

AMÉRICO YOSHIO NAGANO

**A SOMATROTOPINA BOVINA (bST)  
NA SUPEROVULAÇÃO DE FÊMEAS BOVINAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Veterinárias, Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias, Setor de Ciências  
Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Romildo R. Weiss

CURITIBA

2003



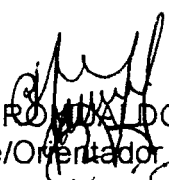
## PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do Candidato ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária **AMÉRICO YOSHIO NAGANO** após a realização desse evento, exarou o seguinte Parecer:

- 1) A Tese, intitulada **“SOMATOTROPINA BOVINA (bST) NA SUPEROVULAÇÃO DAS FÊMEAS BOVINAS”** foi considerada, por todos os Examinadores, como um louvável trabalho, encerrando resultados que representam importante progresso na área de sua pertinência.
- 2) O Candidato se houve muito bem durante a Defesa de Dissertação, respondendo a todas as questões que foram colocadas.

Assim, a Comissão Examinadora, ante os méritos demonstrados pelo Candidato, atribuiu o conceito **“A”** concluindo que faz jus ao Título de Mestre em Ciências Veterinárias, Área Patologia Veterinária.

Curitiba, 08 de outubro de 2003.

  
Prof. Dr. ROMILDO ROMALDO WEISS  
Presidente/Orientador

  
Prof. Dr. LUIZ ERNANDES KOZICKI  
Membro

  
Profa. Dra. LUCIANA BATALHA DE MIRANDA  
Membro

Dedico este trabalho à saudosa memória  
de Luís Sérgio Hauss.

## AGRADECIMENTOS

A DEUS pelas graças recebidas.

À minha família pelo apoio e confiança.

À Carla pelo amor, carinho e compreensão.

Ao professor e orientador Romildo Romualdo Weiss pelo conhecimento e exemplo passados ao longo desta caminhada.

Ao professor Luís Mário Fedalto pelo auxílio na elaboração do delineamento estatístico.

Ao curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da UFPR pela oportunidade oferecida.

À Universidade do Contestado pela bolsa de estudos concedida durante o período do Mestrado.

À médica veterinária Priscilla R. Muradás pelas idéias dadas.

Ao Francisco, por toda a sua dedicação a Pós-Graduação e aos seus alunos.

A Simone pela formatação da dissertação dentro das normas exigidas pela UFPR e por sua atenção e delicadeza ao atender os alunos.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente ajudaram na conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	V
<b>LISTA DE QUADROS</b> .....	VII
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	VIII
<b>RESUMO</b> .....	IX
<b>ABSTRACT</b> .....	X
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	2
2.1 FOLICULOGÊNESE.....	2
2.2 SOMATROTOPINA.....	5
2.3 SUPEROVULAÇÃO.....	8
2.4 COLHEITA E AVALIAÇÃO DE EMBRIÕES.....	10
2.5 INOVULAÇÃO DE EMBRIÕES.....	11
2.6 CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES.....	14
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	18
<b>4 RESULTADOS</b> .....	22
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	27
5.1 NÚMERO DE EMBRIÕES.....	27
5.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	28
5.3 MANIFESTAÇÃO DO ESTRO.....	29
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	31
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	32

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 1 - VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO, VALORES DE F E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO, REFERENTES AO NÚMERO TOTAL DE EMBRIÕES E ÓVULOS, EMBRIÕES VIÁVEIS, EMBRIÕES DEGENERADOS E INFERTILIZADOS PARA NOVILHAS DA RAÇA BLONDE D'AQUITAINE, NO GRUPO DE TRATAMENTO COM bST (N=16) E NO GRUPO CONTROLE (N=16)..... 22
- TABELA 2 - DIFERENÇAS DE MÉDIAS OBSERVADAS PELO TESTE DE TUKEY AO NÍVEL DE 5% PARA O NÚMERO TOTAL DE EMBRIÕES E ÓVULOS, EMBRIÕES VIÁVEIS E INFERTILIZADOS ENTRE DIFERENTES NOVILHAS. DADOS DE 32 COLETAS REALIZADAS NO ANO DE 2002..... 24
- TABELA 3 - VALORES MÉDIOS PERCENTUAIS, DESVIO PADRÃO, VALORES DE F E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO REFERENTES AOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PARA NOVILHAS DA RAÇA BLONDE D'AQUITAINE TRATADAS COM bST (N=8) E CONTROLE (N=8). DADOS DE 16 COLETAS REALIZADAS NO ANO DE 2002 ..... 24

TABELA 4 - DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS DO NÚMERO DE MÓRULAS, PELO TESTE DE TUKEY AO NÍVEL DE 5%, PARA NOVILHAS DA RAÇA BLONDE D'AQUITAINE. DADOS DE 16 COLETAS REALIZADAS NO ANO DE 2002.....	26
---	----

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 -	PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO PARA VACAS.....	10
QUADRO 2 -	PROTOCOLO DE CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PELO MÉTODO CONVENCIONAL (1,4 M DE GLICEROL.....	16
QUADRO 3 -	PROTOCOLO DE CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PELO MÉTODO DE TRANSFERÊNCIA DIRETA.....	17
QUADRO 4 -	CRITÉRIOS PARA A AVALIAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS SEGUNDO OS PARÂMETROS DE QUALIDADE .....	19
QUADRO 5 -	PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS EMBRIÕES BOVINOS.	20

## LISTA DE GRÁFICOS

- GRÁFICO 1 - NÚMERO MÉDIO DE TOTAL DE EMBRIÕES E ÓVULOS, EMBRIÕES VIÁVEIS, DEGENERADOS E INFERTILIZADOS DE 32 COLETAS REALIZADAS NO ANO DE 2002 EM NOVILHAS DA RAÇA BLONDE D'AQUITAINE..... 23
- GRÁFICO 2 - FREQUÊNCIA DE DISTRIBUIÇÃO DE EMBRIÕES VIÁVEIS NOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PARA NOVILHAS DA RAÇA BLONDE D'AQUITAINE TRATADAS COM bST (N=8) E CONTROLE (N=8). DADOS DE 16 COLETAS REALIZADAS NO ANO DE 2002..... 25

## RESUMO

No presente estudo, foi avaliada a ação da Somatotropina Bovina (bST) sobre a superovulação nas fêmeas bovinas, bem como seus efeitos sobre a produção e o desenvolvimento embrionário. Para o estudo foram utilizadas (n=8) novilhas Blonde d'Aquitaine, que foram superovuladas duas vezes como grupo controle, ou seja, sem bST e duas vezes como grupo tratamento com bST, totalizando 32 colheitas, sendo 16 para cada delineamento experimental. A análise dos resultados teve como objetivo avaliar a produção de embriões totais, viáveis, degenerados e infertilizados, além das diferenças entre os estádios de desenvolvimento embrionário e a manifestação de estro pelas doadoras superovuladas. Foram evidenciadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) para a produção de embriões totais e viáveis, mas não se encontrou diferença significativa entre os embriões degenerados ou infertilizados. Para os estágios de desenvolvimento embrionário, observou-se diferença significativa na proporção de mórula, blastocisto inicial e blastocisto. A manifestação de cio pelas doadoras foi 100% nos dois tratamentos,

Palavras-chave: somatotropina, superovulação, transferência de embriões, vacas

## ABSTRACT

At this present study, was evaluated the action of bovine somatotropin (bST), on females bovines superovulation, and their effects in embrionary production and development. This study were used (n=8) heifers of the breed Blonde d'Aquitaine, they were superovulated as the control group like a control group and twice a treatment group with bST, totalizing 32 collections or 16 for each experimental line. The analyze of the results had the objective to evaluate the total embryo production the viable, degenerate, unfertilized ova and embrionary development stages. There are significant differences ( $p < 0,05$ ) for total and viable embryo production, but there aren't showed significant differences among degenerated or unfertilized ova, and embrionary development stage.

Keywords: somatotropin, superovulation, embryo transfer, cows

## 1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da seleção e dos sistemas de produção animal foram a alavanca para o surgimento e crescimento das biotécnicas de reprodução, que inicialmente, e de maneira pioneira, foram estudadas e empregadas na Inglaterra a partir do século XIX (RODRIGUES, 2001). Em 1951 foi reportado nos EUA por Willet e colaboradores o primeiro bezerro nascido através de transferência de embriões (TE). Neste período as grandes barreiras eram a ausência de procedimentos adequados para a estimulação ovariana, de técnicas eficientes para a colheita, transferência e a manutenção dos embriões fora do ambiente uterino.

Atualmente a indústria da reprodução animal no mundo, movimenta valores anuais em torno de cinco bilhões de dólares. Dentro deste contexto a TE é uma ferramenta que possibilita aumentar o potencial reprodutivo de fêmeas consideradas excepcionais, principalmente como instrumento para acelerar o progresso dos programas de seleção animal (RODRIGUES, 2001). O maior entrave dos programas de TE continua sendo o elevado custo e a variabilidade da resposta, entre as doadoras, no tratamento superovulatório. Apesar do intenso número de pesquisas desenvolvidas, em diversos países, ainda não existe protocolo capaz de contornar este problema; entretanto, alguns protocolos que sincronizam a emergência da onda folicular, têm se revelado especialmente úteis por facilitarem o manejo das doadoras e produzirem o mesmo número de embriões dos tratamentos tradicionalmente utilizados.

Vários estudos têm mostrado que a somatotropina bovina (bST) tem a capacidade de aumentar o número de folículos recrutados e, portanto, de embriões viáveis, após diferentes tratamentos superovulatórios (GONG et al., 1996, LUCY, 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência do bST sobre a produção quantitativa e qualitativa de embriões, os estádios de desenvolvimento embrionários e a manifestação de estro nas doadoras superovuladas.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FOLICULOGÊNESE

A fêmea bovina ao nascer tem aproximadamente 500.000 folículos primordiais nos ovários, que em estágios iniciais só podem ser observados com o auxílio de microscópio. Os folículos primordiais iniciam o crescimento gradualmente até se tornarem folículos antrais. Com o início do crescimento os folículos têm dois caminhos, podem sofrer ovulação ou entrar em atresia, sendo que na sua maioria entram em atresia (ERICKSON, 1996).

Segundo WILTBANK (1998a), o crescimento do folículo primordial até folículo ovulatório leva aproximadamente 60 dias. Há muita especulação sobre o crescimento inicial, baseada em dados histológicos. Folículos maiores que 3 mm podem ser avaliados diariamente através de ultrassonografia transretal, cujo crescimento final, de 3mm até a ovulação, leva apenas uma semana e é largamente dependente das gonadotrofinas.

