and quality. **Animal Reproduction Science**, v. 91, n. 1-2, p. 89-96, 2006.
- GUTIÉRREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; ARMSTRONG, D. G.; WEBB, R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) production by bovine granulosa cells *in vitro* and peripheral IGF-I measurement in cattle serum: an evaluation of IGF-binding protein extraction protocols. **Journal of Endocrinology**, v. 153, n. 2, p. 231-240, 1997.
- HAGEMANN, L. J.; BEAUMONT, S. E.; BERG, M.; DONNISON, M. J.; LEDGARD, A.; PETERSON, A. J.; SCHURMANN, A.; TERVIT, H. R. Development during IVPs of bovine oocytes from dissected follicles: interactive effects of estrous cycle stage, follicle size and atresia. **Molecular Reproduction and Development**, v. 53, p. 451-458, 1999.
- HARTNELL, G. F.; FRANSON, S. E.; BAUMAN, D. E.; HEAD, H. H.; HUBER, J. T.; LAMB, R. C.; MADSEN, K. S.; COLE, W. J.; HINTZ, R. L. Evaluation of sometribove in a prolonged-release system in lactating dairy cows-production responses. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n.8, p. 2645-2663.
- HASLER, J. F.; HENDERSON, W. B.; HURTGEN, P. J.; JIN, Z. Q.; McCAULY, A. D.; MOWER, S. A.; NEELY, B.; SHUEY, L. S.; STOKES, J. E.; TRIMMER, S. A.

Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, p. 141-152, 1995.

HENDRIKSEN, P. J. M.; STEENWEG, W. N.; HARKEMA, J. C.; MERTON, J. S.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Effect of different stages of the follicular wave on *in vitro* developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 61, p. 909-920, 2004.

HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. M.; STEENWEG, W. N. M.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J. Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes **Theriogenology**, v. 53, p. 11-20. 2000.

HERRLER, A.; EINSPANIER, R.; SCHAMS, D. Effect of recombinant bovine somatotrophin (rBST) on follicular IGF-I contents and the ovarian response following superovulatory treatment in dairy cows: a preliminary study. **Theriogenology**, v. 41, p. 601-611, 1994.

HIRSHFIELD, A. N. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 421-428, 1994.

HUFANA-DURAN, D.; PEDRO, P. B.; VENTURINA, H. V.; HUFANA, R. D.; SALAZAR, A. L.; DURAN, P. G.; CRUZ, L. C. Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of *in vitro*-derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Theriogenology**, v. 61, n. 7-8, p. 1429-1439, 2004.

HULL, K.L.; HARVEY, S. Growth hormone therapy and quality of life: possibilities, pitfalls and mechanisms. **Journal of Endocrinology**, v. 179, n. 3, p. 311-333, 2003.

HUNTER, M. G.; ROBINSON, R. S.; MANN, G. E.; WEBB, R. Endocrine and paracrine control of follicular development and ovulation rate in farm species. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.461-477, 2004.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; KALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

IWATA, H.; OHOTA, M.; HASHIMOTO, S.; KIMURA, K.; ISAJI, M.; MIYAKE, M. Stage-specific effect of growth hormone on developmental competence of bovine embryos produced in-vitro. **Journal of Reproduction Development**, v. 49, n. 6, p. 493-49, 2003.

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.

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

JENNISCHE, E.; ISGAARD, J.; ISAKSSON, O. G. P. Local expression of insulinlikegrowth factors during tissue growth and regeneration. In: SCHOFIELD, P. N. (Ed.). **The insulin-like growth factors – structure and biological functions**, Oxford: 1992. p. 221-239.

JIMENEZ-KRASSEL, F.; BINELLI, M.; TUCKER, H. A; IRELAND, J. J. Effect of long-term infusion with recombinant growth hormone-releasing factor and recombinant bovine somatotropin on development and function of dominant follicles and corpora lutea in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n.9, p. 1917-1926, 1999.

JOYCE, I. M.; KHALID, M.; HARESING, W. The effect of recombinant GH treatment on ovarian follicle growth and atresia in sheep. **Theriogenology**, v. 54, p. 327-338, 2000.

KACINSKIS, M. A.; LUCCI, C. M.; LUQUE M. C.; BÁO, S. N. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 87, n. 1-2, p. 45-57, 2005.

