PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia.

Influência da somatotropina recombinante bovina (rbST) na produção *in vitro* de embriões em vacas leiteiras: uma revisão

Luiz Harliton Cavalcante Monteiro Mota^{1*}; Marlon de Araújo Castelo Branco²; Yndyra Nayan Teixeira Carvalho¹; Luanna Soares de Melo Evangelista¹; Hécio Santos Correia¹; Isolda Márcia Rocha do Nascimento³; José Adalmir Torres de Souza⁴

¹ Alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí. *Autor para correspondência: luizharliton10@hotmail.com

² Aluno do Programa de Pós-Graduação Renorbio, pólo Universidade Federal do Piauí.

³ Professora do Colégio Agrícola de Teresina, Universidade Federal do Piauí.

⁴ Professor do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária, Universidade Federal do Piauí.

Resumo

A produção *in vitro* de embriões (PIV) associada com a aspiração folicular guiada por ultra-som (OPU) permite a intensificação do uso de animais de alto valor genético, maximizando a produção leiteira, aumentando o número de nascimento por doadoras e reduzindo o intervalo entre gerações, os quais são pré-requisitos importantes para a melhoria genética dos rebanhos leiteiros. Apesar desses fatores, as taxas de blastocistos produzidos *in vitro* ainda encontram-se abaixo do desejado. Com isso, a somatotropina recombinante

bovina (rbST) vem sendo aliada a diferentes técnicas de reprodução com o intuito de melhorar a qualidade dos embriões produzidos *in vitro*. Esta revisão tem como objetivo fazer uma análise da produção *in vitro* de embriões e suas etapas, abordando seus aspectos atuais, bem como, a influência da utilização da rbST, na produção *in vitro* de embriões em vacas de leite.

Palavras-chave: IGF-1, blastocisto, vacas de leite.

Influence of recombinant bovine somatotropin (rbST) in vitro production of embryos in dairy cows: A review

Abstract

The *in vitro* production of embryos (PIV) associated with follicular aspiration guided by ultrasound (OPU) allows for increased use of animals of high genetic value, maximizing milk production, increasing the number of births per donor and reducing the gap between generations, which are important prerequisites for the genetic improvement of dairy herds. Despite these factors, the rates of blastocysts produced *in vitro* are still lower than desired. With this, recombinant bovine somatotropin (rbST) has been combined with different reproduction techniques in order to improve the quality of embryos produced *in vitro*. This review aims analyze the *in vitro* production of embryos and their steps, addressing their current issues, as well as the influence of the use of rbST *in vitro* production of embryos in dairy cows.

Keywords: IGF-1, blastocyst, dairy cows.

1. Introdução

A bovinocultura de leite é uma atividade que se encontra em pleno crescimento no Brasil, apresentando uma produção anual de 29.112.000 toneladas de leite, e um acréscimo de 5,9% em relação ao ano anterior (IBGE, 2009). Porém os índices produtivos e reprodutivos da pecuária leiteira brasileira estão muito abaixo do desejável. O aumento na produção de leite

nas últimas décadas deve-se mais, à expansão das áreas exploradas e aumento efetivo do rebanho do que pelo aumento real da produtividade.

Desta forma, quanto mais maximizada for à produção, utilizando-se de biotecnologias como, a Inseminação Artificial em Tempo Fixo (IATF), Transferência de Embriões (TE) e a aspiração folicular guiada por ultra-som (OPU) associada à Produção *in vitro* de embriões (PIV), maior será a exigência de uma ótima eficiência reprodutiva, possibilitando aumentar o número de nascimento por doadoras de alto padrão genético, reduzindo o intervalo entre gerações, onde torna-se um fator importante para a melhoria genética dos rebanhos (NEVES et al., 2000).

A produção *in vitro* de embriões (PIV) permite a intensificação do uso de animais de alto valor genético. Estudos têm demonstrado a viabilidade da PIV em combinação com a aspiração folicular guiada por ultra-som (OPU), com resultados comparáveis ou superiores àqueles obtidos pela tecnologia tradicional de TE (MERTON et al., 2003). Contudo, as taxas médias de blastocistos obtidos *in vitro* ainda não atingiram valores ideais para que esta biotecnologia seja utilizada mais intensamente de forma comercial, devendo-se levar em consideração que a qualidade e a viabilidade dos embriões produzidos *in vitro* são inferiores a dos embriões obtidos *in vivo* (REICHENBACH, 2003).

Com isso a somatotropina recombinante bovina (rbST), vem sendo aliada a diferentes técnicas de reprodução devido a seus efeitos na população ovariana, na foliculogênese, maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário. Ela atua, promovendo aumento na população folicular ao redor de 3 dias após a sua administração, sendo relacionada ao aumento dos níveis circulantes do hormônio do crescimento (GH), fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1 (IGF-1) e insulina (GONG, 2002).

O IGF-1 e a insulina atuam em sinergismo com as gonadotrofinas, estimulando a esteroidogênese das células da granulosa, principalmente em folículos pequenos (SPICER et al., 2002). A rbST estimula a expansão das células do Complexo *Cúmulus-Oophorus* (CCOs) e a maturação nuclear dos oócitos, aumentando a taxa de fertilização (SÁ FILHO, 2006). Moreira et al.

(2002) relataram aumento na taxa de clivagem quando adicionou hormônio de crescimento (GH) e IGF-1 no meio de maturação, na produção *in vitro*, comprovando seus benefícios no desenvolvimento embrionário em bovinos.

Porém, apesar dos promissores resultados encontrados, existe ainda grandes variações no que envolve fatores como, diferenças entre raças, período do ciclo estral e concentrações das doses utilizadas quando da administração do rbST (DEISEL, 2010).

Neste sentido, esta revisão tem como objetivo, fazer uma análise da produção *in vitro* de embriões, abordando seus aspectos e técnicas atuais, bem como, a influência da utilização da somatotropina recombinante bovina na produção *in vitro* de embriões em vacas leiteiras.

2. Somatotropina Recombinante Bovina (rbST)

A somatotropina recombinante bovina (rbST) foi um dos primeiros fatores de crescimento produzidos em grande escala para a indústria animal, visando aumentar a produção de leite em bovinos (BAUMAN, 1992). Este hormônio está ligado ao crescimento (GLUCKMAN et al., 1987) e a regulação de processos fisiológicos e metabólicos dos animais por meio da síntese de IGF-1 e proteínas transportadoras (IGFBPs), que são seus mediadores hormonais nos processos metabólicos (LUCY, 1996).

A administração exógena de rbST aumenta a síntese hepática de IGF-1 e conseqüentemente sua concentração plasmática (MCGUIRE et al., 1992). As mudanças nas concentrações sanguíneas das IGFBPs podem modificar as ações do IGF-1, através do aumento ou da diminuição de sua disponibilidade no sangue ou nos tecidos (CLEMMONS, 1998).

