MANOEL FRANCISCO DE SÁ FILHO

**Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante
(bST) na população folicular e na produção *in vitro* de
embriões bubalinos**

São Paulo

2006

MANOEL FRANCISCO DE SÁ FILHO

**Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante
(bST) na população folicular e na produção *in vitro* de
embriões bubalinos**

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

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo

2006

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

Elza
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
6/1/06

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1630
FMVZ

Sá Filho, Manoel Francisco de

Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante (bST) na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos / Manoel Francisco de Sá Filho. — São Paulo : M. F. Sá Filho, 2006.

98 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2006.

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

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. OPU. 2. IGF-I. 3. Produção *in vitro*. 4. Vitrificação.
5. *Bubalus bubalis*. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Efeito do rBST na população folicular, taxa de obtenção *in vivo* de oócitos e na produção *in vitro* embriões bubalinos", Protocolo nº432/2004, utilizando 6 búfalos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "rBST effect in follicular pool, ovum pick-up and in vitro production of buffalo embryo" protocol number 432/2004, utilizing 6 buffaloes, under the responsibility of Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting.

São Paulo, 30 de julho de 2004

Profª Drª Julia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SÁ FILHO, Manoel Francisco de

Título: Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante (bST) na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

AGRADEÇO

Primeiramente gostaria de agradecer a **DEUS**, a força maior que cria, ampara e ilumina todos os nossos dias.

À minha mãe ANA MARIA FOGAÇA PEREIRA, exemplo de vida, pessoa que sempre me incentivou e me mostrou como aproveitar intensamente os momentos da vida, construindo-a de forma alegre e prazerosa. “É PRECISO SABER VIVER, É PRECISO SABER VIVER...”.

Ao meu pai MANOEL FRANCISCO DE SÁ que sempre foi o apoio para minhas decisões, me motivando pela carreira de Médico Veterinário desde o simples gesto de me levar para fazer o vestibular até meu ingresso na pós-graduação.

Ao meu avô MANOEL DE SÁ. Dedico a você cada conquista de minha vida, pois tentar ter suas qualidades é meu maior objetivo. Tento através de esta alcançar a sua benção, onde o senhor estiver.

Aos meus irmãos STELA MARIA DE SÁ, TIAGO MANOEL DE SÁ e MARIANA DE SÁ, agradeço a vocês pela presença e valorização, que em muitas vezes, não me acho digno de tanta admiração. AMO VOCÊS MUITO!!!

À minha avó ANÉSIA PALUMBO DE SÁ e minha tia VERA LÚCIA DE SÁ. Sou eternamente agradecido pelo apoio e entusiasmo de minha trajetória acadêmica e científica.

Aos meus avós maternos JERÔNIMO DE PAULA PEREIRA E NAIR FOGAÇA PEREIRA, agradeço a vocês pela convivência e pelos ensinamentos.

A NEHÍSA MÜLLER, minha namorada querida. Que sempre me apoiou em toda e qualquer decisão, me dando forças e infinitas alegrias durante este período. Esta pessoa tão especial, sempre me esperando com seu sorriso aconchegante e apaixonado durante minhas inúmeras viagens. Adoro estar cada minuto da minha vida como você. TE AMO MUITO, MUITO, MUITO!!!!

Ao PROF. DR. PIETRO SAMPAIO BARUSELLI. Difícil simplesmente agradecer esta pessoa. Sou grato desde o voto de confiança dirigido a mim quando me recebeu como estagiário e posteriormente, me aceitando como orientado. Esta pessoa que para mim é um exemplo científico e profissional, fazendo da pós-graduação um aperfeiçoamento muito além de simplesmente técnico e científico e sim profissional e pessoal. Agradeço também pela amizade que conseguimos construir durante este tempo e espero poder cultivá-la por toda minha vida. OBRIGADO PIETRO!!!

À DONA WILMA PENTEADO, E AOS FUNCIONÁRIOS DA FAZENDA SANTA ELIZA (Dourados-SP), que disponibilizaram todos os animais para todas as etapas do experimento. Dona Wilma é exemplo de sinceridade, serenidade, honestidade e sensatez, sempre disposta a ajudar na pesquisa e no desenvolvimento da bubalinocultura nacional. Também gostaria de agradecer em especial os funcionários DORICO, LAERTE E CARLINHO, sempre foram extremamente prestativos durante todas as etapas do experimento.

Ao PROF. DR. JOAQUIM MANZANO GARCIA, que disponibilizou toda a estrutura existente na UNESP-JABOTICABAL, desde o local para a manutenção dos animais até todo o laboratório de produção *in vitro*. Também, gostaria de agradecer pelos ensinamentos e pela amizade.

À PROF BIANCA GASPARINNI, que se dispôs a vir da Itália para ajudar na realização do trabalho. Agradeço pelos infinitos ensinamentos e particularmente pela grande amizade e exemplo de simplicidade e bom humor.

Agradeço ao PROF HUMBERTO TONHATTI pelo sempre imediato auxílio e apoio durante todo o experimento em Jaboticabal.

A todos PROFESSORES, FUNCIONÁRIOS E PÓS-GRADUANDOS da UNESP-JABOTICABAL, que sempre foram muito hospitaleiros e dispostos a ajudar em toda e qualquer necessidade do projeto como também nas necessidades pessoais. Gostaria de agradecer em especial aos pós-graduandos e agora, felizmente grandes amigos CHRISTINA FERREIRA, FELIPE PERECIN, GABRIEL FERREIRA SÓRIA, ANA PAULA PERINI, TATIANA TETZNER sem vocês nada teria acontecido. Gostaria de também agradecer em especial a ROBERTA VANTINI, técnica do laboratório, por seu auxílio, disposição e também pela sincera amizade.

Novamente gostaria de agradecer três pessoas de Jaboticabal, o GABRIEL, O RAFAEL E A CRISTINA. GABRIEL E RAFAEL agradeço por toda a hospitalidade a me receberem em suas casas durante toda minha estadia e pelos inúmeros momentos de discussão sobre reprodução e qualidade de carne. Também gostaria de deixar um sincero agradecimento a uma das pessoas mais especiais que eu já conheci em toda minha vida a CHRISTINA, sempre feliz, dedicada, amiga, disposta a ajudar e com uma capacidade intelectual impar.

Gostaria de agradecer aos estagiários que me ajudaram durante o experimento, em especial ao GUSTAVO, que sempre foi exemplo de disposição e de amizade.

Ao PROF. DR. RUBENS PAES DE ARRUDA, que cedeu todas as somatotrofinas utilizadas no experimento, bem como obrigado pelos ensinamentos e pela preocupação dirigida a mim durante meu tempo em Pirassununga.

AO PROF. DR. GUILHERME DE PAULA NOGUEIRA do Laboratório de endocrinologia da UNESP-Jaboticabal, pela paciência e realização das dosagens de IGF-I, bem como as inúmeras discussões dos resultados obtidos.

A todos os professores do Departamento de Reprodução Animal (VRA) pelos ensinamentos e dedicação. Gostaria de agradecer ao PROF. DR. VISINTIN pelo exemplo de dedicação, à PROF MAYRA, pelo exemplo de amizade com os alunos e ao PROF. DR. RENATO BARNABE, pelo exemplo de simplicidade e dedicação. Em especial gostaria de agradecer ao PROF. DR. MARIO BINELLI e ED HOFFMANN MADUREIRA e pelas inúmeras discussões, ensinamentos técnicos e científicos e pela sincera amizade construída.

A todos os colegas de departamento, em especial aos amigos NELCIO, EVERTON, LINDSAY, ANA PAULA, TORRES, CLAUDINEY, HENDERSON, ALEXANDRE, MARCIO LUDY, RENATA, MAZA, ALESSANDRA, WEBER, CAMILA, VIVIANE, MARCÍLIO, KARINA, PAOLA, CARLA ENEIVA, NORMA, CLAUDIA, ANDRE, JULIANA, PAULINE, PATRICIA, VANESSA, GUTINHO, JOSÉ RODRIGO, ALEXANDRE, WAGNER, SIMONE que se fizeram sempre presentes, mesmo em horas mais difíceis até nos momentos mais agradáveis.

Gostaria novamente em agradecer aos amigos: NELCIO ANTONIO TONIZA DE CARVALHO, EVERTON LUIZ REIS, LINDSAY UNO GIMENES, JOSÉ RIBAMAR TORRES JÚNIOR, HENDERSON AYRES, CLAUDINEY MELO MARTINS e ANA PAULA MANTOVANI, MARCIO OLIVEIRA MARQUES, MARCIO LEÃO FERRAZ, LUIZ FERNANDO NASSER que sempre se fizeram presentes, abrindo mão de seus afazeres, seus lares, seus compromissos para prontamente me ajudar em todos os experimentos realizados durante o mestrado. Gostaria de registrar meu profundo afeto e admiração por vocês.

A todos os funcionários do VRA pelo apoio e paciência, sem vocês a pesquisa em nosso departamento não seria possível, em especial à DONA SILVIA pelo Bom Dia! Sempre sincero e aconchegante.

Às secretárias HARUMI SHIRAISHI, THAÍS SOTO e MARIA ALICE MACHADO, pela eficiência, paciência e orientação.

Aos verdadeiros amigos MARCO ANTONIO PEREIRA (12 VÉIO), TIAGO FERNANDO HILGERT (CDC) e MAICON G. LORENA PINTO (Mrs PI) pelo companheirismo durante todo o período da faculdade, pela sincera amizade em todos os momentos. Também gostaria de agradecer a um verdadeiramente GRANDE AMIGO, o CLAUDIO SPETO, pelos momentos de alegrias etílicas durante o tempo de Pirassununga.

Não poderia deixar de agradecer aos meus professores da Universidade Federal de Santa Maria-UFSM, Santa Maria-RS, PROF. DR. CARLOS ANTÔNIO MONDINO SILVA, PROFA.DRA. MARA IOLANDA BATISTELA RUBIM E PROF. DR. ALCEU MEZALLIRA, que sempre me ensinaram e me dirigiram durante a vida acadêmica e científica. Também gostaria de agradecer ao PROF. DR. JOSÉ EDUARDO PORTELA SANTOS, Davis, Califórnia, EUA, pelas sempre imediatas respostas para com minhas dúvidas e pelo direcionamento profissional.

A NUTRICELL, Nutrientes Celulares, pelo empréstimo do aparelho de ultra-som utilizado durante toda a execução do projeto.

A todas as agências de pesquisa que financiam ou financiaram parte dos nossos trabalhos.

Enfim, gostaria de agradecer todos aqueles que convivi durante este período. Também gostaria de me desculpar por alguém que não citei, mas tenha certeza que você faz parte de minha vida e que sou eternamente agradecido a você.

OBRIGADO A TODOS!

RESUMO

SÁ FILHO, M. F. **Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante (bST) na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos.** [Effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian population and on vitro buffalo embryo production]. 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Avaliou-se neste estudo o efeito do tratamento com somatotrofina recombinante bovina (bST) na população folicular, na taxa de recuperação e qualidade dos oócitos e na produção *in vitro* de embriões bubalinos. A hipótese foi de que o bST aumenta o número de folículos recrutados e a qualidade oocitária, melhorando a eficiência da técnica de aspiração folicular em fêmeas bubalinas. Foram utilizadas 10 novilhas bubalinas, sendo que o grupo bST (n=5) recebeu 500mg de bST em intervalos regulares, enquanto o grupo Controle (n=5) não recebeu tratamento adicional. Ambos os grupos foram submetidos a 10 sessões de aspiração duas vezes por semana. Foram quantificados o número total de folículos e o tamanho destes a cada sessão. Os oócitos recuperados foram quantificados e classificados de acordo com a sua qualidade (A, B, C, D, E), sendo os A+B+C considerados de boa qualidade. Os embriões produzidos foram vitrificados, e uma parte destes, transferidos em tempo fixo. Foram colhidas amostras de sangue para mensuração de IGF-I plasmático durante o estudo. O bST aumentou o número de folículos observados (12,2 vs. 8,7; $p<0,05$) e o número de oócitos recuperados (5,2 vs. 4,1; $p=0,07$), no entanto não afetou a qualidade destes, bem como a sua capacidade de desenvolvimento ($p>0,05$). Observou-se efeito significativo ($p<0,05$) de sessão de aspiração no número de folículos observados, de folículos aspirados e de oócitos recuperados. As concentrações plasmáticas de IGF-I não apresentaram efeito de tratamento ($p>0,05$), no entanto sofreram efeitos de sessão e também da interação entre

sessão e tratamento ($p < 0,05$). Obteve-se taxa de concepção de 10,53 % (2/19) após a inovulação dos embriões, gerando o nascimento de dois bezerros normais. Os resultados são sugestivos de que o tratamento com bST aumenta o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular, demonstrando seu potencial em aumentar a eficiência da técnica de aspiração folicular na espécie bubalina.

Palavras-chave: OPU. IGF-I. Produção *in vitro*. Vitrificação. *Bubalus bubalis*.

ABSTRACT

SÁ FILHO, M. F. **Effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian population and on vitro buffalo embryo production.** [Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante (bST) na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos.] 2006. 98 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

The aim of this experiment was evaluated the effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population, oocyte recovery rates and quality, and on in vitro buffaloes embryo production. The hypothesis was that bST improves the number of follicles per follicular growth wave and oocyte quality, enhancing the results in buffalos females submitted to ovum pick-up programs. A total of ten heifers were assigned in two experimental groups (bST Group that received 500mg of bST in regular intervals and Control Group that did not received any additional treatment). Both groups were submitted to 10 OPU sessions twice weekly (every 3 or 4 days). The number of follicles and its diameters were recoded in all OPU. The oocytes harvest were counted and classified in five categories (A, B, C, D, E). The A+B+C categories were considered as good quality oocyte. The embryos produced were vitrified and some of these embryos were transferred of fixed time. Blood samples for IGF-I were obtained every once weekly. The bST improved the follicular population (12.2 vs. 8.7; $p<0.05$) and the number of oocytes per session (5.2 vs. 4.1; $p=0.07$), however the treatment did not affect the oocyte quality and its *in vitro* development capacity ($p>0.05$). A significant effect ($p<0.05$) of OPU session was observed in follicular population, number of aspirated follicles and number of oocyte recovered. The plasma IGF-I was not affected ($p>0.05$) by treatment, however presented a significant effect of OPU session and also of the treatment by OPU session interaction ($p<0.05$). The conception rate was 10.5% (2/19) and two healthy and normal calves were born from transferred embryo. These results indicate the viability

of bST treatment to improve the follicular recruitment and its potential application in buffaloes donors submitted to OPU programs.

Key words: OPU. IGF-I. in vitro embryo production. Vittrification. *Bubalus bubalis*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Diagramas esquemáticos do delineamento experimental	47
Figura 2 -	Bezerros nascidos de embriões bubalinos produzidos <i>in vitro</i> e vitrificados.....	64

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante (bST) no número de folículos observados em fêmeas bubalinas submetidas à aspiração folicular a intervalos regulares de 3 a 4 dias, Jaboticabal, 2004 (* = $p < 0,05$)..... 58
- Gráfico 2 - Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante (bST) no número de folículos pequenos, médios e grandes em fêmeas bubalinas submetidas à aspiração folicular a intervalos regulares de 3 a 4 dias, Jaboticabal, 2004 (* = $p < 0,05$)..... 62
- Gráfico 3 - Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante (bST) na porcentagem de oócitos de boa qualidade (A+B+C) e distribuição da categoria das estruturas recuperadas em fêmeas bubalinas submetidas à aspiração folicular a intervalos regulares de 3 a 4 dias, Jaboticabal, 2004..... 62
- Gráfico 4 - Efeito do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) na concentração relativa de IGF-I (ng/ml) referente a concentração plasmática de IGF-I observada antes do primeiro tratamento com bST em fêmeas bubalinas submetidas a aspiração folicular em intervalos regulares a cada 3 a 4 dias, Jaboticabal, 2004 (* = $p < 0,05$) 63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS.....	22
3	HIPÓTESE DO TRABALHO	23
4	REVISÃO DE LITERATURA.....	24
4.1	ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SOM.....	24
4.1.1	Histórico.....	24
4.1.2	Fatores relacionados ao sucesso da aspiração folicular.....	25
4.1.2.1	Aspectos mecânicos relacionados à aspiração folicular.....	26
4.1.2.1.1	<i>Aparelho de Ultra-som.....</i>	<i>26</i>
4.1.2.1.2	<i>Pressão de Vácuo.....</i>	<i>27</i>
4.1.2.1.3	<i>Tipo de agulha.....</i>	<i>29</i>
4.1.2.2	Aspectos biológicos relacionados à aspiração folicular.....	31
4.1.2.2.1	<i>Quantidade de folículos disponíveis para aspiração.....</i>	<i>31</i>
4.1.2.2.2	<i>Competência oocitária na aspiração folicular.....</i>	<i>33</i>
4.1.2.2.3	<i>Efeito do intervalo entre aspirações.....</i>	<i>36</i>
4.2	EIXO SOMATOTRÓPICO E A REPRODUÇÃO.....	37
4.2.1	<i>Insulin Growth Factor-I (IGF-I)</i>	38
4.3	SOMATOTOFINA BOVINA RECOMBINANTE (bST)	40
4.3.1	bST e a população folicular.....	42
4.3.2	bST em programas de aspiração folicular.....	44
5	MATERIAL E MÉTODOS	46
5.1	ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO	46
5.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	47
5.3	TRATAMENTO	48
5.4	AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO FOLICULAR.....	48
5.5	ASPIRAÇÃO FOLICULAR.....	49
5.6	PROCURA E SELEÇÃO DOS OÓCITOS.....	50
5.7	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	51
5.7.1	Maturação <i>in vitro</i>.....	51
5.7.2	Fecundação <i>in vitro</i>.....	52
5.7.3	Cultivo <i>in vitro</i>.....	52
5.7.4	Vitrificação dos embriões produzidos <i>in vitro</i>	53

5.8	TRANSFERÊNCIA EM TEMPO FIXO DOS EMBRIÕES VITRIFICADOS.....	54
5.9	COLHEITA DE SANGUE E DOSAGEM DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE IGF-I.....	55
5.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
6	RESULTADOS	58
7	DISCUSSÃO	65
8	CONCLUSÃO	81
	REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos dez anos, o rebanho bubalino mundial apresentou taxa de crescimento de 7,8%, e, a produção de leite desta espécie aumentou 28,3% (FAO, 2005). Atualmente a bubalinocultura é responsável por 12,4% da produção mundial de leite (FAO, 2005). Apesar desta expressiva participação produtiva no cenário mundial, existe reduzido número de búfalos selecionados zootecnicamente para a produção de leite e carne no Brasil e no mundo (RIBEIRO, 2002).