KAMONPATANA, M., CHUANGSOONGNEON, U. Time related to *in vitro* maturation of immature oocytes in swamp buffaloes. **Buffalo Journal**, p.135-146, 1994, Suplemento 2.

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

KNOPF, L.; KASTELIC, J. P.; SCHALLENBERGER, E.; GINTHER, O. J. Ovarian follicular dynamics in heifers: test of two-wave hypothesis by ultrasonically monitoring individual follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 6, p. 111–119, 1989.

KÖLLE, S.; SINOWATZ, F.; BOIE, G.; LINCOLN, D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 4, p. 836-842, 1998.



KOZICKI, L. E.; SEGUI, M. S.; FANTINI FILHO, J. C.; JUNIOR, P. G.; WEISS,

KRUIP, T. A. M.; DEN DASS, J. H. G. *In vitro* produced and cloned embryos: Effect on pregnancy, parturition and offspring. **Theriogenology**, v. 47, p. 43-52, 1997.

KRUIP, T. A.; DIELEMAN, S. J. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. **Reproduction Nutrition and Development**, v. 22, n. 3, p. 465-473, 1982.

KRUIP, T.A.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M.W.; PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v. 42, n. 4, p. 675-84, 1994.

KUMAR, A.; SOLANKI, V. S.; JINDAL, S. K.; TRIPATHI, V. N.; JAIN, G. C. Oocyte retrieval and histological studies of follicular population in buffalo ovaries. **Animal Reproduction Science**, v. 47, n. 3, p. 189-195, 1997.

KUMAR, D.; PUROHIT, G. N. Effect of epidermal and insulin-like growth factor-I on *cumulus* expansion, nuclear maturation and fertilization of buffalo *cumulus* oocyte complexes. **Veterinarski Arhiv**, v. 74, n. 1, p. 13-25, 2004.

LAZZARI, G.; GALI, C.; MOOR, R. E. Centrifugal elutriation of porcine oocytes isolated from the ovaries of newborn piglets. **Analytical Biochemical**, v. 200, p. 31-35, 1992.

LE VAN, T. Y.; CHUPIN, D.; DRIANCOURT, D. A. Ovarian follicular population in buffaloes and cows. **Animal Reproduction Science**, v. 19, p. 171-178, 1989.

LEEUWENBERG, B. R.; HUDSON, N. L.; MOORE, L. G.; HURST, P. R.; MCNATTY, K. P. Peripheral and ovarian IGF-I concentrations during the ovine oestrous cycle. **Journal of Endocrinology**, v. 148, n. 2, p. 281-289, 1996.

LONERGAN, P. Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes. 1992. 157f. Tese (PhD). National University of Ireland, 1992.

LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PINTADO, B. et al. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced *in vitro*. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 57, p. 146-152, 2000.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization, and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, n. 1, p. 48-53, 1994.

LUCCI, C. S.; RODRIGUES, P. H. M., SANTOS JR., E. J. et al. Emprego da somatopropina bovina (BST) em vacas de alta produção. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 35, n. 1, 1998.

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

LUCY, M. C.; CURRAN, T. L.; COLLIER, R. J.; COLE, W. J. Extended function of the corpus luteum and earlier development of the second follicular wave in heifers treated with bovine somatotropin. **Theriogenology**, v. 41, n. 2, p. 561-572, 1994.

LUCY, M. C.; DE LA SOTA, R. L.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Ovarian follicle population in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1014-1027, 1993.

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

MACHATKOVA, M.; JOKESOVÁ, E.; HORKY, F.; KREPELOVA, A. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. **Theriogenology**, v. 54, p. 543-550, 2000.

MACHATKOVA, M.; KRAUSOVA, K.; JOKESOVA, E.; TOMANEK, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on *in vitro* embryo production. **Theriogenology**, v. 61, p. 229-335, 2004.

MADAN, M. L. Status of reproduction in female buffalo. In: LOKESHWAR, R.R. (ed.), Buffalo Production And Health: Compendium Of Latest Research Information Based On Indian Studies. In: World Buffalo Congress, 2; New Delhi, **Proceedings...**p. 89–100. Proceedings of ICAR Publication

MADAN, M. L.; SINGLA, S. K.; CHAUHAN, M. S.; MANIK, R. S. *In vitro* production and transfer of embryos in buffaloes. **Theriogenology**, v. 41, p. 139-143, 1994.

