



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

ISSN 1806-7093

Novembro, 2004

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 14

Punção folicular e produção *in vitro* de embriões em vacas Gir submetidas a estimulação hormonal

Wanderlei Ferreira de Sá
Alessandra de Almeida Ramos
Ademir de Moraes Ferreira
Luiz Sérgio Almeida Camargo
João Henrique Moreira Viana

Juiz de Fora, MG
2004

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Gado de Leite

Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco

36038-330 Juiz de Fora – MG

Fone: (32) 3249-4700

Fax: (32) 3249-4751

Home page: <http://www.cnpgl.embrapa.br>

E-mail: sac@cnpgl.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Pedro Braga Arcuri

Secretária-Executiva: Inês Maria Rodrigues

Membros: Aloísio Torres de Campos, Angela de Fátima A. Oliveira, Antônio Carlos Cóser, Carlos Eugênio Martins, Edna Froeder Arcuri, Jackson Silva e Oliveira, João César de Resende, John Furlong, Marlice Teixeira Ribeiro e Wanderlei Ferreira de Sá

Supervisor editorial: Angela de Fátima Araújo Oliveira

Editoração eletrônica e tratamento de ilustrações: Amaro Alves da Silva

Revisor de texto: Newton Luís de Almeida

Normalização bibliográfica: Inês Maria Rodrigues

Ilustração da capa: Raquel da Silva Fontinelli (estagiária)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

CIP-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Gado de Leite

Punção folicular e produção *in vitro* de embriões em vacas

Gir submetidas à estimulação hormonal / Wanderley

Ferreira de Sá ... [et al.]. – Juiz de Fora : Embrapa

Gado de Leite, 2004.

21 p. (Embrapa Gado de Leite. Boletim de Pesquisa, 14).

ISSN 1806-7093

1. Bovinos. 2. Gir. 3. Produção *in vitro* de embriões. 4. Punção folicular. 5. Estimulação hormonal. I. Sá, Wanderlei Ferreira de. II. Ramos, Alessandra de Almeida. III. Ferreira, Ademir de Moraes. IV. Viana, João Henrique Moreira. V. Camargo, Luiz Sérgio de Almeida. VI. Série.

CDD 636.08926

© Embrapa 2004

Sumário

Resumo	5
Abstract	6
Introdução	7
Material e Métodos	8
Resultados e Discussão	12
Conclusões	18
Agradecimentos	19
Referências bibliográficas	19

Punção folicular e produção *in vitro* de embriões em vacas Gir submetidas a estimulação hormonal

*Wanderley Ferreira de Sá*¹

*Alessandra de Almeida Ramos*²

*Ademir de Moraes Ferreira*³

*João Henrique Moreira Viana*³

*Luiz Sérgio de Almeida Camargo*⁴

Resumo

Avaliou-se a eficiência da estimulação hormonal ovariana antes da punção folicular em vacas da raça Gir, tendo como objetivo principal maximizar a produção *in vitro* de embriões. Foram utilizadas vacas pluríparas, não-lactantes, em boas condições reprodutiva e corporal, que tiveram o ciclo estral sincronizado pela administração de cloprostenol e receberam, ao longo do experimento, implantes auriculares de norgestomet renovados a cada 14 dias. As punções foliculares foram realizadas utilizando um aparelho de ultra-sonografia equipado com um dispositivo-guia para punção, e os oócitos recuperados foram fecundados e cultivados *in vitro*, ou preparados para microscopia eletrônica de transmissão. O primeiro experimento avaliou o efeito da pré-estimulação ovariana com FSH. A administração de FSH exógeno resultou em um aumento no número total de folículos e no número de folículos grandes e médios ($p < 0,01$), porém reduziu o número de folículos pequenos ($p < 0,01$). O total de oócitos recuperados por sessão não foi diferente entre o controle e o tratamento com FSH ($p > 0,05$), mas o tratamento hormonal aumentou o percentual de oócitos de melhor qualidade

¹ Engenheiro Agrônomo – D. Sc., Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco, 36038-330 Juiz de Fora – MG – wandefsa@cnppl.embrapa.br.

² Médica-veterinária – D. Sc., Epamig, Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco, 36038-330 Juiz de Fora – MG – aleramos@cnppl.embrapa.br.

³ Médico-veterinário – D. Sc., Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco, 36038-330 Juiz de Fora – MG – ademirmf@cnppl.embrapa.br e jhmviana@cnppl.embrapa.br

