



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

Produção *in vitro* de embriões e expressão gênica de IGF-I e IGF-II em embriões de fêmeas bovinas da raça Nelore submetidas a administrações de somatotropina recombinante bovina

RAFAEL SOARES DOS ANJOS

RECIFE - PE

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

**Produção *in vitro* de embriões e expressão gênica de IGF-I e IGF-II em embriões de fêmeas
bovinas da raça Nelore submetidas a administrações de somatotropina recombinante
bovina**

RAFAEL SOARES DOS ANJOS

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal
Tropical, como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Mestre em Ciência
Animal Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Ferrer
Carneiro

Co-orientador: Dr. Sebastião Inocêncio
Guido

RECIFE - PE

2014

Ficha Catalográfica

A597p Anjos, Rafael Soares dos
Produção *in vitro* de embriões e expressão gênica de IGF-I e IGF-II em embriões de fêmeas bovinas da raça Nelore submetidas a administrações de somatotropina recombinante bovina / Rafael Soares dos Anjos. -- Recife, 2014.
45 f.: il.

Orientador (a): Gustavo Ferrer Carneiro.
Dissertação (Mestrado em Ciência Animal Tropical) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Recife, 2014.
Inclui anexo(s) e referências.

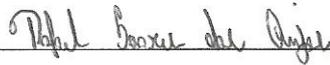
1. Embriões 2. PIVE 3. rbST 4. Expressão gênica 5. IGF-I 6. IGF-II I. Carneiro, Gustavo Ferrer, orientador II. Título

CDD 591.4

Dissertação à disposição na Biblioteca Central da Universidade Federal Rural de Pernambuco. A transcrição ou utilização de trechos deste trabalho é permitida, desde que respeitadas às normas de ética científica.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL TROPICAL

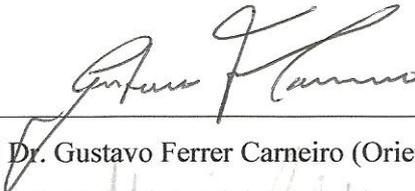
**Produção *in vitro* de embriões e expressão gênica de IGF-I e IGF-II em embriões de fêmeas
bovinas da raça Nelore submetidas a administrações de somatotropina recombinante
bovina**



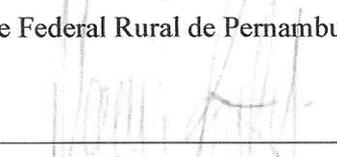
Rafael Soares dos Anjos

Aprovado em 26 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro (Orientador)
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE



Prof. Dr. Marcelo Bertolini

Universidade de Fortaleza – UNIFOR



Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE



Prof. Dr. José Wilton Pinheiro Junior
Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE

DEDICATÓRIA

À minha família e em especial ao mais novo membro dela: a minha filha, Maria Alice. Amo todos vocês!

"É fazendo que se aprende a fazer aquilo que se deve aprender a fazer."

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais José Firmino e Ediane, por serem o meu pilar e os responsáveis por fazerem tornar-me o que sou.

Ao meu orientador e amigo Gustavo Ferrer, por contribuir para/com o meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos integrantes do Laboratório de Reprodução Animal da Unidade Acadêmica de Garanhuns/UFRPE. Em particular à Flávia, pela ajuda espontânea e bem-vinda quando fez-se necessária.

A todos que compõem a Embriza Biotecnologia/MS, representados por Carlos Alberto Zanenga, pelas instruções iniciais em aspiração folicular em fêmeas bovinas.

A todos do Laboratório H02 da Universidade de Fortaleza/CE, liderados por Marcelo e Luciana Bertolini. Em especial ao próprio Marcelo e aos amigos Leonardo, Luís e Kaio – grandes colaboradores para a realização deste trabalho.

À equipe de manejo da Fazenda Santa Luzia/PE, onde foram realizadas as atividades experimentais envolvendo os animais do presente estudo, pela disponibilidade e prontidão.

Ao IPA e à pessoa de Sebastião Guido, pela co-orientação.

Aos colegas e professores de disciplinas do Mestrado, pela convivência e troca de experiências.

Aos amigos Camila Pereira, Diogo Silva e aos professores Aurea Wischral e José Wilton Pinheiro Junior, pela ajuda na etapa final de escrita desta dissertação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical (principalmente à professora e coordenadora do curso Marleyne Amorim) e à Universidade Federal Rural de Pernambuco, por abrirem as portas e dar-me oportunidade de alcançar mais um degrau na vida.

Aos demais que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa.

FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho de dissertação teve o apoio da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), no financiamento da bolsa de Mestrado.

O laboratório Coopers Saúde Animal contribuiu para a realização desta pesquisa, mediante doação de fármacos administrados nas vacas envolvidas no experimento.

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões	17
2.1.1. Aspiração folicular ou <i>ovum pick up</i> (OPU)	17
2.1.1.1. Aspectos que interferem na OPU	18
2.1.1.1.1. Aspectos técnicos que interferem na OPU	19
2.1.1.1.1.1. Transdutor	19
2.1.1.1.1.2. Agulha	19
2.1.1.1.1.3. Pressão a vácuo	20
2.1.1.1.2. Aspectos biológicos que interferem na OPU	20
2.1.2. Maturação <i>in vitro</i>	21
2.1.3. Fecundação <i>in vitro</i>	22
2.1.4. Cultivo <i>in vitro</i>	22
2.2. Somatotropina recombinante bovina	22
2.3. Fatores de crescimento semelhantes à insulina e expressão gênica	23
3. OBJETIVOS	25
3.1. Geral	25
3.2. Específicos	25
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
5. ARTIGO	34
6. CONCLUSÃO	45
7. ANEXOS	46

LISTA DE FIGURAS

Figura I	Demonstração externa do procedimento de <i>ovum pick up</i> (OPU).....	18
Figura II	Óocitos em diversos graus de classificação.....	21
Figura 1	Níveis de expressão do gene IGF-II, em blastocistos de fêmeas Nelore, nos grupos controle (solução salina) e tratamento (rbST).....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Detalhes dos iniciadores utilizados para as qPCRs dos genes IGF-I, IGF-II e controle endógeno RPS9.....	38
Tabela 2	Dados inerentes aos diferentes graus de viabilidade dos oócitos recuperados, a partir de fêmeas Nelore, nos grupos controle (solução salina) e tratamento (rbST).....	40
Tabela 3	Resultados da PIVE, a partir de fêmeas Nelore, nos grupos controle (solução salina) e tratamento (rbST).....	41

ABREVIATURAS E DEFINIÇÕES

PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
rbST	Somatotropina recombinante bovina
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
OPU	<i>Ovum pick up</i>
US	Ultrassonografia
MHz	Megahertz
G	Gauge
mmHg	Milímetros de mercúrio
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
ST	Somatotropina
GH	Hormônio do crescimento
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
qPCR	Reação em cadeia de polimerase em tempo real