Atualmente somente o potencial genético masculino, através da inseminação artificial, é explorado com relativo sucesso no Brasil. No entanto, o potencial reprodutivo da fêmea poderia ser efetivamente multiplicado por biotécnicas da reprodução como transferência de embriões (TE) e a aspiração folicular associada à produção *in vitro* de embriões (BARUSELLI; CARVALHO, 2003).

Programas de superovulação e transferência de embriões ainda não apresentam resultados que assegurem seu uso rotineiro em bubalinos (OHASHI et al., 2003), apresentando um pequeno número de embriões coletados por fêmea (1 a 3; CARVALHO et al., 2002). Tais resultados decorrem principalmente de problemas relacionados à captação e/ou transporte dos oócitos pela tuba uterina (BARUSELLI, CARVALHO, 2003; MISRA et al., 1998).

Devido aos baixos resultados dos programas de transferência de embriões em bubalinos a aspiração folicular guiada por ultra-som aliado à produção *in vitro* de embriões (OPU-PIV) mostra-se como uma das biotécnicas alternativas para o melhor aproveitamento do potencial genético feminino na espécie.

A técnica de OPU-PIV na espécie bubalina foi relatada pela primeira vez por Boni et al. (1994) e tem sido descrita por diversos autores, a partir de então (BONI et al., 1994, 1995, 1997, 1999; GALLI 1998; GUPTA et al., 2006; NEGLIA 2003; PAVASUTHIPAISIT et al., 1995).

A OPU-PIV ainda apresenta alguns problemas na espécie bubalina, principalmente relacionados à baixa quantidade e qualidade dos oócitos obtidos por sessão de aspiração (GASPARINI 2002; GUPTA et al., 2006; NEGLIA, et al., 2003; OHASHI et al., 2003).

Estes problemas são possivelmente devido a particularidades anatômicas e/ou fisiológicas da espécie bubalina, nas quais afetam a eficiência dos programas de OPU-PIV. Os ovários de fêmeas bubalinas apresentam menor tamanho e peso que os de bovinos (VITTORIA et al., 1997). Danell (1987) observou, pela histologia ovariana, que existe uma população de 12,636 e 10,132 folículos primordiais em novilhas búfalas cíclicas e não cíclicas, respectivamente. Segundo este autor, o número é bastante reduzido quando comparado aos 150,000 folículos primordiais em novilhas bovinas (ERIKSON, 1966). O número de folículos > 1mm também difere entre as duas espécies, pois os bovinos possuem aproximadamente 90 folículos, enquanto que os búfalos apresentam apenas 46,3. Danell (1987) e Le Van Ty et al. (1989) descrevem que ovários bubalinos possuem somente 20% dos folículos antrais encontrados em ovários de bovinos.

Outro aspecto importante para o sucesso da OPU-PIV é a qualidade dos oócitos recuperados. Le Van Ty et al. (1989) observaram alto grau de atresia da população folicular em bubalinos. Os oócitos bubalinos obtidos por aspiração folicular apresentam reduzido número de camadas de células do *cumulus* com baixo

grau de compactação, sendo que somente 38.4% dos oócitos são considerados aptos ao cultivo (OHASHI et al., 2003).

Neste sentido o desenvolvimento de estratégias que, promovam incremento na população folicular e que também melhorem a qualidade oocitária, são de grande importância para a incrementar a eficiência da OPU-FIV em fêmeas bubalinas.

A utilização da somatotrofina bovina recombinante (bST) para aumentar a produção de leite já foi relatada em bovinos (BAUMAN 1992) e outros ruminantes como ovinos (FERNANDES et al. 1995), caprinos (GALO et al.1997) e bubalinos (POLIDORI et al., 1997). Ainda, os reflexos de sua aplicação sobre a biologia reprodutiva das fêmeas têm sido alvo de diversos trabalhos publicados (BILBY et al. 2004; GONG 2002; LUCY, 2000; MOREIRA et al. 2002a,b).

Devido a seus efeitos na população ovariana, na foliculogênese, na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário, o bST tem sido aliado a técnicas da reprodução. Existem relatos de sua utilização em programas de inseminação artificial em tempo fixo (MOREIRA et al., 2000), prévio a tratamentos superestimulatórios (BARUSELLI et al., 2003; GONG et al., 1996), no momento da inseminação de doadora ou do cio de receptoras de embrião bovinos (MOREIRA et al. 2002b), bem como previamente a programas de OPU-PIV em bovinos (BOLS et al., 1998; ROTH et al., 2002; TRIPP et al., 2000).

O tratamento com bST mostrou-se capaz de aumentar o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular (GONG, 2002; LUCY, 2000). Este efeito foi estudado em fêmeas taurinas (DE LA SOTA et al., 1993; GONG et al., 1991; GONG et al., 1993; LUCY et al., 1993), zebuínas (BURARTINI et al., 2000) e em fêmeas ovinas (JOYCE et al., 2000).

O bST promove aumento na população folicular ao redor de 3 dias após a sua administração, sendo relacionado ao aumento dos níveis circulantes de hormônio do crescimento (GH), IGF-I e insulina (GONG, 2002). O IGF e a insulina promovem aumento da esteroidogênese das células da granulosa (GONG et al., 1994; SPICER; CHAMBERLAIN; MACIEL, 2002). Estes hormônios atuam em sinergismo com as gonadotrofinas estimulando a proliferação das células da granulosa em folículos pequenos (GONG et al., 1993; SPICER; CHAMBERLAIN; MACIEL, 2002).

O bST estimula a expansão das células do cúmulus e a maturação nuclear dos oócitos, aumentando as taxas de fertilização (IZADYAR, 1998). Moreira et al. (2002b) relatam aumento na taxa de clivagem quando se acrescentou hormônio de crescimento (GH) no meio de maturação. Estes mesmos autores obtiveram uma maior produção embrionária quando se adicionou GH (24,8%) ou IGF-I (33,7%) no meio de cultivo em relação ao grupo controle (16,1%), comprovando os benefícios do GH e do IGF-I tanto na maturação oocitária quanto no desenvolvimento embrionário em bovinos.

Em búfalos, o IGF-I aumentou a taxa de clivagem dos oócitos quando foram maturados em meio suplementado com o fator de crescimento (PAWSHE; RAO; TOTEY, 1998). Os mesmos autores discutem que o IGF-I atua em sinergismo com o FSH nas células da granulosa estimulando a multiplicação celular, a esteroidogênese e a síntese proteica.

A utilização do tratamento com bST em programas de aspiração folicular tem demonstrado eficiência no aumento do número de folículos disponíveis para serem aspirados (BOLS et al., 1998; TRIPP et al., 2000), bem como na qualidade dos oócitos recuperados (PAVLOK et al., 1996; ROTH et al., 2002).

Devido à menor população folicular e à baixa qualidade oocitária inerente à espécie bubalina este experimento procurou avaliar o efeito do tratamento com bST na população folicular, na qualidade e na taxa de obtenção *in vivo* de oócitos e na produção *in vitro* de embriões bubalinos.

2 OBJETIVOS

- Avaliar o efeito do tratamento com bST na população folicular de fêmeas bubalinas submetidas a aspiração folicular.
- Comparar a eficiência de programas de aspiração folicular e de produção *in vitro* de embriões em fêmeas bubalinas tratadas ou não com bST.
- Mensurar as concentrações plasmáticas de IGF-I de acordo com o tratamento.
- Verificar a eficiência de programas de transferência de embriões em tempo fixo em fêmeas bubalinas utilizando embriões produzidos *in vitro* e vitrificados.

3 HIPÓTESE DO TRABALHO

A hipótese desse trabalho é de que o tratamento com bST aumenta o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular e a qualidade oocitária, melhorando a eficiência da técnica de aspiração folicular *in vivo* em fêmeas bubalinas por aumentar o número de folículos aspirados, o número de oócitos recuperados bem como sua capacidade de desenvolvimento *in vitro*.

3.1 MODELO HIPOTÉTICO GRÁFICO

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRA-SOM

4.1.1 Histórico

O primeiro relato de nascimento de animais gerados por fertilização *in vitro* foi feito por Chang (1959) em coelhos. Em bovinos o primeiro nascimento ocorreu em 1981 (BRACKETT et al., 1982).

Diversas técnicas foram desenvolvidas para a obtenção repetida de oócitos de fêmeas vivas. A utilização da laparoscopia para esta finalidade promove altas taxas de recuperação oocitária, no entanto apresenta a desvantagem de ser um procedimento invasivo e laborioso. Além disso, a laparoscopia pode levar a formação de aderências e também aumenta o risco de peritonite (BOLS, 2001).

O primeiro relato do uso da técnica de punção folicular orientada por ultra-som para a recuperação de oócitos bovinos foi feito por Callesen et al. (1987). Estes autores utilizaram novilhas superestimuladas e realizaram a punção folicular no final do período pré-ovulatório (60-65 horas após a administração de prostaglandina). Neste mesmo estudo os autores utilizaram um ultra-som de 3,5 Mz e uma guia de punção, realizando a punção folicular de maneira transcutânea. Os ovários foram posicionados contra a parede abdominal na região sacro-isquiática, por palpação retal, resultando em 42% de taxa de recuperação.

Em 1988, Pieterse et al., modificaram a técnica de punção transvaginal guiada por ultra-som, originalmente proposta para humanos (COHEN et al., 1986; DELLENBACH et al., 1984; LENZ et al., 1987), para ser empregada na espécie bovina. Esta metodologia apresentou-se pouco invasiva e de alta repetibilidade (PIETERSE et al., 1991, 1992), sendo posteriormente denominada “Ovun Pick-Up” (OPU). As potenciais vantagens técnicas e econômicas levaram a uma rápida difusão da OPU entre os diversos grupos de pesquisa (GALLI et al., 2001).

Em fêmeas bubalinas, o primeiro relato da utilização da OPU foi em 1993 por Boni et al. (1994). Os autores testaram a utilização de FSH na aspiração folicular de fêmeas Mediterrâneas em anestro. Desde então, a técnica tem sido aplicada com relativo sucesso em fêmeas bubalinas por diversos autores (BONI et al., 1995, 1997, 1999; GALLI 1998; GUPTA et al., 2006; NEGLIA et al., 2003, 2004; PAVASUTHIPASIT et al., 1995).

4.1.2 Fatores relacionados ao sucesso da aspiração folicular

Os principais fatores que controlam o sucesso da aspiração folicular transvaginal podem ser divididos em fatores mecânicos (aparelho de ultra-som, procedimento de aspiração, pressão de aspiração ou tipo de agulha) e fatores biológicos (raça, espécie ou idade da doadora, pré-estimulação hormonal ou fase do ciclo estral na qual se realiza a aspiração folicular).

4.1.2.1 Aspectos mecânicos relacionados à aspiração folicular

Um sistema de aspiração folicular apresenta três partes principais: 1) Aparelho de ultra-som; 2) Bomba de vácuo e 3) Sistema de guia e agulhas, conectados a um recipiente coletor dos oócitos.

4.1.2.1.1 *Aparelho de Ultra-som*

Em programas de aspiração folicular e na reprodução assistida em bovinos são utilizados diversos tipos de transdutores mecânicos ou eletrônicos. Suas frequências variam de 3 a 8 MHz, sendo que a escolha varia de acordo com a profundidade das estruturas a serem visualizadas, bem como o grau de definição exigido para uma boa eficiência do procedimento (VIANA 2002).

Especificamente para aspiração folicular guiada por ultra-som as metodologias desenvolvidas foram propostas utilizando transdutores tanto lineares como convexas, com frequências variadas, existindo relatos da utilização de transdutores de 5,0 MHz (GIBBONS et al., 1994; LOONEY et al., 1994; PIETERSE et al., 1988); 6,5 MHz (BONI et al., 1997; FRY et al., 1997; KRUIP et al., 1994) e 7,5 MHz (BOLS et al., 1995; KRUIP et al., 1991; SENEDA et al., 2003; VAN DER SCHANS et al., 1991). A simples variação da frequência do transdutor pode alterar a taxa de recuperação dos oócitos devido principalmente a melhor visualização (melhor definição das bordas) como se pode observar quando se utilizam aparelhos

com maior frequência (HASHIMOTO et al., 1999). Tais diferenças na resolução da imagem podem ser mais significativas principalmente em função da experiência do operador do equipamento (FRY et al., 1997; VAN DER SCHANS et al., 1991).

Em fêmeas bubalinas também foi relatada a influência da qualidade da imagem da imagem ultra-sonográfica nos resultados obtidos em programas de aspiração folicular (OHASHI et al., 2002). Neste estudo, estes autores relatam que melhores resultados foram obtidos com a utilização de sondas eletrônicas de 7,5 MHz ($13,7 \pm 4,6$) em relação ao uso de sondas mecânicas ($2,12 \pm 0,4$) de mesma frequência.

4.1.2.1.2 Pressão de Vácuo

Os sistemas de recuperação de oócitos in vivo por aspiração folicular baseiam-se na aspiração dos complexos-cumulus-oócitos (CCOs), após 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 puncionado, a característica do circuito de vácuo (aberto ou fechado), o diâmetro, comprimento e tipo de bisel da agulha de punção, o diâmetro e 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 e 1997; FRY et al., 1997; HASHIMOTO et al., 1999; HORNE et al., 1996). 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). Pressões entre 50 e 100 mmHg são as mais freqüentemente utilizadas, que correspondem a aproximadamente a 5 a 40 ml de água por minuto, dependendo do diâmetro da agulha (BOLS et al., 1996; FRY et al., 1997). 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 (BOLS et al., 1996; FRY et al., 1997; HASHIMOTO et al., 1999).

Os efeitos mecânicos da pressão de vácuo sobre os CCOs variam de acordo com o estado fisiológico do folículo aspirado (BOLS et al., 1996; HORNE et al., 1996). Folículos pré-ovulatórios ou em elevado grau de atresia promovem a obtenção de CCOs com graus variados de expansão, e a menor coesão entre as células do *cumulus*, aumentando a possibilidade de sua desconexão durante a aspiração folicular (VIANA, 2002).

Elevadas pressões de aspiração são altamente prejudiciais à eficiência dos programas de aspiração folicular. Pressões excessivas, particularmente entre 70 e 130 mmHg, causam o desnudamento dos oócitos obtidos, diminuindo a taxa de produção embrionária (BOLS et al., 1996).

Em fêmeas bubalinas (Swamp buffaloes) também foi relatada a influência da utilização de diferentes pressões de vácuo (60, 80 e 100 mmHg) em programas de aspiração folicular (THECHAKUMPHU et al., 2004). Neste estudo os autores utilizaram novilhas superestimuladas e, para a aspiração folicular, agulha longa (34,5 cm) de 17 gauge (G) de diâmetro. Os autores não observaram diferenças na taxa de recuperação utilizando 60 (81,2%; 69/85), 80 (79,1%; 57/67) ou 100 mmHg (90,3%; 93/103). Ainda, a qualidade dos oócitos recuperados não foi afetada pelas diferentes pressões de aspiração, no entanto independente da pressão utilizada, 50% dos oócitos recuperados foram classificados como sendo desnudos, degenerados ou zonas pelúcidas “free”.

4.1.2.1.3 Tipo de agulha

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). As agulhas de maiores diâmetros (17 e 18 G) são mais rígidas e, portanto, menos sujeitas a entortar durante a manipulação do ovário (FRY et al., 1997), no entanto podem causar maiores danos no parênquima ovariano (VIANA, 2002).

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, 1996, 1997; FRY et al., 1997). Agulhas de menor calibre são menos sujeitas à variação na velocidade de fluido aspirado por minuto do que agulhas com calibre interno maior (BOLS et al., 1996). O diâmetro e o comprimento da agulha apresentam uma relação direta e inversa à velocidade do fluxo aspirado (HORNE et al., 1996).