⁴ Médico-veterinário – M. Sc., Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco, 36038-330 Juiz de Fora – MG – camargo@cnppl.embrapa.br

e diminuiu o de degenerados ($p < 0,01$). O FSH aumentou ($p < 0,05$) a taxa de clivagem e melhorou a produção de blastocistos ($p = 0,072$). No segundo experimento avaliou-se o efeito da estimulação ovariana com somatotropina bovina recombinante (rbST) associada ou não ao FSH. A rbST não afetou as principais características ovarianas, porém, quando associada ao FSH, verificou-se aumento no número de folículos grandes e médios, e uma diminuição no número de folículos pequenos ($p < 0,01$). A utilização somente do rbST promoveu uma diminuição na taxa de recuperação de oócitos ($p < 0,05$). A associação ao FSH aumentou o número de oócitos de melhor qualidade ($p < 0,05$) e diminuiu o de degenerados ($p < 0,01$). A rbST aumentou ($p > 0,05$) a taxa de clivagem e produção de blastocistos ($p < 0,01$), e melhorou o desenvolvimento embrionário em associação ao FSH ($p = 0,064$). No último experimento avaliou-se a ultra-estrutura dos oócitos submetidos aos tratamentos hormonais, evidenciando que a maioria apresentava grandes agrupamentos de grânulos corticais e vesículas de lipídios localizados na região periférica do oócito, alguns grânulos isolados espalhados no ooplasma e espaço perivitelíneo ausente. Todos os oócitos apresentavam a membrana do núcleo ondulada.

Palavras-chave: Bovinos, Gir, produção *in vitro* de embriões, punção folicular, estimulação hormonal

Abstract

The efficiency of hormonal ovarian stimulation before follicular puncture in Gir breed (*Bos indicus*) cows was evaluated, with the aim of increasing *in vitro* embryo production. Non-lactating cycling cows were used. Animals had their estrous cycles synchronized with cloprostenol. During experimental period, animals received norgestomet ear implants, replaced every fourteen days. Follicular puncture was performed using an ultrasound device equipped with a sector intravaginal probe. Recovered oocytes were fertilized and cultured *in vitro* or prepared to transmission electronic microscopy. The first experiment evaluated the effects of ovarian pre-stimulation with FSH. Exogenous FSH administration increased total number of follicles and the number of large and medium follicles ($p < 0.01$), however reduced the number of small follicles ($p < 0.01$). The number of oocytes recovered per aspiration section did not differ from control and FSH treatment ($p > 0.05$), but hormonal treatment increased the percentage of oocytes with better quality and reduced the number of degenerated

oocytes ($p < 0.01$). The FSH increased cleavage rate ($p < 0.05$) and improved blastocyst production ($p = 0.072$). In the second experiment, ovarian stimulation with recombinant bovine somatotropin (rbST) associated or not with FSH was evaluated. The rbST did not affect the main ovarian characteristics but in association with FSH increased the number of medium and large follicles and reduced the number of small follicles ($p < 0.01$). Treatment exclusively with rbST reduced oocyte recovery rate ($p < 0.05$). The association of rbST with FSH increased the number of better oocytes quality ($p < 0.05$) and reduced the number of degenerated oocytes ($p < 0.01$). The rbST increased cleavage ($p < 0.05$) and blastocyst production ($p < 0.01$) rates, and improved embryonic development in association to FSH ($p = 0.064$). In the last experiment, the ultrastructure of oocytes submitted to hormonal treatment showed large clusters of cortical granules and lipid vesicles located in the oocyte periphery.

Key-words: Bovine, Gir, *in vitro* embryo production, ovum pick-up, hormonal stimulation

Introdução

A aspiração folicular guiada por ultra-som é uma técnica utilizada para recuperação de oócitos imaturos de doadoras vivas. Quando usada em conjunto com a produção *in vitro* de embriões, pode gerar grande número de embriões de qualidade superior por doadora/ano para uso em programas de melhoramento genético. Além disso, pode ser de grande valia na obtenção de embriões mestiços a partir do cruzamento de animais de diferentes raças.

A eficiência da associação das técnicas de punção folicular e produção *in vitro* de embriões depende do estabelecimento de protocolos que garantam a recuperação de complexos *cumulus*-oócitos com maior potencial de desenvolvimento possível. O controle hormonal da função ovariana pode ser um valioso recurso para aumentar o número de embriões produzidos *in vitro*. Em animais de raças européias, o tratamento hormonal das doadoras de oócitos utilizando FSH e/ou somatotropina recombinante bovina (rbST) tem aumentado o número de folículos viáveis para punção, embora a eficiência desses oócitos na produção *in vitro* de embriões seja questionável (GOODHAND et al., 1999; ROTH et al., 2002).

Animais da raça Gir (*Bos indicus*) apresentam um padrão de crescimento e dinâmica folicular semelhantes aos observados em raças européias (*Bos taurus*)

(SANTOS, 2001), e características morfológicas e funcionais dos corpos lúteos seguem o mesmo padrão observado em outras raças bovinas (VIANA et al., 1999). Entretanto, fêmeas *Bos indicus* e *Bos taurus* diferem em muitos outros aspectos em suas fisiologia reprodutiva, como o diâmetro máximo do folículo dominante (FIGUEIREDO et al., 1997; VIANA et al., 2000), número de folículos presentes no ovário (SEGERSON et al., 1984) e no padrão endócrino (SEGERSON et al., 1984). Além disso, menores doses de gonadotrofinas do que as normalmente utilizadas para superovulação em gado *Bos taurus* parecem ser mais eficientes em animais *Bos indicus* (VISINTIN et al., 1996; FREITAS et al., 1998).