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos constitui-se em uma ferramenta que serve para aumentar o potencial reprodutivo de fêmeas consideradas excepcionais, principalmente, como instrumento para acelerar o progresso dos programas de seleção animal. Com o intuito de melhorar taxas e índices, sintéticos exógenos vêm sendo utilizados corriqueiramente na área da reprodução animal. Pesquisa-se atualmente a utilização da somatotropina recombinante bovina (rbST), tida como substância que acarreta o aumento de receptores para o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF). Tanto os IGFs tipos I e II como seus receptores (IGF-IR e IGF-IIR) são expressos em oócitos e embriões bovinos e ovinos produzidos *in vitro* - o que pode comprovar a relação do sistema IGF com a PIVE. Estudos tem comprovado tendência em melhora da qualidade oocitária nos animais tratados com rbST, bem como aumento da taxa de fecundação e melhoria na qualidade de embriões. Este experimento objetivou estudar a influência da rbST sobre a quantidade e qualidade de oócitos aspirados *in vivo*, produção embrionária e expressão gênica de IGF-I e IGF-II em embriões produzidos *in vitro* de fêmeas bovinas da raça Nelore. Cinco vacas foram tratadas com duas administrações de 2mL de solução salina como placebo, com intervalo de catorze dias entre elas, sendo a primeira administração realizada dezoito e a segunda cinco dias antes das aspirações foliculares; decorridos trinta dias após estas aspirações, em sistema *crossover*, o mesmo protocolo foi utilizado nesses cinco animais sendo, neste caso, a solução salina substituída por 500mg de rbST, com o intuito de efetuar-se comparações entre os tratamentos. Realizou-se a PIVE a partir dos oócitos recuperados nesta pesquisa, sendo todas as etapas que envolvem este processo analisadas e com posterior realização de reações em cadeia da polimerase em tempo real (qPCRs) para expressões gênicas de IGF-I e IGF-II nos blastocistos produzidos. Observou-se que a rbST não exerceu influência significativa sobre a quantidade e qualidade de oócitos aspirados *in vivo*, produção embrionária e expressão gênica de IGF-I e IGF-II em embriões produzidos *in vitro* de fêmeas bovinas da raça Nelore.

Palavras-chave: embriões, PIVE, rbST, expressão gênica, IGF-I, IGF-II.

ABSTRACT

In vitro production of bovine embryos (IVP) is a tool that serves to increase reproductive potential of females considered exceptional, especially, as an instrument to accelerate the progress of animal selection programs. In order to improve results, exogenous synthetic hormones are being used routinely in the animal reproduction industry. Currently there is a research using recombinant bovine somatotropin (rbST), as a substance that causes the increase in receptors for insulin-like growth factor (IGF). Both IGFs type I and type II and its receptors (IGF-IR and IGF-IIR) are expressed in *in vitro* produced bovine and ovine oocytes and embryos from which one can prove the close relation of IGF system with the IVP. Researches have proven a trend in oocyte quality improvement in animals treated with rbST, as well as increased fertilization rate and embryo quality improvement. This experiment aimed to study the effect of rbST on quantity and quality of *in vivo* aspirated oocytes, embryo production and gene expression of IGF-I and IGF-II *in vitro* produced embryos of bovine females of Nelore breed. Five cows were treated with two administrations of 2mL of saline solution as a placebo, with an interval of 14 days between them, being the first administration performed 19 and the second 5 days before follicular aspirations; 30 days after these aspirations, in crossover system, same protocol was used in these five animals being, in this case, the saline solution replaced by 500mg of rbST in order to compare treatments. It was held to IVP of oocytes recovered from this research, being all the steps that involve this process evaluated with subsequent achievement of polymerase chain reactions in real time (qPCRs) for gene expression of IGF-I and IGF-II in the blastocysts produced in the experiment. No difference was observed on quantity and quality of aspirated oocytes *in vivo*, embryo production and gene expression of IGF-I and IGF-II *in vitro* produced embryos of bovine females of Nelore breed under the influence of rbST.

Keywords: embryos, IVP, rbST, gene expression, IGF-I, IGF-II.

1. INTRODUÇÃO

A pecuária nacional tem posição de destaque no cenário econômico mundial, pois segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) o Brasil lidera o *ranking* de maior exportador de carne bovina no Mundo desde 2008 e a estatística mostra crescimento também para os próximos anos (a exportação de carne bovina crescerá em 2,15% ao ano).

A otimização da eficiência reprodutiva é um dos principais fatores que contribuem para o incremento na eficiência produtiva e lucratividade dos rebanhos bovinos (KOZICKI et al., 2005) e, por isso, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos constitui-se em uma ferramenta que serve para aumentar o potencial reprodutivo de fêmeas consideradas excepcionais, principalmente, como instrumento para acelerar o progresso dos programas de seleção animal (GONÇALVES et al., 2002).

De acordo com a Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ), em 2007 foram produzidos 210.937 embriões *in vitro*, com destaque para a raça Nelore PO – a partir da qual houve produção embrionária representativa dentro deste montante (152.029 embriões).

Com o intuito de melhorar taxas e índices, sintéticos exógenos vêm sendo utilizados corriqueiramente na área da reprodução animal. Pesquisa-se atualmente a utilização da somatotropina recombinante bovina (rbST), tida como substância que acarreta o aumento de receptores para o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) favorecendo o recrutamento folicular ovariano (FONSECA, 1999; LUCY, 2000; KOZICKY et al., 2005), estimulando o crescimento e desenvolvimento folicular (WEBB et al., 1994; BURATINI et al., 2000), aumentando a sensibilidade das células foliculares aos hormônios luteinizante e folículo estimulante (GONG et al., 1995; CHASE et al., 1998).

Estudos têm comprovado tendência em melhora da qualidade oocitária nos animais tratados com rbST (PAVLOK et al., 1996). Moreira et al. (2002) atribuíram à rbST o aumento da taxa de fecundação e melhoria na qualidade de embriões. Portanto a administração de tal droga em fêmeas bovinas poderá contribuir no recrutamento folicular aumentando, possivelmente, a viabilidade oocitária e conseqüentemente embrionária.

Em se tratando do sistema IGF e a produção de embriões: os IGFs são de grande importância para os estádios iniciais da foliculogênese, já que a desativação de genes do sistema em questão levou ao comprometimento severo do desenvolvimento folicular pré-antral a antral

(BURATINI, 2006) e, segundo Lonergan et al. (2003), tanto os IGFs tipos I e II como seus receptores (IGF-IR e IGF-IIR) são expressos em oócitos e embriões bovinos e ovinos produzidos *in vitro* – o que pode comprovar a relação do sistema IGF com a PIVE.

Logo é sugestiva a importância fundamental da realização de pesquisas visando melhores resultados em termos de produção de embriões, com o estabelecimento de protocolos para serem utilizados na PIVE.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção *in vitro* de embriões

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

Em todas as fêmeas de mamíferos, a reserva de oócitos, provenientes de folículos ovarianos, é estabelecida durante a vida fetal. Ao nascimento a fêmea bovina possui 150.000 folículos primordiais e ao chegar à puberdade este número diminui para 86.000 a 12.000 sendo gradualmente mobilizados durante a vida reprodutiva, onde poucos chegam à ovulação, com o restante sofrendo atresia (VIANA; BOLS, 2005; MARTINEZ; SOUZA, 2007). O advento da PIVE torna possível a utilização desses oócitos que naturalmente não chegariam à ovulação, dentre outras vantagens da biotécnica em questão.

A PIVE envolve as etapas de coleta, maturação *in vitro* (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos, bem como co-cultivo ou cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e estruturas embrionárias (GONÇALVES et al., 2002).

2.1.1. Aspiração folicular ou *ovum pick up* (OPU)

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

Em 1988, Pieterse et al. modificaram a técnica de punção transvaginal guiada por ultrassonografia (US), originalmente proposta para humanos (LENZ et al., 1987), para ser empregada na espécie bovina. Esta metodologia apresentou-se pouco invasiva e de alta repetibilidade (PIETERSE et al., 1992), sendo posteriormente denominada “*ovum pick up*” (Figura I) – a qual tornou-se a ferramenta de escolha para recuperação de oócitos em vacas doadoras (DE ROOVER et al., 2008).



Figura I: Demonstração externa do procedimento de *ovum pick up* (OPU).