O tratamento com rbST tem aumentado a fertilidade de vacas de leite de alta produção submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (SANTOS et al., 2004), bem como em vacas consideradas sub-férteis (MORALES-ROUPA et al., 2001) e também tem aumentado a eficiência em programas de transferência de embriões (MOREIRA et al., 2002). Esses efeitos são atribuídos

principalmente aos efeitos positivos do Hormônio do Crescimento (GH) e do IGF-1 na fertilidade e no desenvolvimento embrionário (MOREIRA et al., 2002). O tratamento utilizando rbST em vacas altera o desenvolvimento folicular e a atividade luteal (LUCY et al., 1994).

Em novilhas, a rbST aumenta o número de folículos menores que 5 mm (GONG et al., 1997), e em vacas, aumenta o número de folículos médios entre 6 a 9 mm, sugerindo que a população folicular é alvo do tratamento com rbST, podendo variar em função da raça e condições metabólicas relacionadas à lactação (KIRBY et al., 1997).

A rbST persiste circulando por até três semanas após a aplicação (CUSHMANN et al., 2001) e, segundo Lucy et al. (2000) a maior influência da rbST na reprodução é feita de modo indireto através do IGF-1. A administração de rbST em animais duplica os níveis de IGF-1 sanguíneo (BAUMAN, 1999). Vários pesquisadores reportaram que o rbST, o FSH e os estrógenos estimulam a expressão de IGF-1 nas células da granulosa (ATHANASSIOUS, 2000).

Vários trabalhos foram ampliados com o intuito de estudar os efeitos da rbST sobre a população folicular, sendo desenvolvidos em *bos taurus taurus* (ROHT et al., 2002), em *bos taurus indicus* (BURATINI et al., 2000), em ovinos (JOYCE et al., 2000), como também em bubalinos (SÁ FILHO, 2006).

Baratini et al. (2000) relataram que o tratamento com 320mg de rbST em novinhas *Bos taurus indicus* aumentou a concentração plasmática de IGF-1, resultando em um aumento de 36% do número de folículos, quando comparado a novilhas tratadas com solução fisiológica.

Com relação às mudanças na população de folículos médios (6-9 mm) após tratamento com rbST são descritas de diferentes maneiras na literatura, alguns demonstraram aumento no número de folículos médios (BILBY et al., 2004) enquanto outros não observaram essa alteração (GONG et al., 1997). Os efeitos do tratamento com rbST 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-1 e insulina no sangue e conseqüentemente ao incremento na população folicular (GONG, 2002).

Gong et al., (1997) relatam que a administração de diferentes doses de rbST em novilhas resultam em aumento das concentrações de GH, no entanto somente altas doses de rbST foram associadas ao incremento das concentrações de IGF-1 e insulina. Dessa mesma forma, somente foram observadas alterações na população folicular quando os animais apresentam aumento nas concentrações de IGF-1 e não somente nas concentrações de GH. Sugerindo que o incremento na população folicular é mais associado a mudanças nas concentrações de IGF-1 e insulina do que nas concentrações de GH.

Pavlok et al. (1996) testaram o efeito de uma única aplicação de rbST no número de folículos e na qualidade de oócitos recuperados após o abate dos animais 3 dias após o tratamento com rbST. Os autores observaram que apesar do tratamento com rbST não aumentar o número de folículos, o tratamento hormonal aumentou significativamente o número de oócitos de boa qualidade.

Bols et al. (1998) avaliaram o efeito do tratamento rbST durante um longo período em programas de aspiração folicular em novilhas de leite *Bos taurus taurus*. As novilhas (n=14) foram tratadas semanalmente com 640 mg de rbST por via subcutânea e submetidas à aspiração folicular duas vezes por semana, durante dez semanas. Os autores observaram aumento no número de folículos disponíveis no grupo tratado com rbST em comparação ao grupo controle. No entanto o número médio de oócitos recuperados foi semelhante entre os grupos, sugerindo que possíveis alterações morfológicas nas células do *cumulus*, induzidas pelo rbST, possam ter levado à dificuldade de remoção dos oócitos do interior dos folículos no momento da aspiração.

3. Fator de Crescimento Semelhante a Insulina Tipo-1 (IGF-1)

O fator de crescimento semelhante a insulina do tipo-1 (IGF-1) é um polipeptídeo com 70 aminoácidos que exerce efeito no desenvolvimento

periférico de diferenciação celular e da própria sobrevivência de diversas células e tecidos do organismo (DAFTARY; GORE, 2005).

O IGF-1 é um potente agente mitogênico em resposta ao estímulo do GH, sendo que a maior parte do IGF-1 circulante tem origem a parti da síntese hepática (LUCY, 2000). No entanto, as ações do IGF-1 muitas vezes não são derivadas somente após o estímulo do GH por via hepática, e sim pelo próprio IGF-1 exercendo funções autócrinas ou parácrinas sobre diversas células somáticas, como nas gônadas (CHANDRASHEKAR et al., 2004). Desta forma, como esses mesmos autores relataram, o GH e o IGF-1 podem exercer ações como controle da liberação de GnRH pelo hipotálamo, liberação de gonadotrofinas pela pituitária e no número de receptores para gonadotrofinas nas células da granulosa.

Em bovinos, o IGF-1 tem a função de aumentar a sensibilidade dos folículos antrais entre 5 mm à gonadotrofinas, principalmente na transição do estágio de independência para dependência gonadotrófica (SÁ FILHO, 2006).

A expressão de IGF-1 nas células da granulosa de bovinos ainda é controversa (HUNTER et al., 2004). Em ovinos e bovinos, a expressão ovariana de IGF-1 parece não apresentar níveis significantes (MONGET et al., 2002). A expressão do ligante para IGF-1 parece ser restrita as células do compartimento somático (células da teca e da granulosa) do folículo, sugerindo que o IGF-1 atue de maneira autócrina e parácrina sobre o complexo *cúmulus-oophorus* (NUTTINCK et al., 2004).

A expressão do receptor do Tipo-1 aumenta de acordo com o desenvolvimento dos folículos primários até folículos antrais gonadotrófico-dependentes (WANDJI et al., 1992). Este aumento na expressão do receptor do Tipo-1 coincide com o aumento da expressão de receptores para FSH e LH dos folículos (MONGET et al., 2002).