A formação de um óvulo viável pode ser dividida em três fases: desenvolvimento fetal, fase independente de gonadotrofinas e fase dependente de gonadotrofinas. Durante o estágio fetal, a oogônia passa pela mitose e entra na prófase da meiose, no nascimento todos os oócitos estão presos na prófase II da meiose e são circundados por uma camada simples de células da granulosa (ZUCKERMAN e BACKER, 1977). Mesmo antes da puberdade, folículos primordiais são destacados para evoluir até folículos pré-antrais, formados pela proliferação das células da granulosa em várias camadas. Os folículos adquirem então a camada periférica de células tecais, originadas da reestruturação das células intersticiais. Os folículos também podem ser destacados e passar de primordiais para pré-antrais em animais hipofisectomizados, demonstrando que o desenvolvimento inicial não é

dependente de gonadotrofinas. Os folículos pré-antrais, na ausência de gonadotrofinas, não podem evoluir e se tornam atrésicos (RICHARDS, 1980).

VASCONCELOS (2003), descreveu que o crescimento folicular nos bovinos ocorre em forma de ondas, que duram em média 10 dias, com uma variação de 6 a 15 dias. Quando uma fêmea bovina apresenta duas ondas de crescimento folicular elas têm aproximadamente a mesma duração, enquanto que em animais que apresentarem três ondas, a primeira dura aproximadamente 8-9 dias, a segunda 5-6 dias e a terceira 7-8 dias, sendo que a menor duração da segunda onda é devido à alta concentração de progesterona nesta fase do ciclo.

Durante o ciclo estral ocorrem duas ou três ondas foliculares, podendo variar de uma até quatro. Cada onda é composta por três fases: recrutamento, que compreende na entrada dos folículos no grupo de crescimento dependente das gonadotrofinas, seleção, ajuste do número de folículos recrutados para o número de ovulações normais da espécie e por fim a dominância que compreende na inibição do crescimento de novos folículos (GINTHER et al., 1989).

DRIANCOURT (2001), relatou que o recrutamento de folículos em bovinos e ovinos é claramente dependente do hormônio folículo estimulante (FSH). Em ovelhas, cujo desenvolvimento folicular é bloqueado pela depressão de gonadotrofinas, o FSH exógeno é capaz de induzir recrutamento, independentemente do uso ou não do hormônio luteinizante (LH), sendo que o efeito do FSH é exercido sobre a indução da atividade da aromatase dentro das células da granulosa (SAUMANDE, 1990).

Em outras espécies, como ratos e humanos, o FSH também é o hormônio responsável pelo recrutamento, mas com uma magnitude e amplitude de variação maior do que em ovelhas e vacas (HALPIN e CHARLTON, 1988).

O folículo de maior tamanho e mais maduro é o responsável pela seleção dos demais folículos, pois interfere no suporte adequado de gonadotrofinas dos folículos menores e menos maduros. Esta interferência pode ocorrer de duas maneiras: a passiva, onde o folículo dominante inibe indiretamente o crescimento dos subordinados, reduzindo os níveis de FSH abaixo do limiar necessário para sustentar o seu crescimento e de maneira ativa, quando o folículo dominante

secreta, na corrente sangüínea, substâncias que diminuem a absorção de FSH pelos folículos subordinados (DRIANCOURT, 1991).

A produção de FSH é basicamente controlada por dois hormônios ovarianos, a inibina e o estradiol. A inibina é secretada por todos os folículos maiores de 3mm, portanto não deve ser considerada como fator chave no sistema de modulação do FSH. Entretanto o estradiol parece seguir precisamente o crescimento do folículo dominante e acredita-se que a ação conjunta dos dois hormônios seja a responsável pela modulação do FSH, sendo que o estradiol funciona como gatilho e a inibina potencializa a sua ação (WILTBANK, 1998a). O folículo dominante produz 80% do estradiol e 55% de toda inibina circulante. (CAMPBELL et al., 1991).

Logo após o período de seleção, as células da granulosa do folículo dominante começam a expressar receptores ao LH, o que não ocorre com os folículos subordinados, que requerem altas concentrações de FSH para continuar crescendo (GINTHER et al., 1996). O crescimento do folículo, após a seleção, é dependente de um padrão pulsátil de secreção do LH. A parada no crescimento folicular pode ocorrer por três motivos: inibição da secreção de LH, bloqueio progesterônico ou balanço energético negativo. Nestes casos o folículo para de crescer próximo à 10mm e em muitos casos se inicia o crescimento de nova onda folicular (WILTBANK, 1998a). Outra importante característica do folículo dominante é a maior atividade das proteases específicas para IGF-BP (proteínas ligadoras do fator de crescimento semelhante à insulina), liberando IGF-1 o que provavelmente potencializa a ação das gonadotrofinas (RIVERA e FORTUNE, 2001).

A progesterona tem habilidade de inibir a liberação pulsátil de LH, sendo que a luteólise diminui a concentração de progesterona circulante, portanto a freqüência dos pulsos de LH aumenta. O aumento do LH circulante fornece o estímulo necessário à produção de estradiol pelos folículos ovarianos, que por sua vez libera a onda pré-ovulatória de LH (KARSCH et al., 1992).

## 2.2 SOMATOTROPINA

O bST ou hormônio do crescimento foi um dos primeiros fatores de crescimento, produzidos em escala comercial, com proteína recombinante (BAUMAN, 1999).

O bST é um hormônio da pituitária encontrado na forma natural em bovinos e que influencia vários processos metabólicos e fisiológicos. A maior quantidade de receptores para o bST é encontrada no fígado, sendo responsável pela produção de um fator de crescimento semelhante à insulina, o IGF-1 (LUCY, 2000).

A fonte endócrina predominante do IGF-1 é o fígado, porém a maioria dos outros tecidos também contribuem para a produção local. A administração de bST em animais sadios duplica os níveis de IGF-1 no sangue (BAUMAN, 1999). A quantidade de IGF-1 liberada pelo fígado é também controlada pelo estado nutricional do animal, uma vez que vacas com dietas hipocalóricas ou hipoprotéicas têm número reduzido de receptores para o bST no fígado (THIESSEN et al., 1994). Vacas de alta produção nas primeiras 6 a 8 semanas de lactação, que se encontram em déficit calórico, possuem uma resposta menor do IGF ao bST. Devido a esta inter-relação, o nível de IGF-1, que fica baixo no período pós-parto, aumenta conforme as vacas passam a um balanço energético positivo. Observou-se que a concentração sanguínea de bST é superior nas vacas com menor concentração de IGF-1 no sangue. Esta aparente discrepância pode ser justificada pelo *feedback* negativo do IGF-1 no hipotálamo e na hipófise para controlar a secreção de bST (SPICER et al., 1990).

CUSHMAN et al. (2001), relataram que os efeitos do bST persistem por até 3 semanas após a última aplicação, quando as concentrações séricas da somatotropina e do IGF-1 já retornaram aos níveis basais.

O bST também é capaz de atuar diretamente sobre o sistema reprodutor, pois no útero e nos ovários são observados receptores ao bST, mas sem dúvida a maior influência do bST na reprodução é indireta, através do IGF-1 (LUCY, 2000).

HORNBURG e FARHI (1995) relatam que em homens a concentração espermática está linearmente ligada aos níveis de IGF-1 no plasma seminal, sendo

que esta pode servir como marcador da qualidade do sêmen. A administração de somatotropina melhorou a motilidade e concentração espermática em homens com deficiência de somatotropina.

Vacas selecionadas para apresentarem parto gemelar, têm maior concentração sérica de IGF-1 e maior número de folículos antrais e secundários (CUSHMAN et al., 2000).

WATERMAN et al. (1993), relataram que vacas que recebem bST têm corpo lúteo mais pesado, devido ao aumento na produção de progesterona, já DE LA SOTA et al. (1993), relataram que este corpo lúteo responde da mesma maneira aos agentes luteotróficos.

MOREIRA et al. (2002a), relataram que o bST melhorou a taxa de prenhes quando administrado em receptoras no momento da inovulação, talvez em função da melhor produção de fluídos uterinos, uma vez que as glândulas endometriais são ricas em receptores de IGF-1 e somatotropina.

Vários autores citam que nos rebanhos onde se administra bST, a eficiência reprodutiva diminui, provavelmente este fator está associado ao aumento da produção leiteira. O número de inseminações artificiais (IAs) por concepção não altera, mas ocorre aumento no intervalo entre partos. O maior intervalo entre partos está relacionado principalmente a menor expressão de estro (LUCY, 2000). No trabalho de MORBECK et al. (1991) observaram que a detecção do estro diminui de 78% para 48% em vacas tratadas com bST. Em outro estudo, a taxa foi de 100% para as vacas controle e 57% para vacas tratadas com bST (KIRBY et al., 1997).

BILBY et al. (1995), relataram que ao se administrar uma pequena dose de bST (167mg), a taxa de concepção das vacas aumenta, mas não a das novilhas, sendo que esta pequena dose de bST causa um leve aumento da concentração de IGF-1 melhorando a função ovariana e uterina, pois os ovários e o útero são sensíveis ao IGF-1.

Em um estudo semelhante MOREIRA et al. (2000), trataram vacas leiteiras lactantes com bST no início de um programa de IA com tempo fixo, onde não era necessária a observação de cio e verificaram que as tratadas com bST apresentaram um aumento de 15% na taxa de prenhes. Em outro estudo MOREIRA et al. (2002a), aplicaram bST no momento da primeira IA em vacas superovuladas,

para diferenciar os efeitos do bST sobre a foliculogênese, a taxa de fertilização e o desenvolvimento embrionário precoce. Observaram que o bST diminui o número de infertilizados, melhora a taxa de sobrevivência embrionária e acelera o desenvolvimento embrionário.

GONG et al. (1993), demonstraram que o bST é capaz de aumentar a resposta superovulatória, em vacas tratadas com FSH cinco dias após a aplicação de 500mg de bST. Além disso, a qualidade dos embriões parece ser melhor e a incidência de cisto folicular é reduzida. Segundo GONG et al. (1996), este aumento da resposta superovulatória ocorre devido ao aumento no número de pequenos folículos antrais, causado pelo bST.

Segundo o trabalho de MOREIRA et al. (2002b), ao se acrescentar somatotropina ao meio de maturação, do cultivo de embriões *in vitro*, é possível se elevar à taxa de clivagem dos oócitos e a proporção de embriões que alcançam o estágio de blastocisto, sendo que ao se neutralizar os efeitos do IGF-1, não se reduziu os efeitos estimulatórios da somatotropina no desenvolvimento embrionário precoce. Portanto, concluiu-se que a somatotropina afeta o desenvolvimento embrionário independentemente da ação do IGF-1, no entanto, não se exclui a possibilidade da somatotropina estimular a produção de IGF-1 intracelular.

A presença de somatotropina no meio de cultivo acelera o processo de maturação nuclear, diminui a apoptose, aumenta a proliferação celular, melhora a congelabilidade e a sobrevivência após o descongelamento para embriões *in vitro* (MTANGO et al., 2003). Embriões originados de doadoras pré-tratadas com bST apresentavam melhor qualidade (KUEHNER et al., 1993).

BOLS et al. (1998), descreveram um protocolo de aspiração folicular com bST por longos períodos em vacas holandesas e obtiveram melhora de 25% no número de folículos, mas este protocolo não afetou a quantidade nem a qualidade dos oócitos aspirados, entretanto PAVLOK et al. (1996), relataram que uma única aplicação de bST melhora a qualidade e a quantidade de oócitos aspirados, contudo sem afetar o número de folículos.