Fonte: ANJOS, R. S. (2012).

Este método de aspiração *in vivo* associado à FIV é ainda de fundamental importância para produzir embriões de vacas prenhes, de fêmeas que não respondem à superovulação ou ainda de animais portadores de patologias reprodutivas adquiridas, senis ou pré-púberes. Em todos estes casos as fêmeas podem ser utilizadas em sessões de aspiração folicular semanais, sem causar transtornos para o ciclo estral ou prenhez (BOUSQUET et al., 1999).

2.1.1.1. Aspectos que interferem na OPU

A eficiência da aspiração folicular está relacionada a aspectos técnicos e biológicos. Sendo exemplos de aspectos técnicos os correspondentes ao tipo e frequência do transdutor, à agulha e pressão a vácuo utilizadas nas OPU; e os biológicos compreendem a fase reprodutiva a qual a fêmea se encontra, as terapias hormonais, o tamanho dos folículos, além da raça dos animais (SENEDA; BLASCHI, 2004).

2.1.1.1.1. Aspectos técnicos que interferem na OPU

2.1.1.1.1.1. Transdutor

Uma importante conquista brasileira refere-se ao pioneirismo da utilização do transdutor endo-vaginal humano ou micro-convexo, nas aspirações. Este transdutor mostrou-se altamente adequado às condições anatômicas de vacas pequenas e novilhas pré-púberes, além de permitir ótima visualização dos folículos na fêmea (pela facilidade de manipulação ovariana), apresentando, ainda, uma imagem ultrassonográfica de alta resolução e com grande ângulo de abertura (AERTS et al., 2004).

Especificamente para a OPU as metodologias desenvolvidas foram propostas utilizando tanto transdutores lineares como convexas, com frequências variadas, existindo relatos da utilização de transdutores de 3.5, 5.0, 6.5 ou 7.5MHz (SENEDA; BLASCHI, 2004). A simples variação da frequência do transdutor pode alterar a taxa de recuperação oocitária devido, principalmente, a melhor visualização (melhor definição de bordas), como se pode observar quando utilizados equipamentos com maior frequência (HASHIMOTO et al., 1999).

2.1.1.1.1.2. Agulha

Inicialmente a OPU era realizada apenas com agulhas longas (55cm), altamente eficientes, pois eram produzidas especificamente para aspiração folicular (PIETERSE et al., 1988). Mas as desvantagens do elevado custo, a baixa eficiência quando reutilizada e as lesões ovarianas causadas por isso, conduziram sua utilização para um franco declínio no Brasil. É que com a perda do bisel, as agulhas promovem lesões mais severas quando comparadas às agulhas hipodérmicas descartáveis (DÓRIA et al.; 2008). Já estas vêm sendo utilizadas corriqueiramente em substituição àquelas.

Em relação ao diâmetro, segundo Viana (2002), agulhas de calibres entre 17 e 21G são normalmente utilizadas para OPU em bovinos, com boa taxa de recuperação oocitária. O mesmo autor destaca ainda que o calibre interno é a característica mais importante da agulha de punção folicular, pois está diretamente relacionada à velocidade do fluxo do fluido, ao volume do espaço morto e à ocorrência de turbulência no sistema de aspiração.

Alterações na velocidade do fluxo ou o aumento da turbulência no sistema podem influenciar negativamente a taxa de recuperação, a qualidade e a capacidade de desenvolvimento *in vitro* dos oócitos recuperados (BOLS et al., 1997). Então recomenda-se a utilização de agulhas de menor diâmetro, visto que o movimento dos fluidos nestas é mais lento e laminar, resultando em menor turbulência (HORNE et al., 1996), com melhores resultados no condizente à recuperação oocitária.

2.1.1.1.1.3. Pressão a vácuo

Várias pressões a vácuo têm sido utilizadas em punção folicular, variando entre 30 a 400mmHg negativos (BOLS et al., 1996). Pressões entre -50 e -100mmHg são as mais frequentemente utilizadas, que correspondem a uma vazão de aproximadamente 5 a 40mL de fluido por minuto, dependendo do diâmetro da agulha (FRY et al., 1997).

O aumento da pressão a vácuo resulta em aumento da taxa de recuperação oocitária. Entretanto pressões acima de 80mmHg negativos promovem um aumento significativo do número de complexos *cumulus*-oócito (COCs) parcialmente ou totalmente desnudos (HASHIMOTO et al., 1999), o que é indesejável, em relação à PIVE.

2.1.1.1.2. Aspectos biológicos que interferem na OPU

O número de folículos disponíveis para a OPU apresenta considerável variação conforme a dinâmica folicular, sendo o início da onda folicular o momento mais favorável para a recuperação de COCs, pelo maior número de folículos existentes nesse estágio e pela melhor eficiência de captação de oócitos a partir dos folículos menores (SENEDA et al., 2001).

É possível alcançar o momento acima mencionado, artificialmente, com o estabelecimento de protocolos de sincronização de onda folicular, ainda que a OPU possa ser realizada em qualquer fase do ciclo estral da fêmea bovina e inclusive por essa ser uma vantagem da técnica. Porém, uma vez que a ovulação não é desejada, preconiza-se a aspiração quando os folículos se apresentam com 4 a 6mm de diâmetro. Seguindo o referido protocolo, este padrão geralmente ocorre de 2 a 4 dias após o período esperado de emergência de onda, ou seja de 6 a 8 dias após a administração inicial de estrógeno e progesterona (BACELAR et al., 2006).

Já o uso de hormônios gonadotróficos tem acontecido principalmente em vacas de raças europeias, pois animais *Bos taurus indicus* naturalmente apresentam um maior número de folículos por onda e talvez, por este motivo, o uso de gonadotrofinas tenha um impacto menor no crescimento folicular e na conseqüente disponibilidade de oócitos para a produção de embriões (SENEDA et al., 2006).

2.1.2. Maturação *in vitro*

Como os COCs aspirados estão em diferentes estágios e enfatizando que é preciso torná-los competentes às fecundações, faz-se necessária a MIV (processo de cultivo *in vitro*, responsável pela maturação citoplasmática e nuclear dos oócitos). Segundo Souza (2007), esta etapa se completa entre 20 e 24 horas após a OPU e seleção oocitária.

Em relação aos critérios de seleção dos COCs para a MIV, pesquisas indicavam que apenas oócitos completamente cobertos por camadas de células do *cumulus* eram capazes de completar sua maturação e seguir à produção embrionária. Atualmente, de acordo com Palma (2001), fica comprovado que oócitos parcialmente cobertos por camadas de células do *cumulus* também são capazes de chegar à fase de embriões, com viabilidade variável. De acordo com Gonçalves et al. (2008), os complexos *cumulus*-oócito considerados viáveis são classificados em GI, GII, GIII e GIV (Figura II) – em ordem decrescente de viabilidade.

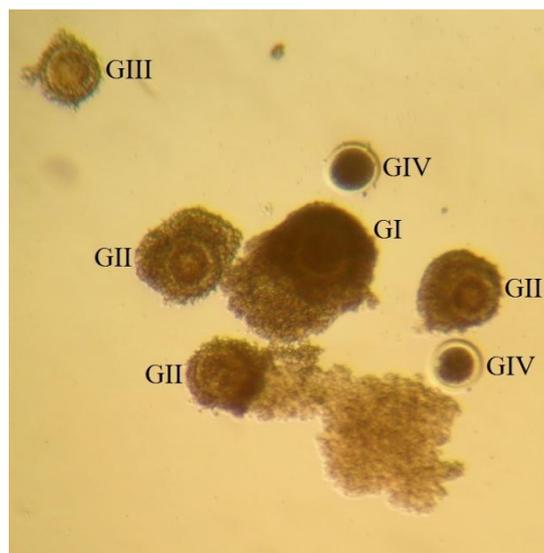


Figura II: Óocitos em diversos graus de classificação.