Sendo assim, torna-se imperativa a procura de protocolos que utilizem a estimulação ovariana antes da punção folicular, bem como o conhecimento da eficiência desses oócitos recuperados quando usados na produção *in vitro* de embriões, principalmente em animais da raça Gir, que possuem poucas informações a respeito na literatura.

O presente trabalho tem como objetivos estudar o uso de diferentes protocolos de estimulação ovariana, utilizando FSH, rbST e rbST associada ao FSH, antes das sessões de punção folicular, como meio de aumentar o número e a qualidade dos oócitos recuperados; verificar a eficiência desses oócitos na produção *in vitro* de embriões e avaliar a ultra-estrutura dos oócitos recuperados após estimulação hormonal .

Material e métodos

Os experimentos foram realizados na Embrapa Gado de Leite, usando-se 45 vacas da raça Gir múltíparas, não-lactantes, em boas condições reprodutiva e corporal. Os animais tiveram o ciclo estral sincronizado pela administração intramuscular de 0,5 mg de cloprostenol (Ciosin, Coopers), e ao longo do experimento receberam implantes auriculares com 3 mg de norgestomet (Crestar, Intevet), renovados a cada 14 dias. Após a sincronização do ciclo estral, os animais foram distribuídos nos diferentes experimentos.

Experimento 1

Efeito da pré-estimulação com FSH na coleta de oócitos por punção folicular e produção *in vitro* de embriões na raça Gir.

Quinze vacas foram submetidas aos seguintes tratamentos:

T1: Punção folicular duas vezes por semana sem estimulação hormonal (controle).

T2: Punção folicular uma vez por semana após tratamento com 250 U.I. de hormônio folículo estimulante (Pluset, Serono), distribuídos em seis aplicações em doses decrescentes (75, 50, 50, 25, 25, e 25 U.I.) administradas em intervalos de 12 horas nos três dias precedentes a cada sessão de punção.

Cada animal foi submetido primeiro ao T1 com duas repetições, e posteriormente ao T2 em duas repetições (30 punções para cada tratamento).

As punções foliculares foram realizadas utilizando-se um aparelho de ultra-sonografia equipado com transdutor setorial intravaginal de 5/7,5 MHz e um dispositivo-guia para punção folicular. Folículos com diâmetro superior a 3 mm foram identificados, mensurados e puncionados utilizando-se agulhas 19G e uma pressão de vácuo de 80 mmHg, correspondendo a um fluxo de 14 ml de água/min. O líquido folicular foi inicialmente recuperado em tubos plásticos de 50 ml (Falcon), com 15 ml de DPBS acrescido de soro fetal bovino (SFB) e heparina, sendo posteriormente os oócitos separados em um filtro de coleta de embriões com malha de 80 micras (Millipore). Os complexos *cumulus*-oócito recuperados foram transferidos para placas de cultivo contendo DPBS acrescido de 10% de SFB a 37 °C e avaliados em um microscópio estereoscópio com aumento final de 50X.

Foram considerados adequados para o cultivo *in vitro* os oócitos de grau I (complexos *cumulus*-oócitos apresentando mais de três camadas de células do *cumulus* compactas, oócitos com citoplasma escuro e homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades) e grau II (complexos *cumulus*-oócito apresentando menos de três camadas de células do *cumulus* compactas, oócitos com citoplasma escuro e homogêneo ou apresentando pequenas irregularidades).

Os oócitos selecionados foram acondicionados em tubos plásticos de 1,5 ml contendo meio Talp-Hepes e mantidos em estufa a 39 °C até o momento do transporte para o Laboratório de Embriologia. O transporte até o laboratório foi realizado utilizando-se uma câmara incubadora (Modular Incubator Chamber, Billups-Rothenberg) mantida à temperatura de 39 °C em uma bolsa térmica. O tempo médio de transporte foi de 40 minutos a uma hora.

Os oócitos foram submetidos à maturação *in vitro* em meio TCM-199 acrescido de 10% de soro de vaca em cio e 20 mg/ml de FSH, por 22 horas, em estufa

incubadora a 39 °C com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após a maturação, os oócitos foram fertilizados com sêmen congelado de um touro da raça Gir previamente selecionado. Para separação de espermatozóides vivos e mortos foi utilizado o método de *swim up*. A fecundação *in vitro* foi realizada em gotas de 100 ml de meio Fert-Talp acrescido de heparina, cobertas com óleo mineral, com concentração espermática de $2,0 \times 10^6$ espermatozóides/ml por um período aproximado de 22 horas em estufa incubadora nas mesmas condições da maturação *in vitro*.

Os possíveis zigotos foram co-cultivados com células da granulosa em CR2aa acrescido de 10% SBF, em gotas de 50 ml cobertas com óleo mineral em estufa incubadora nas mesmas condições da maturação *in vitro*. A avaliação da taxa de clivagem e a renovação do 50% do meio foram realizadas 72 horas pós-fecundação. A taxa de produção de blastocisto foi avaliada 192 horas pós-fecundação.