## 2.3 SUPEROVULAÇÃO

Um dos maiores problemas, associados com a superovulação em bovinos, é a grande variabilidade da resposta, tanto entre diferentes animais como em diferentes colheitas do mesmo animal (ARMSTRONG, 1993).

Vários fatores interferem na resposta superovulatória, tais como: hormônios utilizados, estação do ano, idade da doadora, nutrição, manejo e *status* folicular (KAFI e MCGOWAN, 1997). As principais fontes desta alta variabilidade são as diferenças na população folicular, responsiva às gonadotrofinas, que está presente nos ovários ao início da superovulação (GONG et al., 1996) e a presença de folículo dominante (LUSSIER et al., 1995).

Sabe-se que o crescimento folicular em bovinos acontece em ondas, geralmente duas ou três, durante as quais vários folículos começam a crescer, até que um dominante emerge e suprime o crescimento dos subordinados, que se tornam atrésicos, promovendo assim uma nova onda de crescimento folicular (DRIANCOURT, 1991). Pelo fato do folículo dominante suprimir o crescimento dos outros folículos, os tratamentos superovulatórios, iniciados em presença de um folículo dominante, produzem significativamente menos embriões (GUILBAULT et al., 1991; HUHTINEN et al., 1992).

Os efeitos deletérios da presença de um folículo dominante podem ser evitados de duas maneiras: iniciando-se o tratamento superovulatório em uma fase específica do ciclo (entre o 8º. e 10º. dia do ciclo) onde se supõe não haver nenhum folículo dominante (GOULDING et al., 1990; GRASSO et al., 1989), ou se eliminando o folículo dominante (ADAMS et al., 1994).

O folículo dominante pode ser eliminado por processos físicos, como a aspiração folicular guiada por ultra-som (LINDSEY et al., 1994) ou por hormônios, usando GnRH (ARMSTRONG, 1993), hCG (RAJAMAHENDRAN e SIANANGAMA, 1992) e principalmente estrógenos (BO et al., 1991).

BO et al. (1995), conseguiram dobrar a resposta superovulatória com a eliminação do folículo dominante, usando benzoato de estradiol conjugado com progestágenos. Este tratamento também sincroniza a emergência de uma nova onda

de crescimento folicular, aproximadamente quatro dias após a aplicação do benzoato de estradiol.

Resultados encontrados por NASSER et al. (1993), demonstraram que os tratamentos iniciados um dia antes ou no dia da emergência da onda de crescimento folicular, resultam em uma melhor resposta superovulatória do que os iniciados um ou dois dias após. Baseando-se em tais resultados concluí-se que para se obter a máxima resposta superovulatória, os tratamentos devem ser iniciados no momento da onda endógena de FSH.

O sucesso da manipulação da onda folicular e a eliminação do folículo dominante permitem que os pequenos folículos, responsáveis as gonadotrofinas, cresçam. A resposta passa a ser dependente do número de pequenos folículos presentes nos ovários no início do tratamento superovulatório (ARMSTRONG, 1993). No trabalho de ROMERO et al. (1991), encontrou-se uma correlação positiva altamente significativa entre o número de pequenos folículos no início do tratamento e a resposta superovulatória.

Vários trabalhos, incluindo os de GONG et al. (1996) e KUEHNER et al. (1993), demonstraram a capacidade do bST em aumentar o número de pequenos folículos nos ovários, levando à uma melhor resposta superovulatória.

Um protocolo eficiente de superovulação, como o proposto por WILTBANK (1998b), deve eliminar o folículo dominante, sincronizar a emergência de uma nova onda de crescimento folicular e aumentar o número de pequenos folículos. O protocolo, descrito no QUADRO 1, tem a vantagem de ser flexível, pois pode ser iniciado em um período aleatório do ciclo estral, portanto, sendo desnecessária a observação do início do cio.

QUADRO 1 - PROTOCOLO DE SUPEROVULAÇÃO PARA VACAS

DIAS	PROCEDIMENTOS
DIA 0	- Colocação de implante de progesterona (manhã) - Aplicação de 5mg de benzoato de estradiol (manhã) - Aplicação de 500mg de somatotropina bovina (manhã)
DIA 5	- Aplicação de 40mg de FSH 2X ao dia (manhã e tarde)
DIA 6	- Aplicação de 30mg de FSH 2X ao dia (manhã e tarde)
DIA 7	- Aplicação de 30mg de FSH 2X ao dia (manhã e tarde) - Aplicação de 500µg de cloprostenol sódico (manhã) - Retirada do implante de progesterona (tarde)
DIA 8	- Aplicação de 20mg de FSH 2X ao dia (manhã e tarde)
DIA 9	- Inseminar 12 e 24 horas após o cio
DIA 16	- Colheita dos embriões

FONTE: WILTBANK (1998).

## 2.4 COLHEITA E AVALIAÇÃO DE EMBRIÕES

A colheita de embriões para fins comerciais em bovinos é feita, preferencialmente, entre o 6º e 8º dia após a primeira IA das doadoras. Nesta fase os embriões se encontram, sobre uma película de líquido, no lúmen da extremidade dos cornos uterinos. Por estarem sobre o líquido é possível a utilização das técnicas de lavagem, dos cornos uterinos, para a captação dos embriões. A colheita se procede, preferencialmente, entre o 6º. e 8º. dia após a IA, devido à fase de desenvolvimento em que se encontram os embriões sendo mais indicada, para a transferência imediata ou congelação, a fase de mórula e blastocisto (REICHENBACH et al, 2002).

Os métodos de colheita não cirúrgicos foram inicialmente descritos por SUGIE et al (1972), com cateter rígido metálico, onde se procedeu as colheitas de embriões pela via cervical. Posteriormente se passou a utilizar cateteres flexíveis, como os descritos por DROST (1976). A colheita por via cervical é uma técnica prática, rápida e segura para a doadora, ao passo que as colheitas cirúrgicas expõem as doadoras a contaminações e aderências, devido ao ambiente cirúrgico

inadequado, pois se procede a campo, limitando o número de vezes que as doadoras podem ser utilizadas (MAPLETOFT, 1986). Para a colheita é necessária anestesia epidural baixa e contenção da doadora, sendo esta física ou química dependendo da necessidade (MAPLETOFT, 1986).

Após a passagem do cateter por via cervical, este é fixado em um dos cornos 5 cm cranial à bifurcação uterina. SUARES-FERNANDES et al. (2002), relataram que o cateter posicionado aproximadamente 5 cm cranial à bifurcação uterina, resulta em melhores índices de recuperação embrionária, quando comparado ao cateter colocado mais profundamente, à aproximadamente 7 cm da extremidade do corno uterino, sendo que os lavados são realizados separadamente, um corno de cada vez.

Para cada colheita se utiliza aproximadamente 500ml de DPBS modificado (Phosphate Buffered Salina, Dulbecco e Voigt, 1954), à temperatura de 25° a 30°C. O corno deve ser levemente massageado durante a aplicação e a retirada do DPBS. O fluxo de saída do PBS deve passar por um filtro específico para embriões (EMCON®, Immuno Systems Inc.) (REICHENBACH et al, 2002).

Após a lavagem dos dois cornos o volume do meio que restou no filtro é de 20 a 30ml, este então é transferido para placas de Petri, onde será feita a pesquisa de embriões. Cada embrião que é encontrado deve ser retirado e colocado em meio de cultura (DPBS suplementado com 0,4% de soro albumina bovina (BSA)). O estágio de desenvolvimento embrionário e a qualidade morfológica são avaliados sob estereomicroscópio, com aumento de 50 a 80 vezes, obedecendo às classificações e critérios propostos pela IETS (1998) (International Embryon Transfer Socit) (REICHENBACH et al, 2002).

## 2.5 INOVULAÇÃO DE EMBRIÕES

A expansão em escala comercial da indústria de TE, só foi possível após a introdução de métodos de implante de embriões por via cervical, em meados da década de 70. Apesar de se atingir boas taxas de prenhes através de métodos

cirúrgicos, se fez necessário o desenvolvimento de técnicas mais rápidas e de baixo custo. Os resultados obtidos hoje com a transferência, por via cervical, em novilhas são semelhantes aos obtidos com o método cirúrgico, entretanto, em vacas os resultados com o método cirúrgico são melhores (HASLER, 2001).

A transferência não cirúrgica tem como desvantagem frente ao método cirúrgico, a necessidade de um técnico com habilidade e experiência para manipular o inovulador dentro do útero. O traumatismo provocado, sobretudo no endométrio, pode ocasionar a liberação de prostaglandinas, o que interferirá com a sobrevivência do embrião, devido à diminuição da meia vida do corpo lúteo, conseqüentemente há diminuição nos níveis de progesterona e aumento na contractilidade uterina. O aumento do tempo de manipulação aumenta o efeito traumático da transferência, portanto, a taxa de prenhes é inversamente proporcional ao tempo de inovulação (BOLAND, 1976). O excesso de manipulação ocasiona uma resposta inflamatória do endométrio, o que implica na migração de macrófagos e células imunocompetentes ao útero, resultando em um ambiente hostil ao embrião (THIBIER e NIBART, 1992).

Para se medir o sucesso de um programa de TE, a taxa de prenhes das receptoras é um critério crucial. Em termos gerais, usando apenas um embrião por receptora, com inovulação via cervical, as taxas de prenhes alcançadas devem estar próximas às obtidas com uma palheta na IA, ou seja, 50 a 70% de taxa de prenhes. (NELSON e NELSON, 1988). Utilizando-se embriões congelados, é normal que se obtenha uma taxa de prenhes em torno de 10% menor do que com embriões frescos (HASLER, 2001).

Vários fatores afetam a taxa de prenhes em programas de TE, entre eles a habilidade e experiência do técnico, seleção e manejo das receptoras, sincronia do cio entre doadoras e receptoras, qualidade dos embriões e a técnica empregada para manuseio e inovulação dos embriões (NELSON E NELSON, 1988).

Segundo o trabalho de ASHWORTH (1992), os melhores resultados com relação à sobrevivência embrionária, são conseguidos quando existe total sincronia do ciclo estral entre a doadora e as receptoras, em virtude das mudanças fisiológica e bioquímicas que o embrião tem que sofrer para se adaptar às mudanças do meio uterino. As mudanças no desenvolvimento embrionário, na endocrinologia maternal e no meio uterino, são freqüentemente relacionadas ao período pós ovulatório. O

embrião produz proteínas, prostaglandinas e esteróides que em conjunto aos esteróides ovarianos modificam a morfologia e a bioquímica uterina, sendo que a assincronia destes fatores pode levar à morte embrionária.