Fonte: ANJOS, R. S. (2013).

2.1.3. Fecundação *in vitro*

Na FIV, os oócitos maturados são co-cultivados com espermatozoides pré-capacitados e então ocorre a concepção fora do corpo do animal (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998). Contudo, antes da FIV, as células espermáticas devem passar por um processo de preparação *in vitro* com o objetivo de iniciar sua capacitação e tornarem-se capazes em fecundar os oócitos (PALMA, 2001).

A heparina é um agente capacitante quase sempre adicionada ao meio de FIV para induzir a capacitação espermática *in vitro*. Mendes et al. (2003) observaram que a heparina melhorou as taxas de fecundação *in vitro* independentemente da técnica de separação dos espermatozoides, apesar das observações das indústrias da FIV bovina que indicaram que a heparina pode não ser necessária para os espermatozoides bovinos criopreservados que foram separados pelo gradiente Percoll.

2.1.4. Cultivo *in vitro*

O CIV é responsável pela manutenção bem como desenvolvimento dos zigotos, provenientes das FIVs, até o estágio de mórula ou blastocisto (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1998).

É necessário no CIV o uso de meios simples, mas que suportem a nutrição celular e o desenvolvimento durante a fase de pré-implantação embrionária. A composição dos meios é baseada nos fluidos do útero e do oviduto de fêmeas gestantes (GONÇALVES et al., 2002).

2.2. Somatotropina recombinante bovina

A somatotropina (ST) ou hormônio do crescimento (GH) é um hormônio proteico sintetizado e secretado pela hipófise anterior (CURSIO, 2005). Tem a capacidade de agir nos tecidos muscular, adiposo e hepático, sendo seus principais efeitos observados no aumento dos tecidos esqueléticos e musculares, elevação dos níveis de glicose circulante e estímulo sobre o pâncreas para a liberação de insulina (PRADO et al., 2003).

Além de ações no crescimento e nutrição dos animais, a ST tem função reprodutiva, pois uma variedade de mRNAs para receptores da ST foram encontrados no hipotálamo, hipófise,

corpos lúteos, folículos ovarianos, oviduto, endométrio, miométrio e placenta (KIRBY et al., 1996), sendo o fígado o órgão com maior quantidade de receptores para a ST (LUCY et al., 1998).

Visando inicialmente o aumento da produção leiteira em ruminantes (BORGES et al., 2001), foram desenvolvidos processos de produção da rbST em escala industrial, a partir da técnica de DNA recombinante em *Escherichia coli* (SANTOS et al., 2001), sendo, na atualidade, a rbST bastante utilizada também na reprodução animal.

Os órgãos reprodutivos das fêmeas bovinas sofrem ação da rbST aumentando a população de folículos antrais recrutados (BURATINI et al., 1999), controlando o crescimento folicular e a função do corpo lúteo (LUCY et al., 1993). No útero, estimula a atividade secretória das glândulas endometriais (THATCHER et al., 2001), além de ser capaz de melhorar o desenvolvimento e sobrevivência embrionários (MOREIRA et al., 2002), aumentando, conseqüentemente, os índices de prenhez (WHATES et al., 1998).

A rbST persiste na corrente circulatória por até três semanas após à administração (CUSHMAN et al., 2001) e, de acordo com Lucy (2000), a maior influência da rbST é tida de modo indireto, via IGF-I.

2.3. Fatores de crescimento semelhantes à insulina e expressão gênica

O sistema IGF é composto por IGF-I e IGF-II, por dois tipos de receptores (IGF-IR e IGF-IIR), por seis proteínas ligantes à IGF que são as IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 e -6 e por enzimas de inativação (IGFBPases). Não existe especificidade para receptor, porém quando o IGF-II se liga ao receptor tipo II, não desencadeia o sinal à célula, por ser inativo. As proteínas ligantes de baixo peso molecular (IGFBP-2, -4 e -5) apresentam maior afinidade pelos IGFs impedindo que estes se liguem aos receptores. A função das IGFBPases é degradar as IGFBPs possibilitando maior disponibilidade de IGF (livre) para se ligar aos receptores (FORTUNE et al., 2001).

Os IGFs atuam como mediadores na maioria das ações promotoras do GH, regulam a proliferação e a diferenciação de vários tipos celulares e têm efeitos metabólicos semelhantes à insulina. No entanto, diferentemente da insulina, são produzidos pela maioria dos tecidos e têm capacidade de atuar por via endócrina, assim como por mecanismos parácrino e/ou autócrino (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

Segundo Ponchirolli (2006), folículos ovarianos têm sido reconhecidos como um sítio importante para a ação do IGF-I, por expressarem quantidades consideráveis de receptores para esse fator de crescimento.

A liberação do IGF-I pelo fígado, em resposta à terapia com rbST, tem desempenhado papel importante no reconhecimento materno da gestação. Isto ocorre devido à dependência parcial dos embriões ao IGF-I no sentido de secretar fatores essenciais ao processo de sinalização pelo embrião da sua presença no útero (LUCY et al., 1995).

A quantidade de células embrionárias e a taxa de ocorrência de morte celular são fortes indicativos da qualidade de embriões produzidos *in vitro*. O GH, IGF-I e a insulina, muitas vezes, estimulam a proliferação celular, aumentando a taxa de produção embrionária *in vitro* (MOREIRA et al., 2002).

Bastos (2008) relata que em embriões de 8 a 16 células até o estágio de blastocisto eclodido, o mRNA para IGF-I, IGF-II e IGF-IR tendem a aumentar, o que provavelmente indica que o sistema IGF também pode estar envolvido na proteção contra a morte dos embriões, pois o mesmo foi capaz de proteger embriões *in vitro* do efeito deletério do choque térmico, por aumentar o número total de células e reduzir o número de blastômeros que se tornariam apoptóticos, podendo ainda ter inibido a apoptose (JOURSA; HANSEN, 2004).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Estudar o efeito da somatotropina recombinante bovina sobre a quantidade e qualidade de oócitos aspirados *in vivo*, produção embrionária e expressão gênica de IGF-I e IGF-II em embriões produzidos *in vitro* de fêmeas bovinas da raça Nelore.

3.2. Específicos

3.2.1. Comparar a quantidade e qualidade de oócitos aspirados *in vivo*, quando das administrações prévias (nas fêmeas bovinas) de rbST e quando da ausência de tais administrações;

3.2.2. Comparar dados de produção embrionária *in vitro* (taxas de clivagem e produção de blastocistos), quando das administrações prévias (nas fêmeas bovinas) de rbST e quando da ausência de tais administrações;

3.2.3. Comparar as expressões gênicas de IGF-I e IGF-II em blastocistos produzidos *in vitro*, quando das administrações prévias (nas fêmeas bovinas) de rbST e quando da ausência de tais administrações.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, J. M. J.; LEROY, J. L. M. R.; BOLS, P. E. J. The use of an endovaginal ultrasound micro-convex array transducer adapted for transvaginal oocyte retrieval in the cow; In: Abstracts of 15th International Congress on Animal Reproduction, 2004, Porto Seguro – BA. **Abstracts...** Porto Seguro – BA, v. 2, p. 435, 2004.

ABCZ. Associação Brasileira dos Criadores de Zebu. Disponível em: <http://www.abcz.org.br/content/arquivos/AreaTecnica/Estatisticas/movimentacao_de_embrioes.pdf>. Acesso em: 12 de fev. de 2014.