Análise estatística

As características número total de folículos, diâmetro do maior folículo e número de folículos grandes (≥ 9 mm), médios (6 a 8 mm) e pequenos (≤ 5 mm) foram analisadas usando o teste de Wilcoxon e as taxas de recuperação de oócitos, clivagem e produção de blastocisto pelo teste do Qui-quadrado.

Experimento 2

Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção *in vitro* de embriões em vacas da raça Gir.

Vinte e quatro vacas foram submetidas aos seguintes tratamentos:

T1: Punção folicular duas vezes por semana, sem estimulação hormonal (controle).

T2: Punção folicular uma vez por semana, após tratamento, com 160 mg de rbST(Boostin, Coopers) em aplicação única quatro dias antes de cada punção.

T3: Punção folicular uma vez por semana, após tratamento, com 160 mg de rbST em aplicação única quatro dias antes de cada punção, seguida pela administração de 250 U.I. de hormônio folículo estimulante (Pluset, Serono), distribuídos em seis aplicações em doses decrescentes (75, 50, 50, 25, 25, e 25 U.I.) administradas em intervalos de 12 horas nos três dias precedentes.

Todos os animais foram submetidos aos três tratamentos, com duas repetições para cada um deles (48 punções para cada tratamento). Cada animal foi submetido primeiro ao T1 com duas repetições, e posteriormente ao T2 e T3, respectivamente, em duas repetições (48 punções para cada tratamento).

As punções foliculares, seleção dos oócitos e a produção *in vitro* de embriões foram realizadas seguindo o experimento 1.

Análise estatística

As características número total de folículos, diâmetro do maior folículo e número de folículos grandes (≥ 9 mm), médios (6 a 8 mm) e pequenos (≤ 5 mm) foram analisadas usando o teste de Wilcoxon e as taxas de recuperação de oócitos, clivagem e produção de blastocisto pelo teste do Qui-quadrado.

Experimento 3

Avaliação ultra-estrutural de oócitos obtidos por punção folicular em vacas da raça Gir submetidas a estimulação hormonal.

Foram utilizadas seis vacas divididas em dois grupos, sendo as do grupo I ($n = 3$) submetidas aos dois tratamentos descritos no experimento 1, e as do grupo II ($n = 3$) submetidas aos três tratamentos descritos no experimento 2.

As punções foliculares e a seleção dos oócitos foram realizadas como descrito no experimento 1. Para a avaliação da ultra-estrutura em microscopia eletrônica foram utilizados 10 oócitos de cada tratamento em cada grupo.

Os oócitos selecionados foram lavados em tampão fosfato 50 mM, pH 6,8 e fixados em solução de glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato por 24 horas a 6 °C. Após a fixação primária, os oócitos foram lavados por três vezes em tampão fosfato para remoção do glutaraldeído residual e pós-fixados em solução de tetróxido de ósmio 1% em tampão fosfato por uma hora. Depois de serem novamente lavados por três vezes em tampão fosfato, os oócitos sofreram desidratação em série etanólica crescente (15, 30, 50, 60, 70, 80, 90, 100% etanol em água destilada) e foram embebidos em resina acrílica (LR White *medium grade*) por um período de sete dias, sendo mantidos em geladeira para a infiltração da resina. Subseqüentemente, os oócitos foram transferidos para cápsulas transparentes de gelatina contendo resina, postas a polimerizar em estufa a 60 °C por 18 horas.

As cápsulas polimerizadas foram selecionadas, levadas à lupa do ultramicrotomo e lapidadas à mão, utilizando-se uma gilete nova para a obtenção de blocos em forma trapezoidal contendo o oócito. A partir desses blocos foram obtidas seções semifinas (0,7 mm) e seções ultrafinas (65 nm) utilizando-se um ultramicrotomo e facas de vidro e diamante, respectivamente. Seções semifinas, para observação ao microscópio ótico, foram coletadas em lâminas de vidro contendo uma gota de água, fixadas em placa metálica aquecida e imediatamente coradas com Giemsa. Seções ultrafinas, para observação ao microscópio eletrônico de transmissão, foram recolhidas em grades de níquel (200 mesh) cobertas com filme de polivinil formol, formvar 15/95 solução 0,3% em clorofórmio e postas para secar em papel de filtro. Posteriormente, os cortes ultrafinos foram contrastados em acetato de uranila solução 5% em água por 10 minutos e citrato de chumbo solução 0,2% em NaOH 0,01N por sete a dez minutos. Após a coloração, as grades foram postas a secar em placas de petri com papel de filtro por 12 a 20 horas e examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão.

Resultados e discussão

Experimento 1

A estimulação com FSH em vacas Gir aumentou o número total de folículos ($p < 0,01$), assim como o número de folículos grandes e médios ($p < 0,01$) e o diâmetro do maior folículo ($p < 0,01$) (Tabela 1). Os resultados estão de acordo com outros autores que utilizaram protocolos similares em gado europeu (GOODHAND et al., 1999; SIRARD et al., 1999; GOODHAND et al., 2000), e caracteriza a ação do FSH sobre o desenvolvimento folicular.