GEISERT et al. (1991), relataram que a administração de progesterona, nas receptoras, pode corrigir a assincronia estral entre as receptoras e a doadora, no entanto, esta administração só é efetiva quando a doadora entrar no cio antes das receptoras. DEL REI et al. (2001), demonstraram ser possível inovular embriões em tempo fixo, ou seja, sem a observação de cio, utilizando implante de progesterona (CIDR-B) mais benzoato de estradiol nas receptoras. TRIBULO et al. (2002), descreveram um método semelhante, porém com uma aplicação suplementar de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) nas receptoras, o que implicou em resultados significativamente melhores.

Antes da transferência deve-se avaliar a qualidade do corpo lúteo, apesar de não ser possível estabelecer uma relação entre a qualidade do corpo lúteo e da taxa de prenhes, pois a forma e o tamanho do corpo lúteo à palpação não indicam a sua capacidade funcional nem o seu comportamento futuro (LIEBRICH, 1991).

Não se pode estabelecer uma relação entre os níveis sangüíneos de progesterona, antes da inovulação, e a taxa de prenhes, pois vários trabalhos incluindo o de HAHN et al. (1977) e ELLINGTON (1992) não conseguiram demonstrar diferença entre as concentrações sangüíneas de progesterona nas vacas que eram fertilizadas das que não eram. No trabalho realizado por LIEBRICH et al. (1991), também não foi possível estabelecer uma relação entre a qualidade do corpo lúteo e os níveis sangüíneos de progesterona. Alguns estudos realizados com administração de gonadotrofina coriônica humana (hCG) nas receptoras demonstraram sua capacidade de promover a formação de corpos lúteos acessórios, porém não refletiu em melhores taxas de prenhes (CHRISTIE et al., 1980, LOONEY et al., 1984). Trabalhos utilizando GnRH nas receptoras como o de ELLINGTON et al (1992), também não apresentaram diferenças nas taxas de prenhes. NOGUEIRA et al. (2002), demonstraram que receptoras com altos níveis de progesterona induzidos por eCG, obtiveram redução na taxa de prenhes, entretanto, alguns autores como DREW e PETERS (1994) e SHELDON e DOBSON (1993) relatam elevação na taxa de prenhes com o uso de GnRH.

RAJAMAHENDRAM e SIANANGAMA (1992) e NISHIGAI et al. (2002), demonstraram que hCG administrado no 7º. dia após a ovulação, ocasiona a formação de corpos lúteos acessórios, que elevam os níveis de progesterona e portanto reduzem a taxa de mortalidade embrionária.

O trabalho de SCHNEIDER et al. (1980), revelou que a probabilidade de gestação depende do estágio em que se encontra o embrião no momento da colheita, onde a transferência de mórulas iniciais alcança taxas de prenhes menores quando comparadas aos estádios mais avançados. HASLER (2001), não encontrou diferença estatística entre a taxa de prenhes e os estádios embrionários, sendo que em seu trabalho foram inovulados mais de 9.000 embriões.

No estudo de HASLER (2001), nas receptoras não foi possível comprovar diferenças nas taxas de prenhes entre as vacas de corte, novilhas de corte e novilhas de leite, porém as vacas de leite obtiveram menor taxa de prenhes. COULTARD (1991), preconizou novilhas como receptoras por serem de menor custo e pela facilidade de manejo, apesar de 10% delas apresentarem dificuldade para se transpassar a cervix.

## 2.6 CRIOPRESERVAÇÃO DE EMBRIÕES

A criopreservação é uma biotecnia essencial em programas de transferência de embriões, pois elimina a necessidade imediata de receptoras, portanto a transferência pode ser realizada quando as receptoras estiverem no período adequado do ciclo estral. Esta biotecnia permite que os nascimentos estejam sincronizados com a época de maior oferta de alimento, além de tornar viável a formação de bancos de germoplasma e facilitar, tanto em questões logísticas como sanitárias, o transporte e o comércio de embriões (MAZUR, 1980).

O congelamento de células vivas constitui-se em um complexo processo físico-químico de troca de calor e transporte de água entre a célula e o meio que a envolve. Normalmente existe uma taxa ideal de resfriamento, que é dada em função

do tamanho da célula, ou seja, sua relação tamanho/superfície, e da sua permeabilidade à água (MAZUR, 1980).

A indução da cristalização a uma temperatura de aproximadamente  $-7^{\circ}\text{C}$ , torna-se necessária para evitar a solidificação da solução utilizada, ocorrência que determina um sub-resfriamento do embrião. Esse sub-resfriamento da solução pode persistir até  $-21^{\circ}\text{C}$ , temperatura em que ocorre a cristalização do meio de forma espontânea. A cristalização do meio, em temperaturas inferiores ao seu ponto de solidificação, ocasiona a liberação de energia sob a forma de calor, portanto, elevará a temperatura do sistema próximo à temperatura do ponto de solidificação da solução, sendo que a temperatura reduz rapidamente até atingir o equilíbrio térmico com a temperatura anterior. Este sub-resfriamento ocasiona alterações estruturais na membrana celular, com conseqüentes distúrbios na permeabilidade hídrica (WHITTINGHAM, 1977). Com estes distúrbios, as células não conseguem desidratar suficientemente até o momento da imersão no nitrogênio líquido  $\text{N}_2(\text{l})$ . Para evitar estes distúrbios ocasionados pelo sub-resfriamento, induz-se artificialmente a cristalização do meio extracelular durante a congelação à uma temperatura de  $-7^{\circ}\text{C}$ . Geralmente efetua-se esta indução com o auxílio de uma pinça, previamente resfriada em  $\text{N}_2(\text{l})$ , sendo a cristalização induzida por contato mecânico do instrumento pré-resfriado sobre a superfície da palheta. Após a indução da cristalização é necessário um período de equilíbrio de 5 a 10 minutos, para que o volume celular se ajuste a temperatura e a pressão osmótica (NIEMANN, 1991).

Os crioprotetores são necessários para prevenir danos aos embriões durante a congelação e descongelação, sendo que estes são divididos em duas categorias: penetrantes, o glicerol e etilenoglicol; e não penetrantes, a sacarose. O grau de penetração dos agentes crioprotetores é dependente do coeficiente de permeabilidade, do gradiente de concentração intracelular e extracelular do agente, da temperatura e do tempo de exposição (NIEMANN, 1991). A adição de crioprotetores penetrantes pode ser realizada em apenas uma etapa, com concentração final de 1.4 mols (M), com resultados equivalentes aos da adição em várias etapas. É necessária a extração dos crioprotetores penetrantes em etapas, para evitar a expansão exagerada dos blastômeros e conseqüente morte das células, por rompimento da membrana. Os crioprotetores, não penetrantes, auxiliam

na prevenção do choque osmótico, impedindo a rápida entrada de água nas células (REICHENBACH et al., 2002).

A velocidade de congelação/descongelação e a composição do meio crioprotetor são os fatores críticos para a sobrevivência pós-descongelação dos embriões. A velocidade de congelação, quando muito lenta, causa injúrias devido à exposição por tempo excessivo a uma solução superconcentrada. Quando a velocidade de congelação é muito rápida o embrião não consegue desidratar suficientemente, o que promove a formação de cristais intracelulares, que podem causar lesões mecânicas à microestrutura das membranas celulares (MAZUR, 1980).

Um protocolo que proporciona um bom equilíbrio entre as velocidades de congelação/descongelação e concentração do meio crioprotetor é o descrito por REICHENBACH (2002) no QUADRO 2.

QUADRO 2 - PROTOCOLO DE CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINO PELO MÉTODO CONVENCIONAL (1,4 M DE GLICEROL) .

Congelação	Descongelação
<p>1º.)Exposição do embrião por 15-20 minutos a solução crioprotetora 1,4 M de glicerol;</p> <p>2º.)Envasamento da palheta em 3 colunas(embrião na coluna do meio);</p> <p>3º.)Equilibrar o embrião -6°C por 5 minutos;</p> <p>4º.)Induzir da cristalização;</p> <p>5º.)Equilibrar por 10 minutos;</p> <p>6º.)Congelação numa velocidade de 0,3 – 0,6 °C / minuto até -35°C;</p> <p>7º.)Equilíbrio por mais 10 minutos;</p> <p>8º.)Imersão em N<sub>2</sub>(l).</p>	<p>1º.)Manter a palheta por 15 segundos no ar e em seguida colocar em banho-maria a 30°C por 15 segundos;</p> <p>2º.)Transferir o conteúdo da palheta para uma placa de Petri para as seguintes lavagens:</p> <p>1ª.) 6.6% glicerol + 0,3 Mol sacarose 5-7 minutos;</p> <p>2ª.) 3,3% glicerol + 0,3 Mol sacarose 5-7 minutos;</p> <p>3ª.) 0,3 Mol sacarose 5-7 minutos.</p> <p>3º.)Realizar vários banhos em meio de cultivo e envasar após a avaliação.</p>

FONTE: REICHENBACH (2002).

QUADRO 3 - PROTOCOLO DE CONGELAÇÃO E DESCONGELAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS PELO MÉTODO DE TRANSFERÊNCIA DIRETA.

Congelação	Descongelação
1°.Exposição do embrião por 10-15 minutos a solução crioprotetora 1,5 M de etileno glicol; 2°.Envasamento da palheta em 3 colunas (embrião na coluna do meio); 3°.Equilibrar por 2 minutos a -7°C; 4°.Induzir da cristalização; 5°.Equilibrar por mais 5 minutos; 6°.Congelação numa velocidade de 0,3 – 0,6 °C / minuto até -32°C; 7°.Equilíbrio por mais 5 minutos; 8°.Imersão em N <sub>2</sub> (l).	1°.Manter a palheta por 15 segundos no ar e em seguida colocar em banho-maria a 30°C por 15 segundos; 2°.Transferir o embrião diretamente para a receptora;

FONTE: VOELKEL E HU (1992).

Do ponto de vista comercial, o método de transferência direta, descrito no QUADRO 3, oferece vantagens pois dispensa grande parte da infra-estrutura e equipamentos, sendo que a descongelação e a inoculação podem ser realizadas por um técnico treinado. (VOELKEL e HU, 1992).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

No presente trabalho foram utilizadas 8 novilhas da raça Blonde d'Aquitaine alojadas em uma propriedade situada em Três Barras – SC, no planalto norte catarinense, que receberam a mesma alimentação e manejo. A alimentação consistia exclusivamente de pastagem, *Lolium multiflorum* no inverno, *Cynodon dactylon* e *Penissetum purpureum* no verão e suplemento mineral à vontade. Durante e entre os tratamentos as doadoras não receberam vacina e foram vermifugadas com ivermectina (Ivomec Gold, Merial, Brasil) um dia após a primeira coleta.

As 8 novilhas foram divididas aleatoriamente em 2 grupos de 4 novilhas que foram superovuladas 4 vezes cada, com intervalo mínimo de 45 e máximo de 60 dias entre superovulações. Na 1ª série de colheita, um dos grupos recebeu somatotropina bovina recombinante (rbST) e o outro não. Na seqüência, o grupo que recebeu rbST na 1ª série não recebeu na 2ª série e assim os grupos se alternaram na 3ª e 4ª série, de modo que cada novilha serviu de unidade experimental, duas vezes, tanto no grupo controle como no tratamento com rbST.