O estágio de desenvolvimento do folículo depende da espécie animal, tendo diferenças no sistema ovariano de IGF. As células ovarianas sintetizam e secretam o IGF-1, sendo que a granulosa sintetiza IGF-1 e a teca sintetiza o IGF-2 (PERKS et al., 1999). A síntese e secreção do IGF-1 e IGF-2 do ovário,

promove degradação do IGFBP (ADASHI, 1998; BESNARD et al., 1997). Entretanto, a resposta do ovário ao IGF-1 e IGF-2 depende da quantidade de IGFBP no líquido folicular, pois altos níveis desta proteína inibiram o IGF-1 e IGF-2 no líquido folicular (DE LA SOTA et al., 1996).

A quantidade de IGFBP no líquido folicular depende da qualidade do folículo. Folículos atrésicos têm altas concentrações de IGFBP (STEWART et al., 1996) que impedem a atuação do IGF-1 nos seus receptores posicionados dentro da granulosa, afetando o crescimento e a diferenciação dos folículos que entram em atresia. O IGFBP age diretamente no crescimento das células ovarianas (RECHLER, 1997). O IGF-1 e a IGFBP parecem exercer papel fundamental na dominância folicular, durante o desenvolvimento dos folículos, já que as concentrações de IGF-1 no fluído folicular aumentam, enquanto que as concentrações de IGFBP-1 diminuem durante o estabelecimento da dominância (GINTHER et al., 2002). Há uma síntese local de IGFBP-2 e IGFBP-4 na granulosa e teca, respectivamente, dos folículos de bovinos (ARMSTRONG et al., 1998). A proteína IGFBP é degradada pelas proteases, mantendo a concentração baixa no líquido folicular dos folículos dominantes (BESNARD et al., 1997). A concentração baixa de IGFBP permite maior ação de IGF-1 nos folículos dominantes. Quando testado *in vitro*, IGFBP-3 inibiu os efeitos estimulatórios de IGF-1 na granulosa. Conseqüentemente, IGFBP diminuído, pode conduzir à maior ação de IGF (SPICER & CHAMBERLAIN, 1999).

4. Produção *in vitro* de Embriões (PIV)

4.1. Aspiração Folicular Guiada por Ultra-som (OPU)

Para a obtenção de oócitos algumas técnicas de aspiração folicular podem ser utilizadas como a aspiração folicular por laparoscopia e a aspiração folicular guiada por Ultra-som (OPU). No entanto, a OPU é o método mais eficaz em bovinos para a recuperação de CCOs imaturos e de boa qualidade. Essa técnica foi descrita pela primeira vez em 1988 (PIETERSE et al., 1988). A aspiração folicular associada à PIV em doadoras é uma técnica extremamente

versátil, podendo ser aplicada à doadoras de quase todas as idades, como também em vacas secas, em lactação ou prenhes até o terceiro ou quarto mês de gestação, devido até essa data ocorrer dificuldade de manipulação dos ovários, limitando seu acesso por meio da guia de aspiração. Seu uso, entretanto, não é recomendado em animais com hipoplasia ovariana grave e animais no pós-parto imediato, pois não restaurarão ainda por completo sua atividade ovariana (DIESEL, 2010).

Um fator fundamental para a realização da OPU é o tipo de equipamento e a sonda a ser utilizada. Suas frequências variam de 3,5 a 8 MHz, sendo que a escolha varia de acordo com a profundidade das estruturas a serem visualizadas, bem como o grau de definição exigido para uma boa eficiência do procedimento (VIANA, 2002). Bols et al. (2004), recomendam o transdutor setorial para procedimentos de OPU de rotina devido à sua maior área de digitalização e capacidade de detectar uma maior quantidade de folículos pequenos. O transdutor de 7.5 MHz em comparação ao de 5 MHz não apresenta diferença na visualização de folículos entre 3-5mm e 6-10 mm. Entretanto, a visualização do número total de folículos é maior no transdutor de 7.5 MHz (DIESEL, 2010). Em geral, os oócitos aspirados são de folículos entre 2 a 8 mm de diâmetro. Isso porque somente os oócitos que atingiram seu crescimento total podem ser considerados competentes para a maturação *in vitro* (MIV), onde essa competência ocorre quando os folículos atingem em torno de 2 mm. Portanto, oócitos provenientes de folículos menores que 2 mm, seriam incompetentes para completar a maturação e terem o desenvolvimento embrionário normal (MACHADO, 2009)

Os sistemas de recuperação de oócitos *in vivo* por meio da OPU baseiam-se na aspiração dos complexos-*cúmulus-oophorus* (CCOs) após a perfuração da parede folicular, utilizando-se pressão negativa gerada por bomba de vácuo. A pressão utilizada deve ser eficiente para recuperar a maior quantidade de CCOs sem comprometer a sua qualidade, principalmente no que diz respeito ao número de camadas de células do *cúmulus* ao redor do oócitos.

No entanto, a pressão negativa efetivamente aplicada no folículo aspirado depende de uma complexa série de interações, envolvendo o tamanho do folículo punccionado, a característica do circuito de vácuo (aberto ou fechado), o diâmetro, o comprimento e o tipo de bisel da agulha de punção, o diâmetro e o comprimento do tubo utilizado entre a agulha e o recipiente de recuperação, o tipo de conexão entre as diferentes partes do sistema e as diferenças de alturas entre a fonte de vácuo e o ponto de punção (BOLS et al., 1996, 1997). O resultado final determinará a pressão efetiva na extremidade da agulha, a velocidade do fluxo do sistema e outros fatores mecânicos capazes de influenciar a eficiência na recuperação e na preservação da integridade dos oócitos (VIANA, 2002).

Várias pressões de vácuo têm sido utilizadas em procedimentos de punção folicular, variando entre 30 a 400 mmHg (BOLS et al., 1996). No entanto, pressões entre 50 e 100 mmHg são as mais freqüentemente utilizadas, onde o aumento da pressão de vácuo resulta em aumento na taxa de recuperação, entretanto pressões acima de 80 mmHg promovem aumento significativo no número de CCOs parcialmente ou totalmente desnudos, diminuindo a taxa de produção embrionária (SÁ FILHO, 2006).

A agulha utilizada também tem influência direta sobre os resultados da OPU. Agulhas de calibres entre 17G (diâmetro interno de aproximadamente 2mm) e de 21G (diâmetro interno de aproximadamente 0,45mm) e comprimentos variados, descartáveis ou não, são normalmente utilizadas para aspiração folicular em bovinos (VIANA, 2002). A utilização de calibres de agulhas menores que 21G e maiores que 17G dificultam sua aplicação devido à impossibilidade de colher CCOs intactos ou pela dificuldade na aspiração de folículos de menor diâmetro (HASHIMOTO et al., 1999).