Tabela 1. Características ovarianas no momento da punção folicular, n^o total de oócitos recuperados (média \pm desv. pad.) e taxa de recuperação (%), em vacas Gir não-tratadas (T1) ou tratadas (T2) com hormônio foliculo estimulante.

Tratamento	T1 (controle)	T2 (FSH)
N ^o total de folículos	13,63 \pm 5,85 ^a	20,36 \pm 9,45 ^b
Diâmetro do maior folículo	10,53 \pm 2,89 ^a	13,84 \pm 3,45 ^b
N ^o de folículos \geq 9 mm	1,03 \pm 0,96 ^a	6,84 \pm 4,34 ^b
N ^o de folículos de 6 a 8 mm	4,00 \pm 2,56 ^a	10,52 \pm 6,70 ^b
N ^o de folículos \leq 5 mm	8,23 \pm 5,70 ^a	3,00 \pm 3,68 ^b
Taxa de recuperação	71,39 ^a	67,09 ^a

^{a, b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,01$).

Taxa de recuperação = (total de oócitos recuperados por tratamento/total de folículos por tratamento) \times 100.

Apesar de alguns autores argumentarem que o tratamento com FSH aumenta o número de oócitos recuperados (MERTON et al., 2003), no presente experimento este fato não foi observado (Tabela 1). Outros autores também não observaram melhoria na taxa de recuperação de oócitos após administração de FSH antes da punção folicular (LOONEY et al., 1994). Ao contrário, tem sido demonstrado que a terapia gonadotrófica promove uma diminuição na recuperação de oócitos (GOODHAND et al., 1999; SIRARD et al., 1999).

Apesar de folículos maiores serem tecnicamente mais fáceis de aspirar que os pequenos, eles não necessariamente produzem oócitos. Um dos motivos do aumento no número de folículos não ter sido acompanhado pela melhora da taxa de recuperação de oócitos pode ser a consistência do fluido folicular. Folículos grandes, tais como os estimulados por gonadotropinas exógenas podem estar mais maduros e conter aglomerados de células da granulosa e fluido folicular mais viscoso, enquanto folículos pequenos não possuem fluido folicular viscoso e apresentam grumos menores de células (GOODHAND et al., 1999). Conseqüentemente, a pressão de vácuo de 80 mmHg utilizada no presente experimento pode não ter sido alta o suficiente para aspirar o fluido viscoso dos folículos FSH estimulados.

O FSH melhorou a qualidade dos oócitos (Tabela 2), visto que aumentou a porcentagem de oócitos classificados como de grau I e II e diminuiu a de oócitos degenerados ($p < 0,01$). Resultados semelhantes foram observados por GOODHAND et al. (1999) e ROTH et al. (2002).

A espessura do *cumulus* varia de acordo com a “saúde” e o tamanho dos folículos. Um número reduzido de camadas pode ser conseqüência de oócitos aspirados de folículos em atresia (SIRARD e BLONDIN, 1996). Sendo assim, o FSH pode ter melhorado a qualidade morfológica dos oócitos por diminuir a população de folículos atrésicos.

Tabela 2. Classificação dos oócitos recuperados em vacas Gir tratadas (T2) ou não (T1) com hormônio foliculo estimulante.

Classificação dos oócitos	T1 (controle)		T2 (FSH)	
	n	%	n	%
Grau I	55	18,84 ^a	113	42,32 ^b
Grau II	169	57,88 ^a	124	46,44 ^b
Degenerados	28	9,60 ^a	8	3,00 ^b
Total	292		267	

^{a, b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,01$).

A taxa de clivagem foi maior ($p < 0,05$) para o T2 quando comparada com a do T1, e o pré-tratamento com FSH antes da punção folicular parece melhorar a taxa de produção de embriões ($p = 0,072$) (Tabela 3). Esses resultados são similares aos obtidos por outros autores (GOODHAND et al., 1999; SIRARD et al., 1999; GOODHAND et al., 2000; ROTH et al., 2002). Sugere-se que o FSH beneficie o desenvolvimento embrionário por sincronizar a população folicular, adiantando o desenvolvimento dos folículos e iniciando a maturação *in vivo* dos oócitos, o que levaria a um aumento da competência de desenvolvimento oocitária antes da recuperação dos mesmos (GIBBONS et al., 1994). Além disso, o tratamento com FSH pode alterar o ambiente folicular ao redor do oócito, influenciando direta ou indiretamente a qualidade do oócito (GONG et al., 1997; ROTH et al., 2002).

Tabela 3. Taxas de clivagem e produção de blastocistos de oócitos recuperados *in vivo* em vacas Gir não-tratadas (T1) e tratadas com FSH (T2).

	T1		T2	
	n	%	n	%
Taxa de clivagem	90	44,78 ^a	93	56,02 ^b
Taxa de produção de blastocisto	23	11,44 ^a	30	18,07 ^a
Total de oócitos cultivados	201		166	

^{a, b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$).