O protocolo se iniciou com um implante de 1,9 gramas de progesterona (CIDR-B Agvet, Hamilton, New Zeland) em um período aleatório do ciclo, denominado de Dia 0. Neste dia metade das doadoras receberam uma administração sub-cutânea de 320mg somatotropina bovina recombinante (Boostin, Coopers, Brasil). No dia seguinte, Dia 1, todas as doadoras receberam 5mg de benzoato de estradiol (Estrogin, Farmavet, Brasil). No Dia 5 as doadoras começaram a receber 240mg de FSH (Folltropin, Vetrepharm, Ontário, Canadá) dividido em 8 doses decrescentes, aplicadas duas vezes ao dia por 4 dias consecutivos. (40-30-30-20 mg bid). Com a 5ª administração de FSH as doadoras receberam 500 µg de cloprostenol sódico (Ciosin, Coopers, Brasil) e com a 6ª administração de FSH foi retirado o implante de progesterona. As novilhas foram inseminadas 12 e 24h após o início do cio, ou 60 e 72h após a aplicação de prostaglandina F2α (PGF2α) nas doadoras que não demonstraram cio. A observação de cios foi realizada por funcionário treinado em dois períodos, das 07:00 às 07:30 horas e das 18:00 às 18:30 horas. Foi usado sêmen de dois touros de fertilidade conhecida para as

inseminações e todas as novilhas, dos dois grupos, foram inseminadas com o mesmo touro em cada repetição.

Sete dias após o cio, as novilhas foram coletadas e as estruturas avaliadas sob estereomicroscópio com aumento de 50-80 vezes e classificadas segundo critérios da Internatinal Embryo Transfer Society, IETS (1998) descritos nos QUADROS 4 e 5.

QUADRO 4 - CRITÉRIOS PARA A AVALIAÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS SEGUNDO OS PARÂMETROS DE QUALIDADE.

<b>Código da IETS</b>	<b>Avaliação</b>	<b>Principais Características Morfológicas</b>
1	Excelente ou bom	<ul style="list-style-type: none"> <li>-estádio de desenvolvimento correspondente ao esperado;</li> <li>-massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros individuais que são uniformes em tamanho, cor e densidade;</li> <li>-forma regular, a zona pelúcida não deve apresentar superfície côncava ou plana, deve ser lisa, preferencialmente intacta, especialmente se o embrião é destinado à exportação;</li> <li>-células extrusadas da massa celular do embrião compreendem menos de 15% do material celular total.</li> </ul>
2	Regular	<ul style="list-style-type: none"> <li>-estádio de desenvolvimento correspondente ao esperado;</li> <li>-forma regular, a zona pelúcida intacta ou não, irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais;</li> <li>-células extrusadas da massa celular do embrião compreendem mais de 15% do material celular total;</li> <li>-pelo menos 50% das células compõem uma massa embrionária viável, intacta.</li> </ul>
3	Pobre	<ul style="list-style-type: none"> <li>-estádio de desenvolvimento não correspondente ao esperado;</li> <li>-irregularidades maiores na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais;</li> <li>-menos de 75% das células degeneradas;</li> <li>-pelo menos 25% das células compõem uma massa embrionária viável, intacta.</li> </ul>
4	Morto ou degenerado	<ul style="list-style-type: none"> <li>-estádio de desenvolvimento não correspondente ao esperado, embrião em degeneração;</li> <li>-massa embrionária de menos de 25% de todo material celular presente no interior da zona pelúcida;</li> <li>-oócitos ou estruturas unicelulares degeneradas.</li> </ul>

FONTE: IETS (1998).

QUADRO 5 – PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DOS EMBRIÕES BOVINOS

Estádio	Código da IETS	Número de células	Diâmetro (mm)	Características principais
Oócito	1	1	0,14-0,17	Esférico. Restos de células da granulosa podem estar presentes.
Zigoto		1	0,14-0,17	Esférico, semelhante ao oócito na microscopia comum, além de apresentar os pronúcleos e os corpúsculos polares.
2 a 12 células	2	2-12	0,14-0,17	Blastômeros esféricos ou ovais. A força de coesão e os contatos intercelulares são fracos, mas apresentam excelente visualização de cada blastômero.
Mórula				Estádio de compactação gradual. No decorrer do desenvolvimento, a força de coesão e os contatos intercelulares vão sendo intensificados.
Mórula Inicial	3	13 ± 32	0,14-0,17	Início da compactação. Blastômeros arredondados, boa visualização de cada blastômero.
Mórula Compacta	4	32 ± 64	0,14-0,17	Término da compactação. A força de coesão e os contatos intercelulares são bem intensos, apresentam boa visualização dos blastômeros periféricos, a superfície da massa embrionária apresenta elevações convexas, típicas e semelhantes às de uma amora.
Blastocisto				Diferenciação celular em embrioblastos e trofoblastos. Formação da blastocele. Volume variável. Atenção: devido a uma diminuição passageira do volume da blastocele, os blastocistos podem estar temporariamente colabados.
Blastocisto Inicial	5	64 ± 130	0,14-0,17	Semelhante a mórula, todavia, com pequena blastocele, geralmente excêntrica e com formato achatado. Espaço perivitelino presente.
Blastocisto	6	130 ± 200	0,14-0,17	Blastocele nítida, espaço perivitelino presente. Embrioblasto facilmente identificável.
Blastocisto expandido	7	+200	0,18-0,22	Blastocele nítida, espaço perivitelino não mais visível. Embrioblasto escuro e de fácil identificação. Trofoblastos nitidamente achatados.
Blastocisto eclodido	8	+200 ± 800	0,18-0,22	Forma esférica. Ausência da zona pelúcida (rompida). Embrioblasto e trofoblastos nítidos. Blastocele possui um grande volume.
Blastocisto eclodido / Expandido	9	+200 ± 800	0,20-0,80	Forma tubular. Ausência da zona pelúcida. Fácil diferenciação morfológica das células com microscópio. Massa compacta de embrioblastos, bem nítida no centro do tubo trofoblástico.

FONTE: IETS (1998).

Como a avaliação e a classificação dos embriões é subjetiva, todos os embriões foram examinados pelo mesmo técnico, seguindo as principais características morfológicas dos embriões bovinos para classifica-los.

Embriões classificados nos estádios 2 e 3 de desenvolvimento (2-12 células e mórula inicial, respectivamente), assim como os grau 3 e 4 de qualidade (pobres e mortos/degenerados, respectivamente) foram classificados coletivamente como degenerados. Embriões degenerados, assim como oócitos e embriões no estágio 1 de desenvolvimento (i.e. infertilizados) foram descartados. Somente embriões nos estádios 4 até 7 de desenvolvimento (mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido) e com grau 1 e 2 de qualidade (excelente/bom e regular) foram congelados e designados como embriões viáveis. Considerou-se como embriões totais a soma dos embriões viáveis, dos degenerados e infertilizados.

Após a colheita e avaliação os embriões viáveis foram colocados em um meio de congelamento contendo 1,4 M de etileno glicol (PBS+BSA 0,4% - Cultilab), envazados em palhetas francesas de 0,25ml (IMV, França) e após 10 minutos de tempo total de exposição à solução crioprotetora, foram transferidos para uma máquina de congelamento (TK1000, Tetakom Sistemas e Automação, Brasil) que estava previamente resfriada à  $-6,0^{\circ}\text{C}$ . Passados 2 minutos nesta temperatura era induzida a cristalização e, após um tempo de equilíbrio de 10 minutos era iniciada a rampa de descida da temperatura, na razão de  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . até  $-32^{\circ}\text{C}$ , quando ocorria mais um período de equilíbrio de 5 minutos e então as palhetas eram mergulhadas em nitrogênio líquido.

O delineamento estatístico foi o de blocos ao acaso com quatro repetições. Buscaram-se diferenças estatísticas para os efeitos de tratamento com somatotropina bovina, número de colheitas e doadoras sobre a produção de embriões.

As análises estatísticas incluíram análise de variância (ANOVA) e coeficiente de variação. As diferenças de médias foram comparadas pelo teste de Tukey para o nível de 5%.

#### 4 RESULTADOS

Na TABELA 1 são apresentados os dados das 32 colheitas de embriões, sendo 16 do grupo controle e 16 do grupo tratamento com bST, na qual foi colhido maior número total de embriões e óvulos e de embriões viáveis, sendo a diferença significativa entre os dois grupos.

**TABELA 1 - VALORES MÉDIOS, DESVIO PADRÃO, VALORES DE F E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO REFERENTES AO NÚMERO TOTAL DE EMBRIÕES E ÓVULOS, EMBRIÕES VIÁVEIS, EMBRIÕES DEGENERADOS E INFERTILIZADOS PARA NOVILHAS DA RAÇA BLONDE D'AQUITAINE NO GRUPO DE TRATAMENTO COM bST (N=16) E NO GRUPO CONTROLE (N=16). DADOS DE 32 COLETAS REALIZADAS NO ANO DE 2002.**

		Média	Desvio-Padrão	Valor F	Coef. Variação
<b>Total de Óvulos e Embriões</b>	Bst	10,25 <sup>a</sup>	2,569046516	9,273	33,41
	Controle	7,125 <sup>b</sup>	3,201562119		
<b>Embriões Viáveis</b>	BST	8,4375 <sup>c</sup>	2,064582282	13,281	32,71
	Controle	5,5 <sup>d</sup>	2,476556749		
<b>Embriões Degenerados</b>	bST	1,4375 <sup>e</sup>	0,727438428	2,623	73,53
	Controle	0,9375 <sup>e</sup>	0,997914492		
<b>Infertilizados</b>	bST	0,375 <sup>f</sup>	0,5	1,777	124,80
	Controle	0,6875 <sup>f</sup>	0,793200269		

<sup>a, b, c, d, e, f</sup> letras diferentes na mesma coluna indicam valores que diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

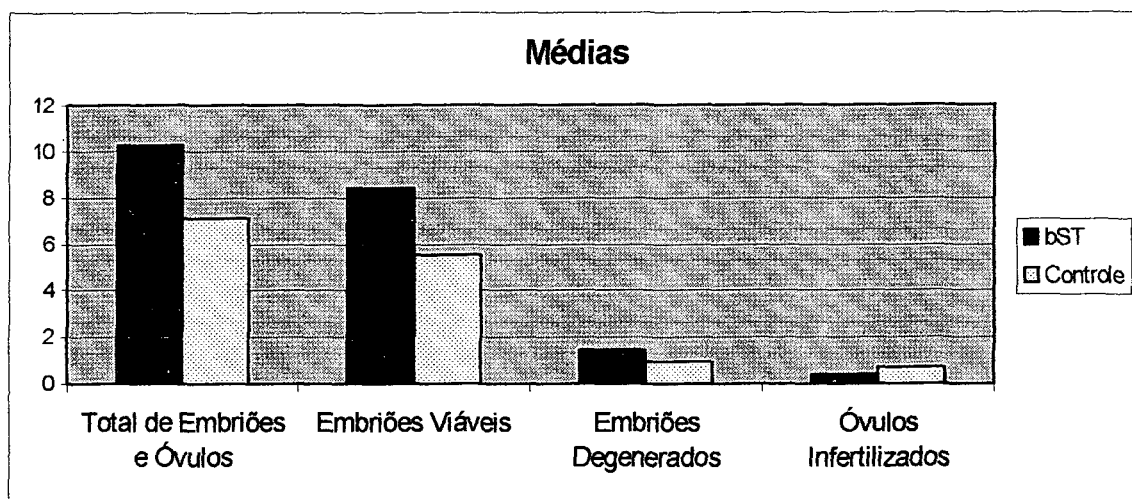
Os valores médios observados para número total de óvulos e embriões dos grupos tratados com bST e controle, diferem ao nível de 5%, assim como os valores médios para número de embriões viáveis. Entretanto, os valores médios do número de embriões degenerados e de infertilizados não diferiram entre os grupos tratamento com bST e controle.