O calibre interno é a característica mais importante da agulha de punção, pois está diretamente relacionado à velocidade do fluxo do fluido, ao volume de espaço morto e à ocorrência de turbulência no sistema de aspiração (VIANA, 2002). Alterações na velocidade do fluxo ou o aumento da turbulência no sistema podem influenciar a taxa de recuperação, a qualidade e a

capacidade de desenvolvimento *in vitro* dos oócitos recuperados (BOLS et al, 1996, 1997; FRY et al., 1997).

Agulhas de menor diâmetro resultam na recuperação de maior percentual de CCOs de melhor qualidade e menor percentual de oócitos total ou parcialmente desnudos (HASHIMOTO, 1999). A possível explicação para estes resultados seria de que o movimento dos fluídos em agulhas de menor diâmetro é mais lento e laminar resultando em menor turbulência (HORNE et al., 1996). A utilização de agulhas maiores, mesmo aplicando menores pressões de vácuo, leva a diferença na velocidade do fluxo entre o centro e a periferia do lúmen destas, gerando forças mecânicas sobre os CCOs (VIANA, 2002).

Outro aspecto a ser considerado na escolha do tipo de agulha para aspiração folicular é o tamanho do bisel da agulha. Bols et al. (1997) testaram o efeito de diferentes pressões de vácuo (50, 70, 90, 110 e 130 mmHg) em agulha de 20G com bisel curto ou longo. Neste estudo, as agulhas de bisel longo promoveram maiores taxas de recuperação quando se utilizou a mesma pressão de vácuo. Uma das possíveis explicações poderia ser de que no momento da perfuração da parede folicular, agulhas mais afiadas (bisel longo) ocasionam menor pressão intrafolicular, reduzindo o risco de perda de fluído folicular entre a parede do folículo e a agulha (HORNE et al., 1996).

4.2. Aspectos biológicos envolvidos na aspiração folicular

Uma das grandes questões abordadas quando se utiliza a aspiração folicular são os efeitos colaterais, entre eles a sedação dos animais e a punção dos folículos, porém estes efeitos parece não traumatizar os animais ou causar qualquer outro sinal de estresse adicional, pois as medidas de progesterona plasmática sugeriram que a ciclicidade não é interrompida (VIANA et al., 2004). Em outro estudo para verificar o efeito da punção na morfologia ovariana, Boni et al. (1997) aspiraram todos os folículos terciários (> 2 mm de diâmetro) dos ovários de vacas da raça Holandesa duas vezes por semana, com 3 ou 4 dias de intervalos durante 3 meses e abateram os animais após as

aspirações. Os autores observaram que a punção duas vezes por semana de todos os folículos terciários aboliu os ciclos estrais e levou a um aumento na frequência da onda folicular sem aparentes efeitos negativos no trato reprodutivo e nos ovários (BONI et al., 1997).

Da mesma forma, Galli et al. (2001) constataram que a OPU não teve nenhum efeito colateral, mesmo depois de duas aspirações por semana por mais de um ano, como foi o caso de algumas doadoras. Entretanto, esses mesmos autores relatam que em alguns casos, um endurecimento leve da superfície dos ovários pode ocorrer após vários meses de coletas repetidas.

Além das lesões nos ovários outro problema observado após repetidas OPUs, foi que a partir da quinta sessão, se tornou cada vez mais difícil obter uma boa anestesia epidural, mesmo alternando o espaço intervertebral utilizado para infiltração anestésica e a diminuição da qualidade do bloqueio anestésico pode contribuir negativamente para a taxa de recuperação de oócitos em animais aspirados duas vezes por semana (VIANA et al., 2004).

Trabalhos realizados indicam claramente que aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som induz e sincroniza a emergência da onda folicular subsequente, e quando é realizada duas vezes por semana gera um maior número de folículos disponíveis e maior porcentagem de oócitos de grau 1 e 2 quando comparado com o regime de uma vez por semana e esses resultados podem ser atribuídos à aspiração de um pool de folículos recrutados logo após a primeira aspiração e antes do estabelecimento da dominância folicular e regressão de folículos subordinados (GARCIA et al., 1998; GALLI et al., 2001). Já na aspiração folicular comercial tem se utilizado intervalos de 15 dias entre as aspirações.

Estudos comprovam que animais *Bos taurus indicus* apresentam naturalmente maior número de folículos por onda em relação a *Bos taurus taurus* (BLASCHI et al., 2004). Vacas Nelore produzem, em média, 25 oócitos por sessão de aspiração folicular, esta média de oócitos por sessão é aproximadamente quatro vezes maior à produção obtida por vacas de raças européias (RUBIN et al., 2004). Um aspecto bastante peculiar refere-se às

fêmeas capazes de produzir centenas de oócitos em uma única aspiração folicular. Há relatos de até 564 oócitos obtidos em um único procedimento (SANTOS et al., 2005).

Cruz et al. (2009) encontraram taxa média de oócitos obtidos por OPU de 4,6 oócitos por sessão de fêmeas *Bos taurus taurus* (Devon) e 16,3 oócitos *Bos taurus indicus* (Nelore). Rubin et al. (2005) avaliando a influência do grau de sangue zebuíno na produção de oócitos relataram que para animais *Bos taurus taurus* da raça Aquitânica a média por sessão de aspiração foi de 3,7 oócitos aspirados, já para animais *Bos taurus indicus* das raças Canchim e Nelore obtiveram 13,6 e 18,4 oócitos, respectivamente.

A alta produção de oócitos da raça Nelore é um importante componente para explicar como a OPU associada a PIV se tornou a opção preferencial para produção de embriões no Brasil, porém para as raças européias como a Holandesa, ainda necessita-se de estudos para que esta opção seja mais disponibilizada comercialmente (PONTES et al., 2009).

4.3. Maturação *in vitro* (MIV)

O processo de maturação inclui todos os eventos que permitem ao oócito expressar seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação. Nesse sentido, é uma das fases mais importantes da PIV, pois é nesse período que o oócito adquire capacidade para prosseguir nos próximos eventos (fertilização e cultivo *in vitro*) chegando até a fase de blastocisto (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

Os oócitos aspirados dos folículos ovarianos não se encontram aptos a serem fecundados, sendo necessário passar por um processo de maturação envolvendo transformações que conferem ao oócito a capacidade de desenvolve-se até o estagio de blastocisto, composto por maturação nuclear e citoplasmática (PEREIRA, 2010).