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

Outro aspecto a ser considerado na escolha 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 20 G 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. Este achado rejeitou a hipótese inicial de que agulhas de bisel curto promoveriam melhores resultados. 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 fluido folicular entre a parede do folículo e a agulha (HORNE et al., 1996).

4.1.2.2 Aspectos biológicos relacionados à aspiração folicular

4.1.2.2.1 Quantidade de folículos disponíveis para aspiração

O número de folículos primordiais ao nascimento em bovinos é altamente variável (ERICKSON, 1966). Esta alta variação entre os indivíduos, no número de folículos da “reserva ovariana”, causa uma alta variabilidade no número de folículos recrutados por onda de desenvolvimento folicular (ERICKSON, 1966). Existe uma alta repetibilidade (95%) entre o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular (BONI et al., 1997; BURNS et al., 2005). Esta questão é especialmente importante, pois em bovinos o elevado número de folículos antrais está relacionado à resposta a tratamentos superestimulatórios (CUSHMAN et al., 1999; KAWAMATA 1994; TANEJA et al., 2000), ao número de oócitos recuperados por sessão de aspiração, bem como a competência de desenvolvimento in vitro destes oócitos (TANEJA et al., 2000).

Sabe-se que o hormônio do crescimento (GONG et al., 1993) e o IGF-I (CAMPBELL et al., 1995) promovem o desenvolvimento de folículos antrais. As variações destes hormônios podem explicar a alta variabilidade no número de

folículos pequenos (3mm) durante as ondas de desenvolvimento folicular em bovinos (BURNS et al., 2005). Todavia, as concentrações de IGF-I parecem ser semelhantes em bovinos (*Bos taurus*) com alto ou baixo número de folículos recrutados por onda, sugerindo outros mecanismos complementares para a determinação do número de folículos recrutados por onda (BURNS et al., 2005).

Diversas diferenças específicas quanto à anatomia e fisiologia ovariana da espécie bubalina podem influenciar o sucesso dos programas de aspiração folicular. Os ovários de fêmeas bubalinas apresentam menor tamanho e peso quando comparados com os de bovinos (2,5 cm vs. 3,7 cm de comprimento; 3,9g vs. 8,5g de peso, respectivamente (VITTORIA et al., 1997). Danell (1987) observou, pela histologia ovariana, que existe uma população de 12,636 e 10,132 folículos primordiais em novilhas búfalas cíclicas e não cíclicas, respectivamente. Segundo este autor, o número é bastante reduzido quando comparado aos 150,000 folículos primordiais em novilhas bovinas (ERIKSON, 1966). O número de folículos > 1mm também difere entre as duas espécies, pois os bovinos possuem aproximadamente 90 folículos, enquanto que os búfalos apresentam apenas 46,3. Danell (1987). Le Van Ty et al. (1989) também observaram a existência de menor número de folículos antrais na espécie bubalina que na espécie bovina. Estes autores notaram que os ovários de bubalinos possuem 20% dos folículos antrais encontrados nos ovários de bovinos ($47,5 \pm 23,8$ vs $233,0 \pm 95,8$; $P < 0.002$).

Baruselli et al. (1997) observaram em fêmeas bubalinas uma média de 7,6 folículos recrutados por fêmea durante a primeira onda de desenvolvimento folicular. Kumar et al. (1997) observaram a presença de $5,20 \pm 0,97$ folículos por ovário derivado de matadouro de fêmeas bubalinas. Ohashi et al. (2003) citam reduzido número de folículos ($4,5 \pm 1,9$) por ovário obtido derivado matadouro de fêmeas

bubalinas quando comparados aos obtidos de fêmeas zebuinas ($8,7 \pm 5,9$). Os mesmos autores também relatam um menor número de oócitos recuperados por ovário de fêmeas bubalinas ($2,2 \pm 1,1$) do que de fêmeas bovinas ($4,1 \pm 2,3$).

Em um trabalho recente realizado em fêmeas bubalinas (Murrah), Gupta et al. (2006) observaram um reduzido número de folículos ovarianos ($3,7 \pm 0,3$) em fêmeas ciclando submetidas à aspiração folicular uma vez por semana. Neste mesmo estudo, apesar dos autores obterem satisfatória taxa de recuperação (68%) a média de oócitos recuperados por sessão de aspiração foi somente $2,0 \pm 0,3$.

4.1.2.2.2 Competência oocitária na aspiração folicular

O cultivo *in vitro* possibilita que os oócitos expressem somente seu próprio potencial de desenvolvimento, de maneira que a produção de embriões *in vitro* é limitada pelas características iniciais dos oócitos cultivados (SIRARD, 2001) visto que nos bovinos, o genoma embrionário somente assume o controle do desenvolvimento embrionário após alguns ciclos celulares depois da fertilização (transição materno-zigótica). O desenvolvimento embrionário inicial depende da quantidade de RNAm e RNAr armazenado no citoplasma do próprio oócito durante o seu desenvolvimento [maturação citoplasmática (HENDRIKSEN et al., 2000)].

Diversos trabalhos demonstram a correlação entre o diâmetro folicular, o diâmetro do oócito e a competência oocitária (BLONDIN, SIRARD, 1995; FAIR et al., 1995; LONERGAN et al., 1994; PAVLOK et al., 1992). O oócito somente adquire a capacidade de realizar a ativação nuclear a partir de $110\mu\text{m}$, o que corresponde a

um folículo de aproximadamente de 3mm de diâmetro (HYTTEL et al., 1997). Sendo assim, o oócito gradualmente adquire a capacidade de sofrer a maturação, meiose e manter o desenvolvimento embrionário inicial (HYTTEL et al., 1997). A capacidade de progressão da meiose *in vitro* aumenta de 21,2% para 80,7% quando se utilizam oócitos com 120µm em relação aos com diâmetro inferiores a 100µm (FAIR et al., 1995).

Em fêmeas bubalinas, as taxas de fertilização, clivagem e desenvolvimento embrionário são aumentadas quando os CCOs são obtidos de folículos grandes (>8mm) em relação aos obtidos de folículos médios (3-8mm) e pequenos (>3mm; RAGHU et al., 2002), sendo que oócitos derivados de folículos médios promovem melhores resultados em relação aos de folículos pequenos. Neste mesmo estudo os autores observaram relação entre o diâmetro do oócito e a taxa de produção de blastocistos. A média do diâmetro dos oócitos obtidos em diferentes diâmetros foliculares foi de 146,4µm, porém maiores taxas de blastocistos foram obtidas quando os oócitos alcançavam tamanhos superiores a 145 µm. Em outro estudo, Yousaf e Chohan (2003), sugerem que a capacidade oocitária em alcançar a maturação nuclear é dependente do diâmetro folicular e que os melhores resultados são obtidos quando se utiliza a punção de folículos com >4 mm de diâmetro.

Apesar do diâmetro folicular ser normalmente utilizado como indicativo de capacidade de desenvolvimento *in vitro* em bovinos, a maioria dos CCOs coletados de folículos de 2 a 6mm não são capazes de produzir blastocistos (BRACKET; ZUELKE, 1993). A aspiração folicular durante fases aleatórias do ciclo estral, pode gerar até 85% de oócitos atrésicos, já que o período de total eliminação do oócito leva ao redor de 1 a 2 semanas (KRUIP et al., 1982). Portanto, a aspiração de folículos de mesmo diâmetro pode gerar diferentes resultados devido as grandes

variações dos momentos fisiológicos (desenvolvimento ou atresia) dos oócitos obtidos (VASSENA et al., 2003).

Diversos estudos têm demonstrado a influência do momento da onda de desenvolvimento folicular tanto na taxa de recuperação oocitária como na eficiência da produção embrionária (HENDRIKSEN et al., 2004; MACHATKOVA et al., 2000, 2004; SENEDA et al., 2001; VASSENA et al., 2003;). O número de oócitos recuperados é maior quando a aspiração é realizada na fase de desenvolvimento inicial da primeira onda de crescimento folicular (MACHATKOVA et al., 2004). Este resultado provavelmente é decorrente do maior número de folículos pequenos (4mm), o que proporciona maiores taxas de recuperação (SENEDA et al., 2001). No entanto, as taxas de desenvolvimento *in vitro* de embriões são maiores quando os oócitos são obtidos na fase de platô ou início de dominância (HENDRIKSEN et al., 2004; VASSENA et al., 2003;) em relação às fases tardias de dominância folicular.

4.1.2.2.3 Efeito do intervalo entre aspirações

O intervalo entre as subseqüentes aspirações influencia tanto a qualidade quanto a quantidade dos oócitos recuperados (MERTON et al., 2003). Após a aspiração dos folículos presentes no ovário a emergência da nova onda de desenvolvimento folicular é induzida em 1,5 dias (ADAMS et al., 1992). Um maior número de CCOs por sessão é coletado em intervalos de 7 dias em relação a intervalos de 3 ou 4 dias. Porém, a qualidade morfológica dos oócitos (número de células do *cumulus*) é melhor quando se empregam intervalos de 3 a 4 dias em relação aos de 7 dias (MERTON et al., 2003).

Em um estudo recente realizado em vacas Gir sob condições tropicais, Viana et al. (2004) relatam que o intervalo entre aspirações a cada 7 dias ou de 3 a 4 dias não afeta a quantidade de folículos puncionados ($12,1 \pm 0,6$ vs $11,6 \pm 0,6$, respectivamente). Os mesmos autores observaram que o intervalo de 7 dias aumenta ($p < 0,01$) o número de oócitos obtidos por sessão ($9,0 \pm 0,8^a$ vs. $7,0 \pm 0,4^b$, respectivamente), resultando em maior ($p < 0,01$) taxa de recuperação (74,3% vs. 59,0%, respectivamente). Ainda neste trabalho, os autores observaram maior porcentagem de oócitos selecionados para produção in vitro ($p < 0,05$) quando as aspirações foram realizadas intensivamente (82,3%, 541/657) comparado com intervalos de 7 dias (71,4%, 418/564), bem como uma maior produção embrionária (31,8% vs. 21,6%, respectivamente).

Ainda, outros autores não observaram diferenças na utilização de diferentes intervalos entre aspirações na quantidade dos oócitos recuperados (BROADBENT et al., 1997; GARCIA; SLAHEDDINE 1998; GIBBONS et al., 1994). Broadbent et al.

(1997) não observaram diferenças no número de folículos visualizados ($9,1 \pm 0,63$ vs $8,3 \pm 0,85$), no número de folículos aspirados ($5,9 \pm 0,56$ vs $6,2 \pm 0,69$), no número de oócitos recuperados ($1,7 \pm 0,27$ vs $1,9 \pm 2,0$) e na taxa de recuperação ($29,4 \pm 2,4$ vs $30,4 \pm 2,4\%$) entre animais aspirados em intervalos de uma ou duas vezes por semana.

4.2 EIXO SOMATOTRÓPICO E A REPRODUÇÃO

O eixo somatotrópico é constituído pelo hormônio do crescimento (GH), o receptor do GH (GHR), o fator semelhante à insulina tipo-1 (insulin growth factor-1; IGF-I), as proteínas carreadoras de IGF (IGFBP), e os receptores de IGF, sendo este eixo essencial para diferenciação e desenvolvimento de diversas células e tecidos (RADCLIFF et al., 2004).

Diversos estudos têm investigado as influências do eixo somatotrópico sobre as funções ovarianas, principalmente visando sua ação no eixo hipotálamo-hipofisário, modulando a secreção de gonadotrofinas, bem como, mais recentemente, sua própria ação sob as gônadas (ARMSTRONG et al., 2001; BILBY et al., 2004; GONG, 2002; HUNTER et al., 2004; LUCY, 2000). Atualmente, é considerado evidente que o GH e o IGF-I podem exercer efeitos estimulatórios e/ou sinérgicos em diferentes níveis do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, no trato reprodutivo, na genitália externa e na glândula mamária (CHANDRASHEKAR; ZACZEK; BARTKE, 2004). Sendo assim, o GH é considerado importante modulador

das funções reprodutivas, e essencial para a reprodução das fêmeas (HULL; HARVEY, 2001).

4.2.1 *Insulin Growth Factor-I* (IGF-I)

O fator semelhante à insulina do tipo 1 (*Insulin-like growth factor-I*) é um polipeptídeo com 70 aminoácidos que exerce efeitos no desenvolvimento periférico, de diferenciação celular e da própria sobrevivência de diversas células e tecidos do organismo (DAFTARY; GORE, 2005).

No metabolismo corporal, o IGF-I possui ações autócrinas, parácrinas e endócrinas, apresentando, além da estrutura, funções semelhantes às da insulina, tais como promover aumento na captação de glicose e atividade de síntese proteica (RUCKEBUSCH; PHANEUF; DUNLOP, 1991). O IGF-I é um potente agente mitogênico em resposta ao estímulo de GH (COHICK, 1998), sendo que a maior parte do IGF-I circulante tem origem a partir da síntese hepática (LUCY, 2000). No entanto, vale a pena ressaltar que as ações do IGF-I muitas vezes não são derivadas somente após o estímulo do GH por via hepática, e sim pelo próprio IGF-I exercendo funções autócrinas e/ou parácrinas sobre diversas células somáticas, como nas gônadas (CHANDRASHEKAR; ZACZEK; BARTKE, 2004).

Nas diferentes espécies, o GH e o IGF-I podem exercer ações como controle da liberação de GnRH pelo hipotálamo, liberação de gonadotrofinas pela pituitária, número de receptor para gonadotrofinas nas células da granulosa (CHANDRASHEKAR; ZACZEK; BARTKE, 2004).

O IGF-I promove a proliferação ou diferenciação das células da granulosa de acordo com o grau de desenvolvimento folicular (MONGET et al., 2002). Estes autores discutem que possivelmente existe uma capacidade intrínseca das células da granulosa em responder a estimulação pelo IGF-I e que esta capacidade deve sofrer alterações durante o desenvolvimento do folículo. Em bovinos o IGF-I tem a função de aumentar a sensibilidade de folículos antrais pequenos (5mm) à gonadotrofinas, principalmente na transição do estágio de independência para dependência gonadotrófica.

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

A expressão de IGF-I nas células da granulosa de bovinos ainda é controversa (HUNTER et al., 2004). Em ovinos e bovinos a expressão ovariana de IGF-I parece não apresentar níveis significantes (MONGET et al., 2002). Alguns trabalhos demonstram a presença ou não de expressão IGF-I nas células da granulosa de folículos antrais, bem como nos folículos pré-antrais de ovinos e bovinos (LEEUEWENBURG et al., 1996; SPICER; ECHTERNKAMP, 1995; SCHAMS et al., 2002; YUAN et al., 1998). A expressão do ligante para IGF-I parece ser restrita as células do compartimento somático (células da Teca e da Granulosa) do folículo, sugerindo que o IGF-I atue de maneira autócrina e parácrina sobre o complexo-cúmulus-oócito (NUTTINCK et al., 2004).

A expressão do receptor do tipo I aumenta de acordo com o desenvolvimento de folículo primário a folículos antrais gonadotrófico-dependentes (WANDJI

PELLETIER; SIRARD, 1992). Este aumento na expressão do receptor do Tipo I coincide com o aumento da expressão de receptores para FSH e LH dos folículos (MONGET et al., 2002).

4.3 SOMATROFINA BOVINA RECOMBINANTE (BST)

A somatotropina bovina recombinante utilizada para aumentar a produção de leite com a aplicação de 500mg de bST em intervalo de 14 dias tem aumentado a produção de leite ao redor de 3 a 5 kg/ dia (BAUMAN et al., 1992; HARTNELL et al., 1991). O uso do bST para fins produtivos também já foi relatado em outras espécies como a ovina (FERNANDES et al. 1995), a caprina (GALO et al. 1997), bem como a bubalina (POLIDORI et al., 1997).

A administração exógena de bST aumenta a síntese hepática de IGF-I e conseqüentemente suas concentrações plasmáticas (GONG et al, 1991; MCGUIRE et al., 1992). As mudanças nas concentrações sanguíneas das IGFBPs podem modificar as ações do IGF-I, através do aumento ou da diminuição de sua disponibilidade no sangue ou nos tecidos (CLEMMONS, 1998). Além disso, o aumento da síntese e secreção do IGF-I aumenta a atividade de diversas rotas metabólicas, tais como a gliconeogênese e a lipólise (ETHERTON; BAUMAN, 1998).

Na reprodução de bovinos, o tratamento com bST tem aumentado a fertilidade de vacas de leite de alta produção submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (MOREIRA et al., 2000; MOREIRA et al., 2001; SANTOS et al., 2004), bem como em vacas consideradas como sub-férteis (MORALES-ROURA et al.,

2001) e também aumentado a eficiência de programas de transferência de embriões (MOREIRA et al., 2002a). Estes efeitos são atribuídos principalmente aos efeitos positivos do GH e do IGF-I na fertilização e no desenvolvimento embrionário (MOREIRA et al., 2002a, 2002b). O tratamento com bST em vacas altera o desenvolvimento folicular (KIRBY et al., 1997; LUCY et al., 1994), bem como a atividade luteal (LUCY et al., 1994).

Em fêmeas bubalinas o tratamento com bST foi associado a programas de superovulação e transferência de embriões (BARUSELLI et al., 2003). Os autores observaram efeito da administração de bST no número de folículos recrutados ($15,6 \pm 3,7$ vs. $12,4 \pm 3,6$), na taxa de ovulação (55,0 vs. 38,2%), bem como no número de estruturas recuperadas ($5,1 \pm 6,8$ vs. $1,6 \pm 1,7$) em relação ao grupo Controle, respectivamente.