- MADAN, M. L.; SINGLA, S. K.; JAILKHANI, S.; AMBROSE, J. D. *In vitro* fertilization and birth of first ever IVF buffalo calf. In: World Buffalo Congress, 3; Varna, Bulgaria, **Proceedings...**1991, v. 7. p. 11-17.
- MAJUND, A. R.; KATIY, P. K.; SINGH TANEJA, V. K.; BHAT, P. N. In: World Buffalo Congress, 2nd. New Delhi, **Proceedings**, v. 1, p. 54, 1988.
- MANIK, R. S., PALTA P., SINGLA S. K. , SHARMA V. Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 14, n. 5, p. 315 – 325, 2002.
- MANIK, R. S.; MADAN, M. L.; SINGLA, S. K. Ovarian follicular dynamics in water buffaloes (*Bubalus bubalis*): ultrasonically monitoring individual follicles for wave hypothesis. **Theriogenology**, v. 41, p. 246, 1994.
- MANIK, R. S.; SINGLA, S. K.; PALTA, P.; MADAN, M. L. Effect of presence of a dominant follicle on the superovulatory response in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, v. 50, n. 6, p. 841-852, 1998.
- MARKKULA, M.; MAKAREVICH, A. Insulin-like growth factor I increases the ratio of proliferating cell nuclear antigen positive cells of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, p. 432, 2001.
- MERTON; J. S.; DE ROOS, A. P. W.; MULLAART, E.; DE RUIGH, L.; KAAL, L.; VOS, P. L. A. M.; DIELEMAN, S. J. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry **Theriogenology**, v. 59, p 651-674, 2003.
- MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSEN, J. M.; MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, n. 1-2, p. 139-154, 2002.
- MOREIRA, F., PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J.; BADINGA, L.; THATCHER, W. W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, v. 57, n. 2, p. 895-907, 2002a.
- MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W. W. 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, 2002b.

MTANGO, N. R.; VARISANGA, M. D.; DONG, Y. J.; RAJAMAHENDRAN, R.; SUZUKI T. Growth factors and growth hormone enhance *in vitro* embryo production and post-thaw survival of vitrified bovine blastocysts. **Theriogenology**, v. 59, n. 5-6, p. 1393-1402, 2003.

NEGLIA, G.; GASPARINNI, B.; BRIENZA, V. C.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; PRESICCE, G. A. Bovine and buffalo *in vitro* embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v. 59, p. 1123-1130, 2003.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; CARACCILO, D.I.; BRIENZA, V.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L. First pregnancies carried to term after transfer of vitrified buffalo embryos entirely produced *in vitro*. **Veterinary Research Communications**, Supl. 1, p. 233-236; 2004.

NIBART, M.; SILVA PEIXER, M.; THUARD, J. M.; DURANT, M.; GUYADER-JOLY, C.; PONCHON, S.; MARQUANT-LE GUIENNE, B.; HUMBLLOT, P. Embryo production by OPU and IVF in dairy cattle. In: RÉUNION A.E.T.E., 11; 1995, Hannover, **Proceedings...1995**, p.216., 1995.

NUTTINCK, F.; CHARPIGNY, G.; MERMILLOD, P.; LOOSFELT, H.; MEDURI, G.; FRERET, S.; GRIMARD, B.; HEYMAN, Y. Expression of components of the insulin-like growth factor system and gonadotropin receptors in bovine *cumulus*-oocyte complexes during oocyte maturation. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 27, n. 2, p 179-195, 2004.

OCAMPO, M. B.; DE ASIS, A. T.; OCAMPO, L. C.; KANAGAWA, H. Histological observation of follicular atresia in Swamp buffalo. **Buffalo Bulletin**, v. 13, p. 51–55, 1994.

OHASHI, O. ; MIRANDA, M. ; SOUSA, J. ; CORDEIRO, M. ; BIONDI, F.C. Produção *in vitro* de embrião bubalino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 103-109, 2003.

OHASHI, O. M.; CORDEIRO, M. S.; MIRANDA, M. S. Biotecnologia da reprodução aplicada a bubalino. **Revista de Ciências. Agrárias**, n. 45, 2006, Suplemento.

OHASHI, O. M.; MIRANDA, M. S.; DANTAS, J. K.; SANTOS, S. S. D.; SOUSA, J. S. The embryo transfer and *in vitro* fertilization program in buffalo of the amazon region In: **Buffalo Symposium of America**, 1; 2002, **Proceedings...** p. 217-224.