O coeficiente de variação se mostra bastante elevado, sobretudo para o número de embriões degenerados e de infertilizados, mostrando que a variação individual da resposta superovulatória é muito grande. Mesmo quando os valores absolutos são transformados pela função logarítmica ou raiz quadrada, os

coeficientes de variação permanecem elevados, não sendo possível observar diferenças estatísticas para os itens avaliados.

No GRÁFICO 1 temos as médias de embriões totais, viáveis, degenerados e infertilizados para o grupo controle e tratamento.

GRÁFICO 1 - NÚMERO MÉDIO DO TOTAL DE EMBRIÕES E ÓVULOS, EMBRIÕES VIÁVEIS, DEGENERADOS E INFERTILIZADOS, DE 32 COLETAS REALIZADAS NO ANO DE 2002, EM NOVILHAS DA RAÇA BLONDE D'AQUITAINE.



Observamos diferença estatística para número total de embriões e óvulos, embriões viáveis e infertilizados entre as diferentes doadoras. Apresentamos na TABELA 2 as diferenças de médias observadas pelo teste de Tukey ao nível de 5%. Para número de embriões degenerados não ocorreu diferença entre as doadoras.

TABELA 2 - DIFERENÇAS DE MÉDIAS OBSERVADAS PELO TESTE DE TUKEY AO NÍVEL DE 5% PARA O NÚMERO TOTAL DE EMBRIÕES E ÓVULOS, EMBRIÕES VIÁVEIS E INFERTILIZADOS, ENTRE DIFERENTES NOVILHAS. DADOS DE 32 COLETAS, REALIZADAS NO ANO DE 2002.

Total de Embriões e Óvulos		Embriões Viáveis		Óvulos Infertilizados	
Novilhas	Média	Novilha	Média	Novilha	Média
3	12.00 <sup>a</sup>	4	9.75 <sup>a</sup>	3	1.50 <sup>a</sup>
4	12.00 <sup>a</sup>	3	8.50 <sup>ab</sup>	4	1.00 <sup>ab</sup>
2	8.75 <sup>ab</sup>	2	7.00 <sup>ab</sup>	2	0.50 <sup>ab</sup>
7	8.75 <sup>ab</sup>	8	7.00 <sup>ab</sup>	5	0.50 <sup>ab</sup>
8	8.00 <sup>ab</sup>	7	6.75 <sup>ab</sup>	6	0.25 <sup>b</sup>
5	7.50 <sup>ab</sup>	1	6.25 <sup>ab</sup>	7	0.25 <sup>b</sup>
1	6.75 <sup>b</sup>	5	6.25 <sup>ab</sup>	8	0.25 <sup>b</sup>
6	5.75 <sup>b</sup>	6	4.25 <sup>b</sup>	1	0.00 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> letras diferentes na mesma coluna indicam valores que diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

Também avaliamos a influência do bST sobre o desenvolvimento embrionário em 16 das 32 colheitas. Os dados se referem às 2 últimas séries de colheitas, em que 8 novilhas foram colhidas com bST e 8 como controle.

Na TABELA 3 são apresentados os dados observados da influência do bST sobre o desenvolvimento embrionário. Para o estágio de desenvolvimento embrionário os dados são apresentados em porcentagem e foram transformados pela função logarítmica ( $\text{Log}_{10} + 1$ ).

TABELA 3 - VALORES MÉDIOS PERCENTUAIS, DESVIO PADRÃO, VALORES DE F E COEFICIENTE DE VARIAÇÃO REFERENTES AOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PARA NOVILHAS DA RAÇA BLONDE D'AQUITAINE TRATADAS COM bST (N=8) E CONTROLE (N=8). DADOS DE 16 COLETAS REALIZADAS NO ANO DE 2002.

		Média	Desvio-Padrão	Valor	Coef. Variação
<b>Mórula</b>	bST	32,125 <sup>a</sup>	15,48675	5,977	49,98
	Controle	22,75 <sup>b</sup>	34,52432		
<b>Blastocisto Inicial</b>	bST	37,875 <sup>c</sup>	13,3142	5,443	30,80
	Controle	57,25 <sup>d</sup>	34,62761		
<b>Blastocisto</b>	bST	25,375 <sup>e</sup>	13,60606	6,508	61,23
	Controle	14,25 <sup>f</sup>	24,55751		
<b>Blastocisto Expandido</b>	bST	7,375 <sup>g</sup>	10,95364	0,011	189,44
	Controle	5,375 <sup>g</sup>	7,872874		

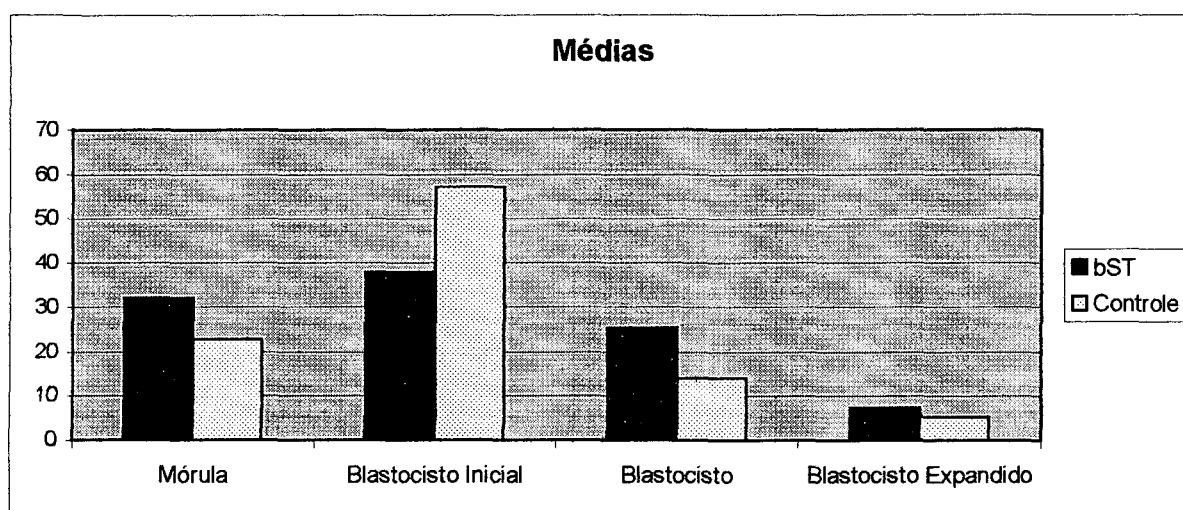
<sup>a,b,c,d,e,f,g</sup> letras diferentes na mesma coluna indicam valores que diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

No GRÁFICO 2 são apresentadas as porcentagens médias dos estádios de desenvolvimento embrionário: mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido.

O tratamento com bST aumentou a proporção de embriões nos estádios de mórula e de blastocisto de maneira significativa em relação ao grupo controle ( $P < 0,05$ ), mas não afetou a proporção de blastocisto inicial e de blastocisto expandido.

Os coeficientes de variação são elevados, sobretudo para embriões degenerados demonstrando a grande variabilidade na resposta superovulatória, tanto no grupo tratamento com bST como no grupo controle, assim como diferentes colheitas da mesma doadora.

GRÁFICO 2 - FREQUÊNCIA DE DISTRIBUIÇÃO DE EMBRIÕES VIÁVEIS NOS ESTÁDIOS DE DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PARA NOVILHAS DA RAÇA BLONDE D'AQUITAINE TRATADAS COM bST E CONTROLE. DADOS DE 16 COLETAS REALIZADAS NO ANO DE 2002.



Antes de ser feita a transformação pela função logarítmica, a porcentagem de embriões no estágio de mórula era estatisticamente diferente entre as doadoras, sendo possível observar as diferenças de médias pelo teste de Tukey ao nível de 5% na TABELA 4. Para os outros estádios de desenvolvimento embrionário não observamos diferenças entre as doadoras.

TABELA 4 – DIFERENÇA ENTRE MÉDIAS, DO NÚMERO DE MÓRULAS, PELO TESTE DE TUKEY AO NÍVEL DE 5%, PARA NOVILHAS DA RAÇA BLONDE D'AQUITAINE. DADOS DE 16 COLETAS REALIZADAS NO ANO DE 2002.

Mórula	
Novilhas	Média
6	80.00 <sup>a</sup>
1	45.00 <sup>ab</sup>
7	26.50 <sup>ab</sup>
3	21.00 <sup>ab</sup>
2	15.00 <sup>ab</sup>
4	12.50 <sup>ab</sup>
5	12.50 <sup>ab</sup>
8	7.00 <sup>b</sup>

<sup>a,b</sup> letras diferentes na mesma coluna indicam valores que diferem estatisticamente entre si ( $p < 0,05$ ).

O terceiro parâmetro avaliado foi a taxa de detecção de estro nas novilhas doadoras, sendo que os resultados nas 32 colheitas foi igual nos dois grupos (100% em ambos os casos). Não foi possível se realizar a análise estatística, por não existir diferença entre os dois grupos.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 NÚMERO DE EMBRIÕES

Semelhante ao que foi observado por GONG et al. (1993), GONG et al. (1996), KUEHNER et al. (1993) e HERRLER et al. (1994) neste trabalho o uso de bST aumentou o número total de embriões, embriões viáveis e infertilizados. Nestes trabalhos utilizaram-se diferentes protocolos de superovulação, variando o hormônio (PMSG ou FSH) e a dosagem. Embora a resposta seja geralmente positiva, sua magnitude varia. KUEHNER et al. (1993), colheram cerca de um embrião viável, a mais, em vacas tratadas com bST durante a superovulação e GONG et al. (1996), registraram quase duplicação na taxa de ovulação e aumento de pelo menos 4 embriões viáveis por novilha colhida, com o uso de bST juntamente com FSH.

Segundo GONG et al. (1996), o aumento do número de embriões colhidos após tratamento com FSH se deve ao aumento do número de pequenos folículos nos ovários induzido pelo tratamento com bST.