A maturação nuclear consiste na habilidade do núcleo em progredir na meiose. Na maioria dos mamíferos, a meiose inicia-se durante a vida fetal após as células germinativas primordiais darem origem aos oócitos que entram

na primeira divisão meiótica (prófase I) e interrompem a meiose organizando seu núcleo em vesícula germinativa (VG) (VAN DEN HURK; ZHOU, 2005). Nos bovinos, em condições *in vivo*, o reinício da meiose ocorre após o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), enquanto que *in vitro* inicia-se com a remoção do oócito do interior do folículo (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). Esses eventos cessam o bloqueio meiótico mantido pelo mediador químico intracelular, a adenosina monofosfato cíclico (AMPc) presente no líquido folicular (VORONINA; WESSEL, 2003). Posteriormente, ocorre a quebra da VG, condensação dos cromossomos, formação do fuso bipolar, pareamento seguido da segregação dos cromossomos homólogos e extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) (SIRARD et al., 2006). Então, o oócito completa a primeira divisão meiótica e sofre nova parada em Meiose II até a fecundação ou ativação partenogenética.

A maturação citoplasmática consiste em modificações de organelas no citoplasma do oócito, importantes para a fecundação e desenvolvimento pré-implantacional (LEONI et al., 2007). Após estimulação hormonal ou retirada do oócito do folículo, as organelas passam por uma reorganização e a maioria migra para o centro (PEREIRA, 2010). Durante o crescimento do oócito há um aumento da taxa de mitose das células da granulosa, contidas no folículo, que irão diferenciar-se em células do *cumulus* (FAIR, 2003). Estas células estão ligadas por junções tipo *gap*, atuando na transferência de íons, metabólitos, aminoácidos, assim como podem modular a atividade transcricional do oócito, facilitando a penetração espermática durante a fecundação (DE LA FUENTE; EPPIG, 2001; FAIR, 2003). Por outro lado, os oócitos secretam fatores que induzem a proliferação e expansão das células do *cumulus* (CHAND et al., 2006). Em oócitos imaturos, as células do *cumulus* estão compactadas e durante a maturação iniciam a secreção de ácido hialurônico o que causa a mucificação e separação das células, ocasionando a sua expansão (FULOP et al., 2003). *In vivo* essa expansão é induzida pela onda de LH e *in vitro* pela adição de soro ou hormônio folículo estimulante (FSH) no meio de maturação (GILCHRIST; THOMPSON, 2007).

As condições de maturação utilizadas na maioria dos laboratórios são o meio TCM-199 com sais de EARLE'S suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e gonadotrofinas (FSH e LH), em 5% de CO₂ em ar a 38,5°C por um período de 20-24h de incubação em estufas (GALLI et al., 2003). Neste período, os oócitos completam sua maturação com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e podem então ser fecundados. Quando as condições de coleta e cultivo são ideais, cerca de 90% dos oócitos chegam à metáfase II (GALLI et al., 2003).

Vários fatores afetam o sucesso da maturação *in vitro* de oócitos, tanto fatores intrínsecos quanto fatores específicos do ambiente de cultivo. Dentre os fatores externos, pode-se citar o meio de maturação propriamente dito, envolvendo composição, osmolaridade, pH, presença de soro e hormônios, e fatores do ambiente como temperatura, tensão de O₂ e volume do meio (NAGAI, 2001).

Vários estudos na tentativa de melhorar a eficiência da MIV vêm sendo realizados com a adição de diferentes substâncias ao meio. Meios padrões podem ser modificados de acordo com os protocolos de cada laboratório, podendo ser suplementados com fonte de energia como glicose e piruvato, fonte protéica como soro fetal bovino, macromoléculas sintéticas (álcool polivinílico-PVA) (RUSSELL et al., 2006) e fluído folicular bovino (FFB). Fatores de crescimento produzido pelas células foliculares durante o desenvolvimento do folículo tais como, fator de crescimento semelhante à insulina tipo-1 (IGF-I), fator de crescimento epidermal (EGF) e fator de crescimento fibroblástico (FGF) já foram testados durante a MIV. Trabalhos usando células foliculares, angiotensina II (Ang II) e IGF-I, obtiveram um incremento significativo no índice de desenvolvimento embrionário precoce (GIOMETTI et al., 2005).

Estudos têm mostrado que quando oócitos são maturados em grupo apresentam maior taxa de blastocisto no dia sete (D7) do que quando são maturados individualmente (WARD et al., 2000). De fato Brum et al. (2005) relataram que a produção de blastocistos bovinos aumentou quando os oócitos foram maturados em grupos de 10 e 20 quando comparado com o grupo de 5

oócitos em uma proporção de 1:10, 1:5 e 1:1 ovócitos/ μ l. A quantidade de meio para cada oócito, durante a maturação, não afetou a clivagem ou a produção de blastocistos, porém a taxa de eclosão foi afetada quando o volume de 1 μ l de meio por oócito foi utilizada.

A maioria dos estudos de maturação *in vitro* é realizada com CCOs obtidos de folículos com 2-8 mm de diâmetro, provenientes de ovários de matadouro. A origem dos ovários, coleta, seleção e manipulação do CCOs antes do início da maturação são minimamente descritos e, certamente, diferem entre laboratórios. Os dados experimentais obtidos em estudos, que buscam revelar algum efeito de determinadas substâncias sobre o desenvolvimento *in vitro*, são por muitas vezes difíceis de interpretar, devido a esta falta de informações da origem do material biológico (BEVERS et al., 1997). Neste aspecto, a utilização de oócitos provenientes de OPU de animais com histórico conhecido é muito interessante e pode ser mais informativo quando se testa substâncias na PIV.

4.4. Fertilização *in vitro* (FIV)

O processo de fecundação do oócito envolve uma seqüência complexa de eventos. Inicialmente, o espermatozóide sofre um processo de capacitação e reação acrossômica (RA). Somente os espermatozoides capacitados conseguem se ligar aos receptores de zona pelúcida 2 (ZP2) e desta forma se preparam para a penetração da zona pelúcida (ZP) e fusão com a membrana plasmática do oócito. Posteriormente à ligação com a ZP2, os espermatozoides sofrem a RA e se ligam ao receptor de zona pelúcida 3 (ZP3) (SILVA, 1998). A penetração do espermatozóide no oócito ocorre após ação de enzimas liberadas na RA que digerem a ZP auxiliada pela sua motilidade. A fusão do espermatozóide com a membrana do oócito ocorre no espaço perivitelínico e desta forma o espermatozóide é incorporado ao citoplasma (FLESCH & GADELLA, 2000; GONÇALVES et al., 2001).

Após a penetração do espermatozóide no citoplasma, o oócito é ativado respondendo, inicialmente, com a despolarização da membrana plasmática,

aumento das oscilações intracelulares de cálcio, exocitose dos grânulos corticais e síntese protéica (GONÇALVES et al., 2001). Com a finalidade de evitar a penetração de mais de um espermatozóide, ocorre o bloqueio primário ou vitelínico devido à rápida despolarização da membrana. O bloqueio secundário ocorre logo após, onde o conteúdo dos grânulos corticais, enzimas hidrolíticas, proteinases e peroxidases são liberadas em toda a superfície do oócito provocando a hidrólise parcial das proteínas da ZP (GONÇALVES et al., 2001).