BACELAR, D. S.; PADILHA, L. C.; BARUSELLI, P. S.; SENEDA, M. M. Incremento da obtenção de oócitos em vacas Nelore com utilização de um protocolo com progesterona injetável. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34 (supl. 1), p. 461, 2006.

BASTOS, M. R. **Influência da ingestão de matéria seca e da condição corporal na produção *in vivo* de embriões bovinos**. Botucatu, SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2008, 168p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, 2008.

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**, v. 45, n. 5, p. 1001-1014, 1996.

BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact *cumulus*-oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 47, n. 6, p. 1221-1236, 1997.

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

BORGES, A. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; ROCHA JÚNIOR, V. R.; CARVALHO, G. R. Resposta superovulatória de novilhas mestiças Holandês-Zebu tratadas com somatotropina bovina recombinante (rbST). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1439-1444, 2001.

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

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**, v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982.

BURATINI JR., J.; PRICE, C. A.; BÓ, G. A.; VISINTIN, J. A. Os efeitos do bST e da ablação do folículo dominante sobre o desenvolvimento folicular. **Arquivo da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS**, v. 27, n. 1, 1999.

BURATINI JR., J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BÓ, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, v. 54, n. 3, p. 421-431, 2000.

BURATINI JR., J. Foliculogênese em bovinos; In: 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina – PR. **Anais...** Londrina – PR, p. 55-62, 2006.

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

CHASE, J. J.; KIRBY, C. J.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; LUCY, M. C. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 212-219, 1998.

CURSIO, B. DA R. **Maturação e vitrificação de oócitos equinos incubados em meio contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina-1**. Pelotas,

RS: Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, 2005, 63p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Pelotas, 2005.

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

DE ROOVER, R.; FEUGANG, J. M. N.; BOLLS, P. E. J.; GENICOT, G.; HANZEN, C. Effects of ovum pick-up frequency and FSH stimulation: a retrospective study on seven years of beef cattle *in vitro* embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 239-245, 2008.

DÓRIA, R. G. S.; CANOLA, P. A.; CARDILLI, D. J.; TONIOLLO, G. H.; LEITE, F. G.; ESPER, C. R.; CANOLA, J. C. Complicações clínicas em vacas Nelore doadoras de oócitos decorrentes da aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 806-810, 2008.

FONSECA, J. F. **Corpo lúteo acessório, perfil plasmático de progesterona e taxa de gestação de receptoras de embriões bovinos tratadas com diferentes hormônios**. Belo Horizonte, MG: Escola da Universidade Federal de Minas Gerais, 1999, 83p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, 1999.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant *versus* subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p.648-654, 2001.

FRY, R. C.; NIALL, E. M.; SIMPSON, T. L.; SQUIRES, T. J.; REYNOLDS, J. The collection of oocytes from bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 48, n. 6, p. 977-987, 1999.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Produção *in vitro* de embriões. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, São Paulo: Varela, p. 195-196, 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, 2ª ed., São Paulo: Roca, p. 261-291, 2008.

GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; PETERS, A. R.; WEBB, R. Effects of chronic treatment with a potent gonadotrophin-releasing hormone agonist on peripheral concentrations of FSH and LH, and ovarian function in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 105, p. 263-270, 1995.

HAFEZ, D. & HAFEZ, E. S. E. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. **Reprodução animal**, 7ª ed., São Paulo: Manole, p. 69-82, 2004.

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**, v. 51, n. 4, p. 757-765, 1999.

HORNE, R.; BISHOP, C. J.; REEVES, G.; WOOD, C.; KOVACS, C. T. Aspiration of oocyte for *in vitro* fertilization. **Human Reproduction Update**, v. 2, n. 1, p. 77-85, 1996.

JOUSAN, F. D. & HANSEN, P. J. Insulin-like growth factor-I as a survival factor for the bovine preimplantation embryo exposed to heat shock. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 1665-1670, 2004.

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

KOZICKI, L. E.; SEGUI, M. S.; FANTINI FILHO, J. C.; PRADO, F. R. A.; MATTÉ, F.; GLASER JR. P.; WEISS, R. R. A somatotropina bovina (bST) e sua relação com o recrutamento folicular ovariano durante o ciclo estral de vacas. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 35-44, 2005.

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

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; MOREIRA, P. M.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1424-1431, 2003.

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**, v. 48, p. 1219-1227, 1993.

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

LUCY, M. C.; BOYD, C. K.; KOENIGSFELD, A. T.; OKAMURA, C. S. Expression of somatotropin receptor messenger ribonucleic acid in bovine tissues. **Journal Dairy Science**, v. 81, p. 1889-1895, 1998.

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

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal>>. Acesso em: 12 de fev. de 2014.

MARTINEZ, I. N. & SOUZA, L. C. **Transferência de embrião e fertilização “in vitro” (FIV) em bovinos**. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em produção e reprodução em bovinos) – Universidade Castelo Branco – Centro de Ciências Agrárias, Rio de Janeiro – RJ, 88p., 2007.

MENDES, J. O.; BURNS, P. D.; DE LA TORRE-SANCHEZ, J. F.; SEIDEL, G. E. Effect of heparin on cleavage rates and embryo production with four bovine sperm preparation protocols. **Theriogenology**, v. 60, p. 331-340, 2003.

MOREIRA, F.; BADINGAL, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W. W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v. 57, p. 1371-1387, 2002.

PALMA, G. Producción *in vitro* de embriones bovinos. **Biología de la reproducción**, Argentina: INTA, 2001.

PAVLOK, A.; KOUTECKÁ, L.; KREJČÍ, P.; SLAVÍK, T.; CERMAN, J.; SLABA, J.; DORN, D. Effect of recombinant bovine somatotropin on follicular growth and quality of oocytes in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 41, n. 3-4, p. 183-192, 1996.

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

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

PONCHIROLLI, C. B. **Desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro* na presença de IGF-1, GH e insulina nos meios de maturação de ovócitos e cultivo embrionário.** Botucatu, SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 2006, 79p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, 2006.

PRADO, I. N.; SOUZA, N. E.; LOBO JÚNIOR, A. R.; ALBUQUERQUE, K. P.; DUCATTI, T.; DUCA, A. C. Somatotropina bovina recombinante (rbST) nos aspectos hematológicos e metabólicos do sangue de novilhas (½ Nelore x ½ Red Angus) em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 2, p. 465-472, 2003.

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

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**, v. 67, p. 37-43, 2001.

SENEDA, M. M. & BLASCHI, W. Ovum pick up em bovinos: considerações técnicas; In: 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 1, 2004, Londrina – PR. **Anais...** Londrina – PR, p. 231-237, 2004.

SENEDA, M. M.; SANTOS, G. M. G.; SILVA, K. C. F.; SPEGIORIN, M. R.; BLASCHI, W.; PONTES, J. H. F. Situação atual da aspiração folicular e da fecundação *in vitro*; In: 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina – PR. **Anais...** Londrina – PR, p. 172-180, 2006.

SOUZA, A. L. B. **Transferência de embrião em bovino**. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em produção e reprodução em bovinos) – Universidade Castelo Branco, Curitiba – PR, 68p., 2007.

STRINGFELLOW, D. A. & SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, 3ª ed., Illinois: IETS, 1998.

THATCHER, W. W.; MOREIRA, F.; SANTOS, J. E. P.; MATTOS, R. C.; LOPES, F. L.; PANCARCI, S. M.; RISCO, C. A. Effects of hormonal treatments of reproductive performance and embryo production. **Theriogenology**, v. 55, p. 75-89, 2001.