No entanto, vale a pena ressaltar a existência de relatos sobre uma possível superstimulação de IGF-I levando a efeitos deletérios na reprodução de bovinos (ARMISTRONG et al., 2001; 2002; BILBY et al., 2004; MCCAFFERY et al., 2000). Novilhas e vacas com nutrição adequada apresentam normalmente elevados níveis plasmáticos de IGF-I, entretanto vacas com deficiência nutricional apresentam reduzidas concentrações de IGF-I. Esta mesma associação pode ser realizada entre vacas lactantes e não lactantes, na qual as vacas não lactantes apresentam níveis superiores de IGF-I em relação às lactantes (BILBY et al., 1999; DE LA SOTA et al., 1993). Bilby et al. (2004) citam que possivelmente existe um patamar no qual o GH e o IGF-I estimulam a performance reprodutiva, e quando este é ultrapassado podem-se reduzir as respostas reprodutivas. A superestimulação com IGF-I (ARMSTRONG et al., 2001) e também com insulina (ARMSTRONG et al., 2003) provoca efeitos deletérios ao desenvolvimento folicular e oocitário de bovinos. O

excesso de IGF-I *in vivo* ou *in vitro* prejudica o desenvolvimento de embriões de ratas (KATAGIRI et al., 1996, 1997).

4.3.1 bST e a população folicular

Inúmeros trabalhos tem demonstrado os efeitos do tratamento com bST alterando a população folicular (GONG, 2002). Este efeito foi estudado em bovinos taurinos (DE LA SOTA et al 1993; GONG; BRAMLEY; WEBB,1993; GONG et al., 1991, LUCY et al., 1993; ROTH et al., 2002), em zebuínos (BURATINI et al., 2000; CARTER et al., 1998), como também em ovinos (JOYCE et al., 2000) e bubalinos (BARUSELLI et al., 2003).

Buratini et al. (2000) relataram que o tratamento com 320mg de bST em novilhas *Bos taurus indicus* aumentou a concentração plasmática de IGF-I ($P<0.001$), resultando em um aumento de 36% do número de folículos pequenos ($<5\text{mm}$; $P<0.001$) quando comparado a novilhas tratadas com solução fisiológica. Joyce et al. (2000) observaram aumento no número de folículos pequenos ($>2\text{mm}$) e uma redução no número de folículos de médios (>0.25 a $< 0.5\text{mm}$) em ovelhas tratadas com bST. Lucy et al. (1993) relataram aumento na população de folículos de 3 a 9 mm ($p<0.04$) quando comparados a vacas tratadas com solução fisiológica.

Em fêmeas bubalinas o bST aumentou ao redor de 20% ($15,6\pm3,7$ Grupo bST vs. $12,4\pm3,6$ Grupo Controle) no número de folículos $>3\text{mm}$ recrutados após o tratamento com benzoato de estradiol e dispositivo intravaginal de progesterona em programas de superovulação e transferência de embriões (BARUSELLI et al., 2003).

As mudanças na população de folículos médios (6-9mm) após o tratamento com bST são descritas de diferentes maneiras na literatura. Alguns estudos demonstraram aumento no número de folículos médios (DE LA SOTA et al., 1993; BILBY et al., 2004; KIRBY et al., 1997; LUCY et al., 1993) enquanto outros autores não observaram esta alteração (GONG et al., 1991, 1997; GONG, BRAMLEY, WEBB, 1993). Estes resultados demonstram que a resposta do bST pode ser alterada em virtude das condições nutricionais, bem como associado à lactação (GONG, 2002).

Os efeitos do tratamento com bST no aumento da população folicular ocorre ao redor de 3 dias após a sua administração e está relacionado com o aumento dos níveis circulantes de GH, IGF-I e insulina (GONG, 2002).

Diversos estudos foram conduzidos para avaliar a importância relativa do GH, IGF-I ou da insulina no aumento do número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular (BURATINI et al., 2000; GONG; BRAMLEY; WEBB, 1993; GONG et al., 1997; LUCY et al., 1993).

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

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

Lucy et al. (1993) observaram baixa expressão de receptor para somatotrofina em folículos ovarianos em bovinos. Kirby et al. (1996) não encontraram alterações na expressão de RNAm codificadores de IGF-I, IGFBP-2 e IGFBP-3 no ovário, útero e oviduto de bovinos após o tratamento com bST.

Estes estudos reforçam a hipótese de que o incremento na população folicular provavelmente não seja decorrente de efeitos diretos do bST no ovário e sim por alterações nas concentrações de IGF-I e/ou insulina.

4.3.2 bST em programas de aspiração folicular

A utilização do tratamento com bST em programas de aspiração folicular ainda é controversa nos trabalhos descritos na literatura, porém sua utilização tem demonstrado eficiência em aumentar o número de folículos disponíveis para serem aspirados (BOLS et al., 1998; TRIPP et al., 2000), bem como a qualidade dos oócitos recuperados (PAVLOK et al., 1996; ROTH et al., 2002).

Pavlok et al. (1996) testaram o efeito de uma única administração de bST no número de folículos e na qualidade de oócitos recuperados após o abate dos animais 3 dias após o tratamento com bST. Os autores observaram que apesar do tratamento com bST 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 bST durante um longo período em programas de aspiração folicular em novilhas de leite (*Bos taurus*). As novilhas (n=14) foram tratadas semanalmente com 640 mg de bST (SC) e submetidas à aspiração folicular duas vezes por semana, durante dez semanas. Os autores observaram aumento no número de folículos disponíveis para aspiração no grupo tratado com bST em relação ao grupo controle. No entanto o número médio de oócitos recuperados foi semelhante entre o grupo tratado (6,4 oócitos) e o grupo controle (6,0 oócitos). Os autores sugerem que possíveis alterações morfológicas nas células do *cumulus* induzidas pelo bST podem ter levado à dificuldade na remoção dos oócitos do interior dos folículos no momento da aspiração.

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

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Campus da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista de Jaboticabal (UNESP-Jaboticabal), localizada no município de Jaboticabal – SP.

Foram utilizadas 10 novilhas *Bubalus bubalis* com idade entre 20 e 30 meses e peso corporal médio de $418,1 \pm 35,2$ Kg. As fêmeas foram previamente submetidas a exame com aparelho ultra-sonográfico e selecionadas de acordo com a presença de corpo lúteo, diâmetro médio de ambos os ovários (≥ 2 cm) e número de folículos (≥ 8 por ovário). Todos os animais foram suplementados com mistura mineral e água *ad libitum*.

5.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi delineado de forma inteiramente ao acaso, sendo os animais subdivididos homogeneamente em dois grupos experimentais (controle e tratamento) homogeneamente de acordo com peso, diâmetro médio dos ovários e pelo número de folículos. Desta maneira somente se esperava efeito de indivíduo e de tratamento sobre as variáveis dependentes. Os animais de ambos os grupos foram submetidos a dez sessões de aspiração sucessivas em intervalos regulares de 3 e 4 dias (2 vezes por semana; Figura 1).

Figura 1- Diagrama experimental do uso de bST em fêmeas bubalinas submetidas a aspiração folicular duas vezes por semana

5.3 TRATAMENTO

O grupo bST foi tratado com 500mg de bST¹ subcutâneo na região da fossa pararectal a cada 14 dias, sendo que especialmente na entre a primeira e a segunda administração utilizou-se intervalo de 12 dias. A primeira aplicação realizada 5 dias antes da primeira sessão de aspiração folicular. O grupo Controle (G-Cont) não recebeu tratamento adicional.

Os animais foram submetidos à ablação folicular guiada por ultra-som de todos os folículos $\geq 4\text{mm}$, cinco dias antes da primeira sessão de aspiração.

5.4 AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO FOLICULAR

Em cada sessão de aspiração os ovários foram examinados de modo a quantificar o número total de folículos presentes bem como classificá-los de acordo com seu tamanho. Os folículos foram classificados em 3 categorias de acordo com o diâmetro folicular : Pequeno ($<5\text{mm}$), Médio (entre 5 a 10mm) e Grande ($>10\text{mm}$).

¹ Lactotropin®- Elanco Saude Animal, Monsanto Europe S.A., Bruxelas Bélgica.

5.5 ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Ao redor de 30 minutos antes da aspiração folicular os animais foram tranqüilizados com 0,6 ml de acepromazina 1%², posteriormente, no momento da aspiração folicular, os animais receberam 0,8 ml de Xilazina a 2%³ e anestesia epidural sacro-coccígea utilizando 2ml de lidocaina a 2%⁴.

Primeiramente a cada procedimento foi realizada a remoção das fezes do reto do animal, limpeza da região perineal com água e álcool e posterior secagem da região com papel toalha. Posteriormente foi realizada a tricotomia e desinfecção com álcool da região da anestesia epidural (entre última vértebra coccígea e primeira caudal).

Para a aspiração folicular utilizou-se um aparelho portátil de ultra-som⁵ equipado com um transdutor endocavitário micro-convexo de 7,5 MHz e uma guia de punção folicular, conectada a agulha descartável de 19g (40 mm x 10 mm)⁶. Para a conexão entre a agulha e o recipiente coletor dos oócitos (tubo cônico de 50ml) foi utilizado um circuito de teflon de 2mm de diâmetro interno e 80 cm de comprimento. A aspiração foi realizada com auxílio de uma bomba a vácuo⁷ portátil calibrada com pressão negativa de 60-65 mmHg (12-15ml d'água/ min). O meio de aspiração utilizado foi composto de Solução Salina Fosfatada (PBS), acrescido de heparina sódica⁸ (5000 UI / L) e mantido a 37 °C de temperatura.

² Acepran® - Acepromazina 1%, UNIVET, Brasil

³ Dopaser® - Calier, São Paulo Brasil

⁴ Lidovet® - Lidocaina 2% com vasoconstritor, Abravet, Brasil

⁵ 100 Falcon, Pie-Medical, Holand

⁶ BD Precision Glide®, Curitiba, Brasil

⁷ Rocket Medical, Inglaterra

⁸ Lique mine, Roche, Brazil

No momento da aspiração folicular, os folículos aspirados eram quantificados, sendo este número posteriormente utilizado para calcular a taxa de recuperação (número de oócitos recuperados pelo número de folículos aspirados).

5.6 PROCURA E SELEÇÃO DOS OÓCITOS

Após o término de cada sessão de aspiração folicular, o conteúdo aspirado foi levado até o laboratório, onde foi transferido para um filtro de colheita de embriões⁹ e lavado com o mesmo meio da aspiração até se obter um líquido límpido. O sedimento restante foi depositado em placas de Petri para realização da procura, classificação e seleção dos complexos *cumulus-oóphorus* (CCOs) sob esteriomicroscópio.

Foram utilizados como critérios de avaliação dos CCOs a presença, o número de camadas e o grau de expansão das células do *cumulus*, assim como o aspecto do citoplasma quanto à cor, homogeneidade e integridade. Foram definidas cinco categorias (A, B, C, D, E), conforme descrito por De Loos et al., (1989). Os oócitos classificados como A, B, C e D foram considerados aptos ao cultivo *in vitro* (oócitos cultivados), enquanto somente os classificados em A, B, C foram considerados como de boa qualidade.

⁹ EmCom®- Nutricell, Campinas, Brazil

5.7 PRODUÇÃO *IN VITRO*

Após a seleção, os CCOs foram lavados por no mínimo 4 vezes em meio TCM-199 acrescido de HEPES, 10% de soro fetal bovino (SFB) e submetidos à maturação, fecundação e cultivo *in vitro* durante sete dias.

5.7.1 Maturação *in vitro*

Os oócitos obtidos foram maturados *in vitro* (MIV) em grupos de 20-25 em gotas de 100µL de meio TCM-199 suplementado com 10% de SFB, 1µg/ml FSH (FolltropinTM, Bioniche Animal Health, Belleville, Ont., Canadá), 50µg/ml hCG (ProfasiTM, Serono, São Paulo, Brasil), estradiol (1µg/ml), 0.20mM de piruvato de sódio e 83.4µg/ml de amicacina por 24h sob óleo mineral, em temperatura 38,5°C, atmosfera de 5% CO₂ e umidade saturada. Os meios foram ajustados especificamente para a espécie bubalina, sendo o meio de maturação suplementado ainda com 50µM de cisteamina e 0,3mM de cistina (GASPARRINI et al., 2006). A adição de cistina ao meio requer um pré-aquecimento do meio para auxiliar na dissolução do sal.

5.7.2 Fecundação *in vitro*

Após 24h de MIV, foi realizada a fertilização *in vitro* (FIV) utilizando sêmen descongelado de um único touro por todo o experimento. Os espermatozoides foram previamente selecionados através de gradientes de percoll e ajustado para a concentração de 25×10^6 spz/mL, em gotas de 100 μ L TALP sob óleo mineral.

O meio de fecundação (TALP-FERT) foi preparado com meio TALP suplementado com 10 μ g de heparina e 160 μ g de PHE, segundo BAVISTER (1995). A FIV foi realizada pelo co-cultivo dos oócitos maturados com espermatozoides previamente selecionados, durante 16-18 horas.

5.7.3 Cultivo *in vitro*

Após o período de fecundação os prováveis zigotos foram lavados pelo menos quatro vezes em meio TCM-HEPES. Posteriormente foram submetidos à agitação mecânica com auxílio de uma micropipeta para a retirada das células do *cumulus oophorus*. Em seguida, grupos de 20 a 25 por gota, foram lavados e distribuídos em gotas de 50 μ L de meio de cultivo SOFaaci contendo aminoácidos essenciais e não-essenciais, citrato e mio-inositol e adicionado de macromoléculas sintéticas, fatores de crescimento e 2,5% soro fetal bovino + 5 mg/mL albumina sérica bovina (BSA). O desenvolvimento embrionário foi realizado estufa a 38,5°C, com 5% CO₂ em ar e umidade saturada. No Dia 3, cada gota recebeu 50 μ L de meio novo ("feeding") perfazendo um total de 100 μ L de cultivo.

No momento do “feeding” (48 horas após a fecundação) foi avaliada a taxa de clivagem dos zigotos. No dia seis e sete foi avaliada a taxa de produção embrionária, sendo que os embriões produzidos foram vitrificados.

5.7.4 Vitrificação dos embriões produzidos *in vitro*

Os embriões produzidos foram vitrificados utilizando o procedimento de vitrificação de três etapas, segundo Gasparrini (2004)¹⁰. A solução base foi constituída de PBS, adicionado 0,3mM de piruvato sódico, 3,3mM de glicose e 20% de soro fetal bovino.

As três soluções de vitrificação (SV1; SV2 e SV3) foram constituídas de:

- SV1 = 1,4M de glycerol na solução base;
- SV2 = 1,4M de glycerol + 3,6M de etilenoglicol na solução base;
- SV3 = 3,4M de glicerol + 4,6M de etilenoglicol na solução base.

Com o objetivo de melhorar os índices após o descongelamento foi utilizado uma solução 4 (SV4) contendo 0,5M sacarose na solução base.

Para a vitrificação dos embriões, estes foram mantidos durante 5 minutos a temperatura ambiente na SV1. Posteriormente, foram mantidos 5 minutos na SV2 e em seguida 20 segundos na SV3. Os 20 segundos de permanência dos embriões na SV3 era realizado concomitantemente ao envasamento dos embriões em palhetas de 0,5ml. Após os 20 segundos na SV3 as palhetas eram expostas durante 1min em vapor de nitrogênio e em seguida imergido em nitrogênio líquido.

5.8 TRANSFERÊNCIA EM TEMPO FIXO DOS EMBRIÕES VITRIFICADOS

Os embriões vitrificados foram transferidos em tempo fixo em fêmeas bubalinas previamente sincronizadas. As fêmeas foram selecionadas por exame ultra-sonográfico, sendo que somente vacas pluríparas foram utilizadas. As fêmeas receberam no início do tratamento de sincronização (Dia 0) a aplicação de 100 µg de Gonadorelina¹¹, seguido da administração de PGF_{2α}¹² sete dias após e de uma segunda dose de Gonadorelina 48 horas após o tratamento com PGF_{2α}. Sete dias após a segunda aplicação de Gonadorelina os animais foram examinados por ultrasonografia para detecção do corpo lúteo (CL). Os animais que apresentavam corpo lúteo com >10mm foram considerados aptos a receberem um embrião (taxa de aproveitamento) através de inovulação transcervical de forma direta. Nesse momento, administrou-se outra dose de gonadorelina para a formação de CL acessório. Os embriões foram descongelados por da exposição ao ar por 12 segundos, seguido de 30 segundos em H₂O a 35 °C. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 dias após a inovulação e confirmados novamente aos 60, 90 e 120 dias após a transferência.

¹⁰ Informações fornecidas por Gasparrini, B. durante a realização do experimento em Jaboticabal-SP, Brasil.