Após a penetração espermática, o oócito retoma sua atividade metabólica e conclui a segunda divisão meiótica (MII), com a expulsão do 2º corpúsculo polar. Segue-se, então, a descondensação da cromatina haplóide do gameta masculino, ocorrendo a formação e aposição dos pronúcleos masculino e feminino e singamia (PALMA, 2001). Portanto, para que a FIV ocorra com sucesso, é necessário que os oócitos tenham sofrido a maturação completa, que os espermatozoides tenham sido apropriadamente preparados e que os mesmo se encontrem em um ambiente adequado (DODE et al., 2002).

Dois meios são, em geral, utilizados para FIV, o meio base TALP e o meio base de Synthetic Oviductal Fluid (SOF) sem glucose. Esses são suplementados com concentrações variadas de heparina e outros fatores importantes para a motilidade e suporte do gameta masculino como a epinefrina, hipotaurina e penicilamina (PHE). Espermatozoides e oócitos são co-incubados por um período de 18-20h (GALLI et al., 2003) em temperatura de 39°C, atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2001).

Para a preparação do sêmen a ser utilizado na FIV, vários métodos têm sido descritos. Entre eles, pode-se citar a lavagem por centrifugação, gradientes de densidade, filtragem em coluna de fibra de vidro e migração ascendente. Os mais utilizados são gradiente de densidade utilizando Percoll e a migração ascendente, conhecida por swim-up (DODE et al., 2002).

Resultados obtidos por Dode et al. (2002) mostraram que o gradiente de Percoll, lavagem e swim-up podem ser usados para preparar as amostras

de sêmen para fecundação *in vitro*. Porém, devido a maior porcentagem de espermatozoides móveis recuperados e o menor tempo necessário para sua realização, o método de Percoll é o mais utilizado para a preparação de espermatozoides bovinos a serem utilizados na FIV (PARRISH et al., 1995). Independentemente do método utilizado, os melhores resultados foram obtidos quando espermatozoides e oócitos foram co-incubados por 12h. No entanto, a prorrogação desse período em até 18h, não teve efeito negativo na taxa de fecundação e clivagem (DODE et al., 2002).

4.5. Cultivo *in vitro* (CIV)

Após a fecundação, os possíveis zigotos são transferidos para o meio de cultivo onde permanecem até atingirem o estágio de blastocisto. O meio de cultivo *in vitro* de embriões (CIV) deve atender suas exigências para que sua qualidade não seja comprometida. Esse período de desenvolvimento embrionário é marcado pelas primeiras clivagens, ativação do genoma embrionário no estágio entre 8 e 16 células, a compactação da mórula e a formação do blastocisto entre os dias 6 e 7 após a FIV, o qual envolve a diferenciação de dois tipos de células, o trofoectoderma e a massa celular interna (MCI). Nesse estágio, os embriões podem ser transferidos para o útero de fêmeas receptoras que levarão a gestação a termo (DODE; RUMPF, 2002).

Assim como para a MIV, vários fatores afetam o sucesso do cultivo *in vitro*, principalmente fatores específicos do ambiente de cultivo. Considerando que a quantidade de estruturas com capacidade de desenvolver até o estágio de blastocisto depende do oócito e da MIV, a qualidade dos embriões produzidos é determinada pelas condições de cultivo. Dentre os fatores ambientais, pode-se citar o meio de cultivo propriamente dito envolvendo composição, osmolaridade, pH, presença de soro e outros como temperatura, tensão de O₂ e volume do meio (DIESEL, 2010).

Um sistema de cultivo adequado, que proporcione um maior desenvolvimento com melhor qualidade de embriões *in vitro* se tornou uma preocupação para a aplicação comercial dessa tecnologia. O meio mais

utilizado atualmente é o meio Synthetic Oviductal Fluid (SOF), entretanto, vários outros tem sido utilizados, tais como meio de cultivo celular 199 (TCM-199), meio Ham's F-10, CR1 e CR2, suplementados com substâncias energéticas, aminoácidos essenciais e não essenciais, e fontes protéicas tais como, soro fetal bovino (SFB), soro sintético quimicamente definido (SSS), albumina sérica bovina (BSA) e as macromoléculas como álcool polivinílico (PVA) ou polivinilpirrolidona (PVP) (DIESEL, 2010). O SFB vem aos poucos sendo substituído nos meios de cultivo pelas demais substâncias por ter sido considerado como o responsável por anormalidades fetais, placentárias, excesso de peso dos bezerros (síndrome do bezerro grande) e gerar distorcias (HOSHI, 2003).

Estudos comparando a produção de embriões em presença de soro e BSA tem mostrado que apesar da qualidade dos embriões serem superiores na presença de BSA, as taxas de blastocistos são menores incluindo as taxas de eclosão (WANG et al., 1997; NEDAMBALE et al., 2004).

Além disso, vários outros protocolos vem sendo empregados com o objetivo de mimetizar ao máximo as condições uterinas, melhorando a taxa de PIV dos embriões, incluindo co-cultivo com células somáticas, cultivo livre de células ou mesmo cultivo *in vivo* em ovidutos de ovelhas (GALLI et al., 2003). O efeito positivo dessa interação das células somáticas com o embrião está atribuído à secreção de fatores embriotróficos que favorecem o desenvolvimento embrionário. A composição do meio junto às fontes protéicas já citadas exerce um efeito na morfologia das células do embrião e na expressão de alguns genes (RIEF et al., 2002)

5. Considerações Finais

Apesar dos promissores resultados obtidos, existem ainda grandes variações envolvendo vários fatores, tais como, diferenças entre raças, período do ciclo estral, região, faixa etária e concentrações das doses utilizadas de rbST. Espera-se que o emprego do rbST, estimulando a síntese de IGF-1 na

MOTA, L.H.C.M. et al. Influência da somatotropina recombinante bovina (rbST) na produção *in vitro* de embriões em vacas leiteiras: uma revisão. **PUBVET**, Londrina, V. 6, N. 32, Ed. 219, Art. 1456, 2012.

produção *in vitro* de embriões bovinos, resulte em uma melhor taxa de produção de blastocistos viáveis, além de produzir um aumento na qualidade.

Portanto, um maior e melhor entendimento das particularidades das espécies domésticas quanto às alterações hormonais e a dinâmica folicular é necessário para adequar o tratamento com rbST, visando uma melhoria na maturação folicular e conseqüentemente, melhora na produção *in vitro* de embriões.

6. Referências Bibliográficas

ADASHI, E. Y. The IGF family and folliculogenesis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 39, p. 13-19, 1998.

ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; GUTIERREZ, C. G.; HOGG, C. O.; GLAZYRIN, A. L.; CAMPBELL, B. K.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Insulin-like growth factor binding protein-2 and -4 messenger ribonucleic acid expression in bovine ovarian follicles: effect of gonadotropins and developmental status. **Endocrinology**, v. 139, p. 2146-2154, 1998.

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

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

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

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

BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; VAN DEN HURK, R.; IZADYAR, F. Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. **Theriogenology**, v. 47, p. 13-22, 1997.

BILBY, T. R.; GUZELOGLU, S.; KAMIMURA, S.; PANCARCI, M.; MICHEL, F.; HEAD, H. H.; THATCHER, W. W. Pregnancy and Bovine Somatotropin in Nonlactating Dairy Cows: I. Ovarian, Conceptus, and Insulin-Like Growth Factor System Responses. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.87, n. 10, p. 3256-3267, 2004.

BLASCHI, W.; ANDRADE, E.R.; NONATO JR.; PONTES, J.H.F.; ERENO JR., J.C.; UVO, S.; SENEDA, M.M., Utilização Prévia do Pluset na Aspiração Folicular: Impacto na Produção In Vitro de Embriões em Vacas Bos indicus. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32(Suplemento), p. 186, 2004 (Abstract).

BOLS, P. E. J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M. T.; VANDENHEEDE, J. M. M.; DE KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus-oocyte complex morphology and

developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 45, p. 1001–1014, 1996.

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

BOLS, P. E. J.; 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**, New York, v. 47, p. 1221–1236, 1997.

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

BONI, R.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C.; KOGUT, J.; KRUIP, T. A. M. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, New York, v. 48, p. 277–289, 1997.

BRUM, D. S.; LEIVAS, F. G.; SILVA, C. A. M.; RUBIN, M. I. B.; RAUBER, L. P.; FIALHO, S. S.; PILLA, L. F. C.; BERNARDI, M. L. The effects of the number of oocytes and the volume of maturation medium in bovine in vitro embryo production, **Animal Reproduction**, v. 2, p. 70–73, 2005.

BURATINI, J. R., J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, 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**, New York, v. 54, p. 421–431, 2000.

CHAND, A. L.; PONNAMPALAN, A. P.; HARRIS, S. E.; WINSHIP, I. M.; SHELLING, A. M. Mutational analysis of BMP15 and GDF9 as candidate genes for premature ovarian failure. **Fertility and Sterility**, v. 86, p. 1009–1012, 2006.

CHANDRASHEKAR, V.; ZACZEK, D.; BARTKE, A. The Consequences of Altered Somatotropic System on Reproduction. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 71, p. 17–27, 2004.

CLEMMONS, D. R. Roles of insulin-like growth factor binding proteins in controlling of IGF actions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Orlando, USA, v. 140, p. 19–24, 1998.

CRUZ, F. B.; MARTINS, L. T.; MARINHO, L. S. R.; FARELL, F.; VIEIRA, A. D.; MAZZAALIRA, A. Aspiração folicular m vacas *Bos taurus* e *Bos indicus* e vitrificação dos oócitos em condições de campo. **Revista de Ciências Agroveterinárias**. Lages v. 8, p. 184–187, 2009.

CUSHMANN, R.A.; DE SOUZA, J.C.; HEDGPETH, V. S.; BRITT, J. H. Effect of longterm treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. **Theriogenology**, v. 55, p. 1533–1547, 2001.

DAFTARY, S. S.; GORE, A. C. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. **Experimental Biology and Medicine**, San Diego: MiniReview, p. 292–306, 2005.

DE LA FUENTE, R.; EPPIG, J. J. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. **Developmental Biology**, v. 229, p. 224–236, 2001.

DE LA SOTA, R. L.; SIMMEN, F. A.; DIAZ, T.; THATCHER, W. W. Insulin-like growth factor system in bovine first-wave dominant and subordinate follicles. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 803–812, 1996.

DIESEL, T. O. **Efeito da estimulação ovariana na quantidade e qualidades de ovócitos obtidos por aspiração folicular transvaginal em novilhas nelore**. 2010, 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

DODE, M. A. N.; RUMPF, R. Produção *in vitro* da espécie Bovina, **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, nº 26- maio/junho 2002.

DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; FERNANDES, C.E. The effect of sperm preparation and co-incubation time on *in vitro* fertilization of *bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 69, p. 15–23, 2002.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 203–216, 2003.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 197–235, 2000.

FRY, R. C.; NIAL, E. M.; SIMPSON, T. L.; SQUIRES, T. J.; REYNOLDS, J. The collection of oocytes from bovine ovaries. **Theriogenology**, New York, v. 48, p. 977–987, 1997.

FULOP, C.; SZANTO, S.; MUKHOPADHYAY, D.; BARDOS, T.; KAMATH, R. V.; RUGG, M. S.; DAY, A. J.; SALUSTRI, A.; HASCALL, V. C.; GLANT, T. T.; MIKECZ, K. Impaired cumulus mucification and female sterility in tumor necrosis factor- α deficient mice. **Development**, v. 130, p. 2253–2261, 2003.

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

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; TURINI, P.; PONDERATO, N.; COLLEONI, S.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Bovine embryo technologies. **Theriogenology**, v. 59, p. 599–616, 2003.

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

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v. 67, p. 6–15, 2007

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: Emerging concepts and technologies to improve developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, v. 67, p. 6–15, 2007.

GINTHER, O.J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; KOT, K. Actin A, estradiol, and free insulin-like growth factor-1 in follicular fluid preceding the experimental assumption of follicle dominance in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 14–19, 2002.

GIOMETTI, I. C.; BERTAGNOLLI, A. C.; ORNES, R. C.; DA COSTA, L. F. S.; CARAMBULA, S. F.; REIS, A. M.; DE OLIVEIRA, J. F. C.; EMANUELLI, I. P.; GONÇALVES, P. B. D. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v. 63, p. 1014–1025, 2005.

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

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTANGER, M. M.; COSTA, L. F. S. In: Produção in vitro de embriões. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Livraria Varela, 1ª ed., São Paulo, p. 195-226, 2001.

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

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

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, p. 82-94, 2009.

HASHIMOTO, S.; TAKAKURA, R.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Ultrasound-guided follicle aspiration: effect of them frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 52, p. 131-138, 1999.

HORNE, R.; BISHOP, C. J.; REEVES G.; WOOD, C.; KOVACS, C. T. Aspiration of oocyte for in vitro fertilization. **Human Reproduction Update**, Oxford, v. 2, p. 77-85, 1996.

HOSHI, H. *In vitro* production of bovino embryos and their application for embryos transfer. **Theriogenology**, v. 59, p. 675- 685, 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. **International Congress on Animal Reproduction**, 15; 2004, Porto Seguro, Bahia, Brazil, v. 82-83, p. 461-477, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Produção da Pecuária Municipal**. 2009. Disponível em <http://www.ibge.gov.br>, PPM 2009: acessado em 30 de agosto de 2011 as 15:00h.