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

VIANA, J. H. M. & BOLS, P. E. J. Variáveis biológicas associadas à recuperação de complexos *cumulus*-ócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (supl. 1), p. 1-4, 2005.

WATHES, D. C.; REYNOLDS, T. S.; ROBINSON, R. S.; STEVENSON, K. R. Role of insulin-like growth factor system in uterine function and placental development in ruminants. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1778-1789, 1998.

WEBB, R.; GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in follicle development in cattle. **Theriogenology**, v. 41, p. 25-30, 1994.

5. ARTIGO

O artigo, intitulado como segue na próxima página, foi submetido ao Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia e, quando da submissão, formatado conforme normas disponíveis em:

<http://cpro4576.publiccloud.com.br:8080/editora/downloads/normas_de_publicacao_da_revista_ABMVZ_pt.pdf>.

Produção *in vitro* e expressão gênica de IGF-I e IGF-II em embriões de fêmeas Nelore submetidas a administrações de somatotropina recombinante bovina

***In vitro* production and gene expression of IGF-I and IGF-II in embryos from Nelore females submitted to administrations of recombinant bovine somatotropin**

Rafael Soares dos Anjos^{I*}, Kaio César Simiano Tavares^{II}, Leonardo Tondello Martins^{II}, Luís Henrique de Aguiar^{II}, Marcelo Bertolini^{II}, Gustavo Ferrer Carneiro^I

^I Universidade Federal Rural de Pernambuco – Recife, PE.

^{II} Universidade de Fortaleza – Fortaleza, CE.

* Autor para correspondência. E-mail: rafa_dos_anjos@hotmail.com

RESUMO: com o presente estudo, objetivou-se estudar a influência da somatotropina recombinante bovina (rbST) sobre a quantidade e qualidade de oócitos aspirados *in vivo*, produção embrionária e expressão gênica dos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) tipos I e II em embriões produzidos *in vitro* de fêmeas bovinas da raça Nelore. Cinco vacas foram tratadas com duas administrações de 2mL de solução salina como placebo, com intervalo de catorze dias entre elas, sendo a primeira administração realizada dezanove e a segunda cinco dias antes das aspirações foliculares; decorridos trintas dias após estas aspirações, em sistema *crossover*, o mesmo protocolo foi utilizado nesses cinco animais sendo, neste caso, a solução salina substituída por 500mg de rbST, com o intuito de efetuar-se comparações entre os tratamentos. A partir dos oócitos recuperados, realizou-se a PIVE, sendo todas as etapas que envolvem este processo analisadas e com posterior realização de reações em cadeia da polimerase em tempo real (qPCRs) para expressões gênicas de IGF-I e IGF-II nos blastocistos produzidos. Observou-se que a rbST, ainda que numericamente tenha influenciado positivamente sobre os parâmetros estudados, não exerceu influência significativa sobre a quantidade e qualidade de oócitos aspirados *in vivo*, produção embrionária e expressão gênica de IGF-I e IGF-II em embriões produzidos *in vitro* de fêmeas bovinas da raça Nelore.

Palavras-chave: embriões, PIVE, rbST, IGF-I, IGF-II.

ABSTRACT: the present work aimed of studying the influence of recombinant bovine somatotropin (rbST) on quantity and quality of *in vivo* aspirated oocytes, embryo production and gene expression of insulin-like growth factors (IGFs) types I and II in *in vitro* produced embryos from bovine females of Nelore breed. Five cows were treated with two administrations of 2mL of saline solution as placebo, with an interval of 14 days between them, being the first administration held 19 and the second 5 days before follicular aspirations; within 30 days after these aspirations, in a crossover design, the same protocol was used in these five animals being, in this case, the saline solution replaced by 500mg of rbST in order to perform comparisons between treatments. From retrieved oocytes, IVP was performed, being all stages involving this process evaluated with subsequent achievement of polymerase chain reactions in real time (qPCRs) for gene expression of IGF-I and IGF-II in produced blastocysts. It was observed that the rbST, although having a numerical increase, did not show significant influence, on the parameters studied, on the quantity and quality of *in vivo* aspirated oocytes, embryo production and gene expression of IGF-I and IGF-II in *in vitro* produced embryos from bovine females of Nelore breed.

Keywords: embryos, IVP, rbST, IGF-I, IGF-II.

INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do Mundo, com aproximadamente 212 milhões de cabeças (IBGE, 2013). Cerca de 80% do rebanho nacional é composto por animais de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*), que são de comprovadas rusticidade e capacidade de adaptação às condições ambientais e climáticas adversas existentes em grande parte do território brasileiro – com destaque para a raça Nelore, por ocupar 90% do mencionado montante (ABIEC, 2013).

Segundo Kozicki et al. (2005), a otimização da eficiência reprodutiva é um dos principais fatores que contribuem para o incremento na eficiência produtiva e lucratividade dos rebanhos bovinos. Com o intuito de aumentar os índices reprodutivos na atividade pecuária, atualmente faz-se uso de biotécnicas como a aspiração folicular ou *ovum pick up* (OPU) seguida da produção *in vitro* de embriões, ou PIVE (Ravedutti e Vechiato, 2010).

Na busca de melhores resultados na reprodução animal, a utilização de fármacos exógenos vem aumentando consideravelmente na última década. Pesquisa-se atualmente a utilização da somatotropina recombinante bovina (rbST), tida como substância que acarreta no

aumento de receptores para os fatores de crescimento semelhantes à insulina, ou IGFs (Lucy, 2000). De acordo com Moreira et al. (2002), a rbST contribui de forma positiva nas taxas de fecundação *in vitro* e qualidade embrionária, além de acelerar a taxa de desenvolvimento embrionário, acarretando em maior quantidade de blastocistos (Ramos et al., 2007).

Em se tratando do sistema IGF e a produção de embriões, os IGFs são de grande importância para os estágios iniciais da foliculogênese, já que a desativação de genes do sistema em questão levou ao comprometimento severo do desenvolvimento folicular pré-antral a antral (Buratini, 2006) e, segundo Lonergan et al. (2003), tanto os IGFs tipos I e II como seus receptores (IGF-IR e IGF-IIR) são expressos em oócitos e embriões bovinos e ovinos produzidos *in vitro* – o que pode comprovar a relação do sistema IGF com a PIVE.

Tais citações despertaram o interesse em, no presente trabalho, estudar o efeito da rbST sobre a quantidade e qualidade de oócitos aspirados *in vivo*, produção embrionária e expressão gênica de IGF-I e IGF-II em embriões produzidos *in vitro* de fêmeas bovinas da raça Nelore.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado entre os meses de setembro de 2013 e janeiro de 2014, na Fazenda Santa Luzia, propriedade localizada no município de Vitória de Santo Antão, na Zona da Mata de Pernambuco (Latitude 08° 07' 05" S e Longitude 35° 17' 29" W) - no condizente às OPUs, rastreamento, seleção, classificação e envase de oócitos para transporte ao laboratório de PIVE; e na Universidade de Fortaleza, em Fortaleza/CE, no referente à PIVE e avaliação das expressões gênicas. Estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade Pio Décimo, sob o protocolo nº 33/2012.

Foram utilizadas cinco fêmeas bovinas da raça Nelore, puras de origem (PO), com idades entre seis e doze anos, multíparas, cíclicas, em período pós-puerperal, escore corporal variando de 3 a 3,5 (em escala de 1 a 5) e peso vivo médio de 504,5Kg, submetidas à exame ginecológico completo anteriormente às atividades experimentais. Os animais foram mantidos em sistema de criação extensivo, em pastagens compostas por *Brachiaria brizantha* e *Brachiaria decumbens*, com fornecimento de água e sal mineral *ad libitum*.