Experimento 2

O uso do rbST, associado ou não ao FSH, não aumentou ($P > 0,05$) o número total de folículos submetidos a punção. O diâmetro do maior folículo, o número de folículos grandes, médios e pequenos também não diferiu ($P > 0,05$) entre o tratamento controle e o tratamento com rbST. Entretanto, associação do rbST com o FSH resultou em um aumento ($P < 0,01$) no diâmetro do maior folículo em relação ao controle e no número de folículos grandes e médios, e em uma redução ($P < 0,01$) no número de folículos pequenos em relação ao T1 e TII (Tabela 4), semelhante aos resultados obtidos com o uso exclusivo do FSH no experimento 1.

Diversos autores têm reportado que o tratamento com rbST aumenta o número de folículos ovarianos (GONG et al., 1991; 1993; KIRBY et al., 1997 a, b) e o número de folículos classificados como pequenos (GONG et al., 1991; 1993; BOLS et al., 1998; PIVATO et al., 1999; BURATINI et al., 2000; ROTH et al.,

2002). Entretanto, o crescimento folicular aumentado não foi observado após o uso da rbST no presente experimento semelhante ao observado por PAVLOK et al. (1996). Essas diferenças podem ocorrer por diversos fatores, tais como a dosagem utilizada (GONG et al., 1993; 1997), status nutricional do animal (LUCY, 2000) e diferença entre raças (BURATINI Jr. et al., 2000).

Tabela 4. Características ovarianas no momento da punção folicular, nº total de oócitos recuperados (média \pm desv. pad.) e taxa de recuperação (%) em vacas Gir não-tratadas (T1), tratadas com somatotropina bovina recombinante (T2) e com somatotropina bovina recombinante associada ao hormônio foliculo estimulante (T3).

Tratamento	T1 (controle)	T2 (rbST)	T3 (rbST + FSH)
Nº total de folículos	11,88 \pm 3,75 ^a	14,08 \pm 6,51 ^a	15,83 \pm 5,94 ^a
Diâmetro do maior folículo	9,88 \pm 3,04 ^a	12,75 \pm 5,50 ^{a b}	14,78 \pm 4,86 ^b
Nº de folículos \geq 9 mm	0,79 \pm 0,98 ^a	1,25 \pm 0,74 ^a	6,00 \pm 3,88 ^b
Nº de folículos de 6 a 8 mm	3,46 \pm 1,77 ^a	2,54 \pm 1,70 ^a	7,35 \pm 4,18 ^b
Nº de folículos \leq 5 mm	7,58 \pm 2,72 ^a	10,38 \pm 5,96 ^a	2,39 \pm 2,50 ^b
Taxa de recuperação	62,81 ^c	49,40 ^d	56,87 ^c

^{a, b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,01$).

^{c, d} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$).

Taxa de recuperação = (total de oócitos recuperados por tratamento/total de folículos por tratamento) \times 100.

A taxa de recuperação não diferiu ($P > 0,05$) entre o controle (T1) e a associação do rbST com o FSH (T3) (Tabela 4), semelhante ao observado quando se utilizou somente o FSH (experimento 1). Porém, o tratamento com rbST (T2) promoveu uma diminuição ($P < 0,05$) na taxa de recuperação (Tabela 4). O uso do rbST antes das sessões de punção folicular não tem melhorado a taxa de recuperação em bovinos (BOLS et al., 1998; PIVATO et al., 1999; TRIPP et al., 2000). Sugere-se que o rbST possa alterar a morfologia da parede folicular ou do complexo *cumulus*-oócito, direta ou indiretamente pela ação do IGF-1, resultando no impedimento da recuperação do oócito (TRIPP et al., 2000). A associação do rbST ao FSH (T3) pode ter evitado esse efeito da somatotropina por ter aumentado o número de folículos grandes e médios (Tabela 4), amenizando a retenção do oócito ocasionada, possivelmente, por alterações nas células do *cumulus*.

O rbST também não melhorou a qualidade morfológica dos complexos *cumulus*-oócito recuperados, uma vez que não aumentou ($p > 0,05$) a porcentagem de oócitos classificados como viáveis (grau I e II). Outros autores também

não evidenciaram melhoria na qualidade dos oócitos utilizando rbST antes das sessões de punção folicular (BOLS et al., 1998; TRIPP et al., 2000). Entretanto, a associação ao FSH (T3) aumentou ($p < 0,05$) a porcentagem de complexos *cumulus*-oócito do grau I e diminuiu ($p < 0,01$) a de oócitos degenerados (Tabela 5), como observado anteriormente com o tratamento utilizando somente FSH (Experimento 1).

Tabela 5. Classificação dos oócitos recuperados em vacas Gir não-tratadas (T1), tratadas com somatotropina bovina recombinante (T2) e com somatotropina bovina recombinante associada ao hormônio foliculo estimulante. (T3).