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

PAVASUTHIPAISIT, K.; HOLYOAK, R. .; TOCHARUS, C.; KITIYANANT, Y. Repeated transvaginal follicular aspiration in swamp buffalo. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 295-295, 1995.

PAVASUTHIPAISIT, K.; KITIYANANT, Y.; THONABULSOMBAT, C.; TOCHARUS, C.; SRIURAIRATNA, S.; WHITE, K.L. *In vitro* maturation and fertilization of swamp buffalo oocytes and their subsequent development. **Theriogenology**, v. 38, n. 3, p. 545-555, 1992.

PAVLOK, A.; KOUTECKÁ, L.; KREJČÍ, P. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 41, p. 183-192, 1996.

PAVLOK, A.; LUCAS-HANN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 63-67, 1992.

PAWSCHE, C. H.; APPA RAO, K. B. C.; TOTEY, S. M. Effects of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins on *in vitro* maturation and embryonic development, cell proliferation and biosynthetic activity of cumulus cell and granulosa cell in buffalo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 49, p. 277-285, 1998.

PERKS, C. M.; PETERS, A. R.; WATHES, D. C. Follicular and luteal expression of insulin-like growth factors I and II and the type 1 IGF receptor in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 116, n. 1, p. 157-165, 1999.

PETYIM, S.; BAGE, R.; HALLAP, T.; BERGQVIST, A.S.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H.; LARSSON, B. Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. **Theriogenology**, v. 60, p. 175-188, 2003.

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

PIETERSE, M. C.; VOS, P. L.; KRUIP, T. A.; WURTH, Y. A.; VAN BENEDEN, T. H.; WILLEMSE, A. H.; TAVERNE, M. A. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, n. 4, p. 857-62, 1991.

PIVATO, I.; PEREIRA, D. C.; PEIXER, M. A. S. et al. Efeito do Bst sobre a taxa de recuperação e qualidade dos oócitos em bovinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 27, p. 171-186, 1999.

POLIDORI, F.; SGOIFO ROSSI, C. A.; SENATORE, E. M.; SAVOINI, G.; DELL'ORTO, V. Effect of recombinant bovine somatotropin and calcium salts of long chain fatty acids on milk from Italian buffalo. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 2137-2142, 1997.

QUETGLAS, M. D.; COELHO, L. A.; GARCIA, J. M. et al. Effect of insulin-like growth factor-1 during *in vitro* oocyte maturation and *in vitro* culture of bovine embryos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, p. 207-211, 2001.

R.R, A somatotrina 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.

RADCLIFF, R. P.; VANDEHAAR, M. J.; KOBAYASHI, Y.; SHARMA, B. K.; TUCKER, H. A.; LUCY, M. C. Effect of dietary energy and somatotropin on components of the somatotrophic axis in Holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 5, p. 1229-1235, 2004.

RAGHU, H. M.; NANDI, S.; REDDY, S. M. Follicle size and oocyte diameter in relation to developmental competence of buffalo oocytes *in vitro*. **Reproduction Fertility and Development**, v.14, n.1-2, p. 55-61, 2002.

RAMOS, A. A., FERREIRA, A. M., SÁ, W. F. et al. Protocolos de produção *in vitro* de embriões na raça Gir. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 3, 2006.

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

REICHENBACH, H. D.; WIEBKE, N. H.; MÖDL, J.; ZHU, J.; BREM, G. Laparoscopy through the vaginal fornix of cows for the repeated aspiration of follicular oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 547, 1994.

REIS, A., STAINES, M. E., WATT, R. G., DOLMAN, D. F., MCEVOY, T. G. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 72, n. 3-4, p.137-151, 2002.

RIEGER, D.; LUCIANO, A. M; MODINA, S.; POCAR, P.; LAURIA, A.; GANDOLFI, F. The effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the metabolic activity, nuclear maturation and subsequent development of cattle oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 112, p. 123-130, 1998.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BOR, A.; ZERON, Y.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Improvement of quality of oocytes collected in the autumn by enhanced removal of impaired follicles from previously heat stressed cows. **Reproduction**, v. 122, p. 734-744, 2001.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BRAW-TAL, R.; BOR, A.; WOLFENSON, D.; Effect of Treatment with Follicle-Stimulating Hormone or Bovine Somatotropin on the Quality of Oocytes Aspirated in the Autumn from Previously Heat-Stressed Cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1398–1405, 2002.