ROMERO et al. (1991), relataram que a produção de embriões após superovulação é diretamente proporcional ao número de pequenos folículos (de 3-6 mm) presentes nos ovários ao início do tratamento.

A somatotropina bovina afeta alguns, mas não todos os aspectos do crescimento folicular, sendo que o bST estimula a quantidade de folículos que entram na fase de recrutamento da onda folicular. De modo geral, nas vacas tratadas com bST são recrutados duas vezes mais folículos. Esta resposta é observada tanto na primeira como na segunda onda de crescimento folicular, estando associada provavelmente ao aumento no nível de IGF-1 sanguíneo em vacas tratadas com bST. O IGF-1 atua de forma sinérgica com as gonadotrofinas (LH e FSH), para estimular o crescimento folicular (LUCY, 2000). Assim, as gonadotrofinas normalmente encontradas no sangue se tornam mais potentes em vacas tratadas com bST, o que ocasiona um maior recrutamento de folículos (LUCY, 2001), entretanto um aumento no número de folículos recrutados não leva a maiores

quantidades de folículos dominantes, sendo que a fase de seleção é rigorosamente controlada nos bovinos, o que impede ovulações múltiplas. Aparentemente a seleção não é influenciada pelo bST (LUCY, 2001).

Neste experimento não foram encontradas diferenças significativas entre embriões degenerados e infertilizados, diferindo dos resultados de MOREIRA et al. (2002a), que atribuíram ao bST o aumento da taxa de fertilização e melhora na qualidade dos embriões. LUCY et al. (1995), citam que o aumento da taxa de fertilização e a melhoria na qualidade dos embriões pode ser por efeito direto do bST ou por aumento das concentrações de IGF-1.

O bST ou IGF-1 parecem melhorar a capacidade de fertilização dos espermatozóides e a competência dos oócitos em se tornarem fertilizados (MOREIRA et al., 2002 a).

## 5.2 DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

Diferentemente do que foi observado por MOREIRA et al. (2002a), neste experimento houve diferença significativa no desenvolvimento embrionário, com aumento na proporção de mórulas e blastocistos e diminuição na proporção de blastocistos iniciais. No trabalho descrito por MOREIRA et al. (2002a), ocorreu aumento de blastocistos.

MAFFILI et al. (2001), relatou que o uso de bST em conjunto a superovulação não aumenta a quantidade de embriões produzidos, mas melhora a sua qualidade e desenvolvimento.

A adição de somatotropina ao meio de cultura melhorou a taxa de clivagem, e (MTANGO et al. 2003), bem como MOREIRA et al. (2002b), concluíram que a adição de somatotropina ao meio de maturação melhora a taxa de clivagem e o desenvolvimento embrionário. A inclusão de anti-IGF1 não reduz os efeitos benéficos, supondo-se que a ação de somatotropina pode ser direta sobre o embrião, sem intermediação do IGF-1.

Segundo IZADIAR et al. (1998), o tratamento com bST estimula a expansão das células *cumulus* e a maturação nuclear dos oócitos. A adição de bST ao meio de maturação de oócitos estimula a progressão da meiose, denotada pela aceleração do tempo da extrusão do primeiro corpúsculo polar (SAKAGUSHI et al., 2000).

Como já citado por HAHN (1992) a variabilidade na resposta superovulatória em bovinos é muito grande e mesmo nos experimentos com gêmeos idênticos, não mais do que 50% da variância pode ser explicada. O alto grau de variabilidade inexplicável leva à hipótese que esta variabilidade tenha uma função biológica especial, que suporta a seleção natural ao longo do tempo. Esta hipótese é suportada pelas investigações de GÄRTNER (1990), que após 30 anos de trabalhos tentando homogeneizar animais de laboratório, conclui que pode ser mudada a média, mas com pequenos efeitos sobre a variância.

Provavelmente, neste trabalho a análise estatística da influência do bST sobre os estádios de desenvolvimento embrionário, foi afetada pela alta variabilidade da resposta, visto que aumentou a distribuição dos embriões nos estádios de mórula e blastocisto, mas diminuiu no estádio de blastocisto inicial, estádio que se encontra entre os dois acima citados.

### 5.3 MANIFESTAÇÃO DO ESTRO

Segundo LUCY (2001), o maior número de vacas com maior intervalo entre partos, está associado a uma menor manifestação do estro em vacas tratadas com bST. MORBECK et al. (1991), observaram que detecção de estro diminuiu de 75% para 48% em vacas tratadas com bST. Em outro estudo, essa mesma taxa foi de 100% para as vacas controle e 57% nas vacas tratadas com bST (KIRBY et al., 1997).

Os fatores que controlam a manifestação de estro em bovinos não são totalmente conhecidos (LUCY, 2001). LEFEBRE e BLOCK (1992), estudaram o efeito do bST na manifestação do estro em novilhas ovariectomizadas tratadas com

estradiol. As novilhas tratadas com bST apresentaram menor número de montas em relação às tratadas com soro fisiológico. Essas mudanças na intensidade do estro em novilhas ovariectomizadas pode indicar uma menor sensibilidade do cérebro ao estradiol em novilhas tratadas com bST.

Entretanto neste trabalho não foi observada diferença significativa na manifestação do estro entre as vacas tratadas e as controle, que foi de 100% em ambos os casos.

## 6 CONCLUSÃO

As conclusões deste experimento ao se utilizar a somatotropina bovina em superovulação de bovinos foram:

- A somatotropina bovina aumentou o número total de embriões e óvulos e de embriões viáveis, e não influenciou no número de embriões degenerados e infertilizados.
- A somatotropina bovina aumentou a proporção de embriões nos estádios de mórula e blastocisto e diminuiu no estágio de blastocisto inicial.
- A somatotropina bovina não alterou a manifestação de estro em novilhas superovuladas.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, G.P., BO, G.A., MARTINEZ, M., TRIBULO, H., PIERSON, R.A., MAPLETOFT, R.J. The effect of estradiol-17 $\beta$  and progestogen treatment on superovulatory response in beef cows. **Theriogenology**, New York, v.41, p.153, 1994.

ARMSTRONG, D.T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, New York, v.39, p.7-24, 1993.

ASHWORTH, C.J. Synchrony embryo-uterus. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.28, p.259-267, 1992.

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

BILBY, C.R., BADER, J.F., SALFEN, B.E., YOUNGQUIST, R.S., MURPHY, C.N., GARVERICK, H.A., CROOKER, B.A., LUCY, M.C., PLASMA, G.H. Insulin-like growth factor-I and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine GH. **Theriogenology**, New York, v.43, p.1285-1296, 1995.

BO, G.A., ADAMS, G.P., PIERSON, R.A., MAPLETOFT, R.J. Exogenous control of follicular wave emergence in cattle. **Theriogenology**, New York, v.43, p.31-40, 1995.

BO, G.A., PIERSON, R.A., MAPLETOFT, R.J. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants. **Theriogenology**, New York, v.36, p.169-183, 1991.

BOLAND, M.P., CROSKY, T.F., GORDON, I. Twin pregnancy in cattle established by non-surgical egg transfer. **British Veterinary Journal**, London, v.131, p. 738-740, 1976.

BOLS, P.E.J., YSEBAERT, M.T., LEIN, A., CORYN, M., VANSOOM, A., KRUIF, A. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an opu-ivc program. **Theriogenology**, New York, v.49, p.983-995, 1998.

CAMPBELL, B.K., MCNEILLY, A.S., MANN, G.E., BAIRD, D.T. The effect of stage of estrous cycle and follicular maturation on ovarian inhibin production in sheep. **Biology of Reproduction**, Madison, v.44, p.483-490,1991.

CHRISTIE, W.B., NEWCOMB, R., ROWSON, L.E.A. Investigation of some factors affecting embryo survival. **Veterinary Record**, London, v.106, p.190-193, 1980.

COULTARD H. On farm embryo transfer in cattle. **In Practice**, v.13, p.16-22, 1991.

CUSHMAN, R.A., DESOUZA, J.C., HELGPETH, V.S., BRITT, J.H. Effect of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. **Theriogenology**, New York, v.55, p.1533-1547, 2001.

CUSHMAN, R.A., HELGPETH, V.S., ECHTERNKAMP, S.E., BRITT, J.H. Evaluation of microscopic and macroscopic follicles in cattle selected for twinning. **Journal Animal Science**, Savoy, v.78, p.1564-1567, 2000.

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

DEL REI, A.J.M., RENNO, F., BARTOLOMEU, C.C., SILVA, A.L.R., MOREIRA, C.H.S., BARUSELLI, P.S. Synchronization of ovulation with CIDR-B for fixed-time embryo transfer in bovine criopreservate in ethylene glycol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.25, p.307-308, 2001.

DREW, S.B., PETERS, A.R. Effect of buserelin on pregnancy rates in dairy cows. **Veterinary Record**, London, v.134, p.267-269, 1994.

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

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, New York, v.35, p.55-79, 1991.

DROST, M., BRAND, A., AARST, M.H. A device for non-surgical recovery of bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v.6, p.503, 1976.

DULBECCO, R., VOIGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. **Journal Experimental Medicine**, New York, v. 99, p.167-182, 1954.

ELLINGTON, J.E., FOOTE, R.H., FARREL, P.B., HASLER, J.F., WEBB, J. Pregnancy rates after use of gonadotropin releasing hormone agonist in bovine embryo transfer recipients. **Theriogenology**, New York, v.36, p.1035-1042, 1992.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of postnatal bovine ovary. **Journal Animal Science**, Savoy, v. 25, p. 800, 1996.

GÄRTNER, K. A third component causing random variability besides environment and genotype. A reason for the limited success of a 30 year efforts to standardize laboratory animals. **Laboratory Animals**, v:24, p.71-77, 1990.

GEISERT, R.D., FOX, T.X., MORGAN, G.L., WELLS, M.E. Survival of bovine embryos transferred to progesterone-treated asynchronous recipients. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.92, p.475-482, 1991.

GINTHER, O.J., KASTELIC, J.P., KNOPF, L. Temporal associations among ovarian events in cattle during estrous cycles with two and three follicular waves. **Journal Reproduction Fertility**, Cambridge, v.87, p.223-230, 1989.

GINTHER, O.J., WILTBANK, M.C., FRICKE, P.M., GIBBONS, J.R., KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, Madison, v.55, p.1187-1994, 1996.

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

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**, Madison, v.47, p.1141-1149, 1993.

GOULDING, D., WILLIAMS, D.H., DUFFY, P., BOLAND, M.P., ROCHE, J.F. Superovulation in heifers given FSH initiated either at Day 2 or Day 10 of the estrous cycle. **Theriogenology**, New York, v.34, p.767-778, 1990.

GRASSO, F., GUIBAULT, L.A., ROY, G.L., LUSSIER, J.G. Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superstimulated heifers pretreated with FSH-P at the estrous cycle. **Theriogenology**, New York, v.31, p.1209-1220, 1989.