Classificação dos oócitos	T1 (controle)		T2 (rbST)		T3 (rbST + FSH)	
	n	%	n	%	n	%
Grau I	37	20,67 ^a	37	22,16 ^a	67	32,37 ^b
Grau II	92	51,40 ^a	94	56,29 ^a	118	57,00 ^a
Degenerados	32	17,88 ^c	24	14,37 ^c	10	4,83 ^d
Total	179		167		207	

^{a, b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$).

^{c, d} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,01$).

A somatotropina parece melhorar a competência de desenvolvimento dos oócitos, visto que aumentou as taxas de clivagem ($P < 0,05$) e de produção de blastocistos ($P < 0,01$) quando utilizada sozinha, e melhorou o desenvolvimento embrionário ($P = 0,064$) quando associada ao FSH (Tabela 6). Segundo GONG et al. (1996), o tratamento com rbST tem melhorado a competência de desenvolvimento dos oócitos e a qualidade dos embriões em bovinos. O efeito benéfico do rbST no desenvolvimento embrionário pode estar relacionado a influências diretas ou indiretas no microambiente folicular e/ou no próprio oócito. Uma das mudanças obtidas pela administração de rbST é aumento das concentrações intrafoliculares de IGF-1 (ROTH et al., 2002), o que poderia resultar no aumento da eficiência do desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Outros autores, entretanto, não obtiveram aumento nas taxas de clivagem e produção de blastocistos após a utilização de rbST ou IGF-1 *in vitro*, bem como com o tratamento com rbST *in vivo* (BOLS et al., 1998; PIVATO et al., 1999; TRIPP et al., 2000). A utilização de diferentes sistemas de cultivo *in vitro*, diferenças nas doses de rbST usadas *in vivo* e *in vitro* e oócitos provenientes de animais de raças diferentes podem ser responsáveis pela obtenção de resultados divergentes.

Tabela 6. Taxas de clivagem e produção de blastocistos de oócitos recuperados *in vivo* em vacas Gir não-tratadas (T1), tratadas com somatotropina bovina recombinante (T2) e com somatotropina bovina recombinante associada ao hormônio folículo estimulante. (T3).

	T1 (controle)		T2 (rbST)		T3 (rbST + FSH)	
	n	%	n	%	n	%
Taxa de clivagem	77	46,11 ^a	78	60,47 ^b	74	50,34 ^{a b}
Taxa de produção de blastocisto	13	7,78 ^c	25	19,38 ^d	21	14,29 ^{c d}
Total de oócitos cultivados	167		129		147	

^{a, b} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,05$).

^{c, d} Médias seguidas por letras diferentes na mesma linha diferem entre si ($p < 0,01$).

Experimento 3

No grupo I, dos dez oócitos provenientes do tratamento controle, nove apresentavam pequenos agrupamentos de grânulos corticais (3 a 15 grânulos), vesículas de lipídios e alguns grânulos isolados espalhados por todo ooplasma, maiores agrupamentos de grânulos (> 15) localizados no interior do oócito e espaço perivitelíneo ausente. Um oócito apresentava os agrupamentos de grânulos corticais mais próximos e mais alinhados à zona pelúcida. Dos oócitos provenientes do tratamento com FSH, nove apresentavam grandes agrupamentos de grânulos corticais e alguns grânulos isolados localizados principalmente na região cortical do ooplasma, maior quantidade de vesículas de lipídios e espaço perivitelíneo ausente, enquanto um oócito apresentava menor quantidade de grânulos e vesículas. Todos os oócitos do grupo I apresentavam a membrana do núcleo ondulada.

No grupo II, todos os dez oócitos do tratamento controle apresentavam configuração semelhante à observada na maioria dos oócitos do mesmo tratamento no grupo I. Oito oócitos provenientes do tratamento com rbST apresentavam grandes agrupamentos de grânulos corticais e vesículas de lipídios localizados na periferia do oócito alinhados próximo à zona pelúcida, espaço perivitelíneo ausente e apenas alguns pequenos agrupamentos de grânulos e grânulos isolados espalhados no ooplasma; enquanto os dois oócitos restantes apresentavam grandes agrupamentos de grânulos corticais e vesículas espalhados por todo ooplasma. Dos dez oócitos oriundos do tratamento com rbST associado ao FSH, seis apresentavam configuração semelhante à da maioria dos oócitos do tratamento com rbST, três eram semelhantes à maioria dos oócitos do tratamento com FSH e um acompanhava os padrões da configuração do tratamento controle. Todos os oócitos do grupo II apresentavam a membrana do núcleo ondulada.

Os resultados do presente experimento demonstram que o tratamento hormonal alterou, principalmente, a distribuição dos grânulos corticais no ooplasma, sugerindo que a terapia estimulatória utilizando FSH, rbST ou rbST associada ao FSH promoveu o início da maturação do oócito.