5.9 COLHEITA DE SANGUE E DOSAGEM DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE IGF-I

Uma vez por semana, juntamente com a sessão de aspiração [-1(Ablação), 1, 3, 5, 7 e 9], foram colhidas amostras de sangue por punção da veia jugular, em tubos de vácuo de 5 ml contendo heparina. Após a colheita, as amostras permaneciam refrigeradas até o momento que fossem centrifugadas a 3000 rpm por 15 min a 4°C para separação do plasma. Este era retirado do tubo com o auxílio de pipeta, envasado em criotubo previamente identificado e armazenado a -20°C em freezer até o momento da realização da dosagem hormonal.

As dosagens de IGF-I plasmático foram realizadas por imune radiometric assay (IRMA)¹³ no laboratório de Endocrinologia da UNESP, Campus de Araçatuba, Araçatuba-SP.

Para a realização dos ensaios para quantificação de IGF-I foi utilizado o Kit IRMA ACTIVE™ DSL-5600, fornecido pela Gênese (São Paulo). As amostras foram analisadas em dois ensaios, os quais apresentaram coeficiente de variação interensaio de 1,01% e de coeficiente de variação intra-ensaio de 2,21%.

A validação biológica do ensaio foi realizada por paralelismo com diluição seriada utilizando como controle negativo plasma não extraído (com IGF-I ligado as IGFBPs) de vacas magras (controle negativo). O ensaio foi conduzido pela adição de:

A) 10µl de soro amostra + 40µl controle negativo;

B) 20µl de soro amostra + 30µl controle negativo;

¹³ Fertagyl, Intervet, Brasil.

C) 30 μ l de soro amostra + 20 μ l controle negativo;

D) 40 μ l de soro amostra + 10 μ l controle negativo;

E) 50 μ l de soro amostra com extração;

F) 50 μ de controle negativo sem extração;

Os resultados para as amostras A; B; C; D; E; F e G foram: 24,4; 163,4; 402,3; >640; >640 e <2,63 ng/ml, respectivamente. Observou-se correlação significativamente ($p < 0,05$) na curva de paralelismo ($CR = 0,97$ e $R^2 = 93,7$).

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

O nível de significância para rejeitar H_0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias para uma determinada

¹² Preloban, Intervet, Brasil.

¹³ IGF-I IRMA; DSL, Webster, Texas, USA.

variável resposta. Para nível de significância de 0,05 a 0,1 considerou-se tendência estatística entre as variáveis comparadas.

As variáveis independentes foram consideradas como sendo o tratamento e a sessão de aspiração. As variáveis dependentes foram o total de folículos, classe dos folículos (pequeno, médio e grande), número de oócitos recuperados (sobre os folículos aspirados), número de oócitos de boa qualidade (A+B+C) recuperados, taxa de clivagem e a taxa de produção embrionária.

As variáveis dependentes [número total de folículos e número de folículos aspirados] foram analisadas pelo PROC-MIXED considerando no modelo estatístico o efeito da doadora, tratamento, sessão de aspiração, bem como a interação entre tratamento X sessão de aspiração. Já para as variáveis dependentes [classe dos folículos (pequeno, médio e grande), número de oócitos recuperados (sobre os folículos aspirados), número de oócitos de boa qualidade (A+B+C) recuperados] efetuaram-se as análises pelo PROC-GLM, considerando no modelo o efeito de sessão e de tratamento e as médias comparadas por Kruskal-Wallis. A taxa de clivagem e a taxa de produção embrionária foram analisadas por One-way ANOVA utilizando o PROC-GLM e as médias comparadas pelo teste T' Student.

As variáveis dependentes [concentração plasmática de IGF-I e concentração relativa de IGF-I] foram analisadas pelo PROC-MIXED considerando no modelo estatístico o efeito da doadora, tratamento, sessão de aspiração, bem como a interação entre tratamento X sessão de aspiração. A transformação dos valores absolutos de IGF-I em valores relativos foi obtida considerando o valor médio do IGF-I absoluto na antes do tratamento com bST como 100%, sendo os outros uma proporção deste valor.

6 RESULTADOS

Observou-se efeito significativo de sessão de aspiração ($p<0,0001$) e de tratamento ($p=0,04$) na população folicular. Não foi observada interação entre tratamento e sessão na população folicular ($p=0,12$). O grupo tratado com bST aumentou o número de folículos observados ($12,2\pm0,86$ folículos) em relação ao grupo Controle ($8,7\pm0,86$ folículos). O efeito de tratamento variou conforme a sessão de aspiração, no qual somente nas sessões 1, 2, 4, 5 e 6 foi observado efeito de tratamento (Gráfico 1).

Gráfico 1- Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante (bST) no número de folículos observados em fêmeas bubalinas submetidas à aspiração folicular à intervalos regulares de 3 a 4 dias, Jaboticabal, 2004 (* = $p<0,05$)

A categoria dos folículos em cada sessão de aspiração foi influenciada pelo tratamento e pela sessão de aspiração ($p<0,05$). O número de folículos pequenos apresentou variação conforme a sessão de aspiração ($p=0,04$) e o tratamento ($p=0,0004$), no entanto não apresentou interação entre tratamento e sessão de aspiração ($p=0,18$). Os animais do grupo bST apresentaram maior número de

folículos pequenos $9,13 \pm 3,9$ folículos que os animais do grupo $6,45 \pm 2,7$. O número de folículos médios não apresentou efeito de sessão de aspiração ($p=0,83$), de tratamento ($p=0,35$) e nem da interação entre tratamento e sessão de aspiração ($p=0,16$). O número de folículos grandes também não apresentou efeito de sessão de aspiração ($p=0,48$), de tratamento ($p=0,29$) e também não apresentou interação entre tratamento e sessão de aspiração ($p=0,58$). Os dados podem ser observados na tabela 1 e gráfico 2.

O número de folículos aspirados variou de acordo com o tratamento ($p=0,0008$), bem como a sessão de aspiração ($p<0,0001$). Não foi observado efeito da interação entre sessão e tratamento no número de folículos aspirados ($p=0,45$). O número de oócitos recuperados apresentou influência da sessão de aspiração ($p=0,02$), apresentou tendência de efeito de tratamento ($p=0,07$) e também de interação entre tratamento e sessão ($p=0,10$). O número médio de oócitos recuperados entre as sessões de aspiração foi $5,2 \pm 0,51$ para o grupo tratado com bST e de $4,1 \pm 0,46$ para o grupo Controle ($p=0,07$). Somente a primeira sessão de aspiração o grupo bST apresentou maior ($p=0,006$) número de oócitos recuperados em relação ao grupo controle. Os dados podem ser observados na tabela 1.

A taxa de recuperação (número de CCOs recuperados / número de folículos aspirados) não apresentou efeito de sessão de aspiração ($p=0,71$), nem de tratamento ($p=0,54$) e também da interação entre tratamento e sessão ($p=0,28$). A taxa de recuperação média entre as sessões de aspiração foi $54,5 \pm 6,2$ % para o grupo tratado com bST e de $57,7 \pm 6,1$ % no grupo Controle. Os dados podem ser observados na tabela 1.

O número de oócitos recuperados de boa qualidade não apresentou efeito de sessão de aspiração ($p=0,28$), no entanto, o tratamento apresentou tendência de efeito ($p=0,10$). Foi observado efeito significativo da interação entre tratamento x sessão ($p=0,007$) sobre o número de oócito de boa qualidade. O grupo bST apresentou média de $3,93 \pm 0,61$ enquanto o grupo controle de $3,20 \pm 0,61$. Na sessão 1 ($p=0,005$), 5 ($p=0,08$) e 8 ($p=0,05$) o grupo bST apresentou um maior número de oócitos de boa qualidade ($6.8 \pm 1,03$) que o grupo controle ($4.8 \pm 1,03$). Nas sessões 2, 3, 4, 6, 7 e 9 não foi observado efeito de tratamento sobre o número de oócitos de boa qualidade. No entanto, na sessão 10 o grupo Controle apresentou maior número de oócitos de boa qualidade em relação ao grupo tratado com bST.

Considerando a porcentagem de oócitos de boa qualidade não foi observado efeito de tratamento ($p=0,21$), sessão de aspiração ($p=0,32$), bem como não foi observada interação entre sessão e tratamento ($p=0,71$; Gráfico 3).

Somente as 5 primeiras rotinas apresentaram produção embrionária, sendo os resultados das ultimas 5 rotinas desconsideradas para a análise. Não foi observado efeito de tratamento no número de oócitos cultivados ($p=0,31$), na taxa de clivagem ($p=0,80$), bem como na taxa de produção embrionária ($p=0,38$). Os resultados da produção embrionária podem ser observados na tabela 1.

Tabela 1– Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante (bST) na eficiência da técnica de aspiração folicular e produção in vitro de oócitos obtidos em fêmeas bubalinas submetidas à aspiração folicular à intervalos regulares de 3 a 4 dias, Jaboticabal, 2004

Parâmetro	bST	Controle	Valores de P		
			Trat.	Sessão	Trat. X Sessão
População Folicular	12,2 ± 0,06	8,7 ± 0,04	0,04	<0,0001	0,12
N. Folículos Grandes (≥ 10mm)	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,29	0,48	0,58
N. Folículos Médios (5 e 10mm)	1,6 ± 0,2	1,9 ± 0,2	0,35	0,83	0,16
N. Folículos Pequenos (≤ 5 mm)	9,1 ± 0,6	6,5 ± 0,4	0,0004	0,04	0,18
N. Folículos Aspirados	9,1 ± 0,6	6,8 ± 0,3	0,07	<0,0001	0,45
N. Oócitos Recuperados	5,2 ± 0,5	4,1 ± 0,5	0,07	0,02	0,10
Taxa de Recuperação (%)	54,5 ± 3,9	57,7 ± 4,9	0,54	0,71	0,28
N. Oócitos Boa Qualidade	3,93±0,61	3,20±0,61	0,10	0,28	0,007
N. Oócitos Cultivados*	31,4 ± 5,2	23,0 ± 2,0	0,31	-----	-----
Taxa de Clivagem (%)*	46,2 ± 8,1	41,7 ± 7,1	0,80	-----	-----
Taxa de Produção Embrionária (%)*	19,7 ± 4,3	26,0 ± 2,7	0,38	-----	-----

*Somente dados das primeiras 5 sessões

Gráfico 2- Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante (bST) no número de folículos pequenos, médios e grandes em fêmeas bubalinas submetidas à aspiração folicular à intervalos regulares de 3 a 4 dias, Jaboticabal, 2004 (* = $p < 0,05$)

Gráfico 3- Efeito do tratamento com somatotrofina bovina recombinante (bST) na porcentagem de oócitos de boa qualidade e distribuição da categoria das estruturas recuperadas em fêmeas bubalinas submetidas à aspiração folicular à intervalos regulares de 3 a 4 dias, Jaboticabal, 2004

As concentrações plasmáticas de IGF-I apresentaram efeito de sessão ($p=0,0014$) e de interação entre sessão e tratamento ($p=0,01$), no entanto não apresentaram efeito de tratamento ($p=0,20$). A média geral do grupo tratado com bST foi de $404,1 \pm 50,1 \text{ ng/ml}$ e do grupo controle de $538,0 \pm 50,11 \text{ ng/ml}$. Antes da aplicação do primeiro bST o grupo bST apresentou menor ($p=0,007$) concentração de IGF-I ($191,88 \pm 50,781 \text{ ng/ml}$) do que o grupo controle ($552,74 \pm 60,841 \text{ ng/ml}$). Entretanto, agrupando-se os dados de forma considerar os valores relativos obtidos antes do primeiro tratamento com bST, observa-se efeito de sessão ($p=0,005$), de tratamento ($p<0,0001$), bem como da interação entre sessão e tratamento ($p<0,0001$; Gráfico 4).

Gráfico 4- Efeito do tratamento com somatotropina bovina recombinante (bST) na concentração relativa de IGF-I (ng/ml) referente a concentração plasmática de IGF-I observada antes do primeiro tratamento com bST em fêmeas bubalinas submetidas a aspiração folicular em intervalos regulares a cada 3 a 4 dias, Jaboticabal, 2004 (* = $p<0,05$)

A taxa de aproveitamento após sincronização para transferência de embriões em tempo fixo foi de 76% (19/25). A taxa de concepção e a taxa de prenhez foram de 10,53 % (2/19) e de 8 % (2/25), respectivamente. Ambas as gestações chegaram a termo, produzindo bezerros normais (1 macho e 1 fêmea), com ambos peso vivo de 27 Kg (figura 2).

Figura 2. Bezerros nascidos de embriões bubalinos produzidos *in vitro* e vitrificados

7 DISCUSSÃO

No presente estudo o tratamento com somatotrofina bovina foi eficiente para aumentar o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular, demonstrando potencial para aumentar a eficiência da técnica de aspiração folicular, bem como, a resposta ovariana a tratamentos superestimulatórios utilizando gonadotrofinas na espécie bubalina.

O bST aumentou o número de folículos observados durante as sessões de aspiração. Este efeito positivo do tratamento com bST está de acordo com o descrito para *Bos taurus* (CRYSTAL et al., 1997; DE LA SOTA et al., 1993; GONG et al., 1991; 1993; ROTH et al., 2002), para *Bos indicus* (BURATINI et al., 2000), bem como para a espécie bubalina (BARUSELLI et al., 2002). Observou-se no presente estudo aumento ao redor de 28% no número de folículos no momento da aspiração folicular. Este incremento na população folicular é semelhante ao descrito por Baruselli et al. (2002) que observaram aumento de 20% no número de folículos recrutados após a sincronização da onda de crescimento folicular com benzoato de estradiol e progesterona em fêmeas bubalinas (15,6 bST vs. 12,4 Controle). Em fêmeas bovinas, Buratini et al. (2000) observaram aumento de 36,5% no número de folículos <5mm em novilhas *Bos indicus* e, em vacas *Bos taurus*, Crystal et al. (1997) descrevem aumento de 27%. No entanto, o incremento verificado no presente estudo é inferior ao observado em bovinos por Gong et al. (1991), que relatam aumento de 55% no número de folículos totais. De La Sota et al. (1993) também

observaram aumento de 53% no número de folículos entre 2 e 9mm em vacas *Bos taurus* lactantes.

O incremento na população folicular observado no presente estudo foi decorrente do aumento do número de folículos pequenos (<5mm), o que concorda com outros relatos em taurinos (GONG et al., 1991, 1993, 1997) e em zebuínos (BURATINI et al., 2000). No entanto, discorda do observado em fêmeas *Bos taurus* lactantes, que apresentaram alteração do número de folículos pequenos e médios (CRYSTAL et al., 1997; DE LA SOTA et al., 1993; KIRBY ET AL., 1997; LUCY et al., 1993), uma vez que no presente experimento não se verificou efeito do tratamento com bST na quantidade de folículos médios e grandes. Adicionalmente, em outro estudo, observou-se incremento do número de folículos médios após o tratamento com bST somente quando as fêmeas foram suplementadas com caroço de algodão (KASSA et al., 2002). Estes resultados demonstram que o efeito do bST na população folicular sofre alterações de acordo com a espécie, a raça, a dieta, bem como o estado metabólico associado à lactação.

Todavia, no presente estudo, vale a pena ressaltar que devido à falta de um delineamento experimental específico para se comprovar a ausência de efeito do tratamento com bST na população de folículos médios e grandes, deve-se ter cautela em tal afirmação. Principalmente devido ao fato de que os animais do atual estudo foram submetidos à aspiração de todos os folículos >3mm em ambos os ovários com elevada frequência (2 vezes por semana), o que poderia impedir o desenvolvimento de folículos médios e, especialmente, os folículos grandes.

Os mecanismos pelos quais o tratamento com bST promove aumento na população folicular ainda não são totalmente esclarecidos na literatura. Estudos discutem sobre efeitos diretos do hormônio do crescimento (GH) no oócito ou nas

células da granulosa, aumentando a esteroidogênese (HULL & HARVEY, 2001; LUCY, 2000). Outros autores sugerem que o efeito é decorrente de alterações nos níveis plasmáticos ou ovarianos de IGF-I e/ou insulina (GONG et al., 1993, 1994; BURATINI et al., 2000; GONG, 2002).

O GH apresenta receptores localizados nos tecidos ovarianos, principalmente no corpo lúteo (LUCY et al., 1993b). Os mesmos autores observaram baixa expressão do receptor para GH em folículos de bovinos. Por outro lado, a utilização de métodos mais sensíveis (PCR; IZADYAR et al., 1997) detectaram síntese de RNAm do receptor para GH nas células da granulosa, nas células do *cumulus* e nos oócitos. Kole et al., (1998) também detectaram RNAm para receptor de GH no oócito e nas células da granulosa. Apesar destes achados, Gong (2002) descrevem ausência de efeito da suplementação com GH durante o cultivo *in vitro* de células da granulosa, tanto obtidas de folículos pequenos e médios, quanto de folículos grandes.

Outro possível mecanismo de ação a ser considerado seria a própria resposta ovariana ao aumento das concentrações de bST, promovendo maior síntese intra-ovariana de IGF-I. Entretanto, este mecanismo em fêmeas bovinas ainda apresenta controvérsia na literatura (LUCY, 2000). Existem trabalhos que falharam em identificar a síntese da proteína de IGF-I nas células da granulosa de bovinos (GUTIERREZ et al., 1997). Já, outros autores observaram razoável expressão de IGF-II nas células da teca (PEKS et al., 1999). Além disso, a imunização de novilhas bovinas com agonista liberador de GH diminuiu a concentração plasmática do hormônio e de IGF-I. Entretanto falhou em diminuir a síntese de RNAm de IGF-I ovariano (COHICK et al., 1996).