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

KIRBY, C. J.; SMITH, 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.

LEONI, G. G.; BEBBERE, D.; SUCCU, S.; BERLINGUER, F.; MOSSA, F.; GALIOTO, M.; BOGLIOLO, L.; LEDDA, S.; NAITANA, S. Relations between relative mRNA abundance and developmental competence of ovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 249-257, 2007.

LUCY, M. C.; BYATT, J. C.; CURRAN, T. L.; COLLIER, R. J. Placental lactogen and somatotropin: Hormone binding to the corpus luteum and effects on the growth and functions of the ovary in heifers. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 50, p. 136-144, 1994.

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

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

MACHADO, G. M. Efeito de diferentes protocolos de Percoll na qualidade espermática e na produção *in vitro* de embriões bovinos. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 67 p. Dissertação de Mestrado, 2009.

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

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

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSEIN, J.; MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, Shannon, Ireland, v. 23, p. 139-154, 2002.

MORALES-ROURA, J. S.; ZARCO, L.; HERNANDEZ-CERON, J.; RODRIGUEZ, G. Effect of short-term treatment with bovine somatotropin at estrus on conception rate and luteal function of repeatbreeding dairy cows. **Theriogenology**, New York, v. 55, p. 1831-1841, 2001.

MOREIRA, F.; BADINGA, L.; BURNLEY, 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, p. 859-902, 2002.

NAGAI, T. The Improvement of *in Vitro* Maturation Systems For Bovine and Porcine Oocytes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1291-1301, 2001.

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

NEDAMBALE, T.; DINNYÉS, A.; GROEN, W.; DOBRINSKY, J.; TIAN, X.; YANG, X. Comparison on *in vitro* fertilized bovine embryos cultured in KSOM or SOF and cryopreserved by slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 62, p. 437-449, 2004.

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**, Shannon, Ireland, v. 27, v. 2, p. 179-195, 2004.

PALMA, G. Producción *in vitro* de Embriones Bovinos. In: G. PALMA, **Biotechnología de la Reproducción**. Argentina: INTA, 2001.

PARRISH, J. J.; KROGENEAS, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up and Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, p. 859-869, 1995.

PAVLOK, A.; KOUTECKA, L.; KREJCI, P.; SLAVIK, T.; CERMÁN, J.; SLABA, J.; DORN, D. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 41, p. 183-921, 1996.

PEREIRA, M. M. Efeitos de diferentes sistemas de maturação *in vitro* no potencial de desenvolvimento de oócitos bovinos. 2010, 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2010.

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

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

PONTES, J.H.F.; NONATO-JUNIOR, I.; SANCHES, B.V.; ERENO-JUNIOR, J.C.; UVO S.; BARREIROS, T.R.R.; OLIVEIRA, J.A.; HASLER, J.F.; SENEDA, M.M. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nellore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, v. 71, p. 690–697, 2009.

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

REICHENBACH H-D. Embryo transfer and cryopreservation in cattle: practical considerations. **Acta Science Veterinary**, v. 31, p. 28-50, 2003.

RIEF, S.; SINOWATZ, F.; STOJKOVIC, M.; EINSPIANIER, R.; WOLF, E.; PRELLE, K. Effects of novel co culture system development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v. 124, p. 543-556, 2002.

ROTH, Z.; ARAV, A.; BRAW-TAL, R.; BOR, A.; WOLFENSON, A. 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**, Savoy, v. 85, p. 1398-1405, 2002.

RUBIN, K. C. P.; PONTES, J. H. F.; NONATO, J. R.; ERENO, J. R.; PANSARD, H.; SENEDA, M. M. Influência do grau de sangue Nelore na produção *in vivo* de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 183, 2005. (Abstract).

RUBIN, K.C.P.; RIGO, A.G.; SCHROEDER, R.V.; SILVA, R.C.P.; MARQUES, M.O.; SENEDA, M.M. Avaliação de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para obtenção *in vivo* de oócitos bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 121, 2004(Abstract).

RUSSELL, D. F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 73, p. 1255-1270, 2006.

SÁ FILHO, M. F. Efeito do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos. 2006, 98 f. Dissertação (Pós-Graduação em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SANTOS, J. E. P.; JUCHEM, S. O.; CERRI, R. L. A.; GALVÃO, K. N.; CHEBEL, R. C.; THATCHER, W. W. ; DEI, C. S.; BILBY, C. R. Effect of bST and reproductive management on reproductive performance of Holstein dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 87, p. 868–881, 2004.

SANTOS, R. G.; SOTO, M. A. B.; LOURENÇO, R. X.; STRANIERI, P.; BISHOP, W.; ACCORSI, M. F.; WATANABE, M. R.; DAYAN, A.; WATANABE, Y. F. Aspiração folicular em Nelore. Relato de caso de alto número de oócitos recuperados. **Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**; v. 16, p. 79, 2005.

SILVA, A. E. D. F.; Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros. Brasília: **Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia**, Série Documentos, nº 35, 37 p. 1998.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBER, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, p. 126-136, 2006.

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

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**, Shannon, Ireland, v. 22, p. 237-254, 2002.

STEWART, R. E.; SPICER, L. J.; HAMILTON, T. D.; KEEFER, B. E.; DAWSON, L. J.; MORGAN, G. L. Levels of insulin-like growth factor (IGF) binding proteins, luteinizing hormone and IGF-I receptors, and steroids in dominant follicles during the first follicular wave in cattle exhibiting regular estrous cycles. **Endocrinology**, v. 137, p. 2842-2850, 1996.

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.

VIANA, J. H. M. Punção e aspiração folicular orientada por ultra-som em vacas da raça Gir. 2002. 124 f. Tese (Doutorado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2002.

VIANA, J. H. M.; 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**, Amsterdam, v. 84, p. 1-12, 2004.

VORONINA, E.; WESSEL, G. M. The regulation of maturation. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 58, p. 53-110, 2003.

WANDJI, S.A.; PELLETIER, G. ; SIRARD, M. A. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled insulin-like growth factor-I, 125I-labeled follicle-stimulating hormone, and 125I-labeled human chorionic gonadotropin binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 47, p. 814-822, 1992.

WANG, S.; LIU, Y.; HOLYOAK, G.; BUNCH, T. The effects of bovine serum albumin and fetal bovine serum on the development of pre- and post-cleavage stage bovine embryos culture in modified CR2 and M199 media. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 37-45, 1997.

WARD, F. A.; LONERGAN, P.; ENNGHT, B. 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, p. 433-446, 2000.