O delineamento experimental foi estabelecido em sistema *crossover*, inteiramente ao acaso, onde as cinco vacas, em um primeiro momento, compuseram o grupo controle e receberam duas administrações de 2mL de solução salina como placebo, via subcutânea, na fossa ísquio-retal, com intervalo de catorze dias entre elas, sendo a primeira administração dezois e

a segunda cinco dias antes da data das OPU; sendo que, após trinta dias destas OPU, tais animais foram invertidos em grupo tratamento e receberam duas administrações de 500mg de rbST (Boostin[®], Coopers Saúde Animal, Brasil), via subcutânea, na fossa ísquio-retal, com intervalo de catorze dias entre elas, sendo a primeira administração dezoito e a segunda cinco dias antes da data das OPU.

Para sincronizar a onda folicular das fêmeas, com o intuito de homogeneizar os grupos quanto ao momento do ciclo estral: cinco dias antes das OPU fez-se uso de 3mg de norgestomet (Crestar[®], Intervet, Brasil), em forma de implante auricular, inserido na face externa da orelha de cada animal e administração de 2mg de benzoato de estradiol (Gonadiol[®], Coopers Saúde Animal, Brasil) por vaca, via intramuscular. A fim de evitar a presença de corpo lúteo quando das aspirações, fez-se uso de duas administrações de 500µg de cloprostenol (Sincrocio[®], Ouro Fino, Brasil) por animal, via intramuscular, com intervalo de onze dias entre as administrações, sendo a primeira dezesseis e a segunda cinco dias antes das OPU. Os implantes auriculares foram removidos no dia das aspirações.

A PIVE e acondicionamento dos blastocistos produzidos, para posterior realização das expressões gênicas, foram realizados conforme Bertolini et al. (2002).

No condizente às expressões gênicas: a extração de ácido ribonucleico (RNA) e síntese de ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA), a partir dos blastocistos, foram realizadas seguindo o protocolo recomendado pelo fabricante do kit SuperScript[®] III Platinum[®] CellsDirect Two-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen, EUA). A realização das expressões gênicas per si foi mediante uso da reação em cadeia de polimerase em tempo real (qPCR).

Para as qPCRs dos genes IGF-I e IGF-II, utilizou-se o controle endógeno RPS9, com os seguintes iniciadores, de acordo com a Tab. 1 abaixo:

Tabela 1. Detalhes dos iniciadores utilizados para as qPCRs dos genes IGF-I, IGF-II e controle endógeno RPS9.

Gene	Sequência dos iniciadores
IGF-I	5' CATTTCATTCAGCAGGCTTGTCTAA
	3' TGATGGAGAAGGGAGTGGGATA
IGF-II	5' TCTACTTCAGCCGACCATCCA
	3' TTCGGAAGCAAACTCTTCCA
RPS9	5' GAGCTGGGTTTGTGCGAAAA
	3' GGTCGAGGCGGGACTTCT

Todas as reações foram processadas utilizando-se o Power SYBR[®] Green Mastermix (Applied Biosystems, EUA) e o termociclador StepOne[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems, EUA) em duplicatas. Para IGF-I foram utilizados 400 nM de cada iniciador, 1 µl de cDNA e o seguinte programa de ciclos e temperaturas: 95°C por 20 segundos, seguido por 55 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Para o gene IGF-II, foram utilizados 400 nM de cada iniciador, 1 µl de cDNA e o seguinte programa de ciclos: 95°C por 2 minutos, seguido por 50 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Posteriormente a todas as amplificações foi realizada uma curva de Melting[®] com a temperatura de 60°C a 95°C com um incremento de 0.3°C/segundo, para verificar a identidade de cada amplicom. Os dados foram normalizados segundo Livak e Schmittgen (2001).

Para obtenção de médias relativas e erros padrão dos parâmetros analisados neste estudo, os dados foram processados no programa GraphPad InStat 3.10[®] (GraphPad Software, Inc., 2009), utilizando-se o teste paramétrico t, com 95% de nível de confiança.

No condizente à análise de associação, quanto à avaliação da qualidade dos oócitos em seus diferentes graus de viabilidade, utilizou-se o teste de qui-quadrado. O nível de significância adotado foi de 5%. O programa Epi Info 3.5.1[™] (Centers for Disease Control and Prevention, 2008) foi utilizado para a execução destes cálculos estatísticos.

Em relação às avaliações das taxas de clivagem e produção de blastocistos, foram descartados os oócitos de uma das vacas envolvidas no experimento (enquanto componente do grupo controle, bem como quando componente do grupo tratamento), por ter-se identificado contaminação fúngica destes entre as etapas de fecundação e cultivo *in vitro*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que, no presente estudo, o uso da rbST não influenciou estatisticamente ($p>0,05$) na quantidade de oócitos totais em vacas Nelore PO. Ramos et al. (2007) também não encontraram diferença significativa entre os grupos tratamento (rbST) e controle (solução salina) no referente à quantidade de oócitos aspirados. Em contrapartida, Kozicky et al. (2005) afirmaram que a rbST age favorecendo o recrutamento folicular ovariano, o que sugere um aumento na quantidade de oócitos recuperados *in vivo* a partir de vacas submetidas a tratamento com a rbST.

Com relação à qualidade, estudos anteriores demonstraram que houve efeito significativo em oócitos sob ação da rbST (Tripp et al., 2000). Na presente pesquisa foram observados o

aumento numérico de oócitos graus I, II e III, bem como a diminuição da quantidade de oócitos degenerados no grupo tratamento em relação ao grupo controle (Tab. 2); além disso observou-se que 97,0% dos oócitos recuperados no grupo rbST eram viáveis, que comparados ao grupo controle de solução salina este percentual atingiu o valor de 64,5%. Resultados semelhantes foram observados por Roth et al. (2002).

Tabela 2. Dados inerentes aos diferentes graus de viabilidade dos oócitos recuperados, a partir de fêmeas Nelore, nos grupos controle (solução salina) e tratamento (rbST).

Viabilidade oocitária	Grupo controle (solução salina)		Grupo tratamento (rbST)	
	F.A.	F.R. (%)	F.A.	F.R. (%)
Oócitos grau I	2	33,3	4	66,7
Oócitos grau II	10	38,5	16	61,5
Oócitos grau III	8	42,1	11	57,9
Oócitos grau IV	0	0,0	1	100,0
Oócitos degenerados	11	91,7	1	8,3

F.A. – frequência absoluta; F.R. – frequência relativa.

Quanto às taxas de clivagem obtidas a partir deste experimento, não houve diferença significativa entre as unidades experimentais. Resultado que difere do encontrado por Ramos et al. (2007) que, ao trabalharem com vacas Gir, relataram que a administração de 160mg de rbST, quatro dias antes das OPUs, aumentou a taxa de clivagem na PIVE. É válido ressaltar que, numericamente, a taxa de clivagem neste estudo foi superior no grupo controle (50,0%) quando comparado ao grupo tratamento (45,4%).

Embora a taxa de clivagem no grupo controle de solução salina tenha sido superior a do grupo rbST, a taxa de produção de blastocistos foi maior neste grupo (31,8%) que comparado àquele (12,5%). Outros autores, como Moreira et al. (2002), sugerem que a rbST influencie positivamente na quantidade de embriões viáveis produzidos. Já Neves et al. (2005) afirmaram que a média de embriões viáveis não aumentou nos grupos tratados com rbST em comparação aos grupos não tratados.