Todavia, as evidências apontam para o IGF-I, ou de origem sistêmica (via aumento de sua síntese hepática), ou autócrina (pela maior produção no próprio ovário, derivado das células luteínicas), como sendo o mediador do aumento do número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular em fêmeas tratadas com bST (LUCY, 2000). Nas células da granulosa cultivadas com a adição de IGF-I e/ou insulina, verificou-se que o IGF-I exacerba os efeitos do FSH e do LH, apresentando efeito significativo na atividade mitogênica e na esteroidogênese, de maneira dose-dependente (GONG et al., 1993, 1994; GUTIERREZ et al., 1997; SPICER; CHAMBERLAIN; MACIEL, 2002; SPICER et al., 1993). Estes efeitos positivos são decorrentes, principalmente, do aumento do número ou da atividade dos receptores para gonadotrofinas nestas células foliculares (LUCY, 2000).

Portanto, considerando as diversas alterações promovidas pelo IGF-I e o reduzido número de informações sobre as ações diretas do GH, acredita-se que o aumento do número de folículos recrutados após o tratamento com bST seja decorrente das elevações nos níveis plasmáticos de IGF-I.

No presente estudo, a concentração plasmática de IGF-I nas fêmeas tratadas com bST aumentou 2,5 vezes em relação à concentração inicial (antes do tratamento), enquanto a concentração do grupo controle permaneceu constante durante todo o experimento (Gráfico 4).

Todavia, as concentrações absolutas de IGF-I mensuradas antes do início do tratamento com somatotropina no grupo bST ($191,88 \pm 50,781 \text{ ng/ml}$) foi menor ($p=0,007$) que as concentrações no grupo controle ($552,74 \pm 60,841 \text{ ng/ml}$). Estes resultados não eram esperados, sendo de difícil interpretação. No entanto, devido aos efeitos biológicos do bST no número de folículos totais, no número de folículos aspirados e no número de oócitos recuperados acredita-se que, possivelmente,

estas alterações sejam decorrentes de aumento nas concentrações plasmáticas de IGF-I.

Todavia, ainda é importante enfatizar que os efeitos do tratamento com bST na população folicular e na concentração plasmática de IGF-I em fêmeas bubalinas submetidas a sucessivas sessões de aspiração folicular, não são totalmente conclusivos e que posteriores estudos deverão ser delineados na tentativa de se reavaliar e confirmar tais efeitos.

Nos trabalhos da literatura os autores são categóricos em concluir que o tratamento com bST promove elevações dos níveis plasmáticos de GH e IGF-I em fêmeas bovinas (BOLS et al., 1998; BURATINI et al., 2000; DE LA SOTA et al., 1993; GONG et al., 1991; 1993; 1997; GONG, 2002; KIRBY et al., 1997; LUCY et al., 1993; TRIPP et al., 2000). No entanto, no presente estudo não se verificou aumento do valor absoluto dos níveis plasmáticos de IGF-I. Dois possíveis aspectos poderiam ser levantados na tentativa de explicar este resultado: 1) o número de animais utilizados foi insuficiente, o que poderia ter ocasionado agrupamento de animais que apresentavam naturalmente elevadas concentrações de IGF-I plasmáticas no grupo controle; ou 2) o ensaio utilizado não foi eficiente ou mesmo ocorreram erros na mensuração associados, principalmente, ao uso de Kit comercial humano para a mensuração de plasma de fêmeas bubalinas.

No presente estudo, o tratamento com bST aumentou o número de folículos disponíveis para aspiração folicular. Este resultado concorda com os experimentos que empregaram fêmeas taurinas de leite (BOLS et al., 1998) e de corte (TRIPP et al., 2000). Bols et al., (1998) observaram aumento ao redor de 20-25% no número de folículos disponíveis para aspiração no grupo tratado com bST em relação ao grupo controle. Tripp et al. (2000) verificaram aumento ao redor de 30% no número

de folículos nos animais que receberam bST. No entanto, os resultados deste experimento discordam com os descritos por Pavlok et al. (1996) que não observaram aumento no número de folículos 3 dias após uma única administração de bST. Esta discordância de resultados pode ser decorrente do reduzido intervalo entre a administração da somatotrofina e a quantificação do número de folículos, que no trabalho de Pavlok et al. (1996) foi de 3 dias. Gong (2002) discutem que o tratamento com bST promove aumento do número de folículos a partir de 3 dias da sua administração.

Em estudo recente avaliou-se o efeito do tratamento ou não com bST em vacas bubalinas lactantes submetidas à aspiração folicular a cada 7 ou 14 dias (FERRAZ, 2006)¹. O autor observou aumento de 21% ($p < 0,001$) no número de folículos aspirados em fêmeas tratadas com bST (15,3 folículos) em relação às não tratadas (12,1 folículos). Estes resultados concordam com os observados no atual estudo e confirmam o efeito positivo do tratamento com bST no número de folículos disponíveis para aspiração em fêmeas bubalinas.

Também foi observado no presente estudo efeito significativo da sessão de aspiração no número de folículos disponíveis. Observou-se redução ao redor de 27% no número de folículos disponíveis para a aspiração nas cinco últimas sessões em relação às primeiras cinco. Este pode ser decorrente do reduzido intervalo entre aspirações (2 vezes por semana), reduzindo o período para a regeneração das lesões decorrentes das sessões anteriores, levando a formação de coágulos e/ou fibrose e prejudicando o recrutamento folicular. Este resultado discorda dos relatados por Boni, Roviello e Zicarelli (1996) em fêmeas Mediterrâneas. Discorda também de outros autores que não observaram diferenças na população folicular de em fêmeas bovinas submetidas à aspiração folicular com a mesma frequência

(BROADBENDT et al., 1997; GIBBONS et al., 1994; GOODHAND et al., 1999; GARCIA; SALAHEDDINE 1998; VIANA et al., 2004). Esta contradição entre os resultados pode ser decorrente de: 1) peculiaridades na fisiologia ovariana da espécie bubalina criadas em condições tropicais, 2) resposta diferenciada aos mediadores inflamatórios e/ou cicatriciais decorrentes das aspirações anteriores, 3) possível efeito da eficiência e/ou cautela do operador em não perfurar a porção medular vascularizada dos ovários durante os procedimentos, promovendo graus variados de lesões e, conseqüentemente, aumentando o risco de hemorragias ou fibroses após as sessões de aspiração folicular.

Viana (2002) sugere que o risco de lesões ovarianas decorrentes da técnica de aspiração folicular é proporcional ao número de sessões ao qual as doadoras são submetidas e ao número de estruturas recuperadas por sessão. Este autor cita ainda, que o maior número de movimentos de perfuração com a agulha podem levar a maior risco de lesões nos ovário. Vale a pena ressaltar que, no presente estudo, foram utilizados somente animais que apresentavam elevado número de folículos ovarianos (> 16 folículos por fêmea), superior ao descrito na literatura para a espécie bubalina (BARUSELLI et al., 1997; GUPTA et al., 2006; MANIK et al., 2002; OHASHI et al., 2002). Esta característica específica dos animais utilizados pode ter determinado maiores riscos de lesões ovarianas, devido ao maior número de perfurações exigidas para realizar os procedimentos, especialmente na espécie bubalina.

Ainda, Ferraz (2006)¹ observou aumento do número de folículos aspirados em búfalas lactantes submetidas à aspiração folicular a cada 14 dias (15,6 folículos) do que a cada 7 dias (12,8). Este resultado demonstra que o aumento no intervalo entre

¹ Ferraz, M. L. experimento em fase de elaboração. Tese Mestrado, VRA, FMVZ, USP, 2006.

aspirações pode provocar menores danos no ovário aumentando o número de folículos disponíveis para aspiração.

O número de oócitos recuperados apresentou tendência de aumento nos animais tratados com bST (21%; $p=0,07$). Estes resultados discordam dos observados em fêmeas bovinas (BOLS et al., 1998; TRIPP et al., 2000), nos quais não se verificou aumento do número de oócitos recuperados após o tratamento com bST. No entanto, concorda com aqueles observados por Ferraz (2006)¹ que observaram incremento do número de oócitos recuperados quando da utilização de bST (12,5%; $p=0,07$).

O número de oócitos recuperados no presente estudo é superior ao verificado em alguns trabalhos descritos na literatura em fêmeas bubalinas (BONI; ROVIELO; ZICARELLI, 1996; GUPTA et al., 2006; ZICARELLI 2003). Entretanto, o resultado é semelhante (BONI et al., 1997; NEGLIA et al., 2003; PAVASUTHIPAISIT et al., 1995; TECHAKUMPHU et al., 2004) ou inferior a outras citações (FERRAZ, 2006; OHASHI et al., 2002). Estas variações nos resultados, possivelmente são decorrentes de fatores como raça, variação individual (BONI et al., 1997), ciclicidade (BONI et al., 1994), estado nutricional, idade, presença de corpo lúteo e idade reprodutiva (KAMONPATANA; CHUANGSOONGNEON, 1994; PAVASUTHIPAISIT et al., 1995), qualidade da imagem do aparelho de ultra-som (HASHIMOTO et al., 1999; OHASHI et al., 2002), intervalo entre aspirações (GARCIA; SALAHEDDINE, 1998; VIANA et al., 2004), estímulo hormonal prévio (BONI et al., 1994; TRIPP et al., 2000), pressão de vácuo (BOLS et al., 1996, 1997; WARD et al., 2000), bem como de acordo com a equipe que realiza os procedimentos (MERTON et al., 2003).

O número de oócitos recuperados variou conforme a sessão de aspiração ($p=0,02$). Este efeito é, provavelmente, decorrente da variação do número de

folículos disponíveis para aspiração de acordo com a sessão, como descrito anteriormente. Estes resultados não estão em conformidade ao verificado por outros autores na espécie bubalina (BONI; ROVIELO; ZICARELLI, 1996), e na espécie bovina (BROADBENDT et al., 1997; GARCIA; SALAHEDDINE 1998; GIBBONS et al., 1994; GOODHAND et al., 1999; VIANA et al., 2004), nas quais não se observou redução do número de oócitos recuperados após sucessivas sessões de aspiração.

Viana (2002) discorre sobre o aumento de 28,6% (2/7) para 77,8% (7/9) na incidência de algum grau de aderência ou fibrose nos ovários de animais submetidos a mais de 20 sessões de aspiração. A incidência destas alterações está, segundo este autor, correlacionada com a capacidade do indivíduo de se recuperar das lesões. Vale a pena ressaltar que os animais do atual estudo apresentaram queda significativa do número de oócitos recuperados a partir da sexta sessão de aspiração, juntamente com o crescente aparecimento de estruturas pouco ecogênicas, sugerindo a presença de coágulos nos ovários dos animais (dados não apresentados). Sendo assim, o aparecimento precoce de alterações nos ovários devido à incapacidade dos animais de se recuperarem das lesões adquiridas, provavelmente, foi a causa da redução do número de oócitos recuperados de acordo com a sessão.

No presente estudo a taxa de recuperação média foi de 55%. Esta taxa de recuperação está dentro da faixa de variação observada em alguns trabalhos realizados com bovinos (GARCIA; SALAHEDDINE, 1998; GIBBONS et al., 1995; KRUIP et al., 1994; MANCHATKOVA et al., 2000; PIETERSE et al., 1991; VIANA et al., 2004), bem como aos descritos para bubalinos (BONI; ROVIELLO; ZICARELLI, 1996; MANIK et al., 2002). No entanto, são inferiores aos obtidos por outros pesquisadores, tanto em bovinos (BUNGARTZ et al., 1995) quanto em bubalinos

¹ Ferraz, M. L. experimento em fase de elaboração. Tese Mestrado, VRA, FMVZ, USP, 2006.

(FERRAZ 2006¹; GUPTA et al., 2006; TECHAKUMPHU et al., 2004;). Esta divergência nos resultados pode ser decorrente novamente dos fatores mecânicos ou biológicos que afetam a eficiência da técnica de aspiração folicular (BOLS 2001; BOLS et al., 1996, 1997; MERTON et al., 2003; VIANA et al., 2004; WARD et al., 2000).

Segundo Viana et al. (2004) a realização de punções foliculares mais frequentes (a cada 3 a 4 dias vs. 7 dias) promove redução na taxa de recuperação de oócitos. Os autores discorrem sobre a crescente dificuldade na realização da anestesia epidural e a menor qualidade no bloqueio anestésico. Estes efeitos também foram observados no atual estudo. Verificou-se que determinados animais apresentavam elevado grau de reatividade ao procedimento de aspiração, sendo que algumas das fêmeas também demonstravam maior sensibilidade às perfurações no fundo de saco vaginal e/ou nos ovários, o que determinou crescente dificuldade para sua contenção e maior dificuldade para a realização os procedimentos.

O tratamento com bST não alterou a taxa de recuperação (54,5 % bST vs. 57,7 % Controle). Este resultado discorda do observado por outros estudos (FERRAZ, 2006¹; TRIPP et al., 2000). Tripp et al. (2000) descrevem redução de 14% na taxa de recuperação nos animais tratados com bST (30%) em relação aos não tratados (44%). Ferraz (2006, em fase de elaboração)¹ observou efeito do tratamento com bST (64,4% bST vs. 70,7% Controle; $p=0,03$), bem como da interação entre o tratamento e o intervalo entre aspirações (a cada 7 ou 14 dias) na taxa de recuperação ($p=0,03$). Este autor observou que o tratamento com bST em animais aspirados a cada 14 dias promove menores taxas de recuperação (58,4%^b) do que animais não tratados aspirados com a mesma frequência (73,6%^a). Valores

¹ Ferraz, M. L. experimento em fase de elaboração. Tese Mestrado, VRA, FMVZ, USP, 2006.

intermediários foram obtidos nos animais tratados (67,4%^{ab}) ou não (69,3%^{ab}) e submetidos à aspiração a cada 7 dias.

Uma possível explicação para a divergência entre os resultados referentes à taxa de recuperação dos animais tratados com bST (FERRAZ, 2006¹; TRIPP et al., 2000) com, os obtidos no presente estudo pode ser decorrente dos diferentes intervalos entre aspirações empregados. Intervalos menos freqüentes (a cada 7 ou 14 dias) podem levar a assincronia entre a atresia folicular e oocitária, o que poderia determinar maiores dificuldades na remoção do oócito do interior do folículo durante a aspiração (BOLS et al., 1998). O tratamento com bST em fêmeas bovinas causa regressão prematura do folículo dominante, reduzindo seu período de dominância de 24 a 48 horas (CRYSTAL et al., 1997; KIRBY et al., 1997; LUCY et al., 1994). Este efeito ocorre provavelmente devido à maior secreção de estradiol nos animais tratados com bST, levando a um *feedback* negativo na secreção LH e FSH (na presença de progesterona), determinando o surgimento prematuro da segunda onda de desenvolvimento folicular (CRYSTAL et al., 1997). Adicionado a este efeito, sabe-se que a total eliminação do oócito do ovário pode levar ao redor de 1 a 2 semanas (KRUIP et al., 1982). Portanto, a aspiração de folículos de animais tratados com bST em intervalos menos intensos pode gerar diferentes resultados devido às grandes variações no desenvolvimento e atresia entre os oócitos e os folículos puncionados.

A porcentagem de oócitos de boa qualidade (A+B+C) não foi alterada pelo tratamento com bST. Observou-se que 72% (186/258) dos oócitos obtidos dos animais tratados com bST e que 70% (144/207) dos obtidos dos animais não tratados foram classificados como de boa qualidade. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Tripp et al. (2000) e por Bols et al. (1998) que não observaram diferenças na qualidade morfológica dos CCOs recuperados de fêmeas

tratadas ou não com bST. Entretanto, discorda com os resultados obtidos por Roth et al. (2002), que trabalhando com vacas de leite durante o outono (após o período de estresse calórico causado pelo verão) obteve aumento na porcentagem de oócitos de boa qualidade (72% bST vs. 26% controle).

O número de oócitos de boa qualidade foi semelhante ao descrito por Zicarelli (2003) em fêmeas Mediterrâneas e por Gupta et al. (2006) em fêmeas da raça Murrah. No entanto, foi superior ao obtido por Boni; Roviello e Zicarelli (1996) em fêmeas bubalinas da raça Mediterrânea e pelo descrito por Techakumphu et al. (2004) em búfalas do pântano. Comparando-se os resultados deste estudo com os obtidos em fêmeas bovinas, a qualidade oocitária é semelhante (VIANA et al., 2004) ou inferior (GARCIA; SALAHEDDINE, 1999).