GUIBAULT, L.A., GRASSO, F., LUSSIER, J.G., ROUILLER, P., MATTON, P. Decreased superovulatory responses in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. **Journal of Reproduction Fertility**, Cambridge, v.91, p.81-89, 1991.

HAHN, J. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. **Theriogenology**, New York, v.38, p.269-275, 1992.

HAHN, J., HAHN, R., BAUMGÄRTNER, G., LOTTHAMMER, K.H., LORRMANN, W., SCHNEIDER, U., TRAUB, J., ZODER, H.F. Untersuchungen zur Verbesserung der Auswahl von Spender und Empfängerinnen im Rahmen der Eierübertragung beim Rind. **Zuchthygiene**, Berlin, v.12, p.68-76, 1977.

HALPIN, D.M.G., CHARLTON, H.M. Effects of short-term injection of gonadotrophins on ovarian follicle development in hypogonadal (hpg) mice. **Journal of Reproduction Fertility**, Cambridge, v.82, p.393-400, 1988.

HASLER, J.F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, New York, v.56, p.1401-1416, 2001.

HERRLER, A., EINSPANIER, R., SCHAMS, D., NIEMANN, H. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular IGF-1 contents and the ovarian response following superovulation treatment in dairy cows: A preliminary study. **Theriogenology**, New York, v.41, p.601-611, 1994.

HORNBURG, R., FARHI, J., Growth hormone and reproduction. **Current Opinion in Obstetric and Gynecology**, Philadelphia, v.7, p.220-223, 1995.

HUHTINEN, M., RAINO, V., AALTO, J., BREDBACKA, P., MAKI-TANILA, A. Increased ovarian responses in the absence of a dominant follicle in superovulated cows. **Theriogenology**, New York, v.37, p.457-463, 1992.

IETS. Manual da sociedade internacional de transferência de embriões. 3ed. Allinois Strigfellow, D. A. & Seidel, S.M., 1998. 180p.

IZADIAR, F., ZEINSTRA, E., BEVERS, M.M. Follicle-stimulation hormone and growth hormone act differently on nuclear maturation while both enhance development competence of in vitro matured oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.51, p.339-345, 1998.

KAFI, M., MCGOWAN, M.R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.48, p.137-157, 1997.

KARSCH, F.J., MOENTER, S.M., CARATY, A. The neuroendocrine signal for ovulation. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.28, p.329-341, 1992.

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 Dairy Science**, Savoy, v.80, p.273-285, 1997.

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

LEFEBRE, D.M., BLOCK, E. Effect of recombinant bovine somatotropin on estradiol-induced estrous behavior in ovariectomized heifers. **Journal Dairy Science**, Savoy, v. 75, p. 1461-1464, 1992.

LINDSEY, B.R., LOONEY, C.R., FUNK, D.J., FABER, D.C. The effect of apparent follicle removal (DFR) prior to FSH treatment on superstimulated response in problem donors. **Theriogenology**, New York, v.41, p.238, 1994.

LOONEY, C.R., ODEN, A.J., MASSEY, J.M., JOHNDON, C.A., GODKE, R.A. Pregnancy rate following hCG treatment of bovine embryo transfer recipients. **Theriogenology**, New York, v.19, p.140, 1984.

LUCY, M.C. Expectativas de índices reprodutivos em vacas leiteiras tratadas com somatotropina bovina. In: Curso novos enfoques na produção e reprodução de bovinos, 5, 2001, Uberlândia, **Anais de V Curso**, Botucatu: CONAPEC Jr., p.47-55, 2001.

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

LUCY, M.C., TATCHER, W.W., COLLIER, R.J., SIMMEN, F.A., KO, Y., SAVIO, J.D. Effects of somatotropin on the conceptus, uterus, and ovary during maternal recognition of pregnancy on cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, New York, v.12, p.73-82, 1995.

LUSSIER, J.G., LAMOTHE, P., PACHOLEK, X. Effect of follicular dominance and different gonadotropin preparations on the superovulatory response in cows. **Theriogenology**, New York, v.43, p.270, 1995.

MAFFILI, V.V., TORRES, C.A.A., BORGES, A.M., AMORIN, L.S. Efeitos da somatotropina bovina na resposta superovulatória e na taxa de clivagem de zigotos de camundongas (*Mus musculus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.25, n.3, p. 377-379, 2001.

MAPLETOFT, T. J. Bovine embryo transfer. In: MORROW, D. A. **Current Therapy in Theriogenology 2**, W.B. Saunder Company, New York, 1986.

MAZUR, P. Fundamental aspects of the freezing of cells with emphasis on mammalian ova and embryos. In: **International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination**, v.9, p.99-114, 1980.

MORBECK, D.E., BRITT, J.H., MCDANIEL, B.T. Relationships among milk yield, metabolism, and reproductive performance of primiparous Holstein cows treated with somatotropin. **Journal Dairy Science**, Savoy, v.74, p.2153-2164, 1991.

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**, New York, v.57, p.1371-1387, 2002a.

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 vitro derived bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v.57, p.895-907, 2002b.

MOREIRA, F., RISCO, C.A., PIRES, M.F.A., AMBROSE, J.D., DROST, M., THATCHER, W.W. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. **Journal Dairy Science**, Savoy, v.83, p.1237-1247, 2000.

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**, New York, v.59, p.1393-1402, 2003.

NASSER, L.F., ADAMS, G.P., BO, G.A., MAPLETOFT, R.J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, New York, v.40, p.713-724, 1993.

NELSON, C.F., NELSON, L.D. Cryopreservation of 7- to 9- day bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v.29, p.281, 1988.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: Current status and research needs. **Theriogenology**, New York, v.35, p.109-123, 1991.

NISHIGAI, M., KAMOMAE, H., TANAKA, T., KANEDA, Y. Improvement of pregnancy rate in Japanese Black cows by administration of hCG to recipients of transferred frozen-thawed embryos. **Theriogenology**, New York, v.58, p.1597-1606, 2002.

NOGUEIRA, M.F.G., MELO, D.S., CARVALHO, L.M., FUCK, E.J., BARROS, C.M. High levels of progesterone, induced by eCG, decreased conception rates in heifers, after frozen embryo transfer. **Theriogenology**, New York, v.57, p.556, 2002.

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

RAJAMAHENDRAN, R., SIANANGAMA, P.C. Effect of human chorionic gonadotropin (hCG) on dominant follicles in cows: accessory corpus luteum formation, progesterone production and pregnancy rates. **Journal Reproduction Fertility**, Cambridge, v.3, p.577-584, 1992.

REICHENBACH, H.D., OLIVEIRA, M.A.L., LIMA, P.F., FILHO, A.S.S., ANDRADE, J.C.O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: **Biotécnicas aplicadas a reprodução animal**, São Paulo, Livraria e Editora Varela, p.127-178, 2002.

RICHARDS, J.S. Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiological Reviews**, Bethesda, v.60, p.51-89, 1980.

RIVERA, G.M., FORTUNE, J.E. Development of codominant follicles in cattle in associate with a follicle stimulating hormone-dependent insuline like groth factor biding protein-4 protease. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 65, p.112-118, 2001.

RODRIGUES, J. L. Transferência de embriões bovinos – histórico e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, v.25, p.102-107, 2001.

ROMERO, A., ALBERT, J., BRINK, Z., WEBB, R. Numbers of small follicles in ovaries affects superovulation response in cattle. **Theriogenology**, New York, v.35, p.265, 1991.

SAKAGUSHI, M., DOMINKO, T., NAGAI, T., FIRST, N.L. A combination of IGF and EGF accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. **Theriogenology**, New York, v.54, p.1327-1342, 2000.

SAUMANDE, J. Culture of bovine granulosa cells in a chemically defined serum free medium. The effect of insulin and fibronectin on the response to FSH. **Journal Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, Oxford, v.38, p.189-196, 1990.

SCHNEIDER, H.J., J.R., CASTEBERRY, R.S., GRIFFIN, J.L. Commercial aspects of bovine transfer. **Theriogenology**, New York, v.13, p.73-85, 1980.

SHELDON, I.M., DOBSON, H. Effects of gonadotropin releasing hormone administered 11 days after insemination on the pregnancy rates of cattle to first and later services. **Veterinary Record**, London, v.133, p.160-163, 1993.

SPICER, L.J., TUCKER, W.B., ADAMS, G.D. Insulin-like growth factor-I in dairy cows: Relationships among energy balance, body condition, ovarian activity, and estrous behavior. **Journal Dairy Science**, Savoy, v.73, p.929-937, 1990.

SUAREZ-FERNANDEZ, C.A., SARTORI, R., MONSON, R.L., GINTHER, J.N., WILTBANK, M.C. Comparing embryo/ova recovery rates between deep uterine horn flushing versus flushing the entire uterine horn in superovulated Holstein heifers. **Theriogenology**, New York, v.57, p.563, 2002.

SUGIE, T., SOMA, T., FUKUMITSU, S., OTSUKI, K. Studies on the ovum transfer in cattle with special reference to transplantation of fertilized ova by means of non-surgical techniques. **Bull National Industry**, v.25, p.27-33, 1972.

THIBIER, M., NIBART, M. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic animals. **Animal Reproduction Science**, Savoy, v.28, p.139-148, 1992.

THIESSEN, J.P., KETELSLEGERS, J.M., UNDERWOOD, L.E. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. **Endocrine Reviews**, Bethesda, v.15, p.80-101, 1994.

TRIBULO H, MORENO D, CUTAIA L, GATTI G, TRIBULO R, CACCIA M AND BOGA. Pregnancy rates in embryo recipients treated with progesterone, vaginal devices, and eCG, and transferred without estrus detection. **Theriogenology**, New York, v.57, p.563, 2002.

VASCONCELOS, J.L.M. Estratégias para aumentar a eficiência reprodutiva em bovinos de leite. <http://www.milkpoint.com.br>, acessado em 14/05/2003.

VOELKEL, A.S., HU, Y.X. Direct transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v.37, p.23-37, 1992.

WATERMAN, D.F., SILVIA, W.J., HEMKEN, R.W., HEERSCHE, J.R.G., SWENSON, T.S., EGGERT, R.G. Effect of bovine somatotropin on reproductive function in lactating dairy cows. **Theriogenology**, New York, v.40, p.1015-1028, 1993.

WHITTINGHAM, D.G. Some factors affecting embryo storage in laboratory animals. In: **Symposium on the Freezing of Mammalian embryos**, p.97-127, 1977.

WILTBANK, M.C. Regulation of the ovary in cattle. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2,1998, Passos, **Anais do II Curso**, Botucatu: CONAPEC Jr., p.01-13, 1998a.

WILTBANK, M.C. Strategies for improving superovulation methods. In: CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 2, 1998, Passos, **Anais do II Curso**, Botucatu: CONAPEC Jr., p.23-35, 1998b.

ZUCKERMAN, S., BAKER, T.G. The development of ovary and the process of oogenesis. In Zuckerman S. and Weir B.J. (Ed.). **The ovary**, New York, Academic Press, v.1, p.161-167, 1977.