Dados obtidos em torno da PIVE, nesta pesquisa, estão expostos na Tab. 3 a seguir:

Tabela 3. Resultados da PIVE, a partir de fêmeas Nelore, nos grupos controle (solução salina) e tratamento (rbST). Valores de oócitos totais e viáveis estão expressos em médias \pm E.P.M.

Parâmetros	Grupos	
	Controle (solução salina)	Tratamento (rbST)
Oócitos totais	6,2 \pm 1,2	6,6 \pm 2,0
Oócitos viáveis	4,0 \pm 0,8	6,4 \pm 2,0
Clivagem (%)	50,0	45,4
Produção de blastocistos (%)	12,5	31,8

Quanto às expressões gênicas: não houve expressão do gene IGF-I em quaisquer dos blastocistos dos grupos em estudo. O que pode ser explicado pela redução na quantidade de transcritos do sistema IGF, à medida que o embrião se desenvolve, como sendo uma característica normal em embriões bovinos (McHughes et al., 2009). A respeito das expressões do IGF-II: não houve diferença significativa em ambos os grupos (Fig. 1), ainda que o gene tenha expressado bem nos embriões em questão. Salientando que a expressão de IGF-II está diretamente relacionada com a regulação do crescimento e diferenciação celular, apresentando ainda, um papel mitogênico e antiapoptótico nos embriões em estádios iniciais de desenvolvimento (Riley e Moley, 2006).

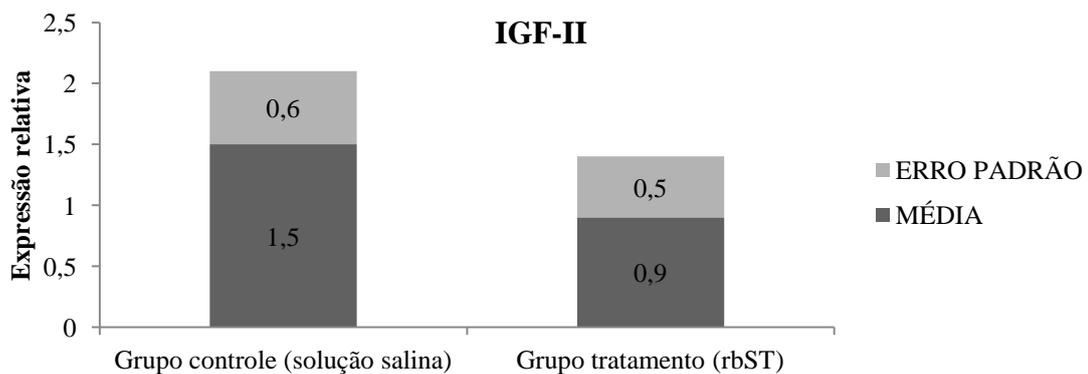


Figura 1. Níveis de expressão do gene IGF-II, em blastocistos de fêmeas Nelore, nos grupos controle (solução salina) e tratamento (rbST). Valores expressos em médias \pm E.P.M.

CONCLUSÕES

O tratamento com duas administrações de 500mg de rbST, com intervalo de catorze dias entre elas, sendo a primeira administração realizada dezanove e a segunda cinco dias antes das

OPUs, não exerceu influência significativa sobre a quantidade e qualidade de oócitos aspirados *in vivo*, produção embrionária e expressão gênica de IGF-I e IGF-II em embriões produzidos *in vitro* de fêmeas bovinas da raça Nelore. Todavia, numericamente, foi observado efeito positivo da rbST na quantidade e qualidade de oócitos aspirados *in vivo*, bem como sobre a produção *in vitro* de blastocistos.

REFERÊNCIAS

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Rebanho Bovino Brasileiro**. 2013. Disponível em: <http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp>. Acesso em: 13 de fev. de 2014.

BERTOLINI, M.; BEAM, S. W.; SHIM, H. et al. Growth, development, and gene expression by *in vivo* - and *in vitro* - produced day 7 and 16 bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, n. 3, p. 318-328, 2002.

BURATINI JR., J. Foliculogênese em bovinos; In: 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada, 2, 2006, Londrina – PR. **Anais...** Londrina – PR, p. 55-62, 2006.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Banco de Dados**. 2013. Disponível em: <<http://ibge.gov.br/>>. Acesso em: 13 de fev. de 2014.

KOZICKI, L. E.; SEGUI, M. S.; FANTINI FILHO, J. C. et al. A somatotropina bovina (bST) e sua relação com o recrutamento folicular ovariano durante o ciclo estral de vacas. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 35-44, 2005.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A. et al. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in vitro* or *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1424-1431, 2003.

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

McHUGHES, C. E.; SPRINGER, G. K.; SPATE, L. D. et al. Identification and quantification of differently represented transcripts in *in vitro* and *in vivo* derived preimplantation bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 48-60, 2009.

MOREIRA, F.; BADINGAL, L.; BURNLEY, C.; THATCHER, W. W. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactating recipient cows. **Theriogenology**, v. 57, p. 1371-1387, 2002.

NEVES, E. F.; RAMOS, A. F.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Pré-tratamento com somatotropina bovina (rbST) na superovulação de doadoras da raça Holandesa. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 57, p. 205-209, 2005.

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

RAVEDUTTI, G. C.; VECHIATO, T. A. F. Transferência de embriões: aspectos econômicos. **Revista Ruminantes**, Lisboa: Nugon, ano 2, n. 13, 2010.

RILEY, J. K.; MOLEY, K.H. Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 131, p. 823-835, 2006.

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 form previously heat-stressed cows. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1398-1405, 2002.

STRINGFELLOW, D. A. & SEIDEL, S. M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**, 3ª ed., Illinois: IETS, 1998.

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, n. 8, p. 1581-1590, 2000.

6. CONCLUSÃO

Mediante a realização deste experimento verificou-se que o tratamento com duas administrações de 500mg de rbST, com intervalo de catorze dias entre elas, sendo a primeira administração realizada dezoito e a segunda cinco dias antes das OPUs, não exerceu influência significativa sobre a quantidade e qualidade de oócitos aspirados *in vivo*, produção embrionária e expressão gênica de IGF-I e IGF-II em embriões produzidos *in vitro* de fêmeas bovinas da raça Nelore.

No entanto os resultados numéricos em torno de OPU e PIVE, encontrados nesta pesquisa, sugerem influência positiva da rbST sobre as variáveis estudadas e portanto faz-se necessário outros estudos para uma melhor compreensão da influência desta substância sobre esses parâmetros.

7. ANEXOS

**ASSOCIAÇÃO DE ENSINO E CULTURA PIO DÉCIMO
FACULDADE PIO DÉCIMO**



**FACULDADE
PIO DÉCIMO**

Comissão de Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E GENÉTICA DE OÓCITOS BOVINOS SOBRE INFLUÊNCIA DA SOMATOTROFINA RECOMBINANTE BOVINA", protocolo nº 33/2012, utilizando 20 (vinte) bovinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade Pio Décimo e foi aprovado em reunião do dia 20/12/2012.

(We certify that the Research "MORPHOLOGICAL AND GENETIC EVALUATION OF CATTLE ON INFLUENCE OF OOCYTES SOMATOTROPIN RECOMBINANT BOVINE", protocol number 33/2012, utilizing 4 (four) cattle, under the responsibility of Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro, conforms to the ethical principles of animal experimentation of the Committee on Bioethics of Faculty Pio Tenth and was approved in a meeting held on 20.12.2012).

Aracaju, 21 de dezembro de 2012.

Prof. Dr. Emerson Israel Mendes
Presidente da Comissão de Bioética
Faculdade Pio Décimo