Outro interessante resultado obtido por Ferraz (2006, em fase de elaboração)¹, demonstrou a dependência do efeito do bST de acordo com o intervalo entre aspirações (a cada 7 ou 14 dias). O autor obteve interação ($p=0,02$) entre o tratamento e o intervalo entre aspirações na qualidade oocitária. O tratamento com bST em animais aspirados a cada 14 dias promoveu menor proporção de oócitos de boa qualidade (66,5%^b) do que animais não tratados e submetidos a aspirações foliculares com a mesma frequência (76,4%^a). Valores intermediários foram obtidos nos animais tratados (71,3%^{ab}) ou não (69,3%^{ab}), submetidos à aspiração a cada 7 dias. Estes resultados demonstram mais uma vez o possível efeito do bST promovendo variados graus de desenvolvimento ou atresia folicular e/ou oocitária. Este efeito parece ser dependente do período de permanência do oócito no folículo contendo altas concentrações de IGF-I ou do efeito da atresia precoce. Neglia et al. (2004) observaram correlação positiva ($r^2=0,29$; $p<0,001$) entre as concentrações plasmáticas de IGF-I e as concentrações deste fator de crescimento no fluido

¹ Ferraz, M. L. experimento em fase de elaboração. Tese Mestrado, VRA, FMVZ, USP, 2006.

folicular em novilhas bubalinas. Elevadas concentrações de IGF-I podem causar superestimulação das células da granulosa (SPICER; CHAMBERLAIN; MACIEL, 2002) e do oócito (ARMSTRONG et al., 2001), promovendo efeitos deletérios na esteroidogênese e no desenvolvimento oocitário. Portanto, os efeitos do bST na qualidade oocitária parecem ser alterados de acordo com o período de permanência dos oócitos no interior de folículos de fêmeas tratadas com o hormônio.

A taxa de produção embrionária não variou conforme o tratamento (19,7% bST vs. 26,0% Controle). Este resultado concorda com o observado por outros autores em fêmeas bovinas (BOLS et al., 1998; ROTH et al., 2002; TRIPP et al., 2000). No entanto, discorda de Ferraz (2006; em fase de elaboração)¹ em fêmeas bubalinas, que observou efeito negativo do tratamento com bST na taxa de produção embrionária (11,9% bST vs. 21,9% Controle). Esta discordância entre os resultados obtidos por Ferraz (2006) e o do presente estudo, possivelmente, possa ser decorrente do reduzido número de sessões com produção embrionária (somente 5 sessões produziram embriões no presente estudo). Mesmo assim, observou-se redução numérica (ao redor de 6%) na taxa de produção embrionária, o que poderia resultar em diferença estatisticamente significativa com o aumento do número de observações.

Em bovinos, o tratamento com 500mg de bST em vacas não lactantes promove considerável aumento de IGF-I, levando a redução na taxa de prenhez (BILBY et al., 2004; THATCHER et al., 2006). Em ratas, o excesso de IGF-I *in vivo* ou *in vitro* prejudica o desenvolvimento embrionário (KATAGIRI et al., 1996, 1997). Bilby et al., (2004) discorrem sobre limiares em que o GH e o IGF-I estimulam maiores taxas de concepção, e que reduções na eficiência reprodutiva podem ocorrer no momento em que estes níveis são ultrapassados. Elevadas

concentrações de IGF-I no cultivo celular (100ng/ml) promovem bloqueio dos efeitos positivos do IGF-I na atividade aromática das células da granulosa de bovinos (SPICER; CHAMBERLAIN; MACIEL, 2002). A superestimulação com IGF-I (ARMSTRONG et al., 2001) e também com insulina (ARMSTRONG et al., 2003) provocam efeitos deletérios no desenvolvimento folicular e oocitário em bovinos.

Neste sentido, acredita-se que o efeito negativo do bST na produção embrionária pode ser decorrente de uma superestimulação ovariana por elevação excessiva das concentrações plasmáticas de IGF-I após o tratamento com 500mg de bST em novilhas bubalinas ou vacas lactantes com produção de leite mediana (até 20kg leite por dia). Portanto, acredita-se que a redução da dose previamente utilizada poderia não causar efeitos negativos na produção embrionária de fêmeas bubalinas.

Os resultados da produção embrionária ao redor de 19-26% obtidos no presente estudo são inferiores aos descritos por Neglia et al. (2003) utilizando oócitos bubalinos obtidos através de aspiração folicular e produzidos *in vitro* com metodologia semelhante (entende-se como: MIV com suplementação de 50 μ M de cisteamina). Estes autores descrevem 29,7%, 19,9% e 29,7% de taxa de produção embrionária para oócitos obtidos por aspiração folicular em fêmeas bubalinas, ovários de matadouro de fêmeas bubalinas e ovários matadouro de fêmeas bovinas, respectivamente.

Entretanto, em experimentos contemporâneos, realizados no mesmo laboratório do presente estudo, ou seja, utilizando as mesmas condições de equipamentos e meios na fertilização e cultivo *in vitro*, Soria (2005, em fase de elaboração)² utilizando oócitos bovinos de matadouro obteve taxas de produção de

¹ Ferraz, M. L. experimento em fase de elaboração. Tese Mestrado, VRA, FMVZ, USP, 2006.

² Soria, G. F. experimento em fase de elaboração. Tese Mestrado, UNESP, Jaboticabal., 2005.

blastocistos entre 12-26%. Sendo assim, acredita-se que é possível obter resultados equiparáveis aos de oócitos bovinos derivados de matadouro a partir de oócitos bubalinos após aspiração folicular.

A taxa de aproveitamento após sincronização da ovulação com o método Ovsynch para transferência de embriões em tempo fixo foi de 76% (19/25). Estes resultados são inferiores às taxas de ovulação (90-95%) com o uso do mesmo protocolo em fêmeas bubalinas (BARUSELLI et al., 1999; BERBER et al., 2002). Este decréscimo da taxa de aproveitamento em relação à taxa de ovulação é decorrente, provavelmente, da não utilização de fêmeas que apresentavam CL com diâmetro inferior a 10mm. Entretanto, estes resultados são semelhantes aos descritos na literatura da utilização do protocolo “Ovsynch” em programas de transferência de embriões em tempo fixo em fêmeas bovinas (BARUSELLI et al., 2000; ZANENGA et al., 2000). Portanto, acredita-se que com o uso do protocolo “Ovsynch” é possível realizar a transferência de embriões em tempo pré-determinado, eliminando a necessidade de detecção de estro e promovendo índices aceitáveis de taxa de aproveitamento em fêmeas bubalinas sincronizadas na estação reprodutiva favorável (outono e inverno).

As taxa de concepção, de prenhez e de nascimento foram de 10,5% (2/19), de 8% (2/25) e 100%(2/2), respectivamente. Até o presente momento este é o primeiro relato do nascimento de dois bezerros bubalinos produzidos *in vitro* e vitrificados nas Américas. Estes resultados são inferiores aos obtidos por Neglia et al. (2004), que descrevem índice de 37,5%(3/8) na taxa de concepção embriões bubalinos produzidos *in vitro* e vitrificados. Estes mesmos autores discorrem sobre a obtenção do primeiro nascimento de embriões bubalinos produzidos totalmente *in vitro* e vitrificados. Adicionalmente, Hufana-Duran et al. (2004) destacam a obtenção

de 16,3% (9/55) de taxa de concepção utilizando maior número de animais, e conseguindo seis produtos de embriões produzidos *in vitro* e vitrificados. Vale a pena ressaltar que no presente estudo a transferência dos embriões vitrificados foi realizada de maneira direta. Deste modo, exclui-se a necessidade de observação da re-expansão do embrião após o descongelamento, realizada no outro experimento relatado (HUFANA-DURAN et al., 2004), o que facilita a rotina da transferência dos embriões.

Sendo assim, estes resultados confirmam a viabilidade da técnica para a espécie, e promovem boas perspectivas tanto nacionais quanto internacionais da aplicação desta biotecnologia em programas de melhoramento genético visando otimizar o potencial reprodutivo feminino na espécie bubalina.

8 CONCLUSÃO

A hipótese do presente estudo foi parcialmente rejeitada. O tratamento com bST aumentou a população folicular, o número de folículos aspirados e o número de oócitos recuperados. Entretanto, não aumentou a qualidade oocitária e a produção *in vitro* de embriões.

Dentro dos objetivos propostos, é possível concluir que:

- O tratamento com bST aumentou a população folicular de fêmeas bubalinas submetidas a aspiração folicular;
- A eficiência da técnica de aspiração folicular apresentou incremento parcial, pois o tratamento com bST aumentou o número de oócitos recuperados, mas não a taxa de produção embrionária;
- As concentrações plasmáticas de IGF-I em fêmeas bubalinas tratadas ou não com bST e submetidas à aspiração folicular não foram conclusivas, devendo ser novamente avaliadas;
- É possível obter satisfatórias taxas de aproveitamento, com taxas de prenhez e nascimento semelhantes às obtidas em bovinos, utilizando a transferência em tempo fixo de embriões bubalinos produzidos *in vitro* e vitrificados.

REFERÊNCIAS¹

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

ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; GARDNER, J. O.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; WEBB, R. Steroidogenesis in bovine granulosa cells: the effect of short-term changes in dietary intake. **Reproduction**, Cambridge; v. 123, n. 3, p. 371–378, 2002.

ARMSTRONG, D. G.; GONG, J. G.; WEBB, R. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: Physiological, cellular and molecular mechanisms. **Reproduction. Supplement**, Cambridge, v. 61, p.403–414, 2003.

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

BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T. Controle do desenvolvimento folicular para emprego de biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 94-102, 2003.

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

BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; BARNABE, V. H.; BARNABE, R. C.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, C. A.; AMARAL, R. Dinâmica folicular em búfalas submetidas à sincronização da ovulação para inseminação artificial em tempo fixo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 15; 2000, Campos do Jordão. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, p. 349,1999.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; CARVALHO, N. A. T.; VALENTIM, R.; BERBER, R. C. A.; CARVALHO FILHO, A. F.; MADUREIRA, E. H.; COSTA NETO, W. P. Aumento da taxa de prenhez em receptoras de embrião bovino pela utilização do protocolo "Ovsynch" com inovulação em tempo fixo. In: REUNIÃO ANUAL DA

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

SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 15., 2000, Caldas Novas. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2000, p. 216.

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

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

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, Oxford, v.1, p. 91-148, 1995.

BERBER, R. C. A.; MADUREIRA, E. H.; BARUSELLI, P. S. Comparison of two ovsynch protocols (GnRH vs. LH) for fixed timed insemination in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology**, New York, v. 57, n. 5, p. 1421-1430, 2002.

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 GH, IGF-I, and conception rate in cattle treated with low doses of recombinant bovine GH. **Theriogenology**, New York, v. 51,n. 7, p. 1285–1296, 1999.

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.

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

BOLS, P. Punción folicular (OVUM PICK-UP, OPU) en la vaca. In *Biotechnologia de la reproducción*, Argentina, Editora INTA, p. 185-224, 2001.

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, n. 5, p. 1001–1014, 1996.

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

BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; VAN SOOM, A.; DE KRIUF, 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, n. 7, p. 983–995, 1998.

BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; VAN SOOM, A.; DE KRIUF, 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, n. 6 p. 1221–1236, 1997.

BONI, R.; DI PALO, R.; BARBIERI, V.; ZICARELLI, L. Ovum pick-up in deep anestrous buffaloes. *In: Proceedings of IV World Buffalo Congress*, Caserta, Italy, v. 3, p. 480-482, 1994.

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, n. 1, p. 277–289, 1997.

BONI, R.; ROVIELLO, S.; CAMPANILE, G.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L. Single ovum pick-up performed from the sixth to the eleventh estrus cycle day in buffalo cows. SYMPOSIUM ON REPRODUCTION ANIMAL BREEDING: ADVANCES AND STRATEGIES, 1995, Proceedings, 1995, p.357-358.

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

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

BRACKET, B.; ZUELKE, K. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, New York, v. 39, n. 1, p. 43-64, 1993.

BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DOMAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M. A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 27, p. 147-158, 1982.

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

BUNGARTZ, L.; LUCS-HAHN, A. ; RATH, D.; NIEMAN, H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. **Theriogenology**, New York, v. 43, n. 3, p. 667-676, 1995.

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, n. 3, p. 421-431, 2000.

BURNS, D. S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J. L. H.; KNIGHT, P. G.; IRELAND, J. J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 73, n. 1, p. 54-62, 2005.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes **Theriogenology**, New York, v. 27, n. 1, p. 217, 1987.

CAMPBELL, B. K.; SCARAMUZZI, R. J.; WEBB, R. Control of antral follicle development and selection in sheep and cattle. **Journal Reproduction Fertility Supplement**, Harrogate, UK, v. 49, p. 335-350, 1995.

CARTER, J. A.; PARANAGUÁ, H. N.; PARANAGUÁ, H. F. N.; GODKE, R. A. The effect of rBST on follicle population of Nelore heifers during the dry season in Brazil. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. 1, p. 342, 1998.

CARVALHO, N. A. T.; BARUSELLI, P. S.; MADUREIRA, E. H.; VISINTIN, J. A.; ZICARELLI, L.; D'OCCHIO, M.J. Control of ovulation subsequent to superstimulation of follicular growth in buffalo: fertilization and embryo recovery. **Theriogenology**, New York, v. 58, n. 9, p. 1641-1650, 2002.

CHANDRASHEKAR, V.; ZACZEK, D.; BARTKE, A. The Consequences of Altered Somatotrophic System on Reproduction. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 71, n. 1, p. 17-27, 2004.

CHANG, M. C. Fertilization of rabbit ova in vitro. **Nature**, London, v. 184, n. 4704, p. 466-467, 1959.

CLEMMONS, D. R. Roles of insulin-like growth factor binding proteins in controlling of IGF actions. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Orlando, USA, v. 140, n.1-2, p. 19-24, 1998.

COHEN, J.; DEBACHE, C.; PEZ, J. P.; JUNCA, A. M.; COHEN-BACRIE, P. Transvaginal sonographically controlled ovarian puncture for oocyte retrieval for in vitro fertilisation **Journal In Vitro Fertility Embryo Transfer**, v. 3, p. 309-313, 1986.

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

CUSHMAN, R. A.; DESOUSA, J. C.; HEDGPETH, V. S.; BRITT, J. H. Superovulatory response of one ovary is related to the micro- and macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. **Biology Reproduction**, Madison, v. 60, n. 2, p. 349-354, 1999.

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, 2005, p.292-306.

DANEL, B. Oestrous behavior, ovarian morphology and cyclic variations in follicular system and endocrine pattern in water buffalo heifers **PhD Thesis, Uppsala, Sweden**: Sveriges, Lantbruksuniversitet, 1987.

DE LA SOTA, R. L.; LUCY, M. C.; STAPLE, R. C.; THATCHER, W. W. Effects of recombinant bovine somatotropin (somatotribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 76, n. 4, p. 1002-1013, 1993.

DE LOOS, F.; VAN VLIET, C.; VAN MAURIK, P.; KRUIP, T. A. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, New York, v. 24, n. 2, p.197-204, 1989.

DELLENBACH, P.; NISAND, I.; MOREAU, L.; FERGER, B.; PLUMERE, C.; GERLINGER, P.; BRUN, B.; RUMPER, Y. Transvaginal sonographically controlled ovarian follicle puncture for egg retrieval. **Lancet**, New York, v. 323, n. 8392, p. 1467, 1984.

ERICKSON, B. H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 25, p.800-805, 1966.

ETHERTON, T. D.; BAUMAN D. E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. **Physiology Review**, Bethesda, USA, n. 3, p. 745-761. 1998.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction Development**, Hoboken, USA, v. 42, n. 4, p. 437-442, 1995.

FAO, FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, FAOSTAT: Agriculture data. 2004. Disponível em <<http://apps.fao.org/cgi-gin/nph-db.pl?subset=agriculture/>> Acesso em 11 agosto, 2005.

FERNANDEZ, N.; RODRIGUEZ, M.; PERIS, C.; BARCELO, M.; MOLINA, M. P.; TORRES, A. Bovine somatotropin dose titration in lactating dairy ewes. 1. Milk yield and milk composition. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 78, , n. 5, p. 1073-1082, 1995.

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, n. 6, p. 977-987, 1997.

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, n. 6, p. 1341-1357, 2001.

GALLI, C.; DUCHI, R.; CROTTI, G.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick-up in water buffalo. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. 1, p. 400, 1998.

GALO, L.; BAILONI, L.; SCHIAVON, S.; CARNIER, P.; RAMANZIN, M.; ANDRIGHETTO, I.; BITTANTE, C.; Effect of slow-release somatotropin on the pattern of milk yield between and within injection interval. . **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n.1, p. 46-51, 1997.

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

GASPARRINI, G. In vitro embryo production in buffalo species: state of the art. **Theriogenology**, New York, v. 57, n. 1, p. 237-256, 2002.

GASPARRINI, G.; BOCCIA, L.; MARCHANDISE, J.; DI PABLO, R.; GEORGE, F.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Enrichment of in vitro maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: Effects of cystine on glutathione synthesis and embryo production. **Theriogenology**, New York, v. 65, n. 2, p. 275-287, 2006.

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

GONG, J. G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications **Domestic Animal Endocrinology**, Shannon, Ireland, v. 23, n. 1-2, 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 somatotrophin: a dose-response study. **Journal Reproduction and Fertility**, Harrogate, UK, v.110 , n. 1, p. 91-97, 1997.

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

GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotrophin on ovarian follicular growth and development in heifers. **Journal Reproduction and Fertility**, Harrogate, UK , v. 97, n.1, p. 247-254, 1993.

GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; WILMUT, I.; WEBB, R. Effect of recombinant bovine somatotrophin on the superovulatory response to pregnant mare serum gonadotropin in heifers. **Biology of Reproduction**, Madison, v.48, n. 5, p.1141-1149, 1993.