ROY, D. J.; MULLICK, D. N. Endocrine functions of corpus luteum of buffaloes during estrus cycle. **Endocrinology**, v. 75, p. 284–287, 1964.

SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; BARUSELLI, P. S. Prenhezes de embriões bubalinos frescos e vitrificados produzidos *in vitro*. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, suplemento 1, p. 431, 2005.

SÁ FILHO, M.F. Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante (bST) na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos. 2006. 98p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal), Universidade de São Paulo. 2006.

SAMAD, H. A.; NASSERI, A. A. A quantitative study of primordial follicles in buffalo heifer ovaries. In: FAO/SIDA INTERNATIONAL COURSE ON ANIMAL REPRODUCTION, 13; 1979, Uppasala, **Compendium** ...

SANTOS, R. A.; TEIXEIRA, J. C.; ABREU, L.R.; MUNIZ, J.A.; DERESZ, F. Efeito de diferentes doses de somatotropina bovina (r bst) na produção e composição do leite. **Ciênc. agrotec.**, v. 25, n. 6, p. 1435-1445, 2001.

SAS STATISTICAL ANALISYS SYSTEM. **SAS User's Guide: Statistics**. Version 9.1 **SAS Ins.** Cary: SAS, 2002-2003.

SAUMANDE, J. La folliculogenese chez les ruminants. **Veterinary Record**, v. 167, p. 205- 218, 1991.

- SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F. Pattern of growth of dominant follicles during the estrous cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 83, p. 663–671, 1988.
- SCHAMS, D.; BERISHA, B.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W. M. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, n. 1, p. 51-72, 2002.
- SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37-43, 2001.
- SEREN, E., PARMEGGIANI, A. Oestrous cycle in buffalo. **Bubalus bubalis Supplement**, v. 4, p. 21-28, 1997.
- SINGH, C. S. P.; SINGH, B. Incidence of oestrus in buffalo. **Indian Journal of Animal Science**, v. 54, p. 259–260, 1984.
- SINGH, G.; TOTTEY, S. M.; TALWAR, G. P. *In vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 3, n. 1, p. 255, 1989.
- SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, p. 1241-1254, 2001.
- SIRARD, M. A.; COENEN, K. The effect of hormones during *in vitro* meiotic inhibition with cicloheximidine on subsequent development of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 361, 1994.
- 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, 1988.
- SMITH, O. F.; ADRIANO, F.; DURAN, P.; VENTURINA, H.; ARGANOSA, A.; CRUZ, L. C. Ovarian follicular population in swamp buffaloes at various ages. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 3; 1991, Bulgária, Varna. **Proceedings...** p. 86.
- SOOGSASEN, N. et al. Effect of treatment with rBST on responses to superovulatory treatment in swamp buffalo. **Theriogenology**, v.62, p.377-384, 1999.



SPICER, L. J.; CHAMBERLAIN, C. S.; MACIEL, S. M. Influence of gonadotropins on insulin- and insulin-like growth factor-I (IGF-I)-induced steroid production by bovine granulosa cells. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 22, n. 4, p. 237-254, 2002.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E.; WONG, E. A.; HAMILTON, D. T.; VERNON, R. K. Serum hormones, follicular fluid steroids, insulin-like growth factors and their binding proteins, and ovarian IGF mRNA in sheep with different ovulation rates. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 4, p. 1152-1163, 1995.

SPICER, L.J.; ALPIZAR, E.; VERNON, R.K. Insulin-like growth factor-I receptors in ovarian granulosa cells: effect of follicle size and hormones. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 102, p. 69-76, 1994.

SPICER, L.J.; STEWART, R.E. Interaction among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 255-263, 1996.

SPICER; L. J.; ALPIZAR, E.; ECHTERNKAMP, S. E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and(or) insulin-like growth factor I production in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 71, n. 5, p. 1232-1241, 1993.

STUBBINGS, R. B.; WALTON, J. S.; ARMSTRONG, D. T.; BASRUR, P. K. Recovery of bovine oocytes from small vesicular follicles for in vitro maturation and fertilization. **Veterinary Research Commun**, v. 4, n. 1, p. 71-81, 1990.

TAYLOR, C.; RAJAMAHENDRAN, R. Follicular dynamics and corpus luteum growth and function in pregnant versus nonpregnant cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, n. 1, p. 115-123, 1991.