A redistribuição dos grânulos corticais pode ser considerada uma das evidências morfológicas da maturação citoplasmática, visto que, nos oócitos imaturos, os grânulos formam grandes aglomerados distribuídos por todo ooplasma, dispersando-se centrifugamente com o progresso da maturação (HYTTEL et al., 1989; WANG et al., 1997). Diversos autores sugerem que a terapia gonadotrófica beneficie o desenvolvimento embrionário por alterar o ambiente folicular ao redor do oócito, influenciando direta ou indiretamente a competência oocitária, e iniciar a maturação *in vivo* (GONG et al., 1996; 1997; LUCY, 2000; ROTH et al., 2002). Tal fato pode ter ocorrido no presente experimento, pois os oócitos provenientes dos tratamentos que utilizaram estimulação hormonal apresentaram melhores taxas de clivagem e produção de blastocistos *in vitro* (Experimento 1 e 2) e grânulos corticais localizados principalmente na região cortical do oócito.

Conclusões

- O uso do FSH antes das sessões de punção folicular mostrou ser uma alternativa para a melhoria da produção *in vitro* de embriões em animais da raça Gir.
- O rbST sozinho não alterou a dinâmica folicular em vacas Gir, o que ocorreu quando associado ao FSH.
- O uso de rbST, associado ou não ao FSH, antes das sessões de punção folicular mostrou ser uma alternativa para a melhoria da produção *in vitro* de embriões em animais da raça Gir.
- A estimulação hormonal com FSH, rbST ou associação de ambos, antes da punção folicular, iniciou a maturação citoplasmática dos oócitos de vacas da raça Gir.

Agradecimentos

A Fapemig, pelo apoio financeiro e à Embrapa Agrobiologia, pelo auxílio na realização das análises de microscopia eletrônica.

Referências bibliográficas

- BOLS, P.E.J., YSEBAET, M.T., LEIN, A., CORYN, M., VAN SOOM, A., de KRUIF, A. Effect of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in OPU-IVF program. **Theriogenology**, v.49, p.983-995, 1998.
- BURATINI Jr., J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A. et al. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, p. 421-431, 2000.
- FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, 1997.
- FREITAS, C.; SÁ, W. F.; FERREIRA, A. M. et al. Produção de embriões em doadoras Gir utilizando doses reduzidas de FSH - Resultados preliminares. **Arquivo da Faculdade de Veterinária de UFRGS**, v. 26 (supl.), n. 01, p. 272, 1998.
- GIBBONS, J. R.; BEAL, W. E.; KRISHER, R. L. et al. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, v. 42, p. 405-419, 1994.
- GONG, J. G.; BAXTER, G; BRAMLEY, T. A et al. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotropin: a dose-response study. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 110, p. 91-97, 1997.
- GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; WILMUT, I. et al. Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory responses to FSH in heifers. **Theriogenology**, v. 45, p 611-622, 1996.
- GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 97, p. 247-254, 1993.
- GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 941-949, 1991.

GOODHAND, K. L.; STAINS, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M. et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine treated with progesterone, oestradiol and FSH. **Animal Reproduction Science**, v. 63, p. 145-158, 2000.

GOODHAND, K. L.; WATT, R. G.; STAINES, M.E. et al. In vivo recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951-961, 1999.

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLENSSEN, H. Cortical granule dynamics in cattle ova. **Theriogenology**, v. 31, p. 205, 1989.

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

KIRBY, C.J., WILSON, S.J., LUCY, M.C. Response of dairy cows treated with somatotropin to a luteolytic dose of prostaglandin F₂ alfa. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.286-294, 1997b.

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

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

MERTON, J. S.; de ROOS, A. P. W.; MULLAART, E. et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, v. 59, p. 651-667, 2003.

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

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

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

SANTOS, J. C. Estudo da dinâmica folicular através da ultra-sonografia em bovinos da raça Gir no inverno e verão. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal Fluminense. 2001. 92p.

SEGERSON, E. C.; HANSEN, T. R.; LIBBY, D. W. et al. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, v. 59, 1026-1046, 1984.

SIRARD, M. A.; PICARD, L.; DERY, M. et al. The time interval between FSH administration and ovarian aspiration influences the developmental of cattle oocyte. **Theriogenology**, v. 51, p. 699-708, 1999.

SIRARD, M. A.; BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 417-426, 1996.

TRIPP, M. W.; JU, J. C.; HOAGLAND, T. A. et al. Influence of somatotropin and nutrition on bovine oocyte retrieval and in vitro development. **Theriogenology**, v. 53, p. 1581-1590, 2000.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F. et al. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. 2501-2509, 2000.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F. et al. Características morfológicas e funcionais do corpo lúteo durante o ciclo estral em vacas da raça Gir. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 03, p. 251-256, 1999.

VISINTIN, J. A.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H. et al. Efeito de diferentes doses de FSH/LH sobre a resposta superovulatória em novilhas de raça Nelore. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 24 (supl.), p. 222, 1996.

WANG, W.; HOSOE, M.; LI, R. et al. Development of bovine oocytes to release cortical granules and block polyspermy after meiotic maturation. **Development, Growth and Differentiation**, v. 39, p. 607-615, 1997.