GONG, J. G.; MCBRIDE, D.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. Effects of recombinant bovine somatotrophin, insulin-like growth factor-I and insulin on the proliferation of bovine granulosa cells in vitro. **Journal Endocrinology**, Woodlands, UK, v. 139, p. 67-75, 1993.

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

GONG, J.G.; WILMUT, I.; BRAMLEY, T.A. Pretreatment with recombinant bovine somatotrophin enhances the superovulatory response to FSH in heifers. **Theriogenology**, New York, v.45, n. 3, p.611-622, 1996.

GUPTA, V.; MANIK, R. S.; CHAUHAN, M. S.; SINGLA, S. K.; AKSHEY, Y. S.; PALTA, P. Repeated ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval from cyclic Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*): Oocyte recovery and quality. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 91, n. 1-2, p. 89-96, 2006.

GUTIERREZ, C. G. CAMPBELL, B. K.; ARMSTRONG, D. G.; WEBB, R. Insuline-like growth factor-I (IGF-I) production by bovine granulosa cells in vitro and peripheral IGF-I measurement in cattle serum: ab evakyatuib if UGF-bubdubg oriteub extration methods. **Journal Endocrinology**, Woodlands, UK, v. 153, n. 2, p. 231-240, 1997.

HARTNELL, G. F.; FRANSON, S. E.; BAUMAN, D. E.; HEAD, H. H.; HUBER, J. T. LAMB, R. C.; MADSEN, K. S.; COLE, W. J.; HINTZ, D R. L. Evaluation of sometribove in a prolonged-release system in lactating dairy cows-production responses. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 74, n.8, p. 2645-2663, 1991.

HASHIMOTO, S.; TAKAKURA, R.; KISHI, M.; SUDO, T.; MINAMI, N.; YAMADA, M.. Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. **Theriogenology**, New York, v. 51, n. 4, p.757-765, 1999a

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, n. 1, p. 131-138, 1999b.

HENDRIKSEN, P. J.; STEENWEG, W. N.; HARKEMA, J. C.; MERTON, J. S.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L.; DIELEMAN, S. J. Effect of different stages of the follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. **Theriogenology**. New York, v. 61, n. 5, p. 909-920, 2004.

HENDRIKSEN, P. J. M.; VOS, P. L. A. M.; STEENWEG, W. N. M.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes **Theriogenology**, New York, v. 53, n. 1, p. 11-20, 2000.

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, n.1, p. 77-85, 1996.

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

HULL, K. L.; HARVEY, S. Growth hormone: roles in female reproduction. Review. **Journal of Endocrinology** , Woodlands, UK, v. 168, n. 1, p. 1-23, 2001.

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, 2004, v. 82–83, p. 461-477.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; KALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.

IZADYAR, F.; HAGE, W. J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. The promotory effect of growth hormone on the development competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, USA, v. 49, n. 4, p. 444-453, 1998.

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

JONES, J. L; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrine Reviews**, Cambridge, v. 16, n. 1, p. 3-33, 1995.

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, n. 2, p. 327-338, 2000.

KAMONPATANA, M.; CHUNGSOONGNEON, U. Time related to in vitro maturation of immature oocytes in swamp buffaloes. **Buffalo Journal Supplement**. Salerno, Italy, n. 2, p. 135-146, 1994.

KASSA, T.; AMBROSE, J. D.; ADAMS, A. L.; RISCO, C.; STAPLES, C. R.; THATCHER, M.-J.; VAN HORN, H. H.; GARCIA, A.; HEAD, H. H.; THATCHER, W. W. Effects of whole cottonseed diet and recombinant bovinesomatotropin on ovarian follicles in lactating dairy cows **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 85, n. 11, p. 2823–2830, 2002.

KATAGIRI, S.; MOON, Y. S.; YUEN. B. H. A somatostatin analogue decreases embryonic loss following superovulation in rats by normalizing insulin-like growth factor I action in the uterus. **Human Reproduction**, Oxford, v. 12, n. 4 p. 671-676, 1997.

KATAGIRI, S.; MOON, Y. S.; YUEN. B. H. The role for the uterine insulin-like growth factor I in early embryonic loss after superovulation in the rat. **Fertility and Sterility**. Los Angeles, v. 65, n. 2, p. 426-436, 1996.

KAWAMATA M. Relationship between the number of small follicles prior to superovulatory treatment and superovulatory response in Holstein cows. **Journal Veterinary Medicine Science**, Tokio, v. 56, p. 965–970, 1994.

KIRBY, C. J.; SMITH, M. F.; KEISLER, D. H.; LUCY, M. C. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained release bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 2, p. 273–285, 1997.

KIRBY, C. J.; THATCHER, W. W.; COLIER, R. J.; SIMMEN, F. A.; LUCY, M. C. Effects of growth hormone and pregnancy on expression of growth hormone receptor, insulin like growth factor and insulin like growth factor binding protein-2 and -3 genes in bovine uterus, ovary and oviduct. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 55, n. 5, p.996–1002, 1996.

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

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

KRUIP, T. H. A. M.; BONI, R.; WURTH, Y. A.; ROELOFSEN, M. W. M.; PIETERSE, M. C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 42, n. 4, p. 675–684, 1994.

KRUIP, T. H. A. M.; PIETERSE, M. C.; VAN BENEDEN, T. H. H.; VOS, P. L. A. N.; WURTH, Y. A.; TAVARNE, M. A. M. A new method for bovine embryo production: a potential alternative to superovulation. **Veterinary Record**, London, v. 128, n. 9, p. 208-210, 1991.

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

LE VAN TY, C. D.; DRAIN COURT, D. A. Ovarian follicular populations in buffaloes and cows. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 19, p. 171-178, 1989.

LEEUWENBERG, B. R.; HUDSON, N. L.; MOORE, L. G.; HURST, L. G.; HURST, P. R.; MCNATTY, K. P. Peripheral and ovarian IGF-1 concentrations during the ovine oestrous cycle. **Journal Endocrinology**, Woodlands, UK, v. 148, n. 2, p. 281-289, 1996.

LENZ, S.; LEETON, J.; RENOU, P. Transvaginal recovery of oocytes for in vitro fertilization using vaginal ultrasound. **Journal In Vitro Fertilization and Embryo Transfer**, v. 4, p. 51-55, 1987.

LONERGAN, P. Kinetics of embryo development in vitro: an indicator of oocyte quality. **Reproduction Domestic Animals**, Berlin, v. 6, p. 62-72, 1994.

LOONEY, C. R.; LINDSEY, B. R.; GONSETH, C. L.; JOHNSON, D. L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problems cows. **Theriogenology**, New York, v. 41, n. 1, p. 67-72, 1994.

LUCY, M. C.; COLLIER, R. J.; KITCHELL, M. L.; DIBNER, J. J.; HAUSER, S. D.; KRIVI, G. G. Immunohistochemical and nucleic acid analysis of somatotropin receptor populations in the bovine ovary. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 48, n. 6, p. 1219-27, 1993.

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, n. 1, p. 136-144, 1994.

LUCY, M. C.; DE LA SOTA, R. L.; STAPLES, C. R.; THATCHER, W. W. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (somatotribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 76, n. 4, p. 1014-27, 1993.

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, R. L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 70, n. 11, p. 3615-3626, 1992.

LUCY, M. C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, n. 7, p. 1635-1647, 2000.

MACHATKOVA, M.; JOKESOVA, E.; HORKY, F.; KREPELOVA, A. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 4, p. 543-50, 2000.

MACHATKOVAA, M.; KRAUSOVAA, K.; JOKESOVAA, E.; TOMANEKB, M. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, New York, v. 61, n. 2-3, p. 329-335, 2004.

MANIK, R.S.; PALTA, P.; SINGLA, S. K.; SHARMA, V. Folliculogenesis in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. **Reproduction Fertility and Development**, Collingwood, Austrália, v. 14, n. 5, p. 315–325, 2002.

MCCAFFERY, F. H.; LEASK, R.; RILEY, S. C.; TELFER E. E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 63, n. 1, p. 267-273, 2000.

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, n. 9, 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 the cattle breeding industry **Theriogenology**, New York, v. 59, n. 2, p. 651-674, 2003.

MISRA, K. A.; KASIRAJ, R.; MUTHA R. A. O.; RANGAREDDY, M.; JAISWAL, R. S.; PANTH, H. C. Rate of transport and development of preimplantation embryo in the superovulated buffalo (*Bubalus bubalis*) **Theriogenology**, New York, v. 50, n. 4, p. 637-649, 1998.

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, n. 1, 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, n. 9, p.1831–1841, 2001.

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, n. 4, p. 1371-1387, 2002a.

MOREIRA, F.; ORLANDI, C.; RISCO, C.A.; MATTOS, R.; LOPES, F.; THATCHER, W.W. Effects of pre-synchronization and bovine somatotropin on pregnancy rates to a time artificial insemination protocol in lactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 84, n. 7, p. 1646-1656, 2001.

MOREIRA, F.; PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J.; BANDIGA, L.; THATCHER, W. W. Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on development of in vitro derived bovine embryos. **Theriogenology** v. 57, n. 2, p. 895-902, 2002b.

MOREIRA, F.; RISCO, C. A.; PIRES, M. F.; AMBROSE, J. D.; DROST, M.; THATCHER, W. W. Use of bovine somatotropin in lactating dairy cows receiving timed artificial insemination. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 83, n. 6 p. 1237–1247, 2000.

NEGLIA, G.; BARUSELLI, P. S.; CARVALHO, N. A. T.; CAVALCANTI, A. K. S.; PRANDI, B.; GASPARINNI, B.; MAIERO, S.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G. Effect of negative balane on ovarian steroid homones and insulin-like growth factor I in Murrah buffalo heifers. **In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION-ICAR**, 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004a, v. 1, p. 36.

NEGLIA, G.; GASPARINNI, B.; BRIENZA, V. C.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; PRESICCE, G. A. Bovine and buffalo in vitro embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by tranvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, New York, v. 59, n. 2-3, p. 1123-1130, 2003.

NEGLIA, G.; GASPARINNI, B.; BRIENZA, V. C.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L. First pregnancy to term after transfer of buffalo vitrified embryos entirely produced in vitro. **Veterinary Research Communication**, Springer Netherlands, v. 28, n. 3, p. 233-236, 2004b (Special issue).

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. 179-95, 2004.

OHASHI, O. M.; MIRANDA, M. S.; DANTAS, J. K.; SANTOS, S. S. D.; SOUSA, J. S. The embryo transfer and in vitro fertilization program in buffalo od the amazon region **In: FIRST BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICA**, 2002 Belém, Pará, p. 217-224.

OHASHI, O. M.; MIRANDA, M. S.; SOUSA, J. S.; CORDEIRO, M. S.; BIONDI, F. C. Produção *in vitro* de embrião bubalino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 103-109, 2003.

PAVASUTHIPAISIT, K.; HOLYOAK, R. G.; TOCHARUS, C.; KITIYANANT, Y. Repeated transvaginal follicular aspiration in Swamp Buffalo. **Theriogenology**, New York, v. 43, n. 1, p. 295, 1995.

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 oocytes in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 41, n. 3-4 p. 183-921, 1996.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, USA, v. 31, p. 63-7, 1992.

PAWSCHE, C. H.; APPA RAO, K. B. C.; TOTEY, S. M. Effects of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins on in vitro maturation and embryonic development, cell proliferation and biosynthetic activity of cumulus cell and granulosa cell in buffalo. **Molecular Reproduction and Development**, Hoboken, USA, v. 49, n. 3, p. 277-285, 1998.

PEKS, 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 bovine ovary. **Journal Reproduction and Fertility**, Woodlands, UK, v. 116, n. 1, p. 157-165, 1999.

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

PIETERSE, M. C.; VOS, P. L. A. M.; KRUIP, T. A. M.; WURTH, Y. A.; BENEDEN, T. H. H.; WILLEMSE, A. H.; TAVERNE, M. A. M. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovun pick-up in eCG-treated cows. **Theriogenology**, New York, v. 37, n. 1, p. 273, 1992.

PIETERSE, M. C.; VOS, P. L. A. M.; KRUIP, T. A. M.; WURTH, Y. A.; BENEDEN, TH.H.; WILLEMSE, A. H.; TAVERNE, M. A. M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, New York, v. 35, n. 1, p. 19-24, 1991.

POLIDORI, F.; SGOIFO ROSSI, C. A.; SENATORE, E. M.; SAVOINI, G.; DELL'ORTO, V. Effect of recombinant bovine somatotropin and calcium salts of long chain fatty acids on milk from italian buffalo. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v. 80, n. 7, p. 2137-2142, 1997.

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

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

RIBEIRO, H. F. L. Reproductive management of buffalo in amazon valley. *In*: FIRST BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICA, 2002, Belém, Pará, p. 172-185.

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, n. 6, p. 1398-1405, 2002.

RUCKEBUSCH, Y.; PHANEUF, L.P.; DUNLOP, R. Physiology of small and large animals. Philadelphia: B.C. Decker, 1991.

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, n. 4, p. 868–881, 2004.

SCHAMS, D.; BERISHA, B.; KOSMANN, M.; AMSELGRUBER, W. M. Expression and localization of IGF family members in bovine antral follicles during final growth and in luteal tissue during different stages of estrous cycle and pregnancy. **Domestic Animal Endocrinology**, Shannon, Ireland, v. 22, n. 1, p. 51-72, 2002.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; ANDRADE, E. R.; BINELLI, M.; OLIVEIRA, J. A., NASCIMENTO, A. B. Efficacy of linear or convex transducer for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, New York, v. 59, n. 5-6, p. 1435-1440, 2003.

SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; OLIVEIRA, J. A.; VANTINI R. Relationship between follicular size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 67, n. 1-2, p. 37-43, 2001.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: mechanism involved in meiotic progress and its relation with developmental competence. **Theriogenology** v. 55, n. 6, p. 1241–1254, 2001.

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

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, n. 4, p. 237-254, 2002.

SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with an emphasis on domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, Shannon, Ireland, v. 12, n. 3, p.223-245, 1995.

STATISTICAL ANALYSES SYSTEM. **SAS user's guide**: statistics. Cary: Versão 8.0, SAS, 2000.

TANEJA, M.; BOLS, P. E.; VAN DE VELDE, A.; JU, J. C.; SCHREIBER, D.; TRIPP, M. W.; LEVINE, H.; ECHELARD, Y.; RIESEN, J.; YANG, X. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 62, n. 1, p. 206–213, 2000.

THATCHER, W. W.; BILBY, T. R.; BARTOLOME, J. A.; SILVESTRE, F.; STAPLES, C. R.; SANTOS, J. E. P. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. **Theriogenology**, New York, v. 65, n. 1, p. 30-44, 2006.

THECHAKUMPHU, M.; PROMDIREG, A.; PHUTICANIT, N.; NACHIENGMA, A.; THONGIAN, S. Transvaginal follicle aspiration in Tai Swamp buffaloes heifers using different pressures after FSH pretreatment (*Bubalus bubalis*), **Journal Veterinary Records**, v. 66, n. 8, p. 973-975, 2004.

TRIPP, M. W.; JU, J. C.; HOAGLAND, T. A.; RIESEN, J. W.; YANG, X.; ZINN, S. A. Influence of somatotropin and nutrition on bovine oocyte retrieval and in vitro development. **Theriogenology**, New York v. 53, n. 8, p. 1581-1590, 2000.

VAN DER SCHANS, A.; VAN DER WESTERLANKEN, L. A. J.; DE WIT, A. A. C.; EYESTONE, W. M.; DE BOER, H. A. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. **Theriogenology**, New York v. 35, n. 1, p. 288, 1991.

VASSENA, R.; ADAMS, G. P.; MAPLETOFT, R. J.; PIERSON, R. A.; SINGH, J. Ultrasound image characteristics of ovarian follicles in relation to oocyte competence and follicular status in cattle. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 76, n. 1-2, p. 25-41, 2003.

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, n. 1-2, p. 1-12, 2004.

VITORIA, A. Anatomy of female genital tract in the buffalo. In: COURSE ON BIOTECHNOLOGY OF REPRODUCTION IN BUFFALOES, 3., 1997, Casserta, Italy, p.15-20.

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, n. 5, p. 814-822, 1992.

WARD, F. A.; LONERGAN, P.; ENRIGHT, B.P.; BOLAND, M. P. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, New York, v. 53, n. 1, p. 433-446, 2000.

WEBB, R.; CAMPBELL, B. K.; GARVERICK, H. A.; GONG, J. G.; GUTIERREZ, C. G.; ARMSTRONG, D. G. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl**, Cambridge, v. 54, p. 33-48, 1999.

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

YUAN, W.; BAO, B.; GARVERICK, H. A.; YOUNGQUIST, R. S.; LUCY, M. C. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II and IGF binding protein- 2 in dominant and subordinate follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, Shannon, Ireland, v. 15, n. 1, p. 55-63, 1998.

ZANENGA, C. A.; PEDROSO, M. S.; LIMA, G. S.; SANTOS, I. C. C.; Transferência de embriões em tempo fixo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 15; 2000, Caldas Novas. **Anais...** Porto Alegre: UFRGS, 2000, p. 349.

ZICARELLI, L. Advances in buffaloes reproduction. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, MG, v. 27, n. 2, p. 85-94, 2003.