TECHAKUMPHU, M., PROMDIREG, A., NA-CHIENGMAI, A., HUTIKANIT, N. Repeated oocyte pick up in prepubertal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH superstimulation. **Theriogenology**, v. 61, n. 9, p. 1705-1711, 2004.

TECHAKUMPHU, M.; PROMDIREG, A.; PHUTIKANIT, N.; NACHIENGMAI, A.; THONGJAN, S. Transvaginal follicle aspiration in Thai swamp buffalo heifers using different vacuum pressures after FSH pretreatment (*Bubalus bubalis*). **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 66, n. 8, p. 973-975, 2004.

TELFER, E. E. *In vitro* models for *in vitro* development. **Theriogenology**, v. 49, p. 451-460, 1998.

- THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J. E. et al. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v. 55, p. 75-89, 2001.
- TOTEY, S. M.; SINGH, G.; TANEJA, M.; PAWSHE, C. H.; TALWAR, G. P. *In vitro* maturation, fertilization and development of follicular oocytes from buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 95, p. 597-607, 1992.
- TRIPP, M. W.; JU, J. C.; HOAGLAND, T. A.; RIESEN, J. W.; YANG, X.; ZINN, S. A. Influence of somatotropin and nutrition on bovine oocyte retrieval and in vitro development. **Theriogenology**, v. 53, n. 8, p. 1581-1590, 2000.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.
- VASSENA, R.; MAPLETOFT, R. J.; ALLODI, S.; SINGH, J.; ADAMS, G. P. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**, v. 60, p. 923-932, 2003.
- VIANA J. H. M.; BOLS, P. E. J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos *cumulus*-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 1-4, 2005.
- VIANA, J. H.; CAMARGO, L. S. A.; FERREIRA, A. M.; SA, W. F.; FERNANDES, C. A. C.; MARQUES JUNIOR, A. P. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1-2, p. 1-12, 2004.
- VITORIA, A. Anatomy of female genital tract in the buffalo. **In: COURSE ON BIOTECHNOLOGY OF REPRODUCTION IN BUFFALOES**, 3; 1997, Casserta, Italy,
- WARD, F. A., ENRIGHT, B. P., LONERGAN, P., BOLAND, M. P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, v. 54, n. 3, p. 433-446, 2000.
- WATANABE, Y. F.; DAYAN, A.; MEIRELLES, F. V.; WATANABE, M. R. Pre and post implantation development of IVP bovine embryos. **Theriogenology**, v. 55, p. 441, 2001.

WATANABE, Y. F.; WATANABE, M. R.; DAYAN, A.; VILA, R. A.; LÔBO, R. B. Competência de oócitos, oriundos de diferentes fêmeas bovinas, na produção *in vitro* de blastocistos. **Arquivo Faculdade de Veterinária, UFRGS**, v. 26, n. 1, p. 384-385, 1998.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P. E.; PRESICCE, G. A.; Control of oocyte maturation in cows – Biological Factors. **Theriogenology**, v. 49, p. 471-482, 1998.

YOSHIDA, Y.; MIYAMURA, M.; HAMANO, S. et al. Expression of growth factor ligand and their receptor mRNAs in bovine ova during *in vitro* maturation and after fertilization *in vitro*. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 60, p. 549-554, 1998.

YOSHIMURA, Y. Insulin-like growth factors and their binding proteins – potential relevance to reproductive physiology. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 2, p. 1-24, 2003.

YOUSAF, M. R.; CHOCHAN, K. R. Nuclear morphology, diameter and meiotic competence of buffalo oocytes relative to follicle size. **Reproduction and Fertility Development**, v. 15, n. 4, p. 223-229, 2003.

ZICARELLI, L. Advances in buffaloes reproduction. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, p. 85-94, 2003.

ZICARELLI, L.; ESPOSITO, L.; CAMPANILE, G.; DI PALO, R.; ARMSTRONG, D. T. Effects of using vasectomized bulls in artificial insemination practice on the reproductive efficiency of Italian buffalo cows. **Animal Reproduction Science**, v. 47, p. 171-180, 1997.

ZUELKE, K. A.; BRACKETT, B. G. Increased glutamine metabolism in bovine *cumulus* cell-enclosed and denuded oocytes after *in vitro* maturation with luteinizing hormone. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 4, p. 815-820, 1993.

# 